報 文

亜硫酸オキシダーゼとカタラーゼを利用したかんぴょう
及びこんにゃく精粉中の亜硫酸の比色定量

(平成 13 年 12 月 25 日受理)

青木和子* 上野清一* 石崎睦雄*,†

Colorimetric Determination of Sulfite in “Kanpyo” (Dried Gourd Shavings) and “Konnyaku-seiko” (Devil’s-tongue Fine Powder) Using Sulfite Oxidase and Catalase

Kazuko AOKI, Seiichi UENO and Mutsuo ISHIZAKI†

(Ibaraki Hygienic Laboratory: 993-2, Kasahara-cho, Mito 310-0852, Japan;

† Corresponding author)

A simple and convenient method for colorimetric determination of sulfite in foods based on its conversion to formaldehyde with sulfite oxidase and catalase was developed.

Sulfite in a sample was extracted with water and then diluted with methanol. One mL of sample solution containing about 5~10 μg of sulfite was taken into a test tube with a ground-glass stopper, and 3 mL of 0.04 mol/L borate buffer (pH 8.7), 1 mL of 0.4% 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) solution, 2,000 units of catalase solution and 1.0 units of sulfite oxidase were added. The mixture was incubated for 35 minutes at 37°C. Then 0.15 mL of 1 mol/L hydrochloric acid and 5 mL of 0.2% iron(III) nitrate solution were added. The reaction mixture was transferred to a measuring flask after standing for 5 minutes at room temperature, and diluted to 20 mL with methanol. The absorbance of this solution was measured using a spectrophotometer at the wavelength of 635 nm. The calibration curve prepared with sodium sulfite showed linearity between 0 to 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as sulfur dioxide.

The recoveries of sulfite in “Kanpyo” (dried gourd shavings) and “Konnyaku-seiko” (devil’s-tongue fine powder) by the proposed method were 97~104%, and the coefficients of variation were below 6%. The sulfite values in these foods determined by the proposed method were reasonably consistent with those obtained by the bubbling distillation-alkaline titration method.

(Received December 25, 2001)

Key words: 食品添加物 food additive; 亜硫酸 sulfite; 亜硫酸オキシダーゼ sulfite oxidase; カタラーゼ catalase; かんぴょう dried gourd shavings; こんにゃく精粉 devil’s-tongue fine powder; 比色定量 colorimetric determination

緒 言

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類は食品添加物として食品の漂白並びに酸化防止を目的に使用されており、我が国では食品衛生法により二酸化硫黄 (SO_2) としての最大残存量が食品ごとに 0.03~5 g/kg の範囲で定められている。

食品中の亜硫酸の定量法は通気蒸留後にアルカリ滴定法あるいは比色法で定量する方法¹⁾が広く利用され、また、イオンクロマトグラフィー²⁾や HPLC³⁾、キャピラリー電気泳動⁴⁾を用いる方法も報告されている。しかし、いずれの場合も前処理に通気蒸留を行うため特別な蒸留装置や窒素ガスを必要とし、手法が煩雑で熟練を要するうえ、多検

体を同時に処理することはできず、より簡便で多数の試料を分析できる測定法の出現が望まれている。一方、Beutler らの方法⁵⁾は、亜硫酸を亜硫酸オキシダーゼで硫酸に酸化する際に生成する過酸化水素を、NADH 存在下で NADH ペルオキシダーゼにより水に還元する際の NADH の減少率を紫外外部領域の波長 340 nm で測定することにより亜硫酸量を測定している。

ところで、先に著者らは食品中の過酸化水素定量法としてメタノール存在下、過酸化水素にカタラーゼを作用させ発生したホルムアルデヒドと 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン (MBTH) とを反応させ、波長 635 nm の青色に呈色させて過酸化水素を測定する方法を報告している⁶⁾。

† 連絡先

* 茨城県衛生研究所: 〒310-0852 茨城県水戸市笠原町 993-2

そこで、亜硫酸を亜硫酸オキシダーゼで酸化する際に発生する過酸化水素を MBTH と反応させる比色法による亜硫酸測定法を検討した。その結果、かんぴょうやこんにゃく精粉などに含有する亜硫酸を精度良く簡便に測定できたので報告する。

