ノート

キャピラリー電気泳動法によるブドウ果皮色素及び
エルダベリー色素の二酸化硫黄の測定

(平成 11 年 8 月 17 日受理)

平田 恵子* 伊藤 弘一* 広門 雅子* 植松 洋子*
鈴木 公美* 鈴木 助治* 斉藤 和夫*Determination of Sulfur Dioxide Content of Grape Skin Extract and
Elderberry Color by Capillary ElectrophoresisKeiko HIRATA, Kohichi ITO, Masako HIROKADO, Yoko UEMATSU, Kumi SUZUKI,
Sukeji SUZUKI and Kazuo SAITO(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho,
Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan)

A rapid and simple method of determination of the sulfur dioxide content from residual sulfite in natural food color such as grape skin extract and elderberry color by capillary electrophoresis (CE) was developed.

After distillation for 22 minutes under bubbling nitrogen gas by using a modified Rankine apparatus, the sulfite in samples was converted to sulfur dioxide. The sulfur dioxide was trapped in a 0.6% hydrogen peroxide solution as sulfuric acid. The sulfate ion was determined by CE using a 80.5 cm fused silica capillary column with a buffer for organic acid pH 5.6, with indirect UV detection at 240 nm against the reference at 200 nm. The recoveries of sulfur dioxide 25~1,000 $\mu\text{g/g}$ added to grape skin extracts and elderberry colors were 86~104% and the quantitative limit was 15 $\mu\text{g/g}$.

The proposed method was applied to 10 commercial food colors. Sulfur dioxide was detected in 5 grape skin extracts at levels of 38.4~944 $\mu\text{g/g}$, but was not detected in 5 elderberry colors. The values determined by CE and colorimetry were in good agreement.

(Received August 17, 1999)

Key words: 二酸化硫黄 sulfur dioxide; 亜硫酸 sulfite; 硫酸イオン sulfate ion; キャピラリー電気泳動 capillary electrophoresis; 改良ランキン装置 modified Rankine apparatus; ブドウ果皮色素 grape skin extract; エルダベリー色素 elderberry color

緒 言

ブドウ果皮色素はアメリカブドウ (*Vitis labrusca* LINNE), 又はブドウ (*Vitis vinifera* LINNE) の果皮より抽出して得られる色素である。この原料はブドウ酒製造後の压榨残留物が使用され、褐変防止などの目的で亜硫酸処理がなされ、その結果ブドウ果皮色素中に亜硫酸が残留している¹⁾。これらの事実が背景となって、平成 11 年度第 7 版食品添加物公定書²⁾ (公定書) に収載されたブドウ果皮色素について二酸化硫黄としての残留規定が設けられたほか、FAO/WHO 規格³⁾、日本食品添加物協会の自主規格 (以下自主規格とする)⁴⁾ の純度試験においても残留規定が設定されている。またエルダベリー (*Sambucus caerulea* RAFIN., *Sambucus canadensis* LINNE, *Sambucus nigra*

LINNE) の果実より抽出されるエルダベリー色素にも同様な理由で自主規格に残留規定が設定されている。

亜硫酸塩は我が国や諸外国において食品添加物として広く用いられているが、1970 年代後半から食品中に残留する亜硫酸による健康障害⁵⁾ についての報告がみられ、特に感受性の高い人は摂取を避ける必要があるのではという指摘もある。このような状況の中で食品添加物に含まれる亜硫酸が食品へ移行することを考え、食品添加物中の二酸化硫黄としての含有量の規定を設けるとともに、精度良く簡易に測定する方法が求められている。

食品中の亜硫酸分析法は通気蒸留^{6), 7)} などの前処理後、滴定法⁸⁾、比色法⁷⁾、イオンクロマトグラフィー (IC 法)⁹⁾ 及びキャピラリー電気泳動 (以下 CE とする) 法⁹⁾ などが報告されているが、その方法をブドウ果皮色素に応用する場合は有機酸などの影響を受けにくい比色法⁸⁾、IC 法⁹⁾ 及

* 東京都立衛生研究所: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

Table 1. List of Samples and the Color Value

Sample	Form	No. of samples	Color value*
Grape skin extract	Powder	3	121-124
	Liquid	2	32- 35
Elderberry color	Liquid	5	25- 32

