

ヨウ素酸カリウム・デンプン試験紙による食品中の亜硫酸検出法の改良

山嶋 裕季子^a, 小川 麻萌^a, 佐藤 絵里^a, 藤原 卓士^a, 小林 千種^a

漂白剤として多くの食品に使用される二酸化硫黄および亜硫酸塩類の検査法のひとつであるヨウ素酸カリウム・デンプン試験紙による定性法は、簡便で感度が良好であるが、低濃度において呈色が始まる時間や陽性・陰性の検出結果にばらつきがある。そこで従来の定性法にマグネティックスターラーによる攪拌操作を加え、試験紙にバレイショデンプンを用いたところ、従来法の検出下限値10 µg (SO₂として)の1/2に相当する5 µgの検出が可能になった。また、当研究科での成績書記載の定量下限値と比べて検出感度が高く、スクリーニング法として有用であると考えられた。

キーワード：漂白剤，二酸化硫黄，亜硫酸塩，ヨウ素酸カリウム・デンプン

はじめに

二酸化硫黄および亜硫酸塩類（以下、亜硫酸と略す）は、乾燥果実、ワインをはじめ多くの食品に使用される食品添加物である。亜硫酸はその残留により漂白、酸化防止、保存の用途で効果を発揮するため、食品の種類によって使用量が設定されている。厚生労働省のホームページの輸入食品等の違反事例¹⁾では、農・水産加工品、乾燥果実、調味料、クッキー等に対する亜硫酸の過量使用の事例が頻繁に報告されており、食品行政上検査の必要性が高い食品添加物の一つである。

食品中の亜硫酸の分析には、改良ランキン通気蒸留装置を用いて亜硫酸をSO₂ガスとして蒸留し、過酸化水素溶液に捕集して生成した硫酸を水酸化ナトリウム溶液で滴定するアルカリ滴定法、SO₂ガスをアルカリ溶液に捕集し、亜硫酸塩として、パラロザニリン-ホルムアルデヒド法により発色させ、吸光度を測定する比色法が汎用されている^{2,3)}。また、衛生試験法には、通気蒸留で1%トリエタノールアミン溶液に捕集したSO₂ガスを、亜硫酸イオン(SO₃²⁻)として陰イオン交換分析カラムを用いて測定するHPLC定量法、およびヨウ素酸カリウム・デンプン試験紙による定性法（以下、定性法と略す）が掲載されている²⁾。

定性法は、試料をリン酸酸性にすることで遊離したSO₂ガスが、水で湿らせた試験紙のヨウ素酸カリウムと反応し、遊離したヨウ素が試験紙のデンプンと反応して藍色を呈する現象を目視で確認する方法であり、簡便かつSO₂として10 µgを検出できる。しかし、亜硫酸含有量が低濃度の場合や、クッキーのように油脂を含む食品では、呈色までの時間にばらつきが生じたり、呈色を示さないことがあり、定性試験としての精度が懸念される。

今回、この定性法による亜硫酸の検出をより確実にを行うためにいくつかの条件検討を行い、良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試薬・試料・装置等

1) **亜硫酸水素ナトリウム**：試薬特級，和光純薬工業（株）製を用いた。亜硫酸水素ナトリウム (NaHSO₃) と二亜硫酸ナトリウム (Na₂S₂O₃) の混合物で、SO₂として64.0～67.4%を含有する。

2) **標準溶液**：衛生試験法・注解²⁾に従い、亜硫酸水素ナトリウム中のSO₂力価を求め、SO₂として100 mg相当量を正確に量り、1%トリエタノールアミン (TEA) に溶かして100 mLとしたものを標準原液とした (SO₂として1,000 µg/mL)。標準原液を1%TEAで5倍に希釈して標準溶液 (200 µg/mL) を調製した。

3) **水**：超純水 (比抵抗値>18 MΩ・cm) を採取後、3時間以内に使用した。

4) **デンプン**：可溶性デンプン (規格一級，ナカライテスク (株) 製) およびデンプン，バレイショ製 (化学用，和光純薬工業 (株) 製) を用いた。

5) **ろ紙**：5C (直径150 mm，アドバンテック東洋 (株) 製) を用いた。

6) **ヨウ素酸カリウム，リン酸，トリエタノールアミン**：試薬特級 (和光純薬工業 (株) 製) を用いた。

7) **コルク栓**：100 mL容三角フラスコの口径に合う9号 (上径27 mm) を使用した。径の小さい面の中央に、ゼムクリップを伸ばして切断し、釣り針型にしたものを垂直に貫通させたものを用いた (図1)。

