

短報

イオンクロマトグラフを用いた 食品中の亜硫酸分析

関戸晴子, 田中由紀子, 酒井康宏
岸 弘子, 藤巻照久

Analysis of sulfite in foods using ion chromatography

Haruko SEKIDO, Yukiko TANAKA, Yasuhiro
SAKAI, Hiroko KISHI and Teruhisa FUJIMAKI

はじめに

二酸化硫黄および亜硫酸塩類は、漂白や酸化防止の目的で様々な食品に利用されている食品添加物である。食品中の亜硫酸の分析には、通常食品衛生検査指針食品添加物編¹⁾(以下指針と略す)に示されているアルカリ滴定法や比色法が多く、多くの検査機関で採用されている。指針では、亜硫酸(SO₂)の含有量として約0.1g/kg以上の食品にはアルカリ滴定法を用い、約0.1g/kg以下の食品には比色法を用いることを推奨しているが、酢酸などの揮発性の酸を多く含む食品は、アルカリ滴定法では滴定に影響を及ぼし適用することは困難である。一方、比色法は、前述のアルカリ滴定法では測定できない食品やSO₂含有量が低い食品に限って使用されるが、検量線の範囲が狭く、操作が煩雑であり、また回収率の悪い食品が多い等の問題点を多く含んでいる。

そこで今回、衛生試験法・注解²⁾に記載されている高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法をもとに測定条件・カラムの選択等の検討を実施し、検出器に紫外吸収検出器(UV検出器)と電気伝導度検出器(CD検出器)を用いたイオンクロマトグラフィー(IC)について、分析への応用を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

方 法

1. 試料

神奈川県内で購入した亜硫酸塩類を食品添加物として使用可能である食品11種類22検体を用いた。

2. 試薬および試液

水：超純水を煮沸して脱気し、冷却したものを使用した。

神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

1%トリエタノールアミン(TEA)溶液：TEA10gを水に溶かして1000mlとした後、窒素ガス(N₂)を5分間通気して脱気した。

亜硫酸水素ナトリウムの標定およびSO₂標準溶液の調製：松本らの方法³⁾に従った。即ち、SO₂としての力価を標定した亜硫酸水素ナトリウムを量って1%TEA溶液に溶解し、1ml中に100μgのSO₂を含む溶液を調製して標準原液とした。標準溶液は、標準原液を用時1%TEA溶液で適宜希釈して用いた。

IC法用試薬：炭酸ナトリウム(無水)および炭酸水素ナトリウム

アルカリ滴定法および比色法用試薬：指針¹⁾に従った。試薬はすべて市販特級品を使用した。

3. 器具および装置

イオンクロマトグラフ：DIONEX社製DX-320, サプレッサー(ASRS-300)付

電気バーナー：HORO Dr Hofmann GmbH社製ELECTRO-BURNER-SYSTEM

通気蒸留装置：指針の二重冷却管付通気蒸留装置を用いた。SO₂の捕集には、25ml共栓試験管(内径20mm)、加熱は松本らの方法³⁾に従い電気バーナーを用いて蒸留フラスコとの距離は6cmとした。

0.45μmフィルター：アドバンテック東洋(株)製DISMIC-13HP045AN

4. 測定条件

分析カラム：DIONEX社製IonPac AS9-SC(4mmi.d.×250mm)およびIonPac AS12A(4mmi.d.×250mm)

ガードカラム：DIONEX社製IonPac AG9-SC(4mmi.d.×50mm)およびIonPac AG12A(4mmi.d.×50mm)

溶離液：炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムの混液

カラム温度：40℃, 注入量：50μl, 流速：0.7~1.5ml/min

検出器：UV検出器およびCD検出器

5. 試験溶液の調製

(1) IC法

衛生試験法・注解の通気蒸留-液体クロマトグラフィーによる定量の項に準じた。通気蒸留装置を用いて亜硫酸を二酸化硫黄として留出させ、25ml共栓試験管に入れた約9mlの1%TEA溶液に捕集し、捕集した液量を10mlとした後0.45μmのフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