*: Measured the absorbance in citric acid buffer solution (pH 3.0)

The specifications of sulfur dioxide:

Japanese standards and FAO/WHO of Food Additives;

Grape skin extract: <0.005% /1 color value

The Federation of Japan Food Additives Association;

Grape skin extract: <0.1%

Kinds of berry color: <0.02%

びCE法⁹⁾が適切と考えられた。しかし、比色法では煩雑であるなどの欠点があることや、IC法では試料中の共存物質が測定後もカラム中に残留し、これらが後に溶出してくるなどのため、次の試料の分析開始までに時間を要するなどの欠点がある。一方、公定書²⁾のブドウ果皮色素に適用されているヨウ素滴定法は分析感度は低い。そこで、今回改良ランキン装置を用いた通気蒸留⁶⁾後CEで測定する簡易で迅速な方法を検討した。更に本分析法を用いて市販のブドウ果皮色素及びエルダベリー色素における二酸化硫黄の含有量調査を行ったので併せて報告する。

実験方法

1. 試料

1997年及び1998年に市販されたブドウ果皮色素の粉末製品を3試料及び液状製品を2試料用いた。また、1997年に市販されたエルダベリー色素の液状製品5試料を用いた。測定対象とした試料の形状及び試料数と公定書²⁾及び自主規格⁴⁾の方法に従って測定した色価の値をTable 1に示した。

なお、公定書²⁾及びFAO/WHO規格³⁾、自主規格⁴⁾の二酸化硫黄としての残留規定もそれぞれ示した。

2. 試薬

0.6% 過酸化水素水 (二酸化硫黄捕集液): 30% 過酸化水素 (試薬特級) 2 mL を水で 100 mL とした。

硫酸イオン標準溶液: 無水硫酸ナトリウム 221.9 mg を 0.6% 過酸化水素水に溶解して 100 mL とし (二酸化硫黄として 1,000 µg/mL), 更に二酸化硫黄として 3~150 µg/mL となるように 0.6% 過酸化水素水で希釈した。

添加回収用亜硫酸標準溶液: 亜硫酸水素ナトリウム 162.5 mg を正確に量り, 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に溶かし 100 mL とし (二酸化硫黄として 1,000 µg/mL), 更に 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で二酸化硫黄として 500 µg/mL, 25 µg/mL となるように希釈して用いた。

CE泳動用緩衝液: ヒューレットパッカード (HP) 社製有機酸測定用 pH 5.6 を用いた。

パラロザニン発色液: 衛生試験法・注解⁶⁾に従った。

Table 2. Capillary Electrophoresis (CE) Conditions

Column: Fused silica (75 µm, 80.5 cm)
Buffer: Organic acids buffer solution (pH 5.6)
5 mmol/L PDC, 0.5 mmol/L CTAB
Temperature: 20°C
Electric: Negative
Voltage: 25.0 kV
Preconditioning: Flush 4 min (buffer)
Injection: Pressure 50 mbar, 2.0 sec
Detection: Photodiode array
Signal: 240 nm (16 Bw), Reference: 200 nm (10 Bw)

その他の試薬: 市販特級品を用いた。

3. 装置

CE装置: HP社製 HP^{3D} system G1602A型

4. 通気蒸留による試験溶液の調製

試料 1 g を 100 mL 容蒸留フラスコにはかり取り, エタノール 2 mL 及び水 40 mL を加えて混和し, 試料を溶解させた後, 蒸留には衛生試験法・注解⁶⁾に記載されている通気蒸留装置を用い, 蒸留開始直前に 25% リン酸溶液 10 mL を加え, 500 mL/min で窒素ガスを通気しながらマントルヒーターを用いて 22 分間加熱し蒸留した。なお, 通気する窒素ガスはピログロール 2 g を 10 mL の水に溶解した液中を通過させたものを用いた。蒸留された二酸化硫黄は 0.6% 過酸化水素水 10 mL に捕集し, その溶液を 0.45 µm のフィルターでろ過し試験溶液とした。

