

食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法に関する検討

—アルカリ滴定法における留意事項について—

磯野 真彩^a, 山嶋 裕季子^b, 武森 真由美^b, 佐藤 絵里^b, 大塚 健治^b

「食品中の食品添加物分析法」に記載されている二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（亜硫酸）の分析法のうち、アルカリ滴定法を実際の検査に用いた場合の課題について、留意すべき事項を検証し、改善を図った。通気蒸留装置の加熱装置としてマントルヒーターを用いるとき、亜硫酸を十分に留出するための加熱時間は20分とした。滴定指示薬のメチルレッド・メチレンブルー試液は、滴定時の終点判定の容易さと測定値の正確さから、二つの試薬粉末を直接混合し溶媒で調製した溶液、あるいはそれより低い濃度で調製された市販品を用いることとした。炭酸含有飲料は、炭酸が指示薬の色調に影響することから蒸留時間の設定をあらかじめ強炭酸飲料で検証することとした。アルカリ滴定法を用いた亜硫酸の検査において、検証を行った3点に留意することで、より正確な結果が得られることを示唆した。

キーワード：二酸化硫黄，亜硫酸塩類，漂白剤，アルカリ滴定法，マントルヒーター，メチルレッド・メチレンブルー試液，炭酸飲料

はじめに

二酸化硫黄及び亜硫酸塩類（亜硫酸）は漂白剤，酸化防止剤または保存料として，多くの食品に使用される食品添加物である。その歴史は古く，15-16世紀頃にはワインの保存性を高めるために二酸化硫黄が使用されていた¹⁾。日本でも，大正時代には硫黄燻蒸の技術が福島県のあんぽ柿に利用されていた²⁾。一方，近年はアレルギーの原因物質としての報告もあることから，米国，EU等では，亜硫酸として10 mg/kg以上を含有する食品に表示を義務付けており³⁾，日本でも食品安全委員会添加物専門調査会が調査を行っている⁴⁾。

食品中の定量分析法として令和3年6月24日に改正通知された「食品中の食品添加物分析法」⁵⁾（通知法）にアルカリ滴定法，比色法，参考法として液体クロマトグラフィー（HPLC法）による確認分析法が記されている。アルカリ滴定法は，操作時間が短く，高価な機器や標準品が不要なため，多くの検査機関で採用されている。その概要は，試料中の亜硫酸をリン酸酸性下，窒素ガスを通気しながら蒸留し，気体として過酸化水素溶液に捕集し，生成した硫酸をメチルレッド・メチレンブルー試液（指示薬）の色調変化を利用して水酸化ナトリウム溶液中で中和滴定により含有量を求める方法である。

しかしながら，試験法通りに分析を行っても問題が生じる。そこで，アルカリ滴定法の精度及び再現性向上を目的として，我々が把握している課題のうち3点について検証を行った。得られた知見について写真を用いて報告する。

実験方法

通知法の分析法Aに基づき，以下の方法とした。

1. アルカリ滴定法

1) 試薬・試液

試薬は富士フィルム和光純薬製を使用し，試液の調製法は以下に示す以外は，通知法に従った。シリコン樹脂は1容量を水で5倍に希釈したものを使用した。0.002 mol/L水酸化ナトリウム溶液として，0.01 mol/L水酸化ナトリウム溶液を5倍希釈し用いた。

2) 通気蒸留装置

図1に示した。

加熱器具は，マイクロバーナーの代用として，マントルヒーター（HF-100S），その温度調節に用いる電圧調整器はエレクトロスライダーを用いた。

冷却管は冷却水循環装置を水温4℃に設定した。

3) 試験溶液の調製操作及び定量

(1) 捕集液の調製 フラスコAに0.3%過酸化水素溶液10 mLを入れ，指示薬150 μ L（市販品の場合300 μ L）を加えた。0.002 mol/L水酸化ナトリウム溶液を，溶液の色調が青みの緑（紫から緑に変化する時点）になるまで加え，装置に取り付けた。

(2) 水及び添加する試液の脱気操作 フラスコB-1に水20 mL，エタノール2 mL，リン酸試液2 mLを加え，装置に取り付け，窒素ガスを0.6 L/分の速度で5分間通気し，フラスコ内の液を脱気した。

(3) 試料採取及び試料フラスコの取り付け フラスコB-2に試料，水（空試験）または標準溶液の一定量を精密に量り，(2)のフラスコB-1を外してB-2に中の液を注ぎ速や