実験方法

1. 試料

平成 12～13 年に茨城県内で購入したかんぴょう及びこんにゃく精粉を試料とした。

2. 試薬

亜硫酸オキシダーゼ：Sigma 社製

カタラーゼ液：カタラーゼ，生化学用，和光純薬工業(株)製を 20 μ L 中に 2,000 単位含むように水で溶解した。用時調製。

ホウ酸緩衝液：ホウ酸 2.473 g を水に溶かし，0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 8.7 に調整後，水を加えて 1,000 mL とした (0.04 mol/L)。

MBTH 溶液：3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩，アルデヒド定量用，和光純薬工業(株)製 0.40 g を水に溶かして 100 mL とした (0.4%)。

亜硫酸標準溶液：無水亜硫酸ナトリウム 984 mg を正確に量り，水に溶かして正確に 100 mL とし，亜硫酸標準原液とする。この液 1 mL は亜硫酸 (SO_2 として) 5,000 μ g を含む。標準原液 1 mL にメタノールを加えて 50 mL とし，更にメタノールで 10 倍希釈して亜硫酸標準溶液とした。この液 1 mL は亜硫酸 (SO_2 として) 10 μ g を含む。用時調製。

その他の試薬：市販の特級品を使用した。

3. 装置

分光光度計：(株)日立製作所製 U-3410

4. 試料液の調製

4.1 かんぴょう

細切りした試料 1.0 g に水 50 mL を加え 5 分間振とう後，ろ紙 (No. 2) を用いてろ過し，ろ液に水を加えて 50 mL としたものを 1 mL 採り，メタノールを加えて 20 mL とした。

4.2 こんにゃく精粉

試料 0.50 g に水 50 mL を加え 5 分間振とう後，メタノールを加えて 100 mL としたものを遠心分離 (3,000 rpm, 5 分間) し，得られた上清を分取した。

5. 測定方法

試料液及び亜硫酸標準溶液 1 mL ずつをそれぞれ共栓付試験管に採り，pH 8.7 のホウ酸緩衝液 3 mL 及び MBTH 溶液 1 mL を加え 37°C で 3 分間加温した後，カタラーゼ液 20 μ L，次いで亜硫酸オキシダーゼ 1.0 単位を加えて混和し，37°C の恒温水槽中で 35 分間反応させた。次に 1 mol/L 塩酸 0.15 mL を加えて混和し，0.2% 硝酸鉄(III) 溶液 5 mL を加え，室温で 5 分間放置した後，試験管の内容物を 20 mL のメスフラスコに移し，メタノール

Fig. 1. The reaction mechanism of proposed method

ルを加えて全量を 20 mL とし試験溶液とした。これらの液につき水を対照として波長 635 nm における吸光度を測定した。別に試料液及び亜硫酸標準溶液それぞれに亜硫酸オキシダーゼを加えずに同様に操作した液の吸光度を差し引き，試料液中の亜硫酸濃度を求めた。

結果及び考察

1. 操作手順の検討

1.1 酵素の添加時機

本法は Fig. 1 に示すように，(1) 亜硫酸が亜硫酸オキシダーゼにより酸化されて硫酸を生じる際に生成した過酸化水素を，(2) メタノール存在下でカタラーゼと処理することにより定量的にホルムアルデヒドを発生させ，(3) そのホルムアルデヒドを MBTH と反応させて生じた呈色物質の吸光度を測定することにより亜硫酸濃度を定量する方法である。

この反応系において，前述の反応式 (1) で発生した過酸化水素が未反応の亜硫酸と反応してしまうことが推測された。そこで，メタノールで調製した 5 μ g/mL 過酸化水素溶液 1 mL を採り，0.2 mmol/L 亜硫酸ナトリウム水溶液 1 mL を添加した溶液について過酸化水素定量法⁶⁾により吸光度を測定した。その結果，亜硫酸ナトリウム水溶液無添加の過酸化水素溶液と比較して，添加した液の吸光度が低下していたことから，亜硫酸との共存により過酸化水素が減少することが確認できた。そこで，発生した過酸化水素を直ちに次の反応へと導く必要があると考え，試料液はメタノールを用いて調製し，緩衝液を加えて 37°C に保っておいたところへ，カタラーゼと亜硫酸オキシダーゼを時間を空けずに順次添加することにした。