5. CE測定条件

Table 2 に示した。

6. 通気蒸留-比色法

衛生試験法・注解⁶⁾に準じ, 標準溶液及び試薬の調製は柴田ら⁷⁾の方法で行った。

結果及び考察

1. 蒸留時間の検討

報告されているCE法⁹⁾は蒸留にMonier-Williams装置を用いて蒸留を行っているが, 著者らは衛生試験法・注解⁶⁾の改良ランキン装置を用いる方法を検討した。しかし, 衛生試験法・注解⁶⁾では直火で加熱を行っているが, 今回は安全性などを考えマントルヒーターで加熱することとしたので, 加熱時間の検討を行った。

ブドウ果皮色素 (粉末) に亜硫酸水素ナトリウムを二酸化硫黄として 500 µg 添加して蒸留し, 5 分間隔ごとに捕集液を変え, それぞれの硫酸イオン濃度をCEで測定することにより, 蒸留時間ごとの二酸化硫黄の回収率を調査した結果を Fig. 1 に示した。

その結果, 20 分間以上で 95% 以上の回収率が得られることが分かったため, 以後の実験では蒸留時間を 22 分間で行うこととした。

なお, 蒸留装置に通気する窒素ガスは極力蒸留される二酸化硫黄の酸化を防ぐ目的で改良 Monier-Williams 法¹⁰⁾で用いられているピログロール溶液に通す方法を採用した。

Fig. 1. Effect of bubbling time on recovery of sulfur dioxide for heating by mantel heater

Table 3. Effect of Concentration of Hydrogen Peroxide on Recovery

Concentration of hydrogen peroxide (%)	Recovery (%)
0.15	87.4±4.2
0.30	94.0±7.1
0.60	93.2±5.3
1.2	89.4±3.9

Results were average±SD of 3 determinations.
Sulfur dioxide added: 1,000 µg

Fig. 2. Electropherograms of standard of sulfate ion at 240 nm and 350 nm

2. 捕集液の過酸化水素濃度

捕集液に二酸化硫黄を硫酸として捕集する場合、衛生試験法・注解⁶⁾では0.3%過酸化水素水を用いているが、1.5%以上の溶液を用いている報告^{8), 9)}があることから、過酸化水素水の適切な濃度を調べるため、0.15~1.2%の濃度範囲の過酸化水素水を捕集液とし、水に亜硫酸水素ナトリウムを二酸化硫黄として1,000 µg添加したときの回収率を求めた。

その結果はTable 3に示したように過酸化水素水の濃度が0.3%以上で90%以上の回収率が得られた。更に、0.6%の過酸化水素水においても同程度の回収率が得られた。しかし0.6%では0.3%に比べて変動係数が小さかったため、以後捕集液には0.6%を用いることにした。

Fig. 3. Electropherograms of reagent blank (a), standard of sulfate ion and organic anions (b), grape skin extract (c) and elderberry color (d)
1: sulfate ion, 2: tartrate ion, 3: malate ion, 4: citrate ion

3. CE測定法の検討

3.1 CE条件

CE測定条件はTable 2に示した。CE泳動用緩衝液はHP社製のpH 5.6を用い、カラム、カラム温度、荷電についてはHP社の有機酸測定法を適用したうえで、測定波長及び測定時間について硫酸イオンの測定に適切な条件を検討した。

間接吸光度法を用いてリファレンス200 nmに対して測定波長220, 240, 300及び350 nmで硫酸イオン標準溶液を測定したときのエレクトロフェログラムを比較した。240 nmと350 nmにおける標準溶液のエレクトロフェログラムをFig. 2に示したが、350 nmでは硫酸イオンのマイグレーションタイム4.2分に近接した4分付近に常にベースの落ち込みがみられ、面積値の算出に影響すると考えられた。一方、測定波長240 nmでは硫酸イオンのピーク付近に落ち込みがなく測定に支障がないことが分かった。なお、測定波長300 nmでは350 nmと同様

Table 4. Recovery of Sulfur Dioxide Added to Grape Skin Extract and Elderberry Color

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	Found ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)	CV (%)
Grape skin extract	0	852	91.9	8.3
	500	1,277	104	6.9
	1,000	1,876		
Elderberry color	0	0	86.0	3.3
	25	21.5		

Results were average of 4 determinations.