^a 当時：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

^b 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

かに装置に手早く取り付けた。

(4) 通気蒸留 予熱したマントルヒーターでフラスコを加熱し（加熱開始を0分とした）、一定の蒸留時間となった時点でフラスコAを装置から外し試験溶液とした。

(5) 測定法 試験溶液及び空試験溶液を0.01 mol/L水酸化ナトリウム溶液で液の色が青みの緑（紫から緑に変化する時点）になるまで滴定し、試験法に記載された式により二酸化硫黄含量を求める。

アルカリ滴定法における検証事例

1. 通気蒸留の加熱におけるマントルヒーターの代用

1) 概要

不十分な加熱では二酸化硫黄が完全に回収されない場合があるため、通知法ではマイクロバーナーを用いる際は10分間加熱することと記されている。マイクロバーナーの他、電気バーナー、マントルヒーター又は水浴を用いて加熱してもよいと記載されている。マイクロバーナーが製造中止となったことから、これらが代用されることが見込まれる。しかし、加熱時間等が試験法に記載されていない。そこで、当センターで採用しているマントルヒーターを用いて再検討し、十分な回収が得られる加熱時間を設定することとした。

2) 方法

前述に従い通気蒸留を行った、通気蒸留開始から10～20分間で試料フラスコに添加した亜硫酸の留出が完了する温度条件を、マントルヒーターの温度設定に用いる電圧調整器のダイヤルを変えながら検討した。亜硫酸の留出量の測定は、アルカリ滴定法に比べて低濃度の検出が可能なHPLCによる定量分析を行った。

(1) 装置：Agilent infinity 1260シリーズ

(2) HPLC条件：既報^{4,6)}に準じた。

(3) 試料溶液の調製 試料フラスコB-2に亜硫酸標準液（1,000 µg/mL標準溶液10.0 mL及び7.0 mL）を取り、エタノール2 mL、リン酸試液10 mLを加えて通気蒸留装置に取り付けた。窒素を通気しながらマントルヒーターで加熱して亜硫酸を留出させ、捕集液の代わりに内径20 mmの試験管に入れた約9 mLの1%トリエタノールアミン溶液に捕集した。5分ごとに分画を採取し、捕集した液を1%トリエタノールアミン溶液で10 mLに定容してHPLC用試験溶液とした。

(4) 留出量の算出 絶対検量線法より亜硫酸の濃度を算出した。

3) 結果及び考察

著者らは、加熱条件を、試料フラスコB-2の内容物が加熱後3分以内に沸騰し始め、かつ加熱30分後においてフラスコ内の液量に著しい減少が生じないこととした。この時のマントルヒーター表面の温度を赤外線照射温度計で測定したところ300±20℃であった。この条件を用いて、蒸留時間の設定を試みた。添加する亜硫酸量は、搬入される試験品の中で含有量の高い食品を参考にした。すな

わち、乾燥果実の使用基準2.0 g/kg（二酸化硫黄として）を1 gを採取した場合に相当する10,000 µg及び果実酒の使用基準である0.35 g/kgを20 g採取した場合の7,000 µgとした。亜硫酸の留出は、いずれの濃度でも初めの5分間で添加量の95%が留出し、15分以降の分画からは0.5 µg/mL以上のピークは検出されなかった。実際に試料を蒸留する場合、採取量が多いと蒸留効率が下がり、留出時間が長くなる傾向がある^{5,6)}。したがって、加熱蒸留時間を、加熱開始から20分とした。ただし、留出に関しては加熱装置だけでなく、加熱温度、窒素ガス流量、冷却水温度及びその他諸々の条件が関与することから、蒸留時間の確認や試料量の調整が個々に必要である。

2. 滴定指示薬に関する調製手順と判定への影響

1) 概要

表1に示すように、通知法では指示薬として（I）メチルレッド及びメチルブルーの試薬粉末を同時にエタノールで溶解し混合した溶液、（II）メチルレッド及びメチルブルーの粉末を各々エタノールで溶解後、使用時に等量ずつ採取し混合した溶液の調製法その他、（III）市販品を用いることができると記載されている。なお、市販品の組成は、添加物公定書⁷⁾において硝酸カリウムの成分規格試験に用いられる「メチルレッド・メチレンブルー混合試液」と同じ組成比である。しかしながら、市販品を用いた際に試験溶液の滴定終点付近の色調が異なるという現象がみられたため、試薬の調製方法から比較検証した。