1.2 MBTH の添加時機

前述の反応式 (2) で発生したホルムアルデヒドを損失なく呈色物質に導くためには適当な時機に MBTH を添加する必要があると考えた。そこで，5. 実験方法の操作法，すなわち酵素反応開始前に MBTH 溶液を添加した場合，及び MBTH 溶液を除いた反応液に亜硫酸オキシダーゼ添加 15 分後に MBTH 溶液 1 mL を添加し，更に 20 分間反応させた後に発色させた場合のそれぞれの吸光度を比較

Fig. 2. Effect of pH of 0.04 mol/L borate buffer on enzymatic reaction

Fig. 4. Effect of reaction time

Fig. 3. Effect of dose of sulfite oxidase

した。その結果、亜硫酸標準溶液 1 mL を用いて実験を行った場合、前者の吸光度は約 0.08 高く、酵素反応開始前に MBTH 溶液を添加する方がホルムアルデヒドの損失を抑えて高い値が得られることが明らかとなった。したがって MBTH 溶液は緩衝液とともに試料液にあらかじめ添加することにした。

2. 反応条件の検討

2.1 酵素反応時の至適 pH

前述の反応式 (1) 及び (2) の酵素反応における至適 pH を検討した。亜硫酸標準溶液 1 mL を採り、pH を 8.0～9.6 の範囲で調整したホウ酸緩衝液を用いて反応を行い、吸光度を測定した。その結果、Fig. 2 に示したように pH 8.5～8.9 の範囲で最大かつほぼ一定の値を示した。また、トリス緩衝液を用いた場合はわずかに呈色する程度、リン酸緩衝液の場合は全く反応しなかった。これらのことから、以後は pH 8.7 のホウ酸緩衝液を用いることにした。

2.2 亜硫酸オキシダーゼ添加量と反応時間

亜硫酸標準溶液 1 mL すなわち SO_2 として $10 \mu\text{g}$ の亜硫酸を酸化するのに必要な亜硫酸オキシダーゼ量を検討した。亜硫酸オキシダーゼを 0.25～3.0 単位の範囲で加えて

反応を行い、吸光度を測定した。その結果、Fig. 3 に示したように 0.75 単位以上の添加量でほぼ一定の値を示したことから、以後は亜硫酸オキシダーゼは 1.0 単位を添加することにした。

また、亜硫酸オキシダーゼを 1.0 単位用いた場合の反応時間と吸光度の変化を Fig. 4 に示した。20 分までは急激に吸光度が変化し 30 分以降ではほぼ直線的に緩やかに増加することが判明したが、90 分までに一定の値を示して変化が止まる様子はなかったため、35 分の時点で反応を停止することにした。

2.3 呈色物質の生成

本法では呈色物質の生成を速やかに進行させる目的で反応液中に酸化剤として 0.2% 硝酸鉄(III) 溶液を添加するが、前述のとおり反応を弱アルカリ性の pH 8.7 の緩衝液中で行うため、加えた鉄により水酸化鉄の沈殿を生じてしまい、そのままでは吸光度の測定に支障があった。一方、亜硫酸オキシダーゼは pH 5.0 以下においては不可逆的に不活性となることが判明している⁷⁾。そこで、反応終了時に亜硫酸オキシダーゼを不活性化して反応を停止させること、及び水酸化鉄の沈殿を生じないようにするための条件を検討した。その結果、反応停止液として 1 mol/L 塩酸を 0.15 mL 添加することで両方の目的を果たせることが判明した。なお、呈色後、室温で 4 時間放置した場合でも吸光度の低下はほとんど認められなかった。

2.4 亜硫酸の反応範囲

亜硫酸オキシダーゼ 1.0 単位を添加した場合に反応が十分進行する亜硫酸量の範囲を検討した。亜硫酸標準原液をメタノールで希釈し、 SO_2 として 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 及び $20 \mu\text{g/mL}$ となるように調製した亜硫酸溶液 1 mL を用いて反応を行った。別にメタノール 1 mL を用いて反応を行った液を対照として吸光度を測定した結果、0～16 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線 ($r^2=0.999$) が得られた。また、これらの濃度のうち $10 \mu\text{g/mL}$ について 6 回繰り返し測定を行った結果、変動係数 1.7% の良好な再現性を示した。

Table 1. Recoveries of Sulfite from Foods by Proposed Method

Sample	Added SO ₂ (μg/g)	Found SO ₂ (μg/g)	Recovery (%)	CV (%)
Dried gourd shavings 1 (Kanpyo)	0 2,500	4,080 6,670	104	5.6 3.1
Dried gourd shavings 2	0 2,500	3,660 6,180		1.4 1.6
Devil's tongue fine powder (Konnyaku-seiko)	0 500	411 898	97.4	3.1 3.0

Results were average of 5 trials.

