

果実酒類の亜硫酸濃度測定方法の検討

後藤 奈美・沼田美子代・荒巻 功・橋爪 克己

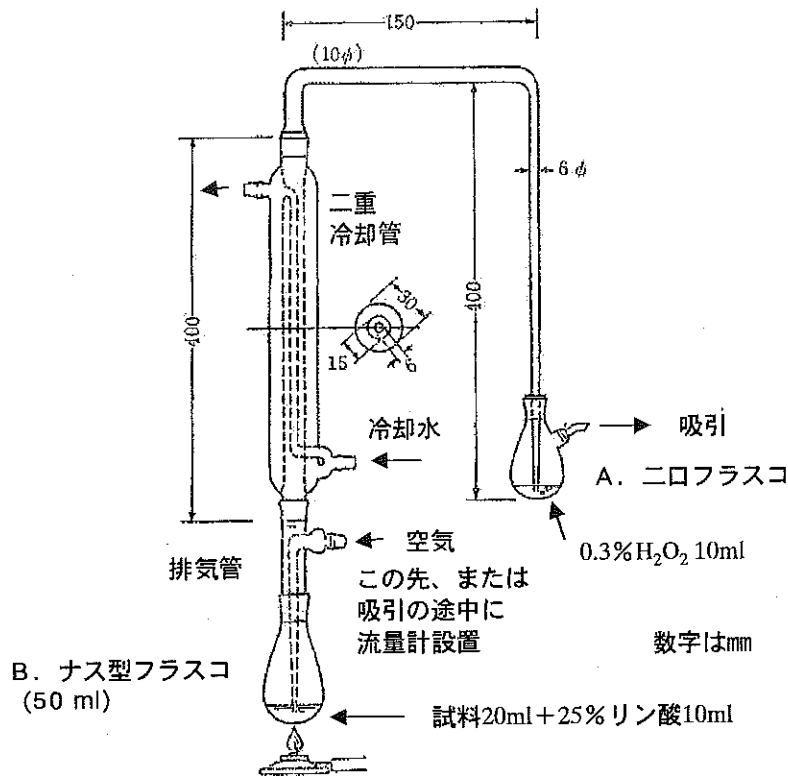
Determination methods of sulfite in wine

Nami GOTO, Mineyo NUMATA,
Isao ARAMAKI and Katsumi HASHIZUME

緒 言 方 法

現在、国税庁所定分析法（以下、所定法）に採用されている亜硫酸の測定方法は、いわゆる Rankine 法の紹介記事¹⁾に準拠しているが、吸引速度などの条件に原報^{2, 3)}や果実酒の分析法の成書⁴⁾と異なる点がある。そこで、今回の所定分析法改訂作業にあたり、文献調査及び分析法の検討を行った。また、あわせて酵素法の適用についても検討した。

通気蒸留・滴定法（Rankine 法）には、図1に示す装置、及びほぼ同様の構成のピードレックス社製亜硫酸定量装置を使用した。酵素法には、Roche 社製Fキット亜硫酸（total SO₂）を使用した。



結合型、及び総亜硫酸測定の場合は加熱

図1 亜硫酸測定装置の例¹⁾

結果及び考察

1. 通気蒸留・滴定法 (Rankine 法) 開発の経緯 (文献調査結果)

ワイン等に添加された SO₂ は、一部がアセトアルデヒド、ピルビン酸、グルコースなどと結合し (図 2)、酸化防止・抗菌活性を失うため、製

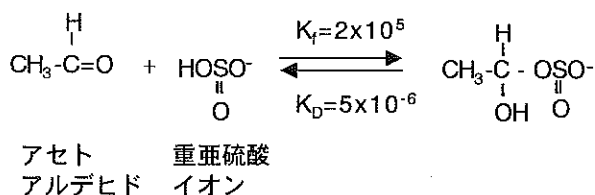


図 2 結合型亜硫酸の生成反応

品及び工程管理のためには遊離亜硫酸濃度を把握する必要がある。一方、食品衛生法では、亜硫酸の最大残留量は、結合型も含めた総亜硫酸として定められており、総亜硫酸濃度の把握も必要である。遊離及び結合型亜硫酸の定量方法としては、ヨウ素滴定による Ripper 法が用いられていたが、赤ワインでは終点が分かりにくく、ヨードで酸化される SO₂ 以外の物質も測定される問題があった。そこで開発されたエアレーション・オキシデーション法 (通気蒸留・滴定法) は、揮発性の酸 (リン酸) を添加して pH を 1-1.5 に下げると、SO₂ ⇌ HSO₃⁻ の平衡が分子状 SO₂ に傾いて揮発しやすくなり、結合型 SO₂ は分解しにくくなることを利用して、通気してパージされた SO₂ を H₂O₂ でトラップして H₂SO₄ に酸化し、中和滴定で定量する方法である。この際、図 1 の排気管から N₂ ガスを吹き込む方法では、SO₂ 濃度が低く (10mg/L 以下) になると、SO₂ の分圧が非常に低くなって揮発しにくくなり、通気蒸留に 30 分程度必要になるが、A から吸引すると若干減圧になって 15 分程度の通気蒸留で測定可能であることが明らかになった⁵⁾。また、15 分の通気中に SO₂ が大気中の酸素で酸化されることはないの、N₂ ガスを使う必要はないことも示された⁵⁾。Rankine²⁾ は A と吸引ポンプの間に、ガラス管を

通した水のシリンダーを設置し、水中に入ったガラス管の長さを変えることで減圧の程度を調節したが、大きな影響は無かったと報告している。

なお、この方法は、ヨーロッパで開発された方法を The Australian Wine Research Institute の Rankine 氏が一部改変してオーストラリアに紹介したことから、日本では Rankine 法と呼ばれることが多いが、エアレーション・オキシデーション法、または衛生試験法にならって通気蒸留・滴定法と呼ぶ方が適切と思われる。

衛生試験法・注解 (2000) 及びその根拠となる報文⁶⁾ では、吸引力の調整が困難で、停止時の逆流のおそれ、取り扱いの不便さがあるとして、吸引法から通気法に改良した (改良 Rankine 法) としているが、通気蒸留に 30 分かかることから、所定法にはより簡便な吸引法が適当であると考えられる。なお、厳密に食品衛生法上問題がないかを検討する際には、衛生試験法に従った分析が必要である。

2. 通気蒸留・滴定法の条件検討

(1) 通気蒸留速度の検討 所定法では、遊離型亜硫酸を測定する際に「できる限り弱く 15 分間常温で吸引」と記載されている。しかし、文献 3) には、500 mL/min の吸引では SO₂ が十分に回収されず、1000-1500 mL/min の吸引が必要と報告されている。また、Rankine ら⁷⁾ も 1000 mL/min 程度の吸引が必要と報告している。そこで流量計を設置して検討したところ、500 mL/min 以下の吸引では測定値が低くなることもあり、1000 mL/min 程度の吸引が必要と考えられた。なお 1000 mL/min は、かなり激しくエアレーションする条件であった。

(2) 通気蒸留時間、及び加熱条件の検討 文献 3, 4) では、吸引時間を 10 分間 (EC は 15 分間) としているため、完全に SO₂ が回収されるために必要な通気蒸留時間を調べた。その結果、亜硫酸濃度が高い場合は、10 分では完全には留出しないことがあるため、所定法としては 15 分間の方が

適当と考えられた。ただし、工程管理のためには10分間でも問題はないと思われる。

加熱が弱いと結合型亜硫酸の留出が著しく悪くなるため、バーナーの炎の先端が触れる程度で加熱（通気蒸留終了後に 90-98℃ 程度）する必要があった。バーナーはマイクロバーナーでなく、通常の実験用ガスバーナーでも問題はなかった。

なお、サンプル中の SO₂ が完全に留出したかどうかは、通気蒸留終了後、H₂O₂ 溶液を入れた図1のAを付け替えて再度通気蒸留を行い、有意量の SO₂ が留出しないことで確認することができる。

(3) H₂O₂ の液深及び吹き込み口の形状 留出した SO₂ はAの H₂O₂ 溶液に吹き込まれてトラップされるが、吹き込み口が広い場合や、液深が浅い場合は完全にトラップされずに低く測定されるのではないかと懸念された。Burroughs ら⁵⁾ は、ナス型フラスコではなく液深の深いシリンダーを、Rankine²⁾ や Buechsenstein ら³⁾ はナシ型フラスコを用いている。

そこで吹き込み口を内径 4 mm のチューブとした場合と、ピペットマンのチップ（内径 1 mm 以下）とした場合を比較したところ、予想に反して有意な差は認められなかった。文献2)にあるように、先端をガラスフィルターとしたところ、泡が高く上がって 1000 mL/min での吸引ができなかった。また、図1のAをナス型フラスコ（液深 1 cm）とした場合と、試験管（5.5cm）とした場合の比較（先端はガラス管）では、試験管の方が、若干測定値が高くなる場合もあったが、通常の実験にはナス型またはナシ型フラスコを用い、吹き込み口はガラス管のまま使用して問題はないと考えられた。ただし、ある程度の液深を確保するた