であり、220 nm では4分にピークが認められた。

また、標準溶液を5回測定した際の変動係数は220, 300及び350 nmで各々5%以上であったが、240 nmでは3.6%であり定量値は安定した。また、標準溶液3~30 $\mu\text{g/mL}$ 及び30~150 $\mu\text{g/mL}$ における相関係数はいずれも0.994と良好な直線性が得られた。

以上の結果からCE測定は測定波長240 nmで行うこととした。なお、測定時間は硫酸イオンのマイグレーションタイムが約4.2分であり、また、7分間以降ではベースラインが上がる傾向を示したので (Fig. 2), 測定時間は6分間とした。カラム洗浄に4分間要するため、全測定時間は約10分間であり、迅速な測定が可能となった。

3.2 市販試料への適用

分析に用いる各試薬を水に溶解し、試薬ブランクとして蒸留して得た試験溶液のエレクトロフェログラム (Fig. 3 a), ブドウ果皮に含まれることが推察される有機酸の中で硫酸イオンのマイグレーションタイムに近接する3種の有機酸及び硫酸イオンのエレクトロフェログラム (Fig. 3 b), 市販のブドウ果皮色素 (粉末) 及びエルダベリー色素の試験溶液のエレクトロフェログラム (Fig. 3c, d) を Fig. 3 に示した。

試薬ブランクのエレクトロフェログラムには、2つのピークが認められるが硫酸イオンのピークと一致するものではなく、これと近接したマイグレーションタイム付近にもピークが認められなかった (Fig. 3a)。各有機酸も硫酸イオンとよく分離した (Fig. 3b)。更に、その他の有機酸として試験溶液中に混入する可能性が高い酢酸はマイグレーションタイムが6分以降であり分析に支障はないことが分かった。ブドウ果皮色素のエレクトロフェログラム (Fig. 3c) からは硫酸イオンのピークが検出され、色素中に亜硫酸の残留が確認されるとともに、その他の妨害ピークもなく定量が可能であった。Fig. 3d はエルダベリー色素のエレクトロフェログラムを示したが、硫酸イオンと一致した小さなピークが認められるものの定量限界をはるかに下回った。また、酒石酸は前処理の蒸留で試験溶液に含まれる可能性は低いと推測されたが、酒石酸と一致したピークが認められた。

4. 添加回収実験

ブドウ果皮色素 (粉末) 1 g に対して亜硫酸塩を二酸化硫黄として500, 1,000 μg を、エルダベリー色素に25 μg

Table 5. Determination of the Levels of Sulfur Dioxide of Grape Skin Extracts and Elderberry Colors by CE and Colorimetric Method

Sample		Results of CE ($\mu\text{g/g}$)	Results of colorimetry ($\mu\text{g/g}$)
Grape skin extract	Powder 1	852	844
	Powder 2	896	893
	Powder 3	944	—
	Liquid 1	38.4	34
	Liquid 2	114	—
Elderberry color	Liquid 1	nd	nd
	Liquid 2	nd	nd
	Liquid 3	nd	nd
	Liquid 4	nd	nd
	Liquid 5	nd	nd

Results were average of 5 determinations.

nd: not detected < 15 $\mu\text{g/g}$

添加して回収実験を行い、その結果は Table 4 に示した。

ブドウ果皮色素では500 μg 添加で平均回収率が91.9%であり、1,000 μg 添加では104%であった。エルダベリー色素では25 μg 添加で86.0%であった。

また、亜硫酸塩を二酸化硫黄として500, 1,000 μg 添加したブドウ果皮色素 (粉末) の各々4回の回収実験を行った変動係数 (CV 値) は8.3と6.9%であり、エルダベリー色素では3.3%であった。なお、本法の定量限界は15 $\mu\text{g/g}$ であった。

5. 市販色素の分析

市販ブドウ果皮色素及びエルダベリー色素についての二酸化硫黄含有量を測定した結果を Table 5 に示した。また、10試料中8試料は比色法で測定した結果も併せて示し、本法と比較した。