(2) アルカリ滴定法および比色法

指針に準じた。通気蒸留装置を用いて亜硫酸を二酸化硫黄として留出させ、アルカリ滴定法は過酸化水素に捕集、比色法は0.1mol/l水酸化ナトリウム溶液に捕集した

ものをそれぞれ試験溶液とした。

6. 定量

(1) IC法

SO₂標準原液を1%TEA溶液で希釈し、調製した0.1~100 μg/mlの標準溶液各々50 μlをICに注入し、得られたピーク面積より検量線(UV検出器およびCD検出器)を作成した。

試験溶液50 μlをICに注入し、得られたピーク面積よりあらかじめ作成した検量線よりSO₂含有量を求めた。

(2) アルカリ滴定法および比色法

アルカリ滴定法は、試験溶液を0.01mol/l水酸化ナトリウム溶液で滴定し計算によりSO₂含有量を求めた。比色法は、試験溶液をパラロザニンおよびホルムアルデヒドと反応させ生じた赤紫色色素を吸光度測定し、試験溶液と同様に操作したSO₂標準溶液により作成した検量線からSO₂含有量を求めた。

結果および考察

1. IC法による測定

(1) UV検出器による定量

SO₂は水溶液中では亜硫酸イオンとして存在する。亜硫酸イオンは紫外外部領域(UV)に吸収をもつことから、陰イオン交換カラムとUV検出器を用いたHPLC測定法が衛生試験法・注解に記載されている。しかし、記載に従って、分析カラムにIonPac AS9-SCを用いて1.8mmol/l炭酸ナトリウム/1.7mmol/l炭酸水素ナトリウム溶液を溶離液に使用し240nmで測定を実施したところ、SO₂濃度100 μg/mlの標準溶液を測定しても十分な感度が得られなかった。そこで波長を210nmに変更したところ、ピーク面積値が10倍以上大きくなり、十分な感度と良好なピーク形状が得られた(図1)。しかし、波長210nm

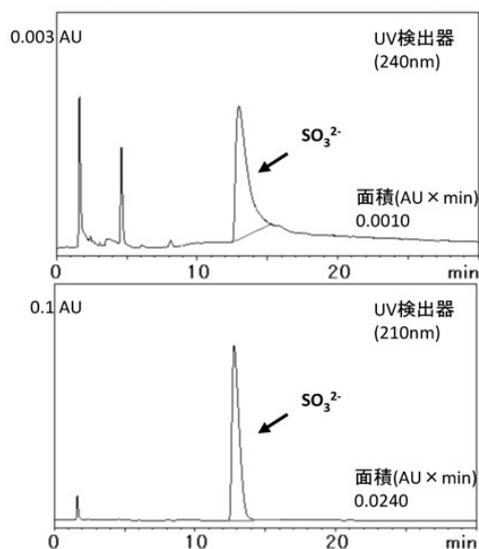


図1 亜硫酸(SO₂)標準溶液100 μg/mlのクロマトグラム

付近は、食品に含まれる多くの有機酸の妨害を受けることが知られている³⁾。食品に含まれる可能性が高い有機酸8種(酢酸、クエン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、シュウ酸、コハク酸、マロン酸)およびUV吸収を持つ陰イオン3種(硝酸イオン、亜硝酸イオン、臭素イオン)を分析したところ、前述の条件では亜硫酸イオンの付近にリンゴ酸および酒石酸の妨害を受けた。移動相の割合や流速を変更し検討したが、リンゴ酸および酒石酸は亜硫酸イオンとほぼ同じ挙動を示し、特にリンゴ酸とは完全に分離することができなかった。そこでカラムをIonPac AS12Aに変更し、溶離液の条件を検討した(表1)。その