2. 方法

1) **定性法 (従来法)**：衛生試験法・注解²⁾に従った (図1)。

2) **ヨウ素酸カリウム・デンプン試験紙の調製**：衛生試験法・注解²⁾に従った。デンプン2 gを水約40 mLに懸濁させたものを、電子レンジで沸騰させた水360 mLに攪拌しながら少量ずつ加え、全体を攪拌して液が半透明になるま

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

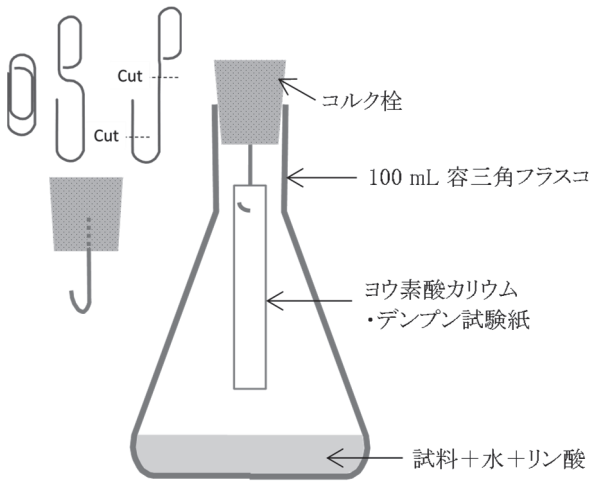


図1. ヨウ素酸カリウム・デンプン試験紙による定性法

でマントルヒーターで煮沸後水冷した。この液の上澄300 mLと0.2%ヨウ素酸カリウム溶液300 mLをステンレス製のバットに入れてよく混和したものに、ろ紙20枚を一枚ずつ浸した。ろ紙が十分に溶液に浸った状態で2~3時間放置後、洗濯干し用ピンチ付きハンガーを用いて重ならないように吊るして暗所で一夜乾燥後、ファスナー付きビニール袋に保管し、必要に応じてカッターナイフを用いて幅1 cm、長さ3~5 cmに切断し、その上部に予め画鋏で穴をあけて用いた。

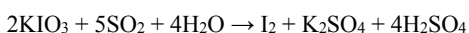
3) 改良定性法：細切した試料10 gを100 mL容の三角フラスコに採り、水10~40 mLを加え、長さ20 mmの攪拌子を入れてコルク栓で軽く栓をしてマグネティックスターラーで3~5分間攪拌 (100 rpm以上) した。試料と水が十分な量から、コルク栓をあけてリン酸約3 mLを加え、時計皿等に滴下した水で下端約1 cmを湿らせた試験紙をコルク栓の釣り針状の部分に吊るして栓をした。試験紙に試料や水が付着しない程度にスターラーの回転を調節し、室温で60分間放置して試験紙の変色を観察した。試験紙の湿潤部分と乾いた部分の境界付近が藍色を呈したものを亜硫酸陽性と判定した。

4) 定量：通気蒸留-アルカリ滴定法 (滴定法)、通気蒸留-比色法 (比色法) または通気蒸留-HPLC法に従った²⁾。

結果及び考察

1. スターラーを用いた効果の確認

ヨウ素酸カリウム・デンプン試験紙の呈色は以下に示す通りであり、発生した I_2 とデンプンにより試験紙上で藍色を呈する²⁾。



試験紙の呈色開始までに要する時間や呈色の濃淡は、フラスコ内の SO_2 ガスの濃度に依存するものと考えられた。従来法ではリン酸を加えて試験紙を吊るした後、放置しているが、同じ濃度の標準溶液または亜硫酸を含む同じ試料でも、呈色に要する時間や呈色の強度に差が認められた。これらの原因として、加えたリン酸と試料の混和の程度に

より亜硫酸が SO_2 として遊離する反応に時間差が生じたり、液相で遊離した SO_2 の気相への移行が、試料成分の存在により妨げられていることが考えられた。また試験時間の短縮のために加温による反応の促進が記されているが²⁾、加温によりフラスコ内に蒸気が発生し、試験紙の全体が湿って呈色が確認できないおそれがある。加熱以外の方法で、試料中の亜硫酸が SO_2 として遊離し、フラスコ内の気相への移行を促進するためには、マグネティックスターラーでの攪拌が有効と考え、検討を行った。

