

通気蒸留法/イオンクロマトグラフィーによる 食品中の亜硫酸塩の定量

永瀬 誠*

(1987年8月24日受理)

通気蒸留法とイオンクロマトグラフィーにより食品中に残存する亜硫酸塩を簡便に定量する方法を開発した。食品中の亜硫酸塩をリン酸溶液と加熱することにより二酸化硫黄を生成させた。生成した二酸化硫黄は、流量 500 ml/min で窒素を 10 分間通気し、氷水で冷却した 10 ml の 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液に捕集した。この溶液を蒸留水で 25 ml とした後、イオンクロマトグラフィーにより亜硫酸イオンを定量した。この定量法によれば亜硫酸イオン量 3~90 µg (二酸化硫黄として) の範囲において直線性のある検量線が得られた。又、定量下限は試料量を 1 g とするとき 3 µg/g であった。なお、9 種類の食品についての回収率は 72.7~103% であった。

1 緒 言

亜硫酸及びその塩類（亜硫酸）は漂白作用をはじめ、酸化防止効果、保存効果を有することから各種食品の加工処理に広く使用されており、わが国においても食品ごとに使用基準が定められている。亜硫酸は、食品に添加された場合、一部は遊離形亜硫酸として存在するが、食品成分中のアルデヒド、ケトン及び糖と結合して結合形亜硫酸として存在することが多い。

亜硫酸の定量法としては、改良 Rankine 法^{1,2)}、改良 Rankine 装置を用いた比色法³⁾ 及びその改良法⁴⁾、GC 法^{5,6)}、改良 Monier-Williams 法⁷⁾、改良 Monier-Williams 装置を用いたイオンクロマトグラフィー (IC)^{8,9)}、抽出法を用いた IC^{10,11)}、FIA¹²⁾、ポーラログラフィー¹³⁾などが報告されている。通常わが国では、食品中亜硫酸の定量には、高濃度の場合には改良 Rankine 法、低濃度の場合には改良 Rankine 装置を用いた比色法が用いられており、共に遊離形亜硫酸と結合形亜硫酸との総量が測定されている。これらの方法はいずれも定量に先立ち試料から二酸化硫黄を発生させ、この二酸化硫黄を通気蒸留後、捕集液に捕集しているが、低濃度亜硫酸の定量に用いられる比色法はアルデヒド類、亜硝酸の影響を除去する必要があり、更に、二重冷却管を用いて試料の膨潤防止のため加えられたエタノールの捕集液への留出を防ぐ必要がある。

そこで、今回著者は、二重冷却管を除くことにより改良 Rankine 法を簡略化し、更に IC を用い、食品中の低濃度亜硫酸を簡便に定量できる方法を開発したので報告する。

2 実 験

2.1 試薬及び試料

蒸留水：再蒸留水を孔径 0.22 µm のメンブランフィルターで沪過後、三角フラスコに採り、超音波洗浄機を用いて振動させながら、減圧アスピレーターで減圧、脱気したものを使用した。

亜硫酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、エチルアルコール、リン酸は特級品を用いた。

亜硫酸イオン標準溶液：亜硫酸水素ナトリウム 0.5 g を採り、蒸留水を加えて溶かし 100 ml とし、標準原液とした。この標準原液を 10 ml 採り、ヨウ素滴定法で亜硫酸イオン濃度を求めた。標準原液を蒸留水で希釈し、亜硫酸イオンが二酸化硫黄として 100, 30 µg/ml の標準溶液を調製した。

窒素：博多共同酸素製高純度窒素

試料は、市販されている白ぶどう酒、かんぴょう、みそなどの亜硫酸使用対象食品を使用した。

2.2 装 置

イオンクロマトグラフ：Dionex 製 System 10 IC (電気伝導度検出器内蔵)

記録計：日立製レコーダー 056 型

二酸化硫黄通気蒸留装置：Fig. 1 に示すとおりであり、(a) の窒素ボンベ、(b) の二酸化硫黄発生瓶、(c) のガラス管、(g) のガラスフィルター付き二酸化硫黄捕集

* 福岡県衛生公害センター：818-01 福岡県太宰府市向佐野字迎田 39

瓶、(i) のトラップ及び(j) の流量計を直列に接続し、使用した。二酸化硫黄発生瓶は 200 ml のナス形プラスコと連結管から成り、(d) のテフロン製熱収縮管で(e) のガラス管 (150 mm × 7 mm i. d.) と接続した。又、ガラス管の他端は(f) のテフロン管 (80 mm × 8 mm i. d.) で二酸化硫黄捕集瓶と接続した。なお、ガラス管は二酸化硫黄捕集瓶側を少し上方に傾け、ガラス管内部に凝縮した水が二酸化硫黄捕集瓶に大量に入らないようにした。又、二酸化硫黄捕集瓶は氷水を十分に加えた氷水で冷却し、(c) のバーナーはガスバーナーの筒先部を外してフレームを絞り使用した。

2.3 操作

2.3.1 前処理操作 Fig. 1 に示す二酸化硫黄捕集瓶 (g) に 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液 10 ml を加え、二酸化硫黄通気蒸留装置に接続後、氷水で冷却しながら窒素を流量 500 ml/min で 5 分間通気し、装置の中の空気を追い出した。その後、ナス形プラスコ (b) を取り外し、液体、粉末試料はそのまま、固体試料は細切りしたものをおおむね 0.2~1.0 g ひょう量し、蒸留水 20 ml を用いてナス形プラスコに移した。試料の膨潤防止及び消泡用エタノール 2 ml、25% リン酸溶液 10 ml を加えた後、直ちに通気蒸留装置に取り付け、ナス形プラスコをバーナーで加熱しながら窒素を流量 500 ml/min で 10 分間通気した。なお、このときバーナーのフレームの高さは 4~5 cm とし、外炎の先端がナス形プラスコの底部に触れるようにした。捕集後、捕集液を蒸留水で 25 ml とし、IC 用試験溶液とした。

2.3.2 IC 条件 IC 条件は以下のとおりであった。カラム：Dionex 製 HPIC-AG3 (50 mm × 4 mm i. d.) + HPIC-AS3 (250 mm × 4 mm i. d.)；サプレッサー：陰イ

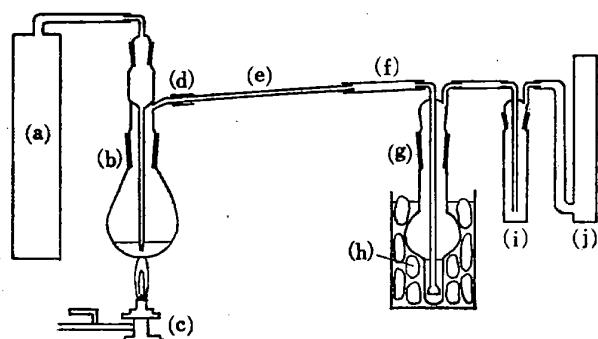


Fig. 1 Schematic diagram of SO_2 purge-and-trap system

(a) nitrogen, (b) SO_2 generator (joint and 200 ml flask), (c) gas burner, (d) thermal shrink tube, (e) glass tube, (f) teflon tube, (g) bubbler (0.1 M NaOH 10 ml), (h) ice and water, (i) trap for water, (j) flow meter

オンファイバーサプレッサー；溶離液：6 mM 炭酸水素ナトリウム溶液-4.8 mM 炭酸ナトリウム溶液 (1:1)；流量：1.1 ml/min；カラム温度：室温；電気伝導度検出器：フルスケール $3 \mu\text{S}/\text{cm}$ ；試料注入量：100 μl

3 結果及び考察

3.1 亜硫酸イオン標準溶液の安定性

亜硫酸水素ナトリウム標準原液を蒸留水で希釈して調製した 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (二酸化硫黄として) の標準溶液の室温における安定性を調べた。その結果、1 時間に約 0.35~1% 濃度が減少した。そのため、実験に使用した標準溶液は、IC を用いて濃度の経時変化を調べ、その結果から使用時における濃度を求めた。なお、亜硫酸イオンの減少に伴い硫酸イオンが増加したが、これは、減少した亜硫酸イオンが硫酸イオンに酸化されたためと考えられる。

3.2 IC 条件の検討

3.2.1 他物質との分離 亜硫酸イオンのクロマトグラムは Fig. 2 に示すとおりであり、フッ化物イオン、塩化物イオン、亜硝酸イオン、リン酸イオン、臭化物イオン、硫酸イオンとの分離は良好であった。しかし、硝酸イオンとの分離は悪く、試料中に硝酸イオンが存在すると定量を妨害するおそれがあった。そこで、試料中の硝酸イオンが亜硫酸イオンの定量に及ぼす影響を調べ

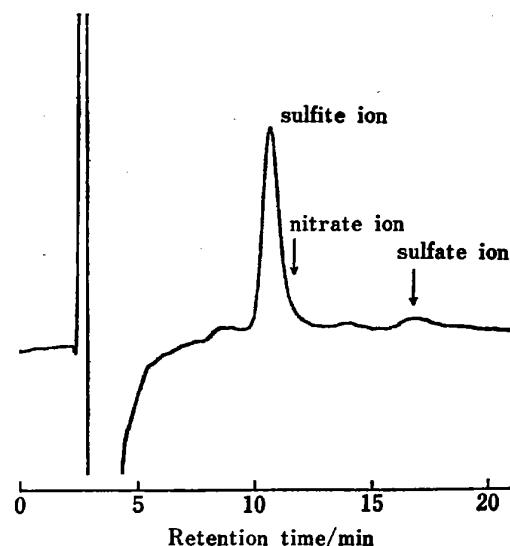


Fig. 2 Ion chromatogram of sulfite ion

Conditions—Column : HPLC-AG3 (50 mm × 4 mm i. d.) + HPIC-AS3 (250 mm × 4 mm i. d.)； Eluent : 6 mM NaHCO_3 -4.8 mM Na_2CO_3 (1:1)； Flow rate : 1.1 ml/min； Column temp. : room temp.； Detection : conductivity, $3 \mu\text{S}/\text{cm}$ ； Sample injection volume : 100 μl

た。すなわち、蒸留水 20 ml に硝酸カリウムを硝酸イオンとして 10, 100, 1000 μg 添加し、2・3・1 に従って操作し、IC により分析したところ、いずれの場合も硝酸イオンのピークは出現せず、定量への妨害はなかった。これは、リン酸水溶液中では硝酸塩から硝酸が生成しないためと考えられる。

3・2・2 水酸化ナトリウム溶液濃度の影響 IC 用試験溶液中の水酸化ナトリウム濃度がクロマトグラムに及ぼす影響を調べた。すなわち、蒸留水 20 ml に亜硫酸水素ナトリウムを二酸化硫黄として 90 μg 添加した試料を用い、2・3・1 に従って操作し、二酸化硫黄として 3.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の亜硫酸イオン溶液を調製した。この溶液、蒸留水及び 0.5 M 水酸化ナトリウム溶液を用い、亜硫酸イオン濃度 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (二酸化硫黄として)、水酸化ナトリウム濃度 0.014~0.15 M となる各溶液を調製し、水酸化ナトリウム濃度がクロマトグラムに及ぼす影響を調べた。その結果は Fig. 3 に示すとおりであり、水酸化ナトリウム濃度が大きくなるに従ってピーク高さは低くなり、0.014 M の場合のピーク高さを 1 とすると 0.15 M の場合は 0.890 であった。又、水酸化ナトリウム濃度が大きくなるに従って、試験溶液注入から約 3 分後のベースラインの落ち込みが大きくなり、良好なクロマトグラムが得られなくなった。しかし、水酸化ナトリウム濃度が 0.014~0.1 M の範囲においては、定量を行うのに十分良好なクロマトグラムが得られた。

3・3 前処理法の検討

3・3・1 流量の影響 試料から発生する二酸化硫黄の追い出しに使用する窒素の流量が二酸化硫黄の回収に及ぼす影響を調べた。

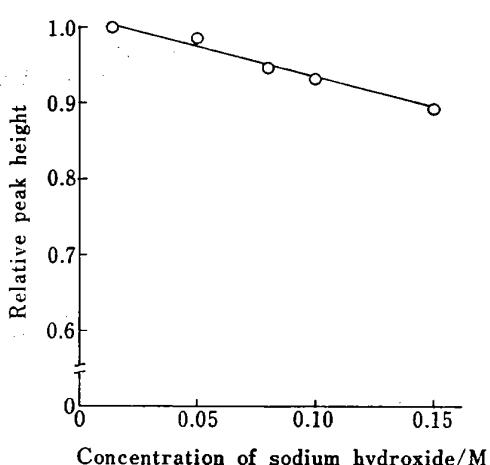


Fig. 3 Effect of concentration of sodium hydroxide on peak height

Concentration of sulfite ion : 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (as sulfur dioxide)

ぼす影響を調べた。すなわち、蒸留水 20 ml に亜硫酸水素ナトリウムを二酸化硫黄として 30 μg 添加した試料を用い、2・3・1 に従って操作し、回収条件を検討した。なお、窒素の通気量は 5.0 l とした。その結果、各流量において得られた亜硫酸イオンのピーク高さは、流量 500 ml/min の場合を 1 とすると流量が 200~500 ml/min の範囲で 0.957~1.00 であり、ほぼ一定の値を示した。従って、流量は操作時間が短くなるように 500 ml/min とした。