表1 IC法測定条件

	条件A	条件B	条件C
カラム	IonPac AS12A(4mm.i.d.×250mm)		
ガードカラム	IonPac AG12A(4mm.i.d.×50mm)		
溶離液	2.7mmol/INa ₂ CO ₃ / 0.3mmol/INaHCO ₃	1.8mmol/INa ₂ CO ₃ / 1.2mmol/INaHCO ₃	0.9mmol/INa ₂ CO ₃ / 2.1mmol/INaHCO ₃
流速	0.7~1.5ml/min		
カラム温度	40°C		
注入量	50 μl		

結果AS12Aを使用することにより、亜硫酸イオンのピークはどの条件でもリンゴ酸および酒石酸と完全に分離することができた。また、他の有機酸の妨害も認められなかった。亜硫酸イオンおよび有機酸8種の中で最後に出てくるシュウ酸の保持時間を鑑み、1検体の測定に要する分析時間を考えると、流速を1.5ml/minとした場合の条件A、Bが有用であると考えられた(図2)。

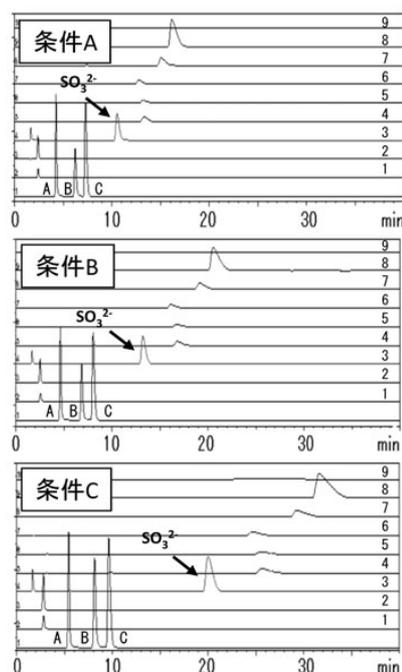


図2 亜硫酸、UV吸収を持つ陰イオン3種および有機酸8種のクロマトグラム(UV検出器測定、流速1.5ml/min)
A:NO₂⁻, B:Br⁻, C:NO₃⁻, 1:酢酸, 2:乳酸, 3:亜硫酸, 4:リンゴ酸, 5:コハク酸, 6:マロン酸, 7:酒石酸, 8:シュウ酸, 9:クエン酸

試料中の不揮発性の有機酸は前処理の蒸留操作で捕集液である1%TEA溶液に移行する可能性は低いと考えられているが、これらの影響を完全に除去し十分な検出感度を得るために、カラムはIonPac AS12Aを使用し、波長210nmで測定するのがよいと思われた。作成した条件における検量線は、0.5~100 μg/mlで相関係数0.999以上の良好な直線性を示した。

(2) CD検出器による定量

亜硫酸イオンは無機の陰イオンであるため、CD検出器を用いたICにより測定が可能である。CD検出器でSO₂標準溶液を定量したところ、前述のUV検出器(波長210 nm)よりも感度がよく、SO₂濃度0.1 μg/mlの標準溶液でも十分な感度と良好なピーク形状が得られた(図3)。

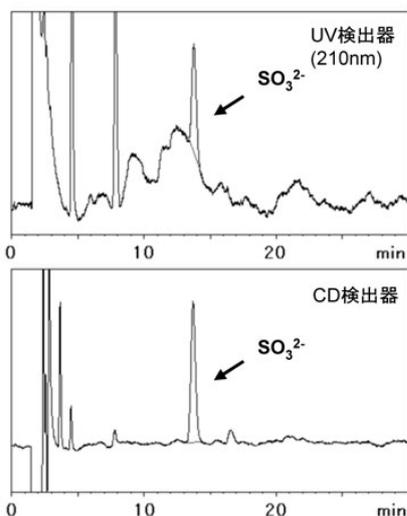


図3 亜硫酸(SO₂)標準溶液0.5 μg/mlのクロマトグラム

しかしCD検出器では、食品中の様々な陰イオンがピークとして検出されることが懸念されたため、陰イオン7種(フッ素イオン、塩素イオン、臭素イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオン、リン酸イオン、硫酸イオン)との分離を確認した。その結果、条件Aでは亜硫酸イオンのピークはリン酸イオンと近接して、リン酸イオンが多量に含まれていた場合分離しなくなる可能性が考えられた。条件B, Cはリン酸イオンや硫酸イオン、また前述の8種の有機酸ともよく分離し、測定に問題は認められなかった(図4)。検量線は0.1~100 μg/mlで相関係数0.999以上の良好な直線性を示し、UV検出器測定よりも広い範囲で直線性が得られた。

以上のことからIC法による測定は、カラムにIonPac AS12A、溶離液に1.8mmol/l炭酸ナトリウム/1.2 mmol/l炭酸水素ナトリウム溶液を用いることにより、UV検出器またはCD検出器のどちらを使用しても、食品中に含まれる可能性の高い有機酸や陰イオンの妨害を受

けることなく測定することが可能であった。

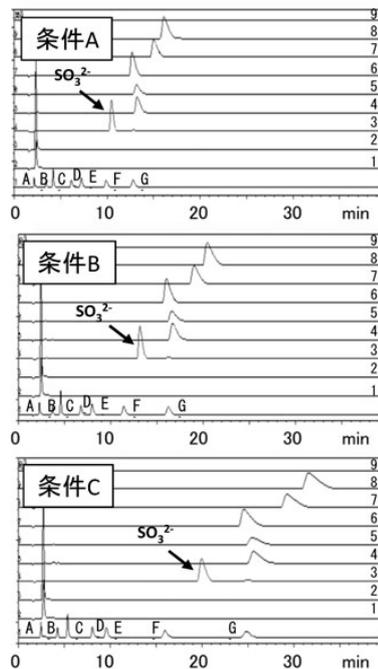


図4 亜硫酸、陰イオン7種および有機酸8種のクロマトグラム (CD検出器測定、流速1.5ml/min)

A:F-, B:Cl-, C:NO₂-, D:Br-, E:NO₃-, F:PO₄³⁻, G:SO₂-1:酢酸, 2:乳酸, 3:亜硫酸, 4:リンゴ酸, 5:コハク酸, 6:マロン酸, 7:酒石酸, 8:シュウ酸, 9:クエン酸

2. 添加回収

砂糖を試料として2.0gにSO₂10 μgを添加して添加回収試験(n=5)を実施した。回収率はUV検出器測定において71~79%、変動係数(CV)4.7%、CD検出器測定において73~76%、CV2.6%であった。本法における定量限界はSO₂としてUV検出器使用の場合は0.0025g/kg(2g採取)、CD検出器使用の場合は0.0005g/kg(2g採取)であった。

3. アルカリ滴定法および比色法との比較

神奈川県内で購入した食品11種類22検体を用いて、検討したIC法とアルカリ滴定法、比色法における測定値の結果を表2に示した。

バルサミコ酢やワインビネガーを除いて、測定値は3法ともほぼ類似した結果が得られた。バルサミコ酢、ワインビネガーでは、IC法や比色法では1検体を除いて不検出であったがアルカリ滴定法では3検体とも数値が得られた。従来から知られているように、これらの食品は酢酸を多く含んでいることがアルカリ滴定法の結果に影響を及ぼしたものと考えられた。また比色法は、検量線の範囲が0~2 μg/mlと狭いために、SO₂含有量が0.02g/kg(2g採取)を超えた検体については試料液を2倍~100倍希釈しなければならなかったためか、若干の差がみら

