

平成 26 年 1 月 31 日

酒類総合研究所標準分析法 遊離型亜硫酸の分析方法の一部修正

通気蒸留・滴定法（Rankin 法）で遊離型亜硫酸を分析する際の品温について、下記赤書きのように修正します。

【分析方法】

9-16 亜硫酸

一般には A) 通気蒸留・滴定法を用いるが、着色の少ない検体の総亜硫酸のみを測定する場合には B) 酵素法を用いてもよい。

A) 通気蒸留・滴定法¹⁾

9-16-1 試薬

0.3%過酸化水素水

3%過酸化水素水 10 ml を水に溶かして 100 ml とする²⁾。

メチル・レッド、メチレン・ブルー混合指示薬³⁾

0.1 g のメチル・レッドを 100 ml のエチルアルコールに溶解した後、0.05 g のメチレン・ブルーを加えて溶解し、密栓して保存する。メチル・レッドが溶解しにくい場合は、50℃程度の湯煎で加温して溶解する。引火性があるため、火気に注意して取り扱う。

25%リン酸

リン酸を水で薄めて 25%溶液とする⁴⁾。

N/100 水酸化ナトリウム溶液

5-8-1 による。

9-16-2 装置

代表的な亜硫酸測定装置は下図のとおりである。

- A 50 ml 容梨型二口フラスコ
- B 50 ml 容丸底フラスコ又はナス型フラスコ
- C 二重冷却管
- D バーナー

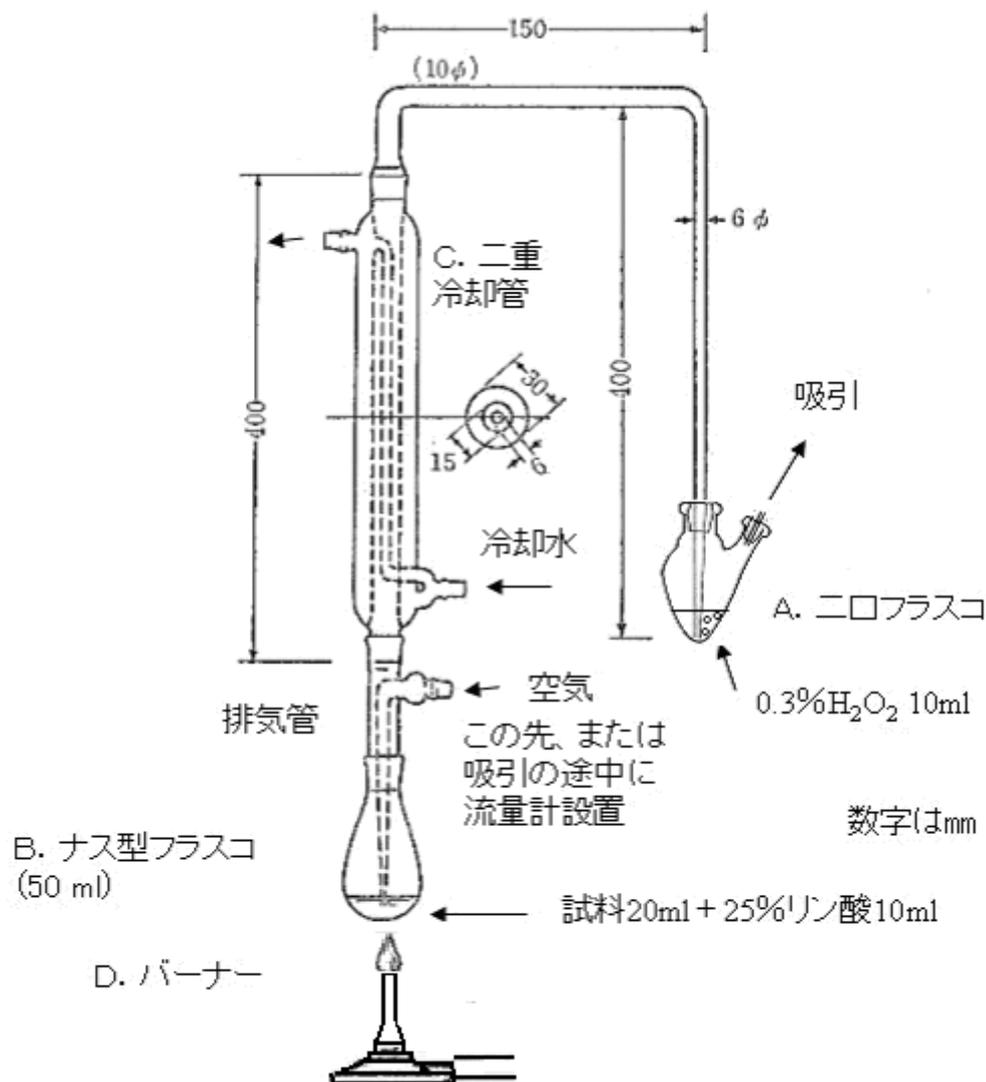


図 亜硫酸測定装置の例

9-16-3 試験操作

A-1) 遊離型亜硫酸定量試験⁵⁾

0.3%過酸化水素水 10 ml をフラスコ(A)にとり、指示薬数滴を加え(紫色になる)N/100 水酸化ナトリウム溶液で緑褐色を呈するまで調製した後、装置に取り付ける⁶⁾。次に検体 20 ml 及び 25%リン酸 10 ml をフラスコ(B)にとり、冷却器の下部に取り付ける。水流ポンプ等により 1000 ml/分程度⁷⁾ で 15 分間吸引する(指示薬は紫色に戻る)。検体の温度は、製造場で果実酒が保存される温度に合わせることが望ましい⁸⁾。フラスコ(A)を取りはずし、水で付着した液を洗い入れ、内容物を N/100 水酸化ナトリウム溶液で緑褐色を呈するまで滴定し、この滴定値を a ml とする。

検体中の遊離型亜硫酸量は次式⁹⁾によって求められる。

$$\text{亜硫酸 (SO}_2 \text{ mg/}\ell) = a \times 0.32 \times 1000 / V \times F$$

V: 検体の採取量

F: N/100 水酸化ナトリウム溶液の力価

A-2) 結合型亜硫酸定量試験

遊離型亜硫酸測定を通気蒸留終了後、遊離型亜硫酸定量と同様に、指示薬を加えて緑褐色に中和した 0.3%過酸化水素水 10 ml を入れたフラスコ(A)を付け替え、フラスコ(B)の検体を静かに煮沸させながら同様に 15 分間吸引した後、A-1)遊離型亜硫酸定量試験と同様に定量する。加熱は実験用ガスバーナーの炎の先端がフラスコ(B)の底部に接触する程度とする。

A-3) 総亜硫酸定量試験

遊離型亜硫酸量と結合型亜硫酸量の和を総亜硫酸量とする。又は、初めから加熱して通気蒸留してもよい。

なお、酢酸の含有量が 1.2 g/ℓ以上の場合、検体に 3%過酸化水素水を数滴添加し、亜硫酸を硫酸に酸化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。

B) 酵素法 (変更無し)

【注意事項】

1) この方法は、我が国ではランキン (Rankine) 法と呼ばれることが多いが、英語圏では Aeration-Oxidation 法や Aspiration 法、「第 2 版食品中の食品添加物分析法」及びその注解にあたる「食品衛生検査指針 食品添加物編 2003」(厚生労働省監修、社団法人日本食品衛生協会) ではアルカリ滴定法、「衛生試験法・注解 2010」(日本薬学会編) の食品添加物試験法では通気蒸留・アルカリ滴定法と呼ばれている。

遊離型亜硫酸は、果実酒等の中で分子状二酸化硫黄 (SO₂) と重亜硫酸イオン (HSO₃⁻) の平衡状態にある。果実酒の pH では、大部分が重亜硫酸イオンであるが、pH が低いほど分子状二酸化硫黄の割合が高くなる。この分析方法の原理は、検体をリン酸で酸性にして遊離型亜硫酸を揮発性の分子状二酸化硫黄にし、通気蒸留でページされたものを過酸化水素 (H₂O₂) で硫酸 (H₂SO₄) に酸化してトラップし、生じた硫酸を中和滴定するものである。結合型亜硫酸は加熱によって遊離型に解離させ、同様に通気蒸留して定量する。

2) 30%過酸化水素水を 1/100 に希釈してもよいが、30%過酸化水素水は劇物であるから、取扱いに注意する。3%過酸化水素水 (オキシドール) は薬局でも購入できる。

3) pH 指示薬のメチル・レッド (酸性で赤、アルカリ性では黄色) にメチレン・ブルー (pH では色が変わらない) を加えて色の変化を見やすくしている。メチル・レッドは溶解しにくく、十分に溶解していない色の変化が分かりにくくなるので注意する。メチル・レッドはナトリウム塩を使用すると 50%エタノール溶液でも溶解しやすい。市販の調製済み混合指