2) 方法

(1) 指示薬の調製法の比較 表1に示したとおり調製した。転倒混和で溶解しない場合、超音波装置で溶解を促進した。各調製段階の沈殿の有無を比較した。

(2) 試験溶液の滴定における終点付近の色調の比較 実験方法に示すとおりに捕集液を調製した。蒸留操作で留出してくる亜硫酸を過酸化水素で酸化し生じる硫酸の代わりに、0.01 mol/L硫酸を1 mL加えた。0.01 mol/L水酸化ナトリウム溶液を変色点まで滴下し、さらに終点（捕集溶液と同じ色調）まで滴下した。色各段階の溶液を30 mL容のガラス製バイアルに移し、色調を比較した（図5）。なお、通知法での指示薬の使用量は3滴であるが、1滴を50 µLとし、（I）及び（II）は150 µL、（III）は300 µLを使用した。

3) 結果及び考察

(1) 指示薬の調製と沈殿の有無の比較 （I）で調製した場合、試薬は完全に溶解せず、沈殿が認められた（図2及び図4C）。（II）で調製した場合、メチルレッドは完全に溶解せず、沈殿が認められた（図3及び図4F）。一方、これらと比較し、（III）は、沈殿の無い完全に溶解した状態であった。これは、（III）の濃度が（I）及び（II）と比べ、メチルレッドが1/4、メチレンブルーが1/2量に相当するためであると考えられた。

(2) 試験溶液の滴定における終点付近の色調の比較 図

表 1. 指示薬（メチルレッド・メチレンブルー試液）の調製方法

調製法の出典		使用量 (g)		調製方法
		MR* ¹	MB* ²	
(I)	通知試験法 本文	0.2	0.1	MR 及び MB に EtOH* ³ を加えて溶かして 100 mL とする
(II)	通知試験法 注	0.2	0.1	MR に EtOH 50 mL を加えて溶かしたものと及び MB に EtOH 50 mL を加えて溶かしたものを別々に保存し、用時等量混和
(III)	市販品	0.1	0.1	MR0.10 g 及び MB 0.10 g に EtOH(95)* ⁴ を加えて溶かして 200 mL とする
参考	食品添加物公定書	0.1	0.1	MR 及び MB を各々 EtOH(95) 100 mL に溶解した試液の等容量を混和

*1：メチルレッド,*2：メチレンブルー,*3：エタノール (99.5) ,*4：エタノール (95)

表 2. 滴定精度向上のための留意点

(I)	指示薬の保管の適正化	密栓できる容器に保管 使用期限の設定	濃縮・変性による色調変化を防ぐ
(II)	指示薬の適量使用	蒸留後の試験溶液に 追加しない	試験溶液の色調を調整した後の追加による色調変化を防ぐ
(III)	フラスコ A の洗浄方法	予洗浄, アンモニア水 含有エタノールでの洗浄	フラスコ内の指示薬の残存による色調への影響を防ぐ

5のように、(I) 及び (III) の変色点は灰青ないし灰色であり、さらに1～2滴の0.01 mol/L水酸化ナトリウム溶液を添加すると、捕集用液調製時の色調②と同じ終点の色調⑤に変わり、判別が容易であった。一方、(II) の終点⑤に0.01 mol/L水酸化ナトリウム溶液を1滴加える前の色調④は青みがかっており、滴定の過程（③～⑤）の色調の変化が明瞭ではなく、(I) , (III) に比べると判別が困難であった。これに0.01 mol/L水酸化ナトリウムを終点の滴下量より多く加えても、色調の変化は少なく、緑色であった。

これらのことから、調製方法に起因するメチルレッドとメチレンブルーのわずかな比率の違いが、判定時の色調に影響すると考えられ、事前に一定の比率で調製された

(I) 及び (III) の指示薬を用いることで、定量値のばらつきが少なくなることが示唆された。加えて表2に示す3点に留意することで、滴定の精度向上を可能とした。

3. 炭酸飲料における捕集液の色調変化

1) 概要

炭酸を含む飲料を試料とした場合、捕集液の色が亜硫酸を捕集する段階で緑色から紫色に変わったのち緑色に戻ることがあるため、擬陽性と判定するおそれがあった。そこで、亜硫酸の使用表示がない炭酸水及び炭酸と亜硫酸を含むスパークリングワインを用いて色調変化を観察した。

2) 方法

炭酸飲料は20 g採取して実施した（3回試行）。スパークリングワインは0.01 mol/L水酸化ナトリウムの滴定量が

ビュレットの容量10 mLの範囲に収まるよう採取量を10 gとした（3回試行）。指示薬は市販品300 μ Lを用い、以降は実験方法に従って操作した。炭酸飲料については、蒸留時における捕集液の変化を観察した。スパークリングワインについては、アルカリ滴定により亜硫酸含有量の定量を行った。

3) 結果及び考察

炭酸飲料を加熱開始後12から16秒で試験溶液の色調は緑色から紫色に変わり、4分30秒から4分50秒で紫色から緑色に戻った（図6）。スパークリングワインを加熱後の試験溶液は亜硫酸表示のない炭酸飲料と同じ挙動を示したが、4分50秒を過ぎても紫色から変化がなかった。20分以降フラスコAを取り換えて5分間色が変わらなかったことから、試料中の亜硫酸の留出が20分以内に完了したと確認できた。定量値は、0.093, 0.093, 0.091 g/kgであった。

亜硫酸を含有しない炭酸飲料では、炭酸ガスが窒素ガスとともにいったん捕集液に溶け込むことで指示薬の色が酸性を示す紫色となった。溶解度の低い窒素ガスが継続して通気されることで、より溶解度の高い炭酸が捕集液から留出し、酸性から初期の液性に戻り緑色になったと推察した。一方、亜硫酸を含むスパークリングワインでは、亜硫酸ガスとの反応で生じた硫酸と炭酸ガス由来の炭酸による色調変化が同時に起こるため、炭酸ガスが抜けた後も色調が紫色から緑色にならなかったと考えられた。炭酸ガスと亜硫酸を含む飲料等では、予め亜硫酸表示のない強炭酸飲料を用いて、捕集液から炭酸が窒素ガスの通気によってすべて抜け切る時間を確認して蒸留時間を設定すると、炭酸ガスによる誤差・誤認を防ぐこ

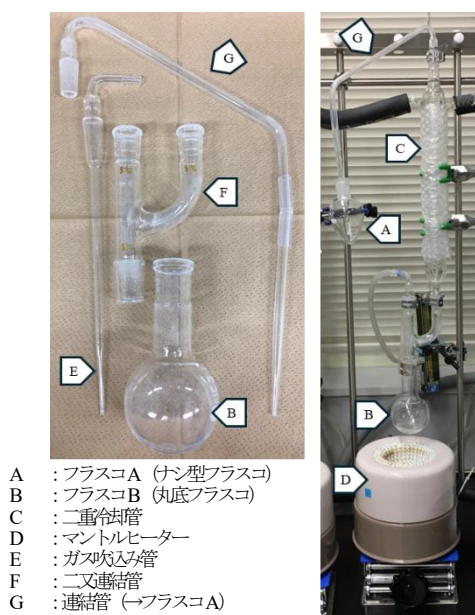
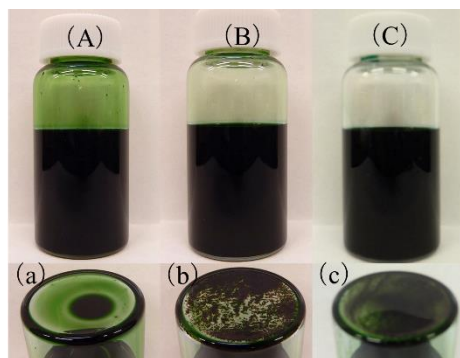
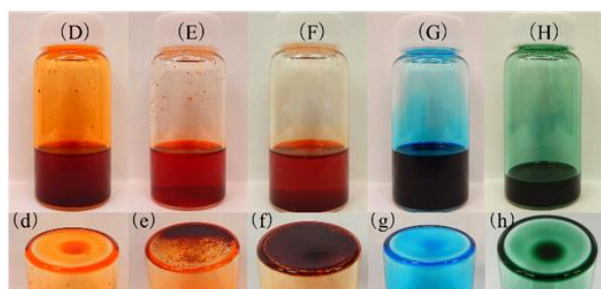


図1. 通気蒸留装置



(A) 転倒混和直後 (a)(A)をゆっくり逆にした
 (B) 転倒混和後5分放置 (b)(B)をゆっくり逆にした
 (C) (B)を超音波洗浄器で5分間処理後5分間放置
 (c)(C)をゆっくり逆にした

図2. 通知試験法 本文の方法 (I) で調製した指示薬の様子



(D) メチルレッドにエタノールを加えて溶かし、転倒混和した直後
 →(d) ゆっくり逆にした
 (E) (D)を5分間静置 →(e) ゆっくり逆にした
 (F) (E)を超音波洗浄器で5分間処理後、5分間静置
 →(f) ゆっくり逆にした
 (G) メチレンブルーにエタノールを加えて溶かし、転倒混和後5分静置
 →(g) ゆっくり逆にした
 (H) (F)と(G)の上澄みを等量混和
 →(h) ゆっくり逆にした