表2 試験法による各種食品中の亜硫酸 (SO₂) 測定値の比較

食品	亜硫酸塩類使用の表示	SO ₂ 測定値(g/kg)			
		アルカリ滴定法	比色法	IC法	
				UV検出器(210nm)	CD検出器
赤ワイン1	有	0.044	0.034	0.034	0.039
赤ワイン2	有	0.062	0.056	0.058	0.063
白ワイン1	有	0.096	0.084	0.077	0.073
白ワイン2	有	0.12	0.10	0.12	0.11
バルサミコ酢	有	0.0082	0.0012	不検出	0.0011
赤ワインビネガー	有	0.012	不検出	不検出	不検出
白ワインビネガー	有	0.0080	不検出	不検出	不検出
タピオカ	有	不検出	不検出	不検出	不検出
かんぴょう1	有	1.5	1.4	1.3	1.3
かんぴょう2	無	不検出	不検出	不検出	不検出
乾燥果実マンゴー	有	0.31	0.28	0.38	0.39
乾燥果実あんず	有	0.83	0.84	0.88	0.89
真だこ	有	不検出	0.0039	0.0040	0.0038
冷凍エビ	有	不検出	不検出	不検出	不検出
山菜水煮1	有	不検出	不検出	不検出	不検出
山菜水煮2	有	不検出	不検出	不検出	不検出
たけのこ水煮	無	不検出	不検出	不検出	不検出
白きくらげ1	無	不検出	不検出	不検出	不検出
白きくらげ2	無	不検出	不検出	不検出	不検出
塩漬くらげ	無	不検出	不検出	不検出	不検出
煮豆1	有	不検出	不検出	不検出	不検出
煮豆2	無	不検出	不検出	不検出	不検出

亜硫酸塩類使用の表示(有)の食品は3試行の平均、(無)の食品は1試行

<定量下限値>

アルカリ滴定法：0.0008g/kg(試料20g採取、滴定量1滴(0.05ml)としたものを定量下限値とした)

比色法：0.0005g/kg(食品衛生検査指針食品添加物編2003の解説に記載されているものを使用した)

IC法(UV検出器)：0.0025g/kg(試料2g採取、捕集液量10ml、検量線の最小濃度0.5μg/ml検出としたものを定量下限値とした)

IC法(CD検出器)：0.0005g/kg(試料2g採取、捕集液量10ml、検量線の最小濃度0.1μg/ml検出としたものを定量下限値とした)

定量下限値未滿を不検出とした

れた。かんぴょうや乾燥果実のような固体試料は、検体そのもののSO₂含有量のばらつきが大きい可能性も考えられた。

ICによる測定は、アルカリ滴定法のように酢酸などの有機酸の影響を受けることは少なく、また、比色法と違って検量線の範囲が広いので、多大な希釈をせずに測定することが可能であった。

まとめ

食品中の亜硫酸分析について、通気蒸留装置を用いたICによる定量試験を検討した。カラムにIonPacAS12A、移動相に1.8mmol/l炭酸ナトリウム/1.2mmol/l炭酸水素ナトリウム溶液を使用することにより、UV検出器、CD検出器のどちらでも酢酸などの揮発性有機酸や夾雑イオンの影響をほとんど受けずに、従来法よりも広い検量線範囲で測定することが可能であった。また、CD検出器測定による検量線はUV検出器よりも広い範囲で直線性が得られた。以上のことから本分析法は、ほぼすべての食品で適用可能であると思われる。

本分析法はIC法のみならず、前述のカラムおよび移動相を用いることにより、UV検出器もしくはフォトダイオードアレイ検出器付の高速液体クロマトグラフ(HPLC)においても適用可能である。

(平成23年8月5日受理)

文献

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 食品添加物編，pp. 100-109，社団法人日本食品衛生協会，東京(2003)
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2010，pp. 340-347，金原出版(株)，東京(2010)
- 3) 松本ひろ子，小川仁志，鈴木敬子，鈴木 仁，斎藤和夫：通気蒸留装置及びHPLCを用いた食品中の残留亜硫酸の分析，食品衛生学雑誌，42，329-334(2001)