1) 検出下限付近の比較

従来法 (静置) とスターラーによる攪拌を行った場合の検出可能な SO_2 の絶対量を比較した。また試験紙調製にはバレイショデンプンまたは可溶性デンプンを使用し、デンプンの種類による比較も行った。100 mL容三角フラスコに、水25 mL、200 $\mu\text{g/mL}$ の SO_2 標準溶液10~50 μL 、リン酸3 mLを加えて下端を水で湿らせた試験紙を吊るして、静置またはスターラーでの攪拌を行いながら呈色の様子を観察し、初めて呈色が認められた時間を表1に示した。呈色に要した時間にばらつきはあるものの、攪拌した場合、 SO_2 として5 μg の添加条件では2種類のデンプン試験紙 (計6回) すべてで24分以内に呈色を示した。一方、静置した場合、確実に呈色を示したのは添加量が8 μg 以上であり、呈色には24分以上を要した。マグネティックスターラーで攪拌することで、静置した結果と比べてより短時間で感度よく検出することが明らかになった。

SO_2 として5 μg 以下を添加した場合、可溶性デンプン製試験紙では、湿潤部分と乾いた部分の境界面の両脇または片脇に点状の呈色が始まり、境界面に沿って中心へ呈色が伸びていく典型的な挙動を示したのに対し、バレイショデ

表1. 攪拌の有無と試験紙に用いたデンプンの違いによる SO_2 検出時間の比較

添加した SO_2 量 (μg)	試験紙の呈色確認時間(分)*						
	試行	攪拌			静置		
		バレイショ製			可溶性製		
2	47	15	27	—	—	—	
3	16			28			
4	21			24			
5	11	16	16	24	16	17	
2	—			—			
3	—	—	—	—			
4	—	—	—	—			
5	57	—	—	—			
6	16	49	—	—			
8	24	53	25	65			
10	11	17	18	27			

* 試験紙の水で湿らせた部分と乾いた部分の境界面に藍色の呈色が初めに認められた時間

—:陰性(呈色を認めない), 空欄は実施せず

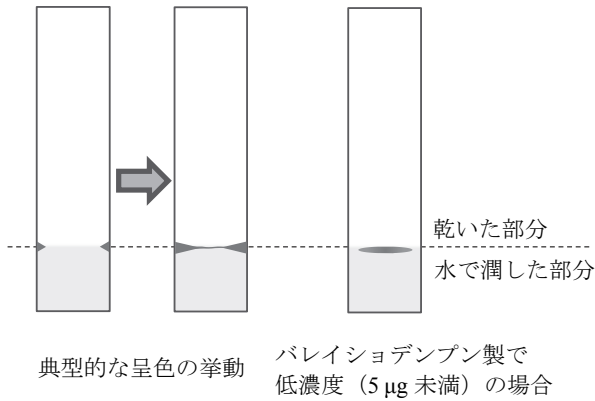


図2. 試験紙における呈色の様子

ンブン製では湿乾境界面の中央から呈色が始まったが、呈色が濃く確認が容易であった(図2)。そこで以後の試験はバレイショデンプン製の試験紙を用いて行うこととした。なお、SO₂添加量が高濃度の場合、バレイショデンプン製の試験紙でも、典型的な呈色挙動を示した。

2) 試験紙の位置の比較

従来法では、試験紙の下端が「溶液の面から約1 cm上方になるように」と記されている。攪拌することで、溶液の飛沫が試験紙に付着してヨウ素デンプン反応を起こし、結果を誤認することが懸念されたため、SO₂として10 µgを添加した条件で、溶液面から試験紙下端までの距離の影響を調べた。試験紙の下端が液面より1, 2, 3, 4, 5 cmとなるように吊るして比較したところ (n=2), 1~3 cmでは2分以内、4 cmで2分前後、5 cmで2分半~3分で呈色したことから、試験紙の位置の影響は少ないものと考えられた。以後、試験紙の下端が液面から2~3 cm程度になるように吊るすこととした。

3) 油を添加しての比較

亜硫酸使用の表示があり、定量法にてSO₂として0.010 g/kg未満を検出するクッキーが、従来の定性法では陰性となる事例があった。ドレッシングやクッキーなど油脂を含む試料では、溶液上部に油膜ができるため、遊離したSO₂の気相への移行を阻害するものと考えられた。そこで液面上部に油膜を作った状態を再現するためにオリーブ油を加えて従来法(静置)と改良定性法(攪拌)での検出を比較した(表2, 試行1)。静置ではSO₂として100 µgを添加した条件でも呈色が認められなかったのに対し、およそ100 rpm(目視で確認)で攪拌した場合はSO₂として50 µgの添加で検出が可能だった。スターラーに回転数表示がないため速度調節および回転速度の数値化は難しいが、液面上部の油膜を巻き込むようにして回転を速め、油膜が絶たれる部分が生ずるようにしたところ、SO₂として10 µgの添加条件で検出された(表2, 試行2)。静置では検出されなかったが、攪拌で検出されたこと、攪拌速度を上げたことでより少ない絶対量まで検出されたことから、スターラーでの攪拌により、油膜層を破壊することで液面と気相の接触面積が増加し、SO₂の気相への移行が促進されたと考えられた。