3・3・2 通気量の影響 3・3・1 と同様の方法で、窒素の通気量が二酸化硫黄の回収に及ぼす影響を調べた。なお、流量は 500 ml/min とした。その結果は Fig. 4 に示すとおりであり、各通気量において得られた亜硫酸イオンのピーク高さは、通気量 6.0 l の場合を 1 とすると通気量が 3.5~6.0 l の範囲で 1.00~1.01 であり、ほぼ一定の値を示した。そこで窒素の通気量を 5.0 l とした。

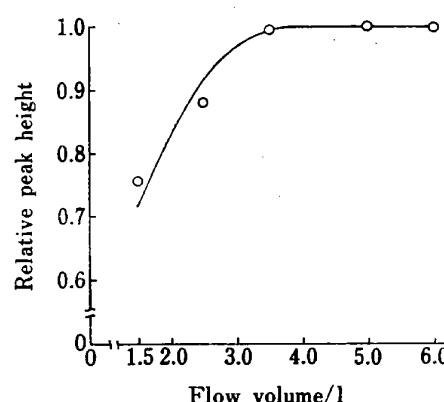


Fig. 4 Effect of flow volume of nitrogen on recovery

Flow rate : 500 ml/min ; Amount of sulfite : 30 μg (as sulfur dioxide)

3・3・3 エタノール量の影響 試料の膨潤防止及び消泡に用いるエタノールの添加量が二酸化硫黄の回収に及ぼす影響を調べた。すなわち、蒸留水 20 ml に亜硫酸水素ナトリウムを二酸化硫黄として 30 μg 添加した試料を用い、エタノールの添加量を変化させ、2・3・1 に従って操作し、回収条件を検討した。その結果、各添加量において得られた亜硫酸イオンのピーク高さは、添加量が増加するに従って減少し、添加しない場合を 1 とすると添加量が 2 ml の場合は 0.964、添加量が 4 ml の場合は 0.925 であった。

3・4 検量線

蒸留水 20 ml に亜硫酸水素ナトリウムを二酸化硫黄

Table 1 Recoveries of sulfite ion added to food samples

Sample	Taken/ g	Sulfite ion (as SO ₃) / μg			Recovery, %
		Added	Found	In sample	
Dried gourd shavings	0.20	200	534	328 (1640)†	103
Dried plum	1.00	30.0	25.7	0	85.7
Gelatine	1.00	30.0	24.5	0	81.7
White wine	1.00	100	258	159 (159)†	99.0
Orange juice	1.00	30.0	26.6	0	88.7
Boiled beans	1.00	30.0	27.3	0	91.0
Frozen peeled shrimp	1.00	30.0	21.8	0	72.7
Bean paste	1.00	30.0	26.5	4 (4)†	75.0
Soy	1.00	30.0	27.9	3 (3)†	83.0

† μg/g

として 3~90 μg の範囲で添加し、2・3・1 に従って操作し、分析を行った。得られたクロマトグラムのピーク高さを測定し、絶対検量線法により検量線を作成した。その結果、上記範囲において直線性が成立した。なお、添加量が 30 μg の場合の繰り返し再現性を求めたところ、繰り返し回数が 6 のとき、ピーク高さの平均値は 44.7 cm、相対標準偏差は 5.0% であった。

3・5 放置時間と試験溶液の安定性

IC 用試験溶液を室温で放置し、亜硫酸イオン濃度の変化を調べた。すなわち、蒸留水 20 ml に亜硫酸水素ナトリウムを二酸化硫黄として 30 μg 添加した試料を用い、2・3・1 に従って操作し、亜硫酸イオン溶液を調製した。この溶液を室温で放置し、放置時間 0, 1, 3, 6, 9 時間ににおける回収率を調べた。その結果、放置時間 0 時間ににおける回収率を 1 とすると、放置時間 1, 3, 6, 9 時間ににおける回収率は、それぞれ 0.978, 0.959, 0.902, 0.884 であった。

3・6 種々の食品における添加回収実験

市販の亜硫酸使用対象食品のうち、Table 1 に示した食品に関して添加回収実験を行った。亜硫酸水素ナトリウム添加量は二酸化硫黄として 30 μg であった。なお、かんぴょう及び白ぶどう酒は亜硫酸イオンの含有量が大きかったため、添加量をそれぞれ 200, 100 μg とした。その結果は Table 1 に示すとおりであり回収率は 72.7~103% であった。