め、ガラス管はフラスコの底部まで深く入ることが必要と考えられる。

(4) 酢酸のブランク 酢酸（揮発酸）の影響を避けるために冷却管を用いており、通常酢酸濃度（0.12% 以下、ただし冷却管の能力によって異なる）であればほとんど影響はないが、必要な場合は、試料に 3% H₂O₂ を数滴添加し、SO₂ を H₂SO₄ にした後に測定した値を揮発酸のブランクとして測定値から差し引くことで影響を排除できると報告されている²⁾。これは、0.2% 酢酸水溶液を用いた実験で確認された（表1）。

(5) 結合型の遊離 結合型亜硫酸のうち、アセトアルデヒドやグルコースとの結合型の遊離は無視できるが、ピルビン酸との結合型は若干遊離する。また、アントシアニンとの結合型は不安定で、タンニン（プロシアニジン）と結合していない遊離のアントシアニンを多く含む若い赤ワインの遊離亜硫酸濃度は実際よりも高く測定される⁸⁾と指摘されている。この問題には、今のところ解決策がなく、若い赤ワインの遊離亜硫酸濃度の分析には注意が必要である。

また、文献5)によると、遊離亜硫酸を測定する際、試料温度 0℃ と 20℃ では、測定値に影響がないが、40℃ になるとやや高く測定されると報告されており、室温が高い場合は、試料（図1のB）を冷却する必要があると考えられる。

(6) リキュールの分析 食品衛生法で、個別に規定されていないその他の食品の亜硫酸の最大残留量は 30mg/kg と定められており、リキュール類もその適用を受けるとされている。リキュール類には果実酒類よりもアルコール濃度や糖濃度が高いものがあるため、高アルコール濃度や高糖濃度が SO₂ の分析に影響を及ぼさないか、検討し

表1 通気蒸留・滴定法による総亜硫酸測定の際の酢酸のブランクの検討

サンプル	総亜硫酸濃度 (mg/L)		
	1	2	平均
0.2% 酢酸水溶液	15.4	13.6	14.5
200mg/L SO ₂ + 0.2% 酢酸 + 0.5ml 3% H ₂ O ₂	14.5	14.7	14.6

表2 リキュールおよびネクタータイプのフルーツワインを用いた亜硫酸の添加回収試験 (通気蒸留・滴定法)

試料	総亜硫酸濃度 (mg/L)	
水 (20ml) + 亜硫酸標準溶液* (0.2ml)	194.4	200.8
シヨ糖 45% (20ml) + 亜硫酸標準溶液 (0.2ml)	203.2	199.2
オレンジキュラソー (エキス分 30% アルコール分 40%)	6.4	
オレンジキュラソー + 亜硫酸標準溶液 (0.2ml)	193.6	
アプリコットブランデー (エキス分 30% アルコール分 30%)	2.7	
アプリコットブランデー + 亜硫酸標準溶液 (0.2ml)	196.2	
抹茶リキュール (アルコール分 20%)	0.0	
抹茶リキュール + 亜硫酸標準溶液 (0.2ml)	196.3	
水 (20ml) + 亜硫酸標準溶液 (0.2ml)	188.8	190.4
グリーンティ・リキュール (エキス分 45%, アルコール分 25%)	0.8	
グリーンティ・リキュール + 亜硫酸標準溶液 (0.2ml)	168.4	170.4
水 (20ml) + 亜硫酸標準溶液 (0.2ml)	192.8	191.5
フルーツワイン (ネクタータイプ)	107.2	
フルーツワイン + 亜硫酸標準溶液 (0.2ml)	299.2	

* 亜硫酸ナトリウム 39.9mg/ml = SO₂ 20.3mg/ml, 純度 97% とすると 19.7mg/ml

表3 酵素法と通気蒸留・滴定法による赤ワインの総亜硫酸濃度測定値 (mg/L)の比較

試料	酵 素 法			通気蒸留・滴定法
	無処理	pH 調製*	PVPP + pH 調製**	
A	191.0	205.6	65.9	93.1
B	75.9	88.9	4.4	5.8
C	91.4	99.2	10.3	21.4
D	229.2	246.3	180.1	204.2
E	136.2	138.4	75.0	87.8