図3. 分析法 注の方法で調製した指示薬の様子



(左) 図2 (C) から3時間後
 デカント後の容器の底の様子
 (右) 図3 (F) から3時間後
 デカント後の容器の底の様子

図4. 指示薬の沈殿の様子



① 0.3%過酸化水素溶液に指示薬を添加したもの
 ② 5倍希釈した0.01 mol/L水酸化ナトリウムを添加したもの
 ③ 0.01 mol/L硫酸を添加したもの (蒸留後の状態)
 ④ 変色点 ⑤ 終点

図5. 指示薬の違いによる試験溶液の色調の比較



図6. 炭酸飲料蒸留中の色調変化

とができることが示唆された。

ま と め

食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の試験法として国内で広く採用されているアルカリ滴定法において、実際の検査で様々な課題が発生する。その中から今回は、3点について、検証を行った。

1. 加熱装置としてマントルヒーターを使用する際の亜硫酸の留出状況から、加熱時間を20分とした。
2. メチルレッド・メチレンブルー試液は、濃度により色調変化が微妙であり、試薬粉末を直接混合し溶媒で調製した溶液、あるいはそれより低い濃度で調整された市販品を用いることとした。
3. 炭酸ガスを含有する飲料を検査する際は、捕集液に溶け込んだ炭酸が液性に大きく影響するため、あらかじめ強炭酸飲料を用いて炭酸ガスの抜け切る時間を確認したのち加熱時間を設定する必要がある。

アルカリ滴定を行う際に、以上のことに留意することで、より正確な検査が可能となることを示した。通知法を日常検査に用いる際に、留意事項までは十分に記載されておらず、現場で判断に困る事項は多い。把握している課題を検証し、その情報をフィードバックすることで、関連機関における再現性の高い検査の実施に寄与できると考える。

文 献

- 1) 湯目英郎：ワイン，吉田 淑編，酒の科学，117-118，1995，朝倉書店，東京。
- 2) 上田明子：一般社団法人JA共済総合研究所・共済総研レポート，**159**, 2-7, 2018.
- 3) 消費者庁食品表示課：諸外国における食物アレルギーの表示対象品目等に関する調査事業報告書，令和7年3月28日。
- 4) 食品安全委員会添加物専門調査会：第201回添加物専門調査会資料，添加物評価書「亜硫酸塩類等（亜硫酸ナトリウム，次亜硫酸ナトリウム，二酸化硫黄，ピロ亜硫酸カリウム，ピロ亜硫酸ナトリウム）及び亜硫酸水素アンモニウム水」（案），令和7年3月，<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrieveId=kai20250310te1&fileId=110>（2025年7月23日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある）
- 5) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長，厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長：薬生食基発0624第1号，薬生食監発0624第1号，「食品中の食品添加物分析法」の改正について（通知），令和3年6月24日。
- 6) 鈴木裕司，芳賀晋一，須釜久美子他：福島県衛生研究所年報，**33**, 46-49, 2015
- 7) 厚生労働省：厚生労働省告示第29号，「食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件」，令和6年2月6日，https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuten/kouteisho10e.html（2025年8月22日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある）

Examination of Sulfur Dioxide and Sulfites in Food
—Considerations in Alkaline Titration Method—

Maaya ISONO^a, Yukiko YAMAJIMA^b, Mayumi TAKEMORI^b, Eri SATO^b and Kenji OTSUKA^b

The “Methods for Analyzing Food Additives in Foods” (amended by Ministry of Health, Labour and Welfare Notification on June 24, 2021) describes the alkaline titration method for analyzing sulfur dioxide and sulfites (sulfurous acid). However, when applying this method, we encountered practical challenges and introduced improvements to resolve them. We used a mantle heater for the aeration distillation apparatus and set the heating time to 20 min to ensure sufficient distillation of sulfurous acid. For the titration indicator (methyl red/methylene blue), we used either a mixture prepared by directly combining the reagent powders in a solvent or a commercially available product containing both reagents; both approaches provided a clear endpoint during titration and ensured accurate measurements. Finally, because carbon dioxide affects indicator color, we verified the distillation time for carbonated beverages in advance using a strongly carbonated sample. These three modifications enable reliable results when applying the alkaline titration method for sulfurous acid testing.

Keywords: sulfur dioxide, sulfites, bleaching agents, alkaline titration method, mantle heater, methyl red-methylene blue reagent, carbonated beverages

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health