ブドウ果皮色素は粉末状の3試料から1 g 中852~944 $\mu\text{g/g}$ を、液状2試料では38.4~114 $\mu\text{g/g}$ 検出された。二酸化硫黄含有量が944 $\mu\text{g/g}$ (約0.09%) の粉末試料では色価が124であった。公定書²⁾ 及びFAO/WHO規格³⁾ において1色価当たり0.005% 以下という基準値があり、この値と比較すると、この試料は1色価当たり0.0007% となり、この値は基準値の1/7程度と低い値であることが分かった。また、エルダベリー色素の5試料はすべて定量限界の15 $\mu\text{g/g}$ 以下であった。

本法は衛生試験法・注解⁶⁾ の比色法の定量値と一致し、同等の結果が得られることから、公定書²⁾ の方法に準ずる試験法として利用できるものと考えた。また、ブラックカーラント色素などの二酸化硫黄の規格値が定められている食品添加物にも本法を応用できるものと考えた。

ま と め

食品添加物のブドウ果皮色素及びエルダベリー色素中に残留する亜硫酸由来の二酸化硫黄の測定にCE法が適用できるかについて検討した。

マントルヒーターによる加熱で、22分間窒素ガスによ

る通気蒸留を行い、蒸留された二酸化硫黄を 0.6% 過酸化水素水に硫酸として捕集し、この硫酸イオンを泳動用緩衝液に HP 社製の pH 5.6 を用い、測定波長は 240 nm の CE 条件で測定した。本法の添加回収率は 86~104% を示し、定量限界は 15 $\mu\text{g/g}$ であった。

市販食品添加物に本法を適用したところ、ブドウ果皮色素 5 試料から二酸化硫黄として 38.4~944 $\mu\text{g/g}$ 検出され、エルダベリー色素 5 試料ではすべて定量限界以下であった。また、本法と比色法の結果もよく一致した。

本法に使用した CE の測定法では 1 試料当たりの測定所要時間は 10 分間で終了するため、比色法に比べて迅速性に優れた方法である。

謝 辞

試料の収集にご協力いただきました東京都食品環境指導センターの諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Shimizu, T., Nakamura, M. (Fujii, M. supervised) "Gaisetsu Shokuyo Tennenshikiso", Tokyo, Korin, 1993, p. 92. (ISBN 4-7712-9308-2)
- 2) The Japanese Standards of Food Additives, 7th Ed., Ministry of Health and Welfare, Japan (1999), p. 413-414.
- 3) Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives; Specifications for identity and purity of certain food additives, FAO Food and Nutrition Paper, 52/1, p. 719-721 (1992), FAO of The United Nations, Rome.
- 4) "Dainihan Kagakuteki Gouseihin Igai No Shokuhintenkabutsu Jishukikaku", Japan Food Additives Association, p. 160-166. (1993).
- 5) Warner, C. R., The influence of public opinion on the FDA's promulgation of food additive regulations. Shokuhin Eisei Kenkyu (Food sanitation research), **42**(6), 7-21 (1992).
- 6) Nippon Yakugakukai, ed., "Eisei Shikhenho Chukai (Standard method of analysis for hygienic chemists, with commentary), 1990, Tokyo, Kanehara Shuppan, 1995, p. 76-77, p. 719-721. (ISBN 4-307-47031-1)
- 7) Shibata, T., Tsuji, S., Ito, Y., Miura, K., Obara, K., Adachi, T., Giga, T., Hamano, T., Mitsuhashi, Y., Aoki, N., Yamamoto, S., Mizuno, T., Iwaida, M., Tezuka, Y., Improvement of colorimetric microdetermination of sulfites in various foods by using the modified Rankine apparatus. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **31**, 57-66 (1990).
- 8) Anderson, C. C., Warner, C. R., Daniels, D. H., Ion chromatographic determination of sulfites in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem., **69**, 14-19 (1986).
- 9) Trenerry, V. C., The determination of the sulphite content of some foods and beverages by capillary electrophoresis. Food Chem., **55**, 299-303 (1996).
- 10) Committee on Food Chemicals Codex; Food Chemicals Codex, 4th Ed., p. 80-85 (1996), National Academic Press, Washington, D. C.