* pH を 7.5-8.0 に中和し, 中和前のサンプル量の 2 倍に希釈して測定し, 2 倍量のサンプルを測定に使用した。

** サンプル 20ml に PVPP (Sigma P-6755) 1 g を添加し, 攪拌・ろ過後, 同様に中和・希釈して, 測定した。

た。その結果, 分析を行ったアルコール分30度まで, ブドウ糖及びシヨ糖 45% (w/v) までは, 測定値にほとんど影響を及ぼさないことが示された。エキス分, アルコール分の高い市販リキュールを用いて添加回収試験を行ったところ, 1点 (グリーンティのリキュール) を除いて表2のように 93~98% の回収率を示した。グリーンティのリキュールで回収率がやや低い理由は不明であるが, 過酸化水素のような阻害物質を生じていたのではないかと推定される。なお, 通気蒸留中に試料の発泡が激しい場合は消泡剤を添加すること

で, 冷却管中に泡が上がることを防ぐことができた。また, 粘度の高いネクタータイプのフルーツワインでも支障無く亜硫酸濃度が測定できることが確認された。

3. 酵素法キットの検討

Fキット亜硫酸の説明書には, 白ワインはそのまま, 赤ワインは pH 7.5-8.0 に調製して測定する。また, 強く着色した試料は PVPP で脱色すると書かれている。

酵素法の測定値は, 白ワインの場合は通気蒸

表4 通気蒸留・滴定法及び酵素法の総亜硫酸分析値 (mg/L) の比較及び再現性

試料	通気蒸留・ 滴定法	酵素法*	酵素法用処理 試料→通気蒸 留滴定法**
赤ワイン1	36.4	18.3	20.2
	37.2	17.1	
	35.5	17.4	
平均	36.4	17.6	
σ	0.7	0.5	
赤ワイン2	71.1	47.0	44.4
	73.5	42.9	
	74.3	39.5	
平均	73.0	43.1	
σ	1.4	3.1	
赤ワイン3	196.3	148.3	148.7
	191.9	144.0	
	193.1	144.6	
平均	193.8	145.6	
σ	1.9	1.9	
白ワイン1	54.9	54.0	
	55.3	54.7	
	54.9	43.7	
平均	55.0	50.8	
σ	0.2	5.0	
白ワイン2	125.2	119.0	
	125.2	119.0	
	124.6	118.6	
平均	125.0	118.9	
σ	0.3	0.2	
白ワイン3	290.5	274.3	
	288.9	283.9	
	292.5	283.0	
平均	290.6	280.4	
σ	1.5	4.3	

* 赤ワインはPVPP処理後に中和・希釈(表3脚注参照)して測定, 白ワインはそのまま測定した。赤ワインはPVPP処理から3連で行った。

** 酵素法用に処理した試料のうち1点を通気蒸留・滴定法で測定した。

留・滴定法の測定値と比較的良好一致したが、赤ワインでは、PVPP処理をしないと非常に高く測定された。また、PVPP処理をするとやや低く測定され(表3)、PVPP処理・pH調製・希釈操作中に亜硫酸濃度が減少していることが確認された(表4)。なお、AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ではグルコース、フラクトース、クエン酸の定量に、OIVとECではこの3種類に加えてグリセロール、乳酸、D-リンゴ酸、L-リンゴ酸の定量に酵素法が認められているが、亜硫酸については酵素法は認められていない。酵素法では遊離亜硫酸が測定できないため、工程管理等には適さないが、白ワインの総亜硫酸濃度の把握には利用可能と考えられる。

引用文献

- 1) 嶋崎孝行. 醸協, 78, 191-192 (1983)
- 2) B. C. Rankine. Australian Wine, Brew. and Spirit Rev., 80 (5), 14-16 (1962)
- 3) J. W. Buechsenstein and C. S. Ough. Am. J. Enol. Vitic., 29, 161-164 (1978)
- 4) C. S. Ough and M. A. Amerine. Methods for Analysis of Musts and Wines, 2nd ed. p.222-235, Wiley Interscience (1988)
- 5) L. F. Burroughs and A. H. Sparks. Analyst, 89, 55-60 (1964)
- 6) K. Fujita, M. Ikuzawa, T. Izumi, T. Hamano, Y. Mitsuhashi, Y. Matsuki, T. Adachi, H. Nonogi, T. Fuke, H. Suzuki, M. Toyoda, Y. Ito and M. Iwaida. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 168, 206-211 (1979)
- 7) B. C. Rankine and K. F. Pocock. Australian Wine, Brew. and Spirit Rev., May 29, 40-48 (1970)
- 8) L. F. Burroughs. Am. J. Enol. Vitic., 26, 25-29 (1975)