3・7 実試料への適用

Table 1 に示した亜硫酸使用対象食品について分析を行ったところ、かんぴょう、白ぶどう酒、みそ、しょうゆなどから亜硫酸イオンが検出され、その含有量は二酸

化硫黄としてそれぞれ 1640, 159, 4, 3 μg/g であった。なお、クロマトグラムは Fig. 2 と同様のものが得られた。又、本法における定量下限は、試料量を 1 g とするとき 3 μg/g であった。

終わりに、本研究に際し御支援をいただいた高橋克己福岡県衛生公害センター所長に深謝致します。

文 献

- 1) 日本薬学会編：“衛生試験法・注解”，p. 313 (1980)，(金原出版)。
- 2) K. Fujita, M. Ikuzawa, T. Izumi, T. Hamano, Y. Mitsuhashi, Y. Matsuki, T. Adachi, H. Nonogi, T. Fuke, H. Suzuki, M. Toyoda, Y. Ito, M. Iwaida : *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **168**, 206 (1979).
- 3) S. Ogawa, H. Suzuki, M. Toyoda, Y. Ito, M. Iwaida, H. Nonogi, T. Fuke, K. Obara, T. Adachi, K. Fujita, M. Ikuzawa, T. Izumi, T. Hamano, Y. Mitsuhashi, Y. Matsuki : *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **168**, 293 (1979).
- 4) 宮本文夫, 佐伯政信 : 日本食品工業学会誌, **31**, 739 (1984).
- 5) 浜野 孝, 三ツ橋幸正, 長谷川明彦, 田中喜作, 松木幸夫 : 農化, **53**, 299 (1979).
- 6) 宮本文夫, 佐伯政信 : 日本食品工業学会誌, **31**, 685 (1984).
- 7) Association of Official Analytical Chemists : "Official Methods of Analysis", 14th Ed, p. 391 (1984).
- 8) D. M. Sullivan, R. L. Smith : *Food Technology*, **39**, 45 (1985).
- 9) C. Anderson, C. R. Warner, D. H. Daniels, K. L. Padgett : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 14 (1986).
- 10) P. L. Cooper, M. R. Marshall, J. F. Gregory III, W. S. Otwell : *J. Food Sci.*, **51**, 924 (1986).
- 11) H.-J. Kim, Y.-K. Kim : *J. Food Sci.*, **51**, 1360 (1986).
- 12) J. J. Sullivan, T. A. Hollingworth, M. M. Wekell, R. T. Newton, J. E. Larose : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 542 (1986).
- 13) D. B. Stonys : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**,

114 (1987).



Determination of sulfite in foods by ion chromatography after purge-and-trap. Makoto NAGASE (Fukuoka Environmental Research Center, 39, Mukaeda, Mukaezano, Dazaifu-shi, Fukuoka 818-01)

A simple method for the determination of sulfite in foods has been developed by ion chromatography after purge-and-trap. After 0.2~1.0 g of sample was placed in a SO₂ generator with 20 ml of distilled water, 2 ml of ethanol and 10 ml of 25% H₃PO₄ were added. SO₂ produced from sulfite by heating was purged with nitrogen at 500 ml/min for 10 min and absorbed into 10 ml of 0.1 M NaOH cooled with ice and water. After this solution was made up to 25 ml with distilled water, sulfite ion was determined by ion chromatography. The condition was as follows : Column, HPIC-AG3 (50

mm × 4 mm i.d.) + HPIC-AS3 (250 mm × 4 mm i.d.) (Dionex); suppressor, anion fiber suppressor; eluent, 6 mM NaHCO₃-4.8 mM NaCO₃ (1 : 1); flow rate, 1.1 ml/min; column temp., room temp.; detection, conductivity 3 µS/cm full scale; sample injection volume, 100 µl. The calibration curve was made by adding standard sulfite solution (NaHSO₃ aqueous solution) to 20 ml of distilled water. The calibration curve was linear for 3~90 µg SO₂ added. Recoveries of SO₂ added to 9 kinds of foods at the level of 30~1000 µg/g were 72.7~103%. The limit of detection was 3 µg/g for 1 g of sample.

(Received August 24, 1987)

Keyword phrases

determination of sulfite in foods; purge-and-trap method; ion chromatography; food additive.