また、標準溶液ではSO₂の添加量で2 µgが検出できたが

表2. オリーブ油添加時の攪拌の有無によるSO₂検出時間の比較

添加したSO ₂ 量 (µg)	試験	試験紙の呈色確認時間(分)*1				推定残存SO ₂ 量*2 (µg)
		攪拌		静置		
10		—	9	—	—	
25		—	3	—	—	1.3
50		1	1	—	—	13.3
100		2	—	—	—	42.4

*1 試験紙の水で湿らせた部分と乾いた部分の境界面に藍色の呈色が初めに認められた時間

*2 SO₂(添加したSO₂量), 水 25 mL, リン酸 3 mL, オリーブ油 5mLを通気蒸留し, HPLC法で測定した(n=2).

—: 陰性(呈色を認めない), 空欄は実施せず

(表1), 油を加えた場合は10 µgおよび25 µgの検出ができなかった(表2, 試行1)理由の一つとして、油との接触により添加したSO₂の一部が消費されて減少したためと考えられた。そこで、定性法で三角フラスコ内に入れた量と同量の標準溶液、水、リン酸およびオリーブ油を通気蒸留装置に付し、1%トリエタノールアミン溶液に捕集してHPLCで測定したところ(表2, 推定残存SO₂量)、検出されたSO₂量は添加量が少ないほど減少しており、油の添加によりSO₂が消費されたと考えられた。

2. 実試料での定量法との比較

改良定性法での検出下限をSO₂として5 µgとした場合、定性法は、試料10 gについて行うため、試料あたり0.5 µg/g (0.0005g/kg)に相当し、改良試験法は当センターでの成績書記載の定量下限値である0.01 g/kgと比べて十分な感度を示した。

平成26年度および27年度に当センター広域監視部および都保健所から二酸化硫黄の検査依頼のあった試験品の検査結果において、改良定性法と定量法での結果を比較した(表3)。

改良定性法で陰性、定量法で各定量法の定量下限値未満(N.D.)の試験品の中には、亜硫酸使用と表示されているものがあった。これらは原材料での亜硫酸使用が微量であったり、洗浄・加熱等の加工工程で除去されたため試験品に残留していなかったものと考えられた。

改良定性法で陽性、定量法でN.D.であった試験品の中には、定性疑似物質を含む食品である²⁾しょうゆおよびしょうゆを使用した米菓が含まれていた。ハトムギ加工品の呈色は、通常の呈色の色調とは異なり赤紫色を呈していたため、疑似反応であると考えられた。今回の試験品にはないが、ゴマおよびゴマを含む食品で疑似反応が認められる場合がある。一方、ビールおよびこんにゃくの原料に亜硫酸が使用される可能性があるが⁴⁾、加熱等の製造工程で除去されるため、食品表示に記載の義務がない場合があり、微量の亜硫酸の残存も考えられた。寿司ねたえび、味付けくらげ、茹でだこについては、亜硫酸使用の表示があった。