示薬を使用することも可能である。

4) 85% (w/v) リン酸 100 mlを蒸留水 240 mlに添加・混合する。

5) 遊離型亜硫酸のうち、抗菌作用を示す分子状二酸化硫黄の割合は pH が低い程多い。したがって、果実酒等の貯酒管理のために亜硫酸濃度を測定する場合は、遊離型亜硫酸濃度とともに pH を測定する必要がある。亜硫酸臭を避けるには分子状二酸化硫黄が 2 mg/ℓ以下、抗菌作用を確保するために必要な分子状二酸化硫黄の濃度は、報告によって多少はあるが、0.6~0.8 mg/ℓ以上とされている (Rotter)。次表に各 pH で 0.6、0.8、及び 2 mg/ℓの分子状二酸化硫黄濃度になるために必要な遊離型亜硫酸濃度を示す。

表 果実酒の各 pH で所定の分子状二酸化硫黄濃度と
なるために必要な遊離型亜硫酸の濃度

pH	各分子状二酸化硫黄濃度になるために に必要な遊離亜硫酸濃度 (mg/ℓ)		
	0.6 mg/ℓ	0.8 mg/ℓ	2 mg/ℓ
2.8	6	9	22
2.9	8	11	27
3.0	10	13	33
3.1	12	16	41
3.2	15	20	51
3.3	19	26	64
3.4	24	32	80
3.5	30	40	100
3.6	38	50	125
3.7	47	63	157
3.8	59	79	197
3.9	74	99	248
4.0	94	125	312

注) $\text{分子状二酸化硫黄濃度} = \text{遊離亜硫酸濃度} / (1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}_1})$

この表は、20℃の水溶液の場合の $\text{pKa}_1 = 1.81$ を用いている。

pKa は品温、アルコール分、及び塩濃度の影響を受けるが、ブドウ酒の工程管理にはこの値で概ね妥当とされている。

6) 通気蒸留の吹き込み口をフラスコ (A) の底近くまで差し込む。過酸化水素溶液の表面近くに吹き込まれると二酸化硫黄が完全にトラップされずに低く定量されるおそれがある。

7) 500 ml/分程度の弱い吸引では、二酸化硫黄が完全にパージされずに低く定量されるおそれがある。完全に二酸化硫黄がパージされているかは、遊離型亜硫酸 (ピロ亜硫酸カリ

ウムなど)の水溶液を検体に用いて通気蒸留を行った後、新しい過酸化水素溶液を入れたフラスコ(A)を取り付けて再度通気蒸留を行い、有意な量の亜硫酸が検出されないことで確認できる。

8) ビーカー(B)を氷冷する、と記載した実験書も多く、本分析法でも訂正前は「20℃程度であれば室温でよいが、室温が高い場合はフラスコ(B)を氷冷する。」としていた。

しかし、結合型及び遊離型亜硫酸を含む検体で、ビーカー(B)が低温の方が遊離型亜硫酸濃度が低く定量される場合があり、20℃と0℃でも差が認められる。この理由として、①高温の方が結合型亜硫酸の解離速度が早くなるため、②品温によって遊離型と結合型亜硫酸の平衡が変化し、高温の方が遊離型が増えるため、の2つが考えられる。①結合型の解離については、7)で完全に二酸化硫黄がパーズされることを確認した条件で、検体を15分間通気蒸留した後、再度15分間通気蒸留を行って測定される遊離亜硫酸の値を、解離で生じたものと見なして測定値から引くことで概ね補正できる(Burroughs and Sparks, 1964)と報告されている。遊離のアントシアニンやピルビン酸が多い場合は、結合型亜硫酸の解離によって遊離亜硫酸がやや高く測定されることが知られている(Burroughs and Sparks, 1964; Burroughs, 1975)。一方、②の平衡の変化については補正が困難である。したがって、冷蔵保存した検体を分析する場合や、分析室と貯酒庫の室温が著しく異なる場合には、検体を常温に戻したり、フラスコ(B)を果実酒が保存される温度の水を入れたビーカーに漬けたりして、温度を調整する必要がある(Iland et al., 2004)ことから、「検体の温度は、製造場で果実酒が保存される温度に合わせることを望ましい。」と訂正した。その上で、必要な場合は解離の補正を行うことが望ましい。

9) 二酸化硫黄の分子量 64.07 と硫酸が2価の酸であることから、F=1の0.01 N NaOH 1 mlに相当する二酸化硫黄は0.32 mgである。検体を20 ml用いた場合の式は、

$$\text{亜硫酸}(\text{SO}_2 \text{ mg}/\ell) = a \times F \times 16$$

となる。

【文献】

Burroughs, L. F.: Am. J. Enol. Vitic., 26, 25-29, 1975

Burroughs, L. F. and Sparks, A. H.: Analyst, 89, 55-60, 1964.

Iland, P., Bruer, N., Edwards, G., Weeks, S. and Wilkes, E.: Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts, Patrick Iland Wine Promotions, 2004

Rotter, B: www.brsquared.org/wine