Table 2. Comparison of Sulfite Values in Foods Determined by Proposed Method and Alkaline Titration Method

Food	Proposed method			Alkaline titration method		
	Determined SO ₂ (g/kg)		CV (%)	Determined SO ₂ (g/kg)		CV (%)
	Range (n=5)	Mean		Range (n=5)	Mean	
Dried gourd shavings 2 (Kanpyo)	3.59 ~3.72	3.66	1.4	3.56 ~3.82	3.71 ^{a)}	2.6
Devil's-tongue fine powder (Konnyaku-seiko)	0.396~0.426	0.411	3.1	0.398~0.446	0.420	4.6

^{a)} The value is the sum of free sulfite (0.32 g/kg) and combined sulfite (3.39 g/kg).

3. 実試料の測定

本法により市販のかんぴょう及びこんにゃく精粉中の亜硫酸の定量と添加回収実験を行った結果、Table 1 に示したとおり、回収率 97.4~104%、変動係数 1.4~5.6% と良好な結果が得られた。また、この際の定量下限は試料液中の SO₂ 濃度で 0.5 μg/mL であった。

次に、本法と通気蒸留-アルカリ滴定法との亜硫酸測定値の比較を行ったところ、Table 2 に示したとおり、両者の値は良く一致した。なお、Table 2 の中で、かんぴょうのアルカリ滴定法による測定値は、氷冷下で窒素ガスを 30 分通じて揮発するものを遊離型、通気下加熱して揮発してくるものを結合型として分別定量¹⁾した値を合計したものである。このことから、本法を用いると遊離型・結合型の区別なく全亜硫酸量が測定できることが判明した。

ま と め

亜硫酸オキシダーゼとカタラーゼの 2 種類の酵素反応を利用して亜硫酸を比色定量する方法について検討した結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 前処理に蒸留などの煩雑な操作は不要であり、多検体を同時に測定できた。
- 2) 発色試薬である MBTH をあらかじめ添加しておくことで最大の吸光度が得られた。
- 3) 遊離型・結合型の区別なく全亜硫酸量を測定できた。
- 4) 本法をかんぴょう及びこんにゃく精粉に適用した場合の添加回収率は 97~104%、変動係数は 1.4~5.6% と良好な結果が得られた。
- 5) 定量下限は試料液中の SO₂ として 0.5 μg/mL で

あった。

以上の結果から、本法はかんぴょう及びこんにゃく精粉中の亜硫酸定量法として十分実用に供しうる方法と考えられる。

文 献

- 1) The Pharmaceutical Society of Japan ed., "Eisei Shikhen Chukai (Methods of analysis in health science) 2000", Tokyo, Kanehara Shuppan, 2000, p. 304-308. (ISBN 4-307-47033-8)
- 2) Nagase, M., Determination of sulfite in foods by ion chromatography after purge-and-trap. Bunseki Kagaku, **37**, 30-34 (1988).
- 3) Matsumoto, H., Ogawa, H., Suzuki, K., Suzuki, J., Saito, K., Determination of sulfite residues in foods by using the modified Rankine apparatus and HPLC. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **42**, 329-334 (2001).
- 4) Hirata, K., Ito, K., Hirokado, M., Uematsu, Y., Suzuki, K., Suzuki, S., Saito, K., Determination of sulfur dioxide content of grape skin extract and elderberry color by capillary electrophoresis. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **41**, 144-148 (2000).
- 5) Beutler, H.-O., Schütte, I., Eine enzymatische methode zur bestimmung von sulfit in lebensmitteln. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, **79**, 323-330 (1983).
- 6) Ishizaki, M., Murakami, R., Ueno, S., Kataoka, F., Oyama, N., Kubota, K., Katsumura, K., Determination of hydrogen peroxide in foods by the 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone method. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **19**, 167-171 (1978).
- 7) Cohen, H. J., Fridovich, I., Hepatic sulfite oxidase. J. Biol. Chem., **246**, 359-366 (1971).