表3. 加工食品における改良定性法と定量値の比較

食品の種類	改良 定性法	定量値 (g/kg)		食品の種類	改良 定性法	定量値 (g/kg)		
		滴定法	比色法			滴定法	比色法	HPLC法
煮豆 (うぐいす豆)	—	N.D.		しょうが酢漬	+		N.D.	
煮豆 (こんぶ豆)	—	N.D.		たけのこ水煮	+		N.D.	
甘納豆	—	N.D.		洋生菓子 (プリン)	+		N.D.	
栗きんとん	—		N.D.	洋生菓子	+		N.D.	
栗甘露煮	—		N.D.	(チョコレートケーキ)	+		N.D.	
漬物 (胡瓜の塩こうじ漬)	—	N.D.		ウエハース	+		N.D.	
野菜加工品 (山芋のジャム)	—		N.D.	ウエハース	+		N.D.	
山菜しょうゆ漬	—	N.D.		クラッカー	+	N.D.		
野菜加工品 (メンマ)	—	N.D.		冷凍むきえび (生)	+		0.005	0.007
野菜加工品 (味付け山菜)	—	N.D.		冷凍むきえび (生)	+		0.017	0.032
ブドウ酢	—		N.D.	ワイン	+	0.13		
唐辛子加工品	—		N.D.	ワイン	+	0.11		
しょうゆ漬 (山菜)	—		N.D.	ワイン	+	0.08		
しょうゆ漬 (山菜)	—		N.D.	ワイン	+	0.08		
焼菓子 (チーズケーキ)	—		N.D.	ワイン	+	0.14		
しょうゆ	+	N.D.		ワイン	+	0.06		
米菓 (歌舞伎揚げ)	+		N.D.	ワイン	+	0.04		
米菓 (歌舞伎揚げ)	+		N.D.	ワイン	+	0.03		
米菓 (歌舞伎揚げ)	+		N.D.	ワイン	+	0.05		
生ビール (非加熱)	+	N.D.		ワイン	+	0.11		
生ビール (非加熱)	+	N.D.		マンゴーワイン	+	0.06		
生ビール (非加熱)	+	N.D.	N.D.	乾燥果実 (キウイフルーツ)	+	0.10		
こんにやく	+	N.D.		乾燥果実 (キウイフルーツ)	+		0.02	
こんにやく	+	N.D.		乾燥果実 (あんず)	+	1.5		
もち (とっぼぎ)	+		N.D.	乾燥果実 (あんず)	+	0.35		
ハトムギ加工品	+		N.D.	乾燥果実 (あんず)	+	0.75		
アンチョビペースト	+		N.D.	果実加工品 (あんず)	+	0.23		
冷凍食品 (寿司ねたえび)	+		N.D.	果実加工品 (あんず)	+	0.11		
魚介加工品 (味付けくらげ)	+	N.D.		生あん (白)	+		0.018	
魚介加工品 (茹でだこ)	+	N.D.		はるさめ	+	0.06		

* : 呈色の色調が赤紫色で通常の色調と異なる

— : 改良定性法陰性 (試験紙の呈色を認めない), + : 陽性 (試験紙の呈色を認める)

N.D. : 定量下限値未満 (滴定法 0.01 g/kg 未満, 比色法・HPLC法 0.004 g/kg 未満, いずれもSO₂として)

いずれも定性法で検出されても定量法で定量下限値未満であり, 検出されたものが亜硫酸であるか疑似反応であるかは判断できなかった。

改良定性法で陽性, 定量法で検出した試験品のうち, 比色法で0.005 g/kgを検出した冷凍むきえびは, 成績書記載の定量下限値 (0.01 g/kg) より低かったため, 「二酸化硫黄を検出しない」という検査結果となった。定量法で検出された試験品はすべて改良定性法でも陽性であり, 改良定性法は高感度のスクリーニング法として有用であると考えられた。

ま と め

食品の漂白剤・酸化防止剤として使用される亜硫酸を

ヨウ素酸カリウム-デンプン試験紙で検出する方法について, バレイショデンプンを用いて試験紙を調製し, フラスコ内をマグネティックスターラーで攪拌することにより, 従来法の1/2の検出下限値 (SO₂として5 μg) を得ることが可能となった。滴定法または比色法で検出・定量された試験品はすべて改良定性法でも陽性であり, 本法は高感度のスクリーニング法として有用であると考えられた。

文 献

- 厚生労働省 : 輸入食品監視業務, 違反事例.
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuo/shokuhin/yunyu_kanshi/ihan/index.html (2017年12月28日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015, 351-359, 2015,
金原出版, 東京.
- 3) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編2003,
12-25, 2003, 日本食品衛生協会, 東京.
- 4) 柴田智美, 青木一浩, 菅根克己, 他：食品衛生研究,
59, 39-44, 2009

Improvement of the Potassium Iodate-Starch Paper Method of Detecting Sulfite in Foods

Yukiko YAMAJIMA^a, Asamoe OGAWA^a, Eri SATO^a, Takushi FUJIWARA^a and Chigusa KOBAYASHI^a

Sulfite is an additive used in various foods as a bleaching agent or antioxidant. The potassium iodate-starch paper method, one of the detection methods for sulfite, is simple and sensitive. However, this conventional method is subject to errors when the sulfite content in foods is low. By stirring samples in a flask with a stirrer bar and using a test paper made from potato starch, a two-fold improvement in the detection sensitivity was achieved. The improved method was considered useful as a screening method.

Keywords: bleaching agents, sulfite, sulfur dioxide, potassium iodate-starch paper

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan