通気分離後にガスクロマトグラフィーを用いる 食品中の微量亜硫酸の定量

宮本文夫*・佐伯政信*

Microdetermination of Sulfur Dioxide in Foods by Gas Chromatography after Separation with Bubbling

Fumio MIYAMOTO* and Masanobu SAEKI*

* Public Health Laboratory of Chiba Prefecture, 666-2,
Nitona-cho, Chiba 280

A method using gas chromatography (GC) after separation with bubbling was proposed for the microdetermination of sulfur dioxide in foods on the basis of GC method. Because the values of sulfur dioxide contents of foods were different depending upon the method using colorimetry after separation with bubbling (bubbling-colorimetric method) or GC method, this distinction was caused by difference of pretreatment of tested sample. On the proposed method, volatile aldehydes and other sulfur compounds interfered less intense than the original method. Good agreement was obtained between the values of sulfur dioxide contents by the proposed method and the bubbling-colorimetric method in various foods except for "wasabi" powder. The sulfur dioxide was detected in foods which was not added sulfur dioxide (containing other volatile sulfur compounds) by the proposed method and the GC method, and identified by GC-MS. By the proposed method, blank values from the foods which was not added sulfur dioxide were confirmed to be actually due to sulfur dioxide by bubbling-colorimetric method and modified RANKINE's colorimetric method. The recoveries of sulfur dioxide from foods were 82.5%~101% at the level of 10 ppm and the detection limit was 0.2 ppm in the case of 5 g of sample size.

(Received Feb. 9, 1984)

食品中の亜硫酸の定量法はこれまでに多くの方法が報告されている^{1)~7)}が、微量まで分析可能で、かつ正確な方法は少ない。

著者らは先に改良ランキン比色法²⁾を基に吸収液、通気条件等を改良した方法(以後、通気-比色法と呼ぶ)を報告した。比色法は簡便ではあるが、多量のアルコール類や一部のイオウ化合物の影響を受けやすいなどの欠点もあり、食品への適用性を確認する必要がある。そこで、今回食品中の亜硫酸分析法として精度が高いと考えられる浜野らのガスクロマトグラフ法と比較検討を行ったところ、食品によって測定値に大きな違いが観察され、その相違は両方法の前処理の違いが原因と考えられた。そこで、通気-比色法と同一の前処理を行い、吸収液をガスクロマトグラフィーで定量する方法について検

討したところ、測定値は通気-比色法と良く一致し、また浜野らの方法よりイオウ化合物等の影響も小さく、より精度よく定量できたので、それらの結果について報告する。

実験方法

1. 試料

赤ワイン、濃縮果汁等市販食品22種を用いた。残存亜硫酸が不検出の食品については前報³⁾と同様に必要に応じて亜硫酸溶液を添加し、亜硫酸が検出されたものを試料とした。

2. 試薬及び試液

(1) 吸収液

前報³⁾と同様。

* 千葉県衛生研究所 (〒280 千葉県千葉市仁戸名町 666-2)

(2) 遊離型亜硫酸標準溶液

前報⁸⁾と同様。

(3) 充填剤

APS-1000 (40~60 mesh) ガスクロ工業製。

3. 器具及び装置

(1) 通気装置

改良ランキン法²⁾の装置を用いた。

(2) ガスクロマトグラフ (GC)

島津製作所製 GC-4 CM 型 (FPD-S フィルター付)。

(3) ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS)

日立製作所製 RMU-6 MG 型。

4. 褐変反応物の調製

褐変反応物 I は前報⁸⁾と同様に調製した。褐変反応物 II は加熱時間を8時間に変更した他は前報と同様に調製した。

5. 分析方法

(1) 試験溶液の調製

前報⁸⁾と同様。

(2) GC 法による定量

試験溶液の 5 ml を取り、50 ml 三角フラスコに入れ、シリコン栓にて密栓した。これに 60% リン酸溶液 1 ml を注射器で注入し、30 秒間激しく振とうした後 10 分間室温で放置した。更に 30 秒間激しく振とうした後ガスタイトシリンジでヘッドスペースガス 1 ml を取り、これをガスクロマトグラフに注入した。得られたクロマトグラムのピーク高を測定し、標準溶液について同様に得たピーク高と亜硫酸濃度の両対数値から作成した検量線を用いて試料中の亜硫酸含量を求めた。

6. GC 及び GC-MS 条件

(1) GC 条件

カラム: APS-1000 を充填したガラスカラム (3 mm × 3 m)。

カラム恒温槽: 90°C。

注入口温度: 120°C。

検出器温度: 220°C。

キャリアーガス: N₂, 30 ml/min。

(2) GC-MS 条件

カラム: APS-1000 を充填したガラスカラム (3 mm × 2 m)。

カラム恒温槽: 90°C。

注入口温度: 120°C。

キャリアーガス: He, 30 ml/min。

イオン化電圧: 70 eV。

実験結果及び考察

1. 浜野らの GC 法に関する検討

(1) 通気-比色法と浜野らの GC 法の比較

13 種の食品試料について著者らの通気-比色法と浜野らの GC 法で亜硫酸を測定し、比較した結果を Table 1 に示す。一般食品 8 種のうち甘納豆、干しすもも、キャンデットチェリー、干しあんずで測定値間に差が観察され、いずれも GC 法の方が低値であった。含イオウ食品 5 種のうちガーリックパウダー、オニオンパウダー、干しいたけで測定値間に大きな差が観察され、一般食品とは逆に GC 法の方が高値であった。

(2) 両方法の測定値の差の原因

両方法の操作法は最終測定方法ばかりでなく前処理法も異なっている。そこで、まず前処理法について検討した。GC 法の前処理を行った食品試料について通気-比色法と GC 法で亜硫酸を測定したところ、両方法の値は近似し、Table 1 で観察された測定値の差は前処理法の違いによることがわかった。

(3) GC 法の前処理における亜硫酸の消失

通気-比色法では通気条件により亜硫酸の測定値に差

Table 1 Determination of SO₂ in various foods by the Bubbling-colorimetric method and HAMANO's GC method

Sample	Found SO ₂ (ppm)	
	Bubbling-colorimetric method	HAMANO's GC method
Concentrated orange juice	0.5	1.7
Red wine	124	140
Molasses	131	120
Black sugar beans	5.0	ND
Dried plum	47.4	ND
Candied cherry	30.9	ND
Dried apricot	187	36.3
Frozen peeled shrimps	50.7	51.0
Garlic powder*	4.9	330
Onion powder*	4.0	47.0
"Wasabi" powder*	36.9	9.1
Dried strips of Japanese* radish ("Kiriboshidaikon")	4.2	1.5
Dried <i>Lentinus edodes</i> * ("Hoshishiitake")	15.3	317

ND: Not detected <1 ppm (HAMANO's GC method)

* Bleaching agent (SO₂) was not added.

Table 2 Recoveries of added SO₂ from foods and browning reaction product

Sample	Added SO ₂ (ppm)	Bubbling-colorimetric method		HAMANO's GC method	
		Found SO ₂ (ppm)	Recovery (%)	Found SO ₂ (ppm)	Recovery (%)
Black sugar beans	50	44.8	89.6	5.0	10.0
	100	97.9	97.9	47.9	47.9
Dried plum	50	43.7	87.4	2.3	4.6
	100	94.2	94.2	45.8	45.8
Candied cherry	50	40.6	81.2	21.3	42.6
	100	91.5	91.5	71.3	71.3
Glucose*	50	48.9	97.8	43.3	86.6
	100	100	100	85.9	85.9
Browning product (I)**	50	16.0	32.0	ND	0.0
	100	50.0	50.0	17.6	17.6
Glucose+Glycine***	50	49.2	98.4	47.1	94.2
	100	100	100	101	101
Browning product (II)****	50	0.5	1.0	12.3	24.6
	100	19.8	19.8	35.0	35.0

ND: Not detected <1 ppm (HAMANO's GC method)

Each sample was not containing SO₂.

* 1 M Glucose

** 1 M Glucose was heated and pyrolyzed with burner.

*** Mixture of 2 M Glucose and 2 M Glycine

**** Mixture of 2 M Glucose and 2 M Glycine was heated at 100°C for 5 h.

が観察され、その原因は前処理中の褐変反応物などの食品成分による亜硫酸消失量の違いによるものと判断された。GC 法の前処理ではどの程度亜硫酸が消費されるかを知るために、亜硫酸不検出食品及び褐変反応物を試料として亜硫酸の添加回収実験を行い、消失量を調べた。比較のために 通気-比色法も併せて行った。結果は Table 2 に示したように食品における回収率は GC 法の方が通気-比色法よりも低く、GC 法の方が消失量が大であった。褐変反応物は褐変反応前の溶液と比べ回収率が低く、通気法ばかりでなく GC 法の前処理でも亜硫酸を消費する成分であることが確認された。褐変反応物 I (糖のカaramel化) は GC 法の方が回収率が低く食品と同様な傾向であったが、褐変反応物 II (アミノ・カルボニル化) は通気法の方が回収率が低く食品と異なった傾向であった。以上の結果から、GC 法が低値を示した 4 試料中には褐変反応物 I のような性質を持つ食品成分が亜硫酸と未反応の状態で存在していることが予想され、この成分の前処理中における亜硫酸の消費の差が測定値の差となって現われたものと考えられる。

(4) 含イオウ食品から検出された亜硫酸の確認

含イオウ食品 5 試料からは GC 法で 1.5~330 ppm の亜硫酸が検出された。しかし浜野ら¹⁾はわさび粉、オニオ

ンパウダー、切り干し大根からは亜硫酸を検出しなかったことを報告しており、また今回用いた含イオウ食品はいずれも亜硫酸無添加であったことから妨害物質の可能性も考えられたので GC-MS 法により確認を行った。その結果含イオウ食品からの亜硫酸は標準亜硫酸とマスス

Standard SO₂ Dried *Lentinus edodes*

Garlic powder

Fig. 1 GC-MS spectrum of SO₂ in dried *Lentinus edodes* ("Hoshishiitake") and garlic powder

ベクトルが一致し、含イオウ食品では亜硫酸そのものが存在または生成することが明らかとなった。ガーリックパウダー及び干しいたけから検出された亜硫酸及び標準亜硫酸のマススペクトルを Fig. 1 に示す。

これまでにモニアー・ウィリアムス法やその他各種の分析法により検出された含イオウ食品からの盲検値^{9)~11)}は亜硫酸以外の揮発性有機イオウ化合物によるものと考えられてきたが、上記の結果から亜硫酸そのものの定量値の可能性もあるものと思われる。

2. 通気分離後に GC で定量する方法の検討

浜野らの GC 法に関する検討結果から、GC 法の前処理は一般食品での亜硫酸測定値を低下させ、含イオウ食品の盲検値を高くさせる可能性があることが判明し、前処理の改良が必要であると考えられた。そこで、通気-比色法の前処理部分を用い、得られた吸収液中の亜硫酸を GC で定量する方法について検討を行った。

(1) ヘッドスペースガス化の条件

亜硫酸のヘッドスペースガス化は 50 ml 共栓試験管を用い室温で行われているが、この方法の場合再現性にやや難点が見られた。これは試験管中では気化した亜硫酸が充分拡散されていないためではないかと考え、振とうしやすく、液面近くの気化した亜硫酸を採取できる三角フラスコの使用について検討した。標準亜硫酸 6 μg を用いた場合の 5 回の繰り返し測定の変動係数は共栓試験管使用が 10.0%、三角フラスコ使用が 4.4% と三角フラスコの方が良かった。

(2) 揮発性アルデヒドの影響

揮発性アルデヒドは比色法では呈色を妨害する²⁾こと

が知られているが、GC 法に対する影響は十分に調べられてはいない。そこで本法及び浜野らの方法に対する 4 種の揮発性アルデヒドの影響を調べたところ、Table 3 に示すように浜野らの方法でかなりの負の妨害が観察された。本法では 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによりアルデヒド類が除去されているため妨害は認められなかった。

(3) 含イオウ化合物の影響

GC 法では含イオウ化合物の分別が可能であり、食品中の他の揮発性イオウ化合物の影響はほとんどないことが報告^{5)~12)}されている。そこで本法及び浜野らの方法に対する含イオウ化合物 5 回の影響を調べたところ、Table 4 に示したように硫化ナトリウム及びアリルイソチオシアネートで影響が観察された。硫化ナトリウムの場合、両方法とも亜硫酸が検出されており、用いた試薬に

Table 3 Effect of aldehydes on the GC method

Aldehyde (mg)		Found SO ₂ (μg)	
		Proposed method	HAMANO's method
None		10.0	10.0
Formaldehyde	0.1	9.8	6.4
	1	10.0	1.3
Acetaldehyde	0.1	10.1	7.0
	1	10.3	4.2
Furfural	1	10.0	6.7
	10	9.3	4.9
Benzaldehyde	1	9.8	5.9
	10	9.2	2.2

Table 4 Effect of volatile sulfur compounds on the GC method

Sulfur compound (mg)		Found SO ₂ (μg)			
		Proposed method		HAMANO's method	
		Blank	Added 10 μg SO ₂	Blank	Added 10 μg SO ₂
None		0.0	10.0	0.0	10.0
Dimethyl sulfide	1	0.0	9.3	0.0	10.0
	10	0.0	9.1	0.0	8.8
Dimethyl disulfide	1	0.0	9.9	0.0	11.8
	10	0.0	8.4	0.0	8.8
Methyl mercaptan	1	0.0	9.8	0.0	9.6
	10	0.0	9.9	0.0	10.0
Allyl isothiocyanate	1	0.0	9.9	0.0*	10.8*
	10	0.0	9.3	4.1*	12.8*
Sodium sulfide	0.2	6.9	17.5	13.0	28.1
	2	19.2	27.5	27.4*	39.8*

* 30 mg of mercuric chloride was added to eliminate hydrogen sulfide.

含有されている亜硫酸を測定したものと考えられるが、浜野らの方法は本法より測定値が高く、前処理中での硫化ナトリウムからの亜硫酸の生成の可能性も考えられる。アリルイソチオシアネート 10 mg の場合、本法では亜硫酸は全く検出されなかったが、浜野らの方法では 4 μ g の亜硫酸が検出され、かつアリルイソチオシアネートのアルカリ分解のためと考えられる多量の硫化水素が検出された。

以上の結果から浜野らの方法では硫化ナトリウムあるいは硫化水素を生成するようなイオウ化合物は亜硫酸を生成増加させる可能性が高いことがわかった。

なお、浜野らの方法を検討した際、硫化ナトリウムやアリルイソチオシアネートからの多量の硫化水素を除去

するためには所定の 0.5 mg の塩化第二水銀添加では不十分であったので 30 mg の塩化第二水銀を用いた。Table 1 における分析でもわさび粉、切り干し大根などでは硫化水素の除去に塩化第二水銀 30 mg を必要とした。

これに対し、本法では通気処理により揮発性イオウ化合物が除去されているためと考えられるが、亜硫酸以外のピークは硫化水素を除いて全く検出されず、硫化水素のピークも浜野らの方法よりはるかに小さく亜硫酸の定量をほとんど妨害しなかった。従って塩化第二水銀の添加は必要なかった。試料における分析でも塩化第二水銀を添加せずに行なえ、かつ亜硫酸以外のピークが出現しないことから GC の所要時間は 1 試料 5 分で充分であった。

(4) 通気-比色法との比較

食品試料 22 種類を用いて本法と通気-比色法との比較を行った。結果は Table 5 に示したようにわさび粉を除いていずれの食品も測定値は良く一致していた。両方法の一致は前処理が同一であったためと考えられるが、さらに実際の食品では比色法に影響を及ぼす妨害物質の量が少ないことを示しているものと思われる。

6 種の含イオウ食品からは浜野らの方法ばかりでなく本法でも亜硫酸が検出されたため GC-MS 法で確認したところ Fig. 1 と同様、標準の亜硫酸とマススペクトルが一致した。また、前報で通気-比色法と改良ランキン比色法で盲検値に差が見られたが、これについても本法を応用して確認を行ったところ亜硫酸そのものの差に

Table 5 Determination of SO₂ in various foods by the proposed method and the Bubbling-colorimetric method

Sample	Found SO ₂ (ppm)	
	Proposed method	Bubbling-colorimetric method
Concentrated orange juice	63.4	74.8
Red wine	27.7	27.6
Molasses	104	96.2
Black sugar beans	13.0	15.0
Dried plum	35.8	37.8
Candied cherry	56.4	53.1
Dried apricot	1 020	1 050
Frozen peeled shrimps	39.5	37.2
Soy sauce	43.3	42.9
"Miso"	58.5	58.4
Mashed potato	10.6	9.8
Boiled beans	28.1	26.4
Wheat flour	104	107
Taro (Satoimo)	4.9	5.0
"Moyashi"	86.0	84.8
White pepper*	N D	N D
Garlic powder*	1.1	0.8
Onion powder*	0.9	0.3
"Wasabi powder"*	54.0	36.9
Mustard powder*	5.5	5.7
Dried strips of Japanese radish*	4.7	4.2
Dried <i>Lentinus edodes</i> *	12.7	15.3

N. D.: Not detected < 0.2 ppm

*) Bleaching agent (SO₂) was not added.

Table 6 Recoveries of added SO₂ from various foods

Sample	Added SO ₂ (ppm)	Found SO ₂ (ppm)	Recovery
Concentrated orange juice	0	14.4	84
	10	22.8	
Red wine	0	17.8	91
	10	26.5	
Molasses	0	28.5	100
	10	38.5	
Dried plum	0	60.1	83
	10	68.4	
Candied cherry	0	42.5	94
	10	51.9	
Frozen peeled shrimps	0	31.2	101
	10	41.3	
"Miso"	0	3.3	100
	10	13.3	
Boiled beans	0	1.8	87
	10	10.5	

よることがわかった。

(5) 添加回収実験

食品試料8種類を用いて本法における亜硫酸の添加回収率を求めた。結果は Table 6 に示したように 10 ppm 添加で 83~101% で、通気-比色法における亜硫酸検出食品での回収率とはほぼ同等であった。なお本法における検出限界は試料 5 g の場合 0.2 ppm であり比色法と同等である。

要 約

通気-比色法と浜野らの GC 法の比較を行い、両方法の亜硫酸測定値の相違の原因について検討した。更に浜野らの方法に改良を加え、通気分離後に GC で定量する方法を考案検討した。

(1) 浜野らの GC 法は通気-比色法に比べ一般食品では測定値が低く、含イオウ食品では高い傾向が示された。

両方法の測定値の相違は前処理法の違いが原因であり、GC 法は通気-比色法より一般食品において亜硫酸損失の可能性が大きいことを認めた。含イオウ食品は全て亜硫酸無添加であったため GC 法で検出された亜硫酸を GC-MS 法で確認したところ標準と一致した。

(2) 通気-比色法の前処理部分を用い GC で定量する方法について検討した結果アルデヒド類や含イオウ化合物の影響はほとんど観察されず、通気-比色法との比較でも測定値はほぼ一致していた。含イオウ食品からは本法でも亜硫酸が検出され、GC-MS 法で確認したところ標準と一致した。本法により通気-比色法や改良ランキン法で含イオウ食品から検出された盲検値は亜硫酸そのものよることがわかった。本法における亜硫酸の添加回収率は 10 ppm 添加で 83~101% であり、検出限界は

試料 5 g の場合 0.2 ppm である。

本研究を行うにあたり有益な御助言を賜った国立衛生試験所大阪支所、原田基夫食品部長ならびに GC-MS 測定に御協力いただいた本研究所加藤嘉久技師に深謝いたします。本報告の一部は昭和55年5月日本食品衛生学会(東京)で発表した。

文 献

- 1) 日本薬学会編: 衛生試験法注解(金原出版, 東京), p. 185 (1973).
- 2) 日本薬学会編: 衛生試験法注解(金原出版, 東京), p. 313 (1980).
- 3) HORWITZ, W.: Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13th ed. (Washington, D. C.) p. 339 (1980).
- 4) 中村昌道・馬場奈保子・中岡正吉・和田 裕・河端俊治: 神奈川衛研報告, 5, 23 (1975).
- 5) 浜野 孝・三ッ橋幸正・長谷川明彦・田中喜作・松木幸夫: 農化, 53, 299 (1979).
- 6) NAGARAJA, K. V. and MANJREKAR, S. P.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 54, 1146 (1971).
- 7) KARASZ, A. B., MAXSTADT, J. J., REHER, J. and DECOCO, F.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 59, 766 (1976).
- 8) 宮本文夫・佐伯政信: 日食工誌, 31, 739(1984).
- 9) 二島太一郎・松本 茂: 東京都立衛生研究所研究年報, 21, 59 (1970).
- 10) 加藤三郎: 衛生試験所報告, 90, 119 (1972).
- 11) 木村庄治・寺田志保子: 食衛誌, 11, 459 (1970).
- 12) 浜野 孝・三ッ橋幸正・松木幸夫: 食衛誌, 19, 56 (1978).

(昭和59年2月9日受理)