

果実中の残存亜硫酸の測定

大村, 浩久
九州大学農学部食糧化学教室

副枝, 紘一郎
明治乳業株式会社

山藤, 一雄
九州大学農学部食糧化学教室

<https://doi.org/10.15017/22961>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 22 (2), pp.131-149, 1966-04. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

果実中の残存亜硫酸の測定

大村 沿久・副枝絃一郎*・山藤 一雄

Determination of sulfite remaining in fruits

H. Omura, K. Soeda and K. Yamafuji

前報^{3,4}に示したように亜硫酸塩はリンゴ、馬鈴薯あるいはエビなどの褐変を防ぎ、また柿の渋味を除くことも出来る。このほか味噌などの漂白剤や酸味をもつ野菜、果実などの防腐剤としても利用されている。このように亜硫酸塩は各種の食品に添加されて種々の効果を発揮するが、たとえば大気汚染の問題などから明らかに衛生上問題があつて食品への添加も避けることが望ましいのは当然である。しかし普通に使用される量では毒性は殆んど認められないといわれており現在では食品への添加量が法律によつて制限されているに過ぎない。従つて亜硫酸塩がどんなにすぐれた効果を示すとしても少なくともこれを無制限に食品に用いることは許されずその残存量を測定して常に規定量以下に保持しなければならない。そこで我々は SP 処理を試みたリンゴおよび柿について残存亜硫酸の測定法を検討した。

実験および結果

亜硫酸の比色定量法

亜硫酸の測定法についてはこれまで滴定法、比色法など種々の方法が提案されているが、食品には少量の添加しか許されておらずしかも果実表面あるいは果汁の中ではさらに分解される可能性も考えられ、微量の亜硫酸を対象とするので比色法の利用を先ず検討した。そこで我々は fuchsin-aldehyde 試薬を用いる West ら⁵の方法を試験した。これは triphenylmethane 系の色素である fuchsin が亜硫酸で還元されて無色の leucosulfonic acid になる。これと aldehyde とが反応して生ずる色素ははじめの fuchsin そのものではなくて色調は異なつており亜硫酸陽性反応では生じた色素は赤味ないし青味を帯びた紫色である。

0.04 % rosanilin-HCl 溶液：原報に従つて rosanilin-HCl 塩 1 % 水溶液 4 ml と濃 HCl 6 ml とを混

合し H₂O を加えて 100 ml とした。この試薬は H₂O に比較的とけにくいので 0.04 g の rosanilin-HCl 塩を適当量の H₂O にとかし、これに濃 HCl 6 ml を加え最後に H₂O で全容量を 100 ml とした方がよい。Rosanilin-HCl 塩の水溶液は鮮紅色であるが濃 HCl を加えると黄色になる。調製後少なくとも数時間放置してから使用することが望ましい。West らによると rosanilin については 0.02 % ないし 1 %, HCl については 6 % ないし 12 % が適当であるが前者では 0.04 %, 後者では 6 % が最も望ましいので我々もこの条件に従つた。

0.2 % formaldehyde：原報によると 0.1 % ないし 1 % の範囲で利用され、とくに 0.2 % が最もよいといわれているのでこれに従うこととし市販試薬 formalin を適当に H₂O で希釈して調製した。

試料 10 ml に rosanilin-HCl 溶液 1 ml および formaldehyde 溶液 1 ml を加えて放置すると鮮やかな赤紫色を呈した。West らはこの着色液を 560 m μ で測定しているがその吸収スペクトルは第 1 図に示すように 580 m μ に最大吸収があるのでこの波長で測定した。

発色は比較的すみやかであつて試薬添加後 5 分で既に一定の値に達しかなりの期間安定である。しかし

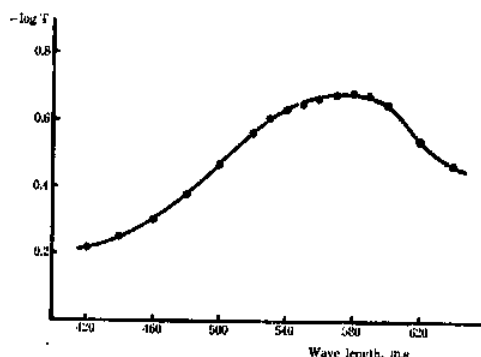


Fig. 1. Absorption spectrum of color.

* 勤務先：明治乳業株式会社

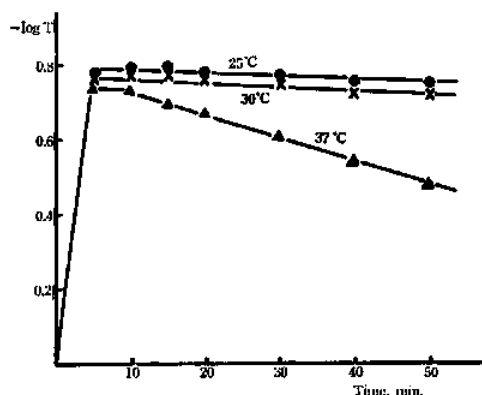


Fig. 2. Change of color intensity at various temperature. Optical density ($-\log T$) was estimated at 580 mμ.

発色は少なくとも室温以下で行うべきであつて、第2図から明らかなように 37°C ではかなりすみやかに褪色する。

そこで $10^{-5}M$ ないし $4 \times 10^{-5}M$ の範囲に亘つて 10ml Na_2SO_3 溶液に rosanilin-HCl 溶液および formaldehyde 溶液それぞれ 1 ml を加え室温で発色させ、30 分後その吸光値を日立分光光度計 EPU-2 型 10 mm セルを用い 580 mμ で測定した。測定の対照としては Na_2SO_3 の代りに H_2O 10 ml に同様に試薬を添加したものを用いた。第3図から明らかなようにこの範囲に亘つて呈色の強さは Na_2SO_3 の濃度と直線関係を示した。 $4 \times 10^{-5}M$ 以上でも引続いて直線関係を保つことが推定されるが吸光値が高いので試料を H_2O で適当に希釈したのちに発色しなければならない。

リンゴの褐変防止あるいは渋柿の処理には我々も藤井⁷⁾によつて開発されたいわゆる SP 剤を使用した。これは Na_2SO_3 水溶液にオルソ磷酸を加えてその pH を 5.5 に調節したものである。発色試薬は 6% HCl 酸性であるので磷酸による酸度の影響は殆どないものと考えられるが念のために試験した。 $10^{-3}M$ SP を種々の量にとりそれぞれ 25 ml に H_2O で希釈しその 10 ml について発色させた。一方対照として同じ濃度の Na_2SO_3 水溶液を同様に発色させてその吸光度を比較したが第4図からみられるように磷酸の影響は殆ど認められなかつた。従つてリンゴあるいは渋柿の処理に SP を用いても残存亜硫酸の測定には別に支障はない。

リンゴ果汁中の亜硫酸の比色定量

リンゴの果実に附着している亜硫酸の量を比色法に

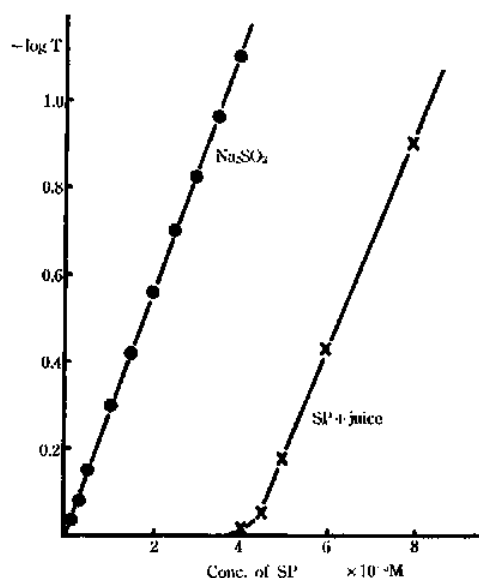


Fig. 3. Coloration of Na_2SO_3 solution and SP in apple juice.

Na_2SO_3 (—●—): 10ml Na_2SO_3 solution + 1ml rosanilin-HCl + 1ml formaldehyde
SP + juice (---×---): 10ml SP containing 1 ml apple juice + 1ml rosanilin-HCl + 1 ml formaldehyde.

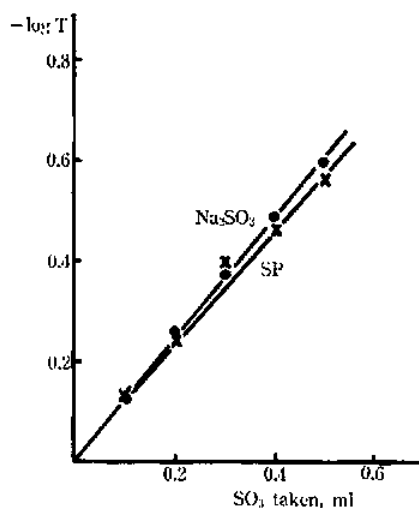


Fig. 4. Coloration of Na_2SO_3 and SP.

An aliquot of $10^{-3}M$ Na_2SO_3 or SP solution cited was diluted to 25 ml with H_2O . Into 10 ml of the solution, 1 ml rosanilin-HCl and 1 ml formaldehyde were added.

よつて定量するには先づこれを適当に H_2O で抽出しそれについて発色させなければならない。従つてこのような呈色にリンゴの抽出果汁が影響しない場合にのみ測定に利用出来る筈である。一般にリンゴ果汁中の諸成分を比色法で測定する場合には果汁の相変にもとづく吸光度の測定誤差も考慮されなければならない。しかし亜硫酸の場合には前報のように亜硫酸によつて相変は抑制され、さらに *rosanilin*-HCl 溶液は強酸性であるので果汁調製後すみやかに試薬を添加すればこれによつても相変は防止されるので問題とするには及ばない。

素早く剥皮したリンゴの果肉 10 g を Waring blender を用いて 40 ml H_2O に 30 秒間磨砕懸濁しすみやかに吸引濾過して抽出液を調製した。種々の量の $10^{-4}M$ SP にこの抽出果汁 1 ml 宛を添加しさらに H_2O で全量 10 ml とし室温に約 60 分間放置したのち試薬を添加して発色させた。リンゴ果汁への SP の添加量と発色度との関係を純溶液でのものと比較するために同じく第 3 図に示したが、SP の添加量 4.4×10^{-5} 以上では $580 m\mu$ での吸光度は SP の量と直線関係を示し、しかもこの直線はリンゴ果汁を加えない Na_2SO_3 溶液での標準直線と平行関係にあつた。しかし前報に示したように SP はリンゴの果実中に含まれている *phenol* 性物質等と反応することが推定されるのでリンゴ果汁中に検出される亜硫酸の量は添加した量よりも減少していることは当然考えられる。従つてリンゴ果汁中に残存する亜硫酸の量は呈色液の吸光値に対応する純溶液での標準直線から求められ、標準ならびに果汁含有両直線の間隔は SP と反応する諸成分の量を示しリンゴの種類、状態あるいは果汁の濃度などに影響されるものと推定される。いずれにしてもこの両直線が平行関係にあることはリンゴ果汁に SP を添加した場合、充分に反応すれば残存する亜硫酸は果汁中の他の成分によつてもはや妨害されることなく *rosanilin*-HCl-formaldehyde 試薬によつて発色することを示す。

異つた個体から別々に調製した SP 含有リンゴ果汁についてその 1 ml および 2 ml をそれぞれ 10 ml に H_2O で稀釈し常法通り発色させてその吸光度を測定した。

第 1 表に示すように各発色液の $580 m\mu$ の吸光度はリンゴ果汁の濃度に関係なく亜硫酸の残存量とほぼ比例関係をもつことも確められた。

柿の抽出液と *rosanilin*-HCl-formaldehyde 試薬

渋柿を SP で処理すれば *tannin* が不溶性となるの

Table 1. Coloration apple juice containing SP.

Apple juice		A	B	C	D
OD ₅₈₀	1 ml 2 ml	0.116 0.246	0.087 0.171	0.167 0.327	0.312 0.610

Each 1ml or 2ml of different apple juice containing SP was filled up to 10ml with H_2O . Into the diluted juice, 1ml of *rosanilin*-HCl and 1ml of formaldehyde were added to coloration.

で沈抜きが可能となるが亜硫酸の残存量は許容量以下でなければならないことは当然である。そのため亜硫酸の残存量を測定する必要から *rosanilin*-HCl-formaldehyde 試薬による比色法が柿にも適用されるかどうかを検討した。

皮を剥いだ渋柿の果実を 4 分しその 1 つを $10^{-2}M$ SP に 30 分間浸漬したのち水洗し、100 ml H_2O に常法通り Waring blender で磨砕懸濁した。液はリンゴに比べて粘稠であつて濾過が困難であるので、5,000~6,000 r.p.m. で 20~30 分間遠心分離して抽出果汁を調製した。この抽出液を常法通り *rosanilin*-HCl-formaldehyde 試薬で発色させたところ Na_2SO_3 溶液あるいは SP 含有リンゴ果汁の場合とは異つて青紫色を呈した。その吸収スペクトルは第 5 図に示すように $590 m\mu$ に最大値を示した。しかもしばらく放置すると沈澱を析出しさらに加熱によりこの沈澱の生成は促進されることが観察された。

また念のために同一の渋柿果実から SP 処理をせず調製した水抽出液に呈色試験を加えたところ同じように青紫色に発色し $590 m\mu$ に極大値をもつ類似のスペクトルが観察された。このことは渋柿の抽出果汁自身が *rosanilin*-HCl-formaldehyde 試薬と反応して青紫色を呈することを示すものであつて SP 処理によつて吸収の値は多少増大するけれども、吸収スペクトルから明らかなように亜硫酸による発色は渋柿の成分によつて妨害される。

この場合亜硫酸の含有量が少ないためにその発色が現われにくいことも考えられる。そこで渋柿の水抽出液を常法通り調製し、この 25 ml に $10^{-3}M$ および $10^{-4}M$ となるように SP を加えて 40 倍に稀釈したのち発色したが勿論いずれも青紫色を呈した。しかしその吸収スペクトルは第 6 図に示すように $10^{-4}M$ では $580 m\mu$ 、 $10^{-3}M$ では $570 m\mu$ と SP の量に応じて吸収極大の位置は短波長の側に移動した。

一方甘柿を SP 処理した場合その抽出液ではリンゴの場合と同様に *rosanilin*-HCl-formaldehyde 試薬に

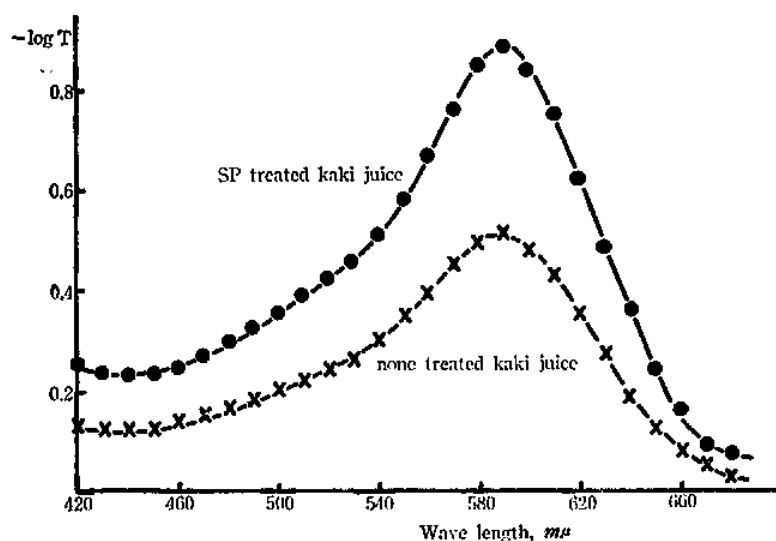


Fig. 5. Coloration of kaki juice with rosanilin·HCl-formaldehyde reagent.

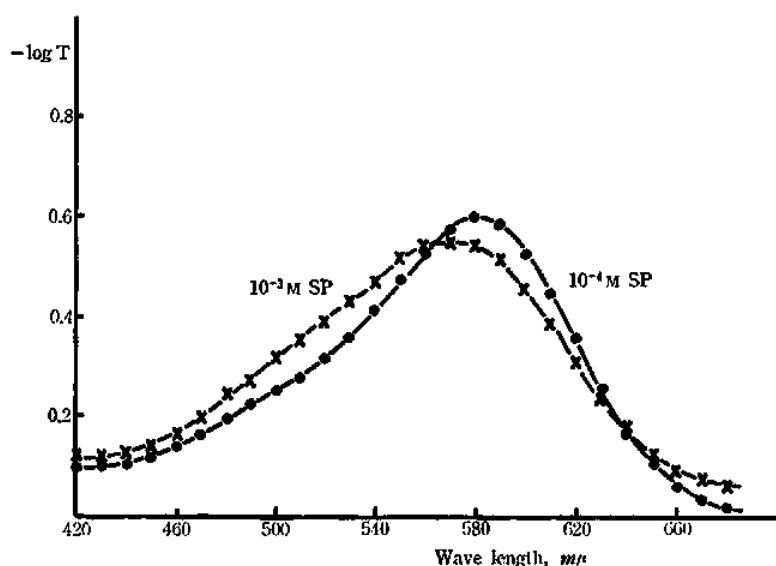


Fig. 6. Coloration of mixture of SP and kaki juice with rosanilin·HCl-formaldehyde reagent.

よつて赤紫色を呈した。従つて rosanilin·HCl-formaldehyde 試薬による青紫色の呈色は渋柿に特有のものと思われるのでこのような試薬の影響をさらに検討した。

銅皮した渋柿および甘柿それぞれ半個約 75 g から 100 ml 宛 H₂O で抽出液を調製し rosanilin·HCl-formaldehyde 試薬を第 2 表に示すように添加しその色の变化および沈澱の生成等を観察した。

渋柿の抽出液は灰白色をしているが甘柿のものは黄橙色であつて粘度も高かつた。Rosanilin·HCl あるいは formaldehyde 溶液をそれぞれ単独に加えると渋柿甘柿の区別はなくとも赤橙色または黄橙色を示すが両試薬を加えると上述のように渋柿では青紫色を呈し甘柿では赤紫色に発色した。甘柿でも SP 処理をしていないにも拘らず亜硫酸と同様に赤紫色を呈しさらに tannic acid も全く同様に赤紫を呈することが確

Table 2. Effect of kaki juice on rosanilin-HCl-formaldehyde reagent.

Kaki	Astringent				Sweet			
Juice, ml	10	10	10	10	10	10	10	10
Rosanilin-HCl, ml	0	1	1	0	0	1	1	0
Formaldehyde, ml	0	1	0	1	0	1	0	1
H ₂ O, ml	2	0	1	1	2	0	1	1
Color	light gray	blue-violet	reddish orange	yellowish orange	yellowish orange	red-violet	reddish orange	yellowish orange
Precipitate	—	卅	±	±	—	—	—	—

められた。

5% tannic acid 水溶液を種々の量にとり H₂O を加えて 10 ml としこれに発色試薬を加え生じた赤紫色の強さを亜硫酸の場合と同様に 580 mμ で測定した。

Table 3. Coloration of tannic acid with rosanilin-HCl-formaldehyde reagent.

5% Tannic acid, ml	0.25	0.5	1.0	2.0	5.0
H ₂ O, ml	9.75	9.5	9.0	8.0	5.0
OD ₅₈₀	0.135	0.235	0.415	0.725	1.30

Into 10 ml of tannic acid, 1 ml of rosanilin-HCl and 1 ml formaldehyde were added. Intensity of red-violet color developed was estimated at 580 mμ.

こうして rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬による亜硫酸の比色定量は渋柿だけでなく甘柿の抽出液によつても妨害されることが明らかになったが、この試薬によつて渋柿では青紫色、甘柿では赤紫色を呈することは興味深い。そこで種々の状態の脱渋過程にある渋柿について発色試薬との挙動を試験した。

自然に熟した渋柿の果実、alcohol 処理によつて脱渋途中のものおよび剥皮して約 10 日間常法によつて干柿を作りかけているものからそれぞれ H₂O で抽出液を調製したところ、渋柿の新鮮果実から得た灰白色のものとは異つていずれも黄橙色であつて甘柿の抽出液の色に類似している。さらにこれらの抽出果汁に rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬を加えると甘柿の場合と同様に皆赤紫色を呈した。しかし脱渋は充分ではなく果汁はまだかなりの渋味を残していた。

Table 4. Coloration of astringent kaki juice of various states with rosanilin-HCl-formaldehyde reagent.

Kaki	Flesh		Matured		Alcohol-treated		Under drying	
Reagent	—	+	—	+	—	+	—	+
Color	light gray	blue-violet	yellowish orange	red-violet	yellowish orange	red-violet	yellowish orange	red-violet
Precipitate	—	卅	—	—	—	—	—	—

Polarography による亜硫酸の定量

上述のように rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬による亜硫酸の比色定量法はリンゴについては利用出来るが柿には適用出来ないことは明白である。このように植果実の成分によつて類似の発色が起こるいは発色が阻止されるなど測定が妨害される場合には他の方法を検討しなければならない。

その一つとして polarography が考えられる。測定条件を適当に選べば物質に特有の polarogram が得られ不純物の妨害から免れる可能性がある。さらに Kolthoff, Miller²⁾ が亜硫酸は強酸性では典型的な polarogram を与え拡散電流はその濃度に比例すると報告しているように定量の可能性も期待される。そこで我々は柳本交直 polarograph PA 102 型を用いて亜硫酸の定量について検討した。

10⁻³M Na₂SO₃ 6 ml または 3 ml を pH 3 の McIlvaine 緩衝液 (10⁻⁴M citric acid ~ 2×10⁻⁴M Na₂HPO₄) 5 ml に加えさらに H₂O で全量 15 ml として測定に用いた。あらかじめ 3 分間 N₂ gas を通じ水銀は 3 秒に 1 滴程度滴下した。この条件で第 7 図に示すように Na₂SO₃ の典型的な polarogram が得られ、-0.7 volt 附近に半波電位が観測され Na₂SO₃ の濃度に応じて波高は高くなった。

亜硫酸処理には SP として H₃PO₄ で pH を 5.5 に調節した Na₂SO₃ 溶液を用いている。そこで電解液の pH を McIlvaine 緩衝液の代りに H₃PO₄ で調節した。即ち H₃PO₄ で pH を 3 に調節し終濃度を 10⁻²M および 10⁻³M とした Na₂SO₃ 溶液についてその polarogram を測定し第 8 図に示した。この場合にも -0.67 ~ -0.70 volt 附近に半波電位をもつ

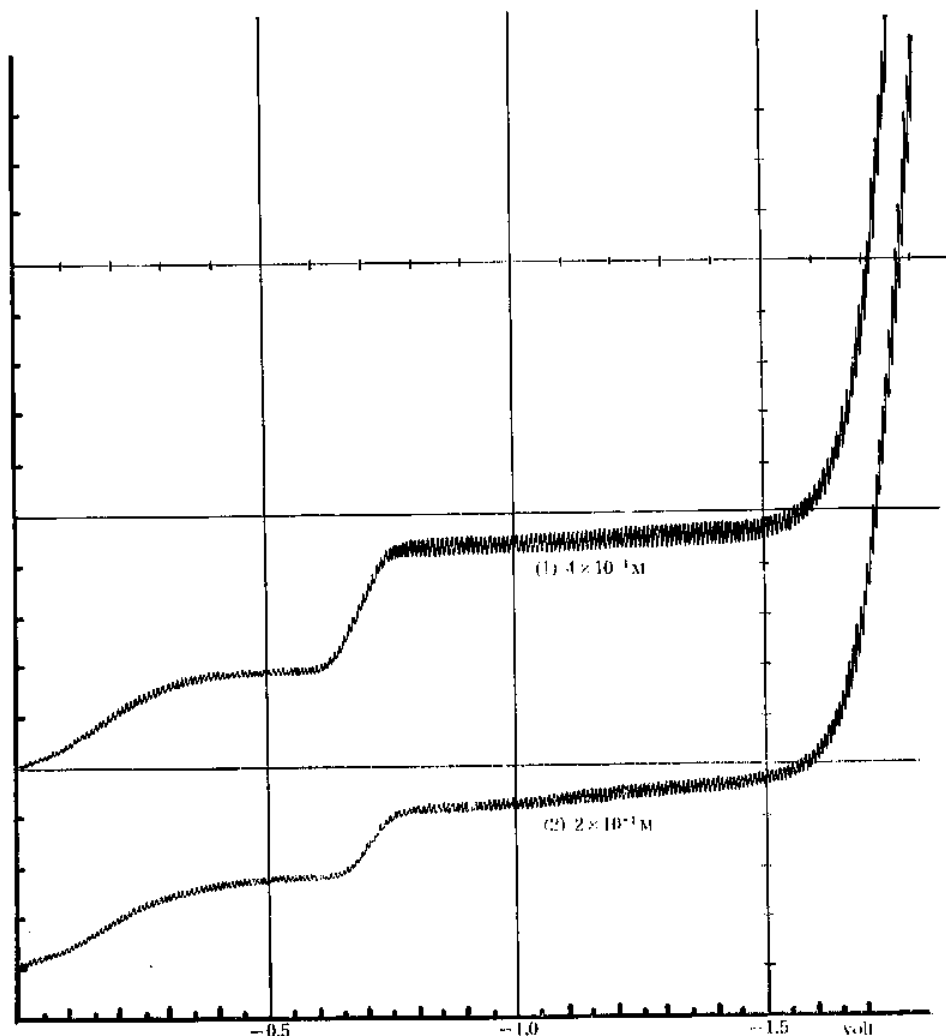


Fig. 7. Polarogram of Na_2SO_3 acidified with McIlvaine buffer.

- (1) 10^{-3}M Na_2SO_3 6 ml, McIlvaine buffer (pH 3) 5 ml, H_2O 4 ml.
 (2) 10^{-3}M Na_2SO_3 3 ml, McIlvaine buffer (pH 3) 5 ml, H_2O 7 ml.

polarogram が得られたが電解液に支持電解質を殆ど加えていないためか polarogram は -0.7 volt を僅かに越えたところに極大波が認められた。さらに波高も濃度に応じて大きくなる傾向はあるが完全な比例関係を保持するには至っていない。

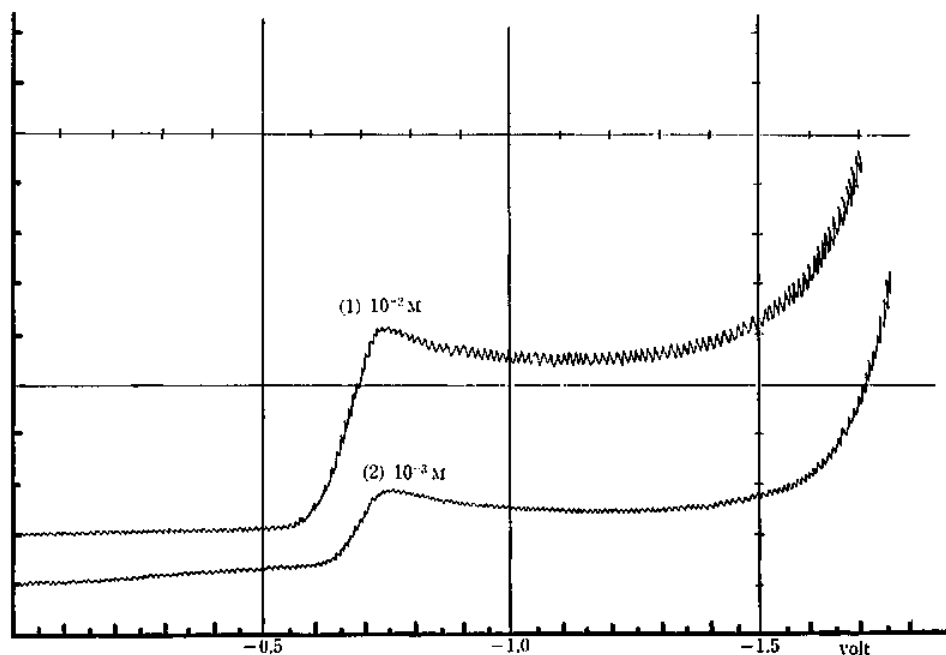
従つて次に種々の Na_2SO_3 濃度で McIlvaine 緩衝液 5 ml によつて pH を 3 に定めた 15 ml の電解液を調製して polarogram を測定した。第 9 図に示す polarogram の測定は大部分 sensitivity 0.004 で行なつたが一部は 0.002 で行なつた。そのため波高と濃度との関係を求めるに際し使用した機器について実

測により補正値を求めた。第 9 図の polarogram から求めた Na_2SO_3 と波高との関係を第 5 表および第 10 図に示す。

こうして第 10 図に示すように Na_2SO_3 の濃度と polarogram の波高とは殆んど直線関係にあることが明らかになつた。従つて測定された polarogram から波高を求めればそれに応じて Na_2SO_3 の濃度を求めることが可能となりその検出最低限界はこの測定条件で 10^{-4}M 程度にあつた。

洗柿抽出果汁中の亜硫酸の polarogram

このように亜硫酸は pH 3 の酸性で明瞭な polaro-

Fig. 8. Polarogram of Na_2SO_3 acidified with phosphoric acid.

- (1) 10^{-2} M Na_2SO_3 adjusted to pH 3 with phosphoric acid.
 (2) 10^{-3} M Na_2SO_3 adjusted to pH 3 with phosphoric acid.

Table 5. Relation wave height of polarogram and concentration of Na_2SO_3

McIlvaine buffer, ml	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Na_2SO_3 , ml	10^{-2} M				2×10^{-3} M							
H_2O , ml	9	7.5	6	5	10	8	6	5	4	3	2	1
Conc. of Na_2SO_3 , $\times 10^{-4}$ M	12.0	10.0	8.0	6.7	6.7	5.3	4.0	3.3	2.7	2.0	1.3	0.7
Sensitivity	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.002	0.004	0.002	0.002	0.002
Estimated wave height, cm	10.1	8.1	6.5	5.6	5.6	4.55	3.5	5.05	2.1	2.35	1.65	0.58
Corrected wave height, cm	10.1	8.1	6.5	5.6	5.6	4.55	3.5	2.62	2.1	1.21	0.85	0.30

sensitivity factor estimated : $0.004 : 0.002 = 1 : 1.93$

gram を与えるが、濃縮抽出液の polarogram が亜硫酸のものとはつきり異なっており、抽出液中の亜硫酸の検出さらにその測定が可能になる。

剥皮した濃縮半個約 75 g から常法通り 100 ml H_2O で抽出果汁を調製し、酸性、中性およびアルカリ性で polarogram を測定した。電解液は果汁 10 ml, 6.7×10^{-2} M 緩衝液 4 ml, 2×10^{-2} M Na_2SO_3 または H_2O 1 ml よりなり、McIlvaine 緩衝液で pH 3, 磷酸緩衝液で pH 6 および 8 に調節した。p.c. 25, sensitivity 0.06 で測定した各 polarogram を第 11 図に示した。

第 11-a 図は pH 3 での polarogram であつて濃縮果汁自身種々の諸成分を含むにも拘らず殆んど明瞭な還元波は認められず -0.3 volt および $-1.1 \sim -1.3$

volt 付近に非常に弱いものが観察されるに過ぎなかつた。これに対して亜硫酸の波は -0.7 volt 付近に極めて明瞭にあらわれた。この場合果汁成分によるものも -0.15 volt ならびに -1.1 volt 付近に見られるが、対照の果汁自身の polarogram と同様に極めて微弱であつた。

それに対して pH 6 では亜硫酸の顕著な還元波は認められず、 -0.57 , -0.92 および -1.25 volt 付近に識別されるに過ぎなかつた。また pH 8 でも勿論亜硫酸の polarogram は求められなかつた。しかし果汁成分の還元波は却つてアルカリ側でとくに $-0.9 \sim -1.0$ volt 付近に明瞭なものが観察され、亜硫酸含有果汁では -1.35 volt 付近に還元波があらわれた。

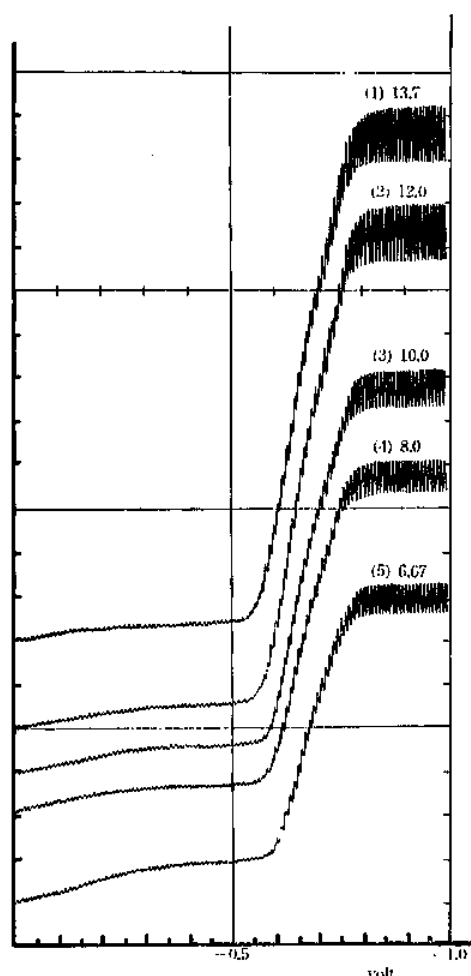


Fig. 9-a. Estimation of standard wave height of Na_2SO_3 (1).

$\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ 10 ml, McIlvaine buffer (pH 3) 5 ml. [$2 \times 10^{-3} \text{ M Na}_2\text{SO}_3$: (1) 10 ml, (2) 9 ml, (3) 7.5 ml, (4) 6 ml, (5) 5 ml.]

これらの実験から亜硫酸は波柿の H_2O 抽出果汁中でも pH 3 では果汁成分に妨害されことなく明瞭な還元波を示すが pH 6 あるいは 8 では認められないことが明らかにされた。

これに関連して波柿果汁成分によつても微弱な還元波が測定された。その濃度がさらに高くなれば還元波も明瞭になるものと思われるが柿抽出果汁の粘度は高くこれ以上果汁濃度を高めることは調製上むづかしい。しかし測定条件を変えればより明瞭な果汁固有の polarogram を求めることは可能になるわけであつて

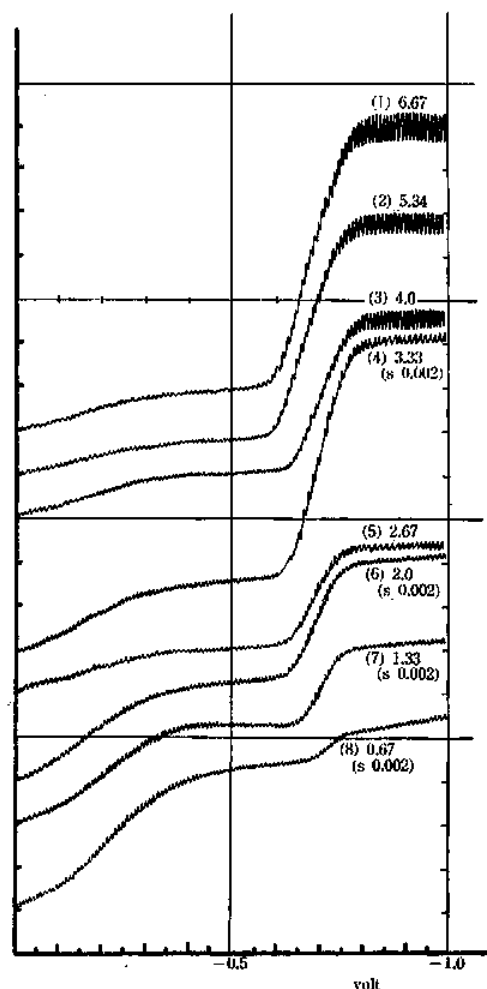
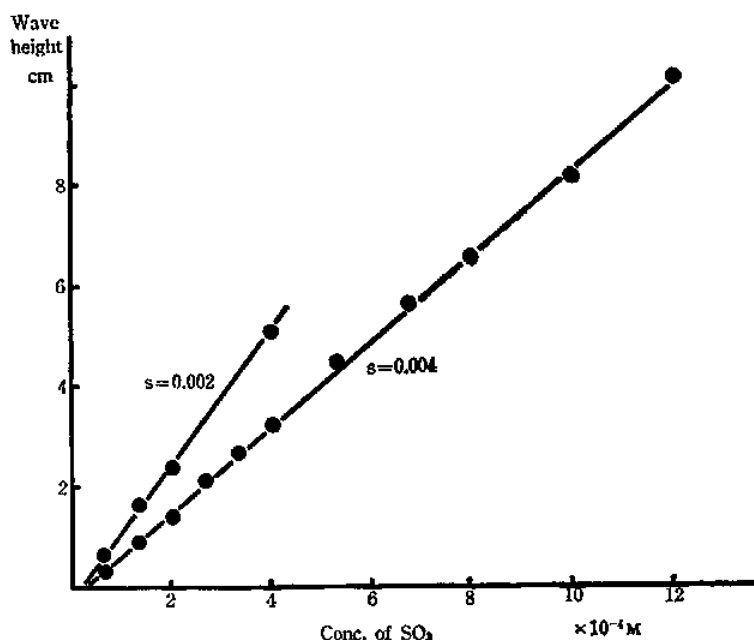


Fig. 9-b. Estimation of standard wave height of Na_2SO_3 (2).

$\text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ 10 ml, McIlvaine buffer (pH 3) 5 ml. [$10^{-3} \text{ M Na}_2\text{SO}_3$: (1) 10 ml, (2) 8 ml, (3) 6 ml, (4) 5 ml, (5) 4 ml, (6) 3 ml, (7) 2 ml, (8) 1 ml.]

第12図はその1例である。即ち果汁 10 ml, $2 \times 10^{-3} \text{ M Na}_2\text{SO}_3$ 5 ml, 緩衝液 5 ml の電解液で常法通り測定すれば顕著な亜硫酸の還元波の前にわずかに識別出来る還元波がみられるに過ぎなかつたが機器の感度を高めると -0.25 volt 附近に半波電位をもつ polarogram が明瞭に測定された。勿論これらが柿の成分のどれにもとづくかは現在のところ明らかでない。

これらの測定は波柿果汁に Na_2SO_3 を加えたものについて行なつたものであるが次にこれを実際に適用した。波柿1ヶ約 150 g を剥皮しそのまま 10^{-4} M SP

Fig. 10. Relation of wave height of polarogram and concentration of Na_2SO_3 .

に数日浸漬し洗抜き処理を試みた。前報⁴⁾のように柿果実の表面に白色沈澱を生じたがこれを水洗除去し常法通り H_2O 抽出果汁を調製し酸性で polarogram を測定した。第13図に示すように明瞭な還元波があらわれ亜硫酸が残存していることを示したが半波電位は -0.55 volt 付近にあった。これとともに従来わずかながら認められていた -0.2 volt 付近の還元波は SP 処理によつてさらに明瞭になった。

またこれらの測定との比較のために自然に熟して甘くなつた渋柿果実の抽出果汁について同一条件で測定し同じく第13図に示した。柿が熟すと SP 処理の場合と同様に -0.2 volt 付近の還元波は明瞭になり -0.9 volt 付近のほかに -1.25 volt 附近にもはつきりあらわれた。

いずれにしても柿の果汁の polarogram は 2~3 の微弱な還元波を示すが酸性で測定すれば亜硫酸の還元波があらわれる -0.7 volt を中心に -0.3 volt ないし -0.8 volt 付近にかけてこれを妨害する還元波は殆ど認められなかつた。同様にリンゴ果汁についても第14図に示すように種々の pH で測定した polarogram には還元波は全く認められなかつた。

このように polarography によつて柿の果汁中の亜硫酸の検出が可能になつたので一定量の果汁に種

々の量に Na_2SO_3 を添加して polarogram を測定し亜硫酸の濃度と波高との関係を求めた。渋柿半個 75 g を 100 ml H_2O に磨砕懸濁し 3,000 r.p.m. で 30 分間遠心分離して抽出液を調製した。この果汁 10 ml に pH 3 の Mc Ilvaine 緩衝液 8 ml および種々の量の 10^{-2}M Na_2SO_3 を加えさらに H_2O で全量 20 ml とし、polarogram を測定した。第15図に示す各 polarogram から波高を求め第16図および第6表に示した。

リンゴの場合と同様に亜硫酸は渋柿果実の成分と反し添加量よりもかなり減少していることが考えられるので第16図は柿果汁中の亜硫酸の検量線ということとは出来ない。しかも電解液が果汁を含むために

Table 6. Relation of wave height of polarogram and concentration of Na_2SO_3 in kaki juice.

Kaki juice, ml	10	10	10	10	10
McIlvaine buffer, ml	8	8	8	8	8
10^{-2}M Na_2SO_3 , ml	2	1.5	1.0	0.5	0.2
H_2O , ml	0	0.5	1.0	1.5	1.8
Conc. of SO_3 added, $\times 10^{-4}\text{M}$	10	7.5	5.0	2.5	1.0
Wave height, cm	9.4	6.3	3.4	1.3	0.9

PC 25, sensitivity 0.01

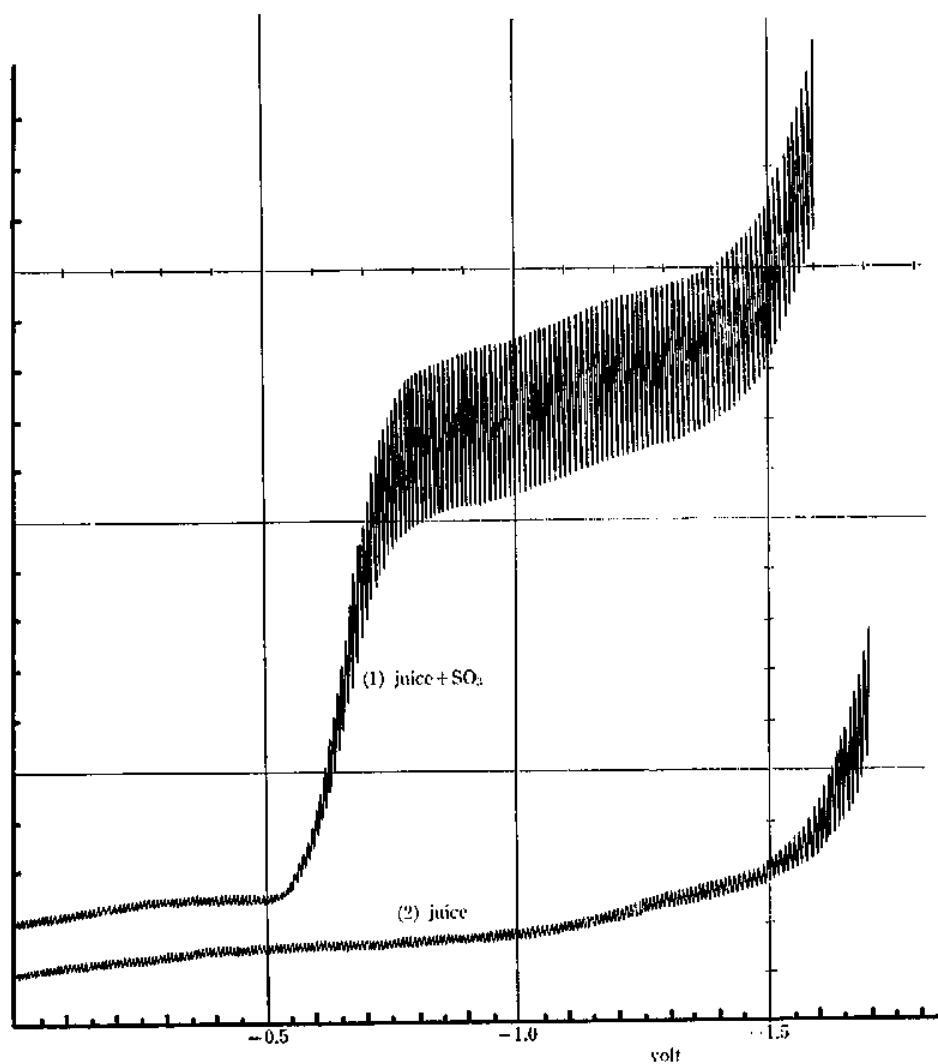


Fig. 11-a. Polarogram of kaki juice at pH 3.

- (1) kaki juice 10ml, $2 \times 10^{-3} \text{M}$ Na_2SO_3 1ml, McIlvaine buffer (pH 3) 4 ml.
(2) kaki juice 10ml, H_2O 1ml, McIlvaine buffer (pH 3) 4 ml.

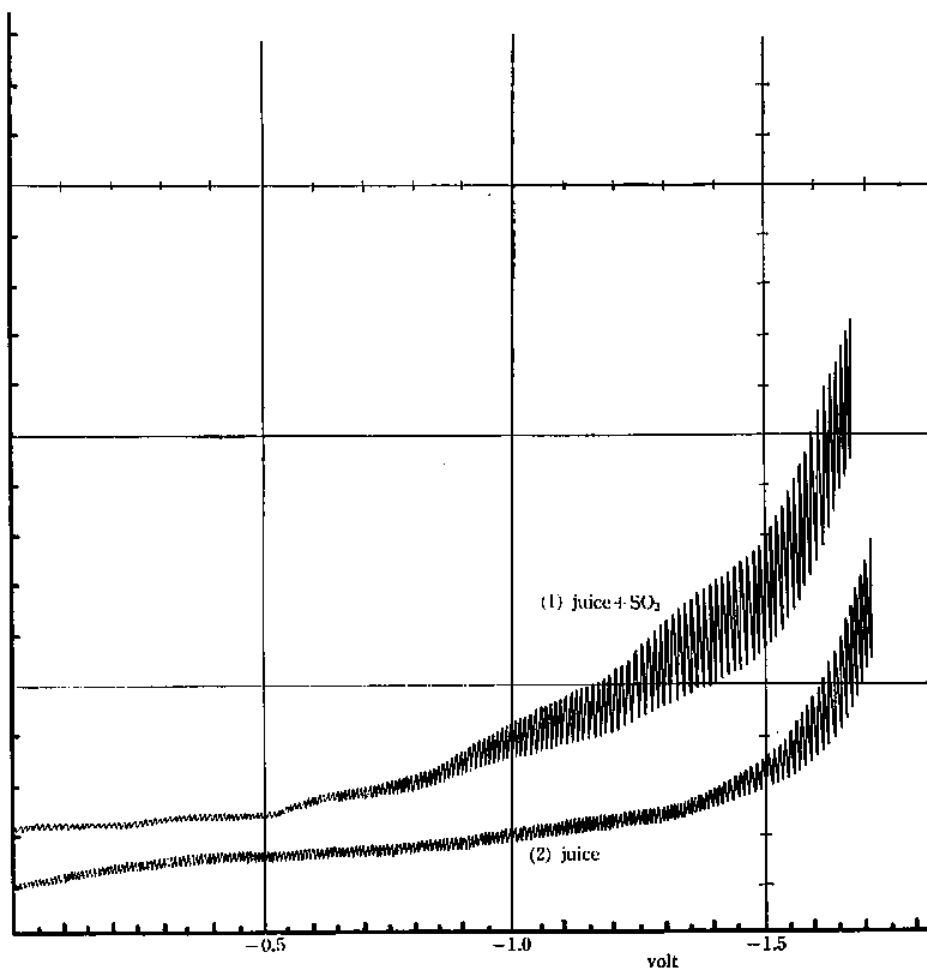


Fig. 11-b. Polarogram of kaki juice at pH 6.

Same with Fig. 11-a, except that phosphate buffer (pH 6) was used.

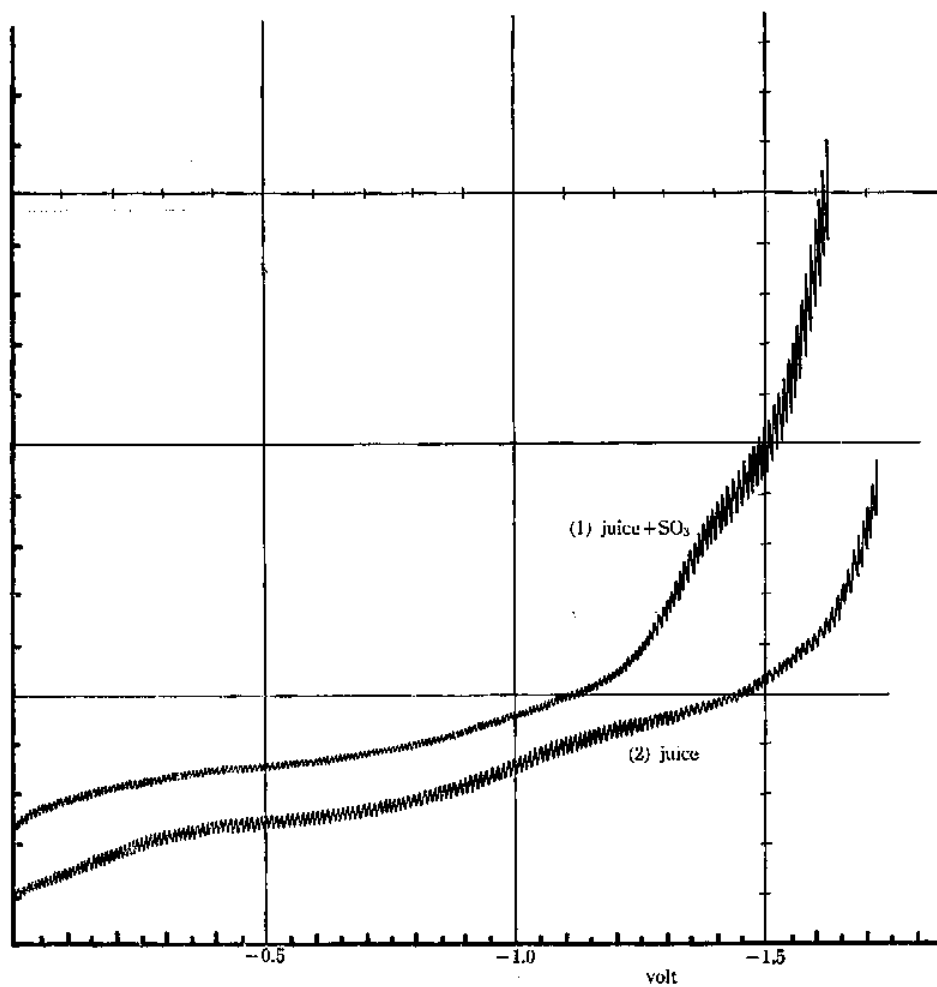


Fig. 11-c. Polarogram of kaki juice at pH 8.

Same with Fig. 11-a, except that phosphate buffer (pH 8) was used.

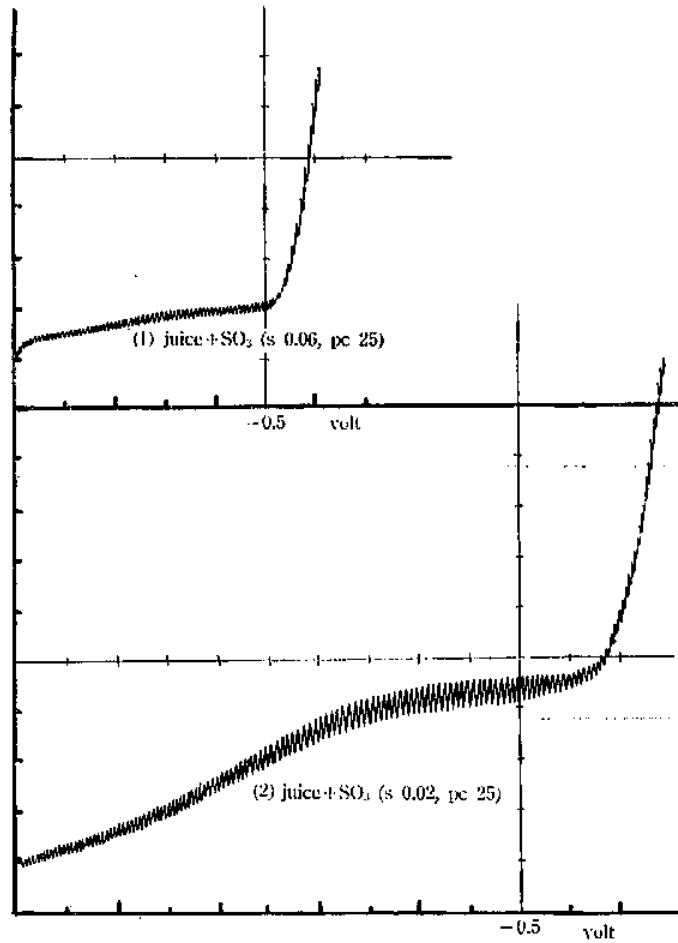


Fig. 12. Polarogram of mixture of kaki juice and Na₂SO₃.

Kaki juice 10ml, 2×10^{-2} M Na₂SO₃ 5ml, McIlvaine buffer 5ml.
Polarograms were estimated at different sensitivity.

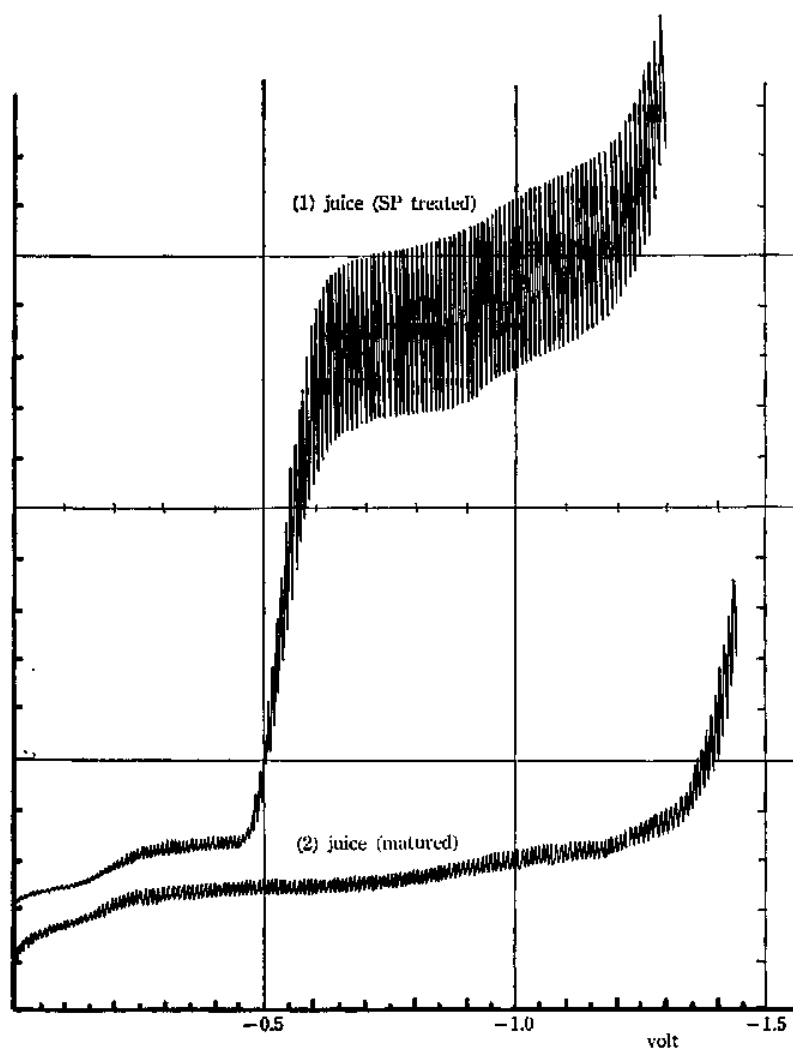


Fig. 13. Polarogram of juice of kaki which had been immersed into SP (1) and of matured kaki (2).

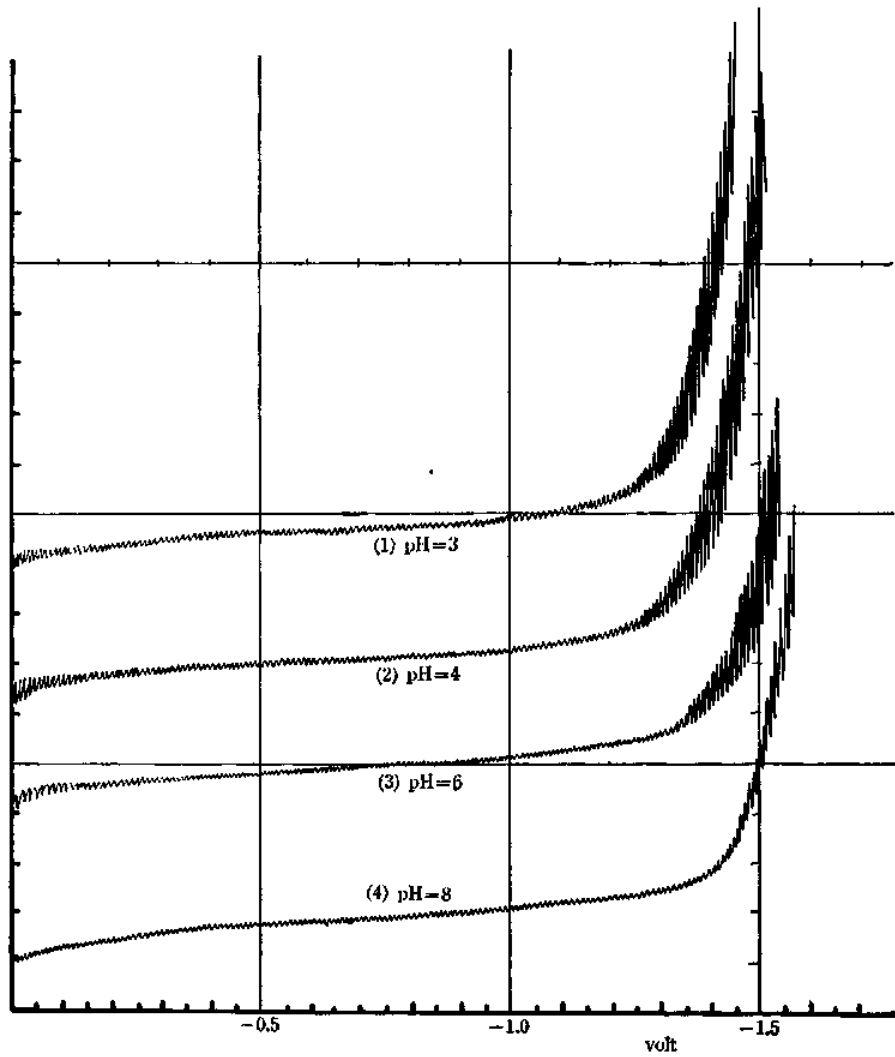


Fig. 14. Polarogram of apple juice at various pH.

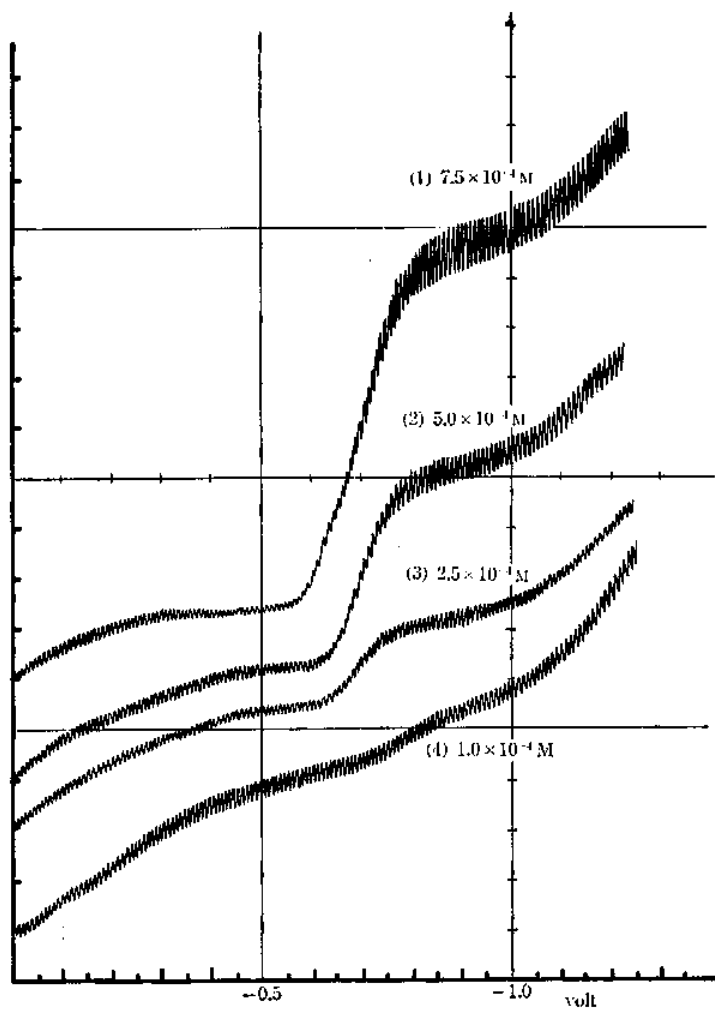


Fig. 15. Estimation of wave height of polarogram of SP in kaki juice.
Kaki juice 10 ml, 10^{-2} M SP + H_2O 2 ml, McIlvaine buffer (pH 3) 8 ml.

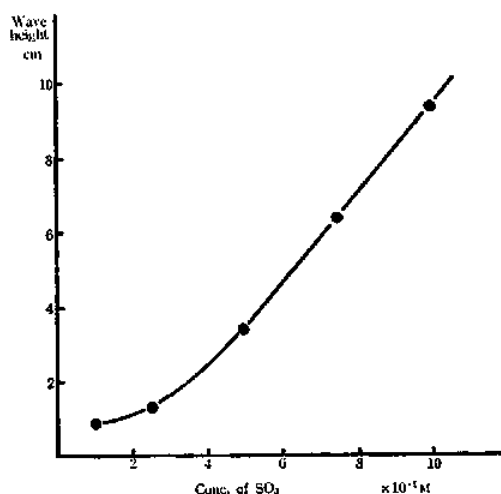


Fig. 16. Relation of wave height of polarogram and concentration of SP.

polarogram の測定条件が異なるのでさらに詳細な検討を要するが少なくとも亜硫酸が果汁成分と充分に反応すればその残存量が polarography によって定量出来ることは第 16 図に示すように Na_2SO_3 の添加量 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 付近までは濃度と polarogram の波高との間にかなり正確な比例関係が認められることから明白である。

考 察

Rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬による亜硫酸の呈色反応は West 等によって大気中の亜硫酸ガスの測定法として検討されたがリンゴ果実ないし果汁中に含まれる亜硫酸塩の測定にも利用されることが認められた。しかし亜硫酸がリンゴ果実成分と反応するので、とくに果実表面に付着しているものを測定する場合呈色液を調製するため果実を磨砕抽出する操作中にさらに反応して減少することを考慮しなければならない。しかし第 3 図に示すように亜硫酸ソーダ水溶液での標準直線とリンゴ果汁を含んだ亜硫酸ソーダ溶液の呈色度とが平行関係を示すのでこの両直線の間隔で果汁中に含まれている亜硫酸塩と反応する成分の量が推定出来る。こうしてこの点を充分に考慮すればかなり少量の亜硫酸まで測定することが出来る。これは食品への添加が法的に認められている量よりも低く従ってリンゴ果実中の亜硫酸の残存量をそのまま測定して制限量以下のものを追及出来ることは前報³⁾に既に示した通りである。

一般にたとえば食品中の添加物を測定する場合その

食品成分が影響しない定量法を用いることが大切である。リンゴの場合 rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬での比色法はこの要求を満足するが柿では状況異なる。渋柿果実抽出液もこの試薬によつて青紫に発色ししかもその吸収極大は $590 \text{ m}\mu$ にある。亜硫酸塩での呈色が赤紫であつて $580 \text{ m}\mu$ に吸収極大があることから渋柿の場合 rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬は殆ど利用出来ない。さらにこの試薬に含まれている HCl-formaldehyde は tannin の縮合剤として用いられているが、事実 rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬によつて渋柿果実抽出液は沈澱も生ずる。このように渋柿果実成分はこの試薬による亜硫酸の比色定量を完全に妨害するが、その上に 2—3 の興味ある事実も観察された。すなわち甘柿果実成分あるいは tannic acid もこの試薬によつて亜硫酸と同様赤紫に発色するが渋柿と異なつて沈澱は生じない。しかも渋柿の果実でもこの試薬による青紫呈色および沈澱生成は新鮮なものに特有であつて、自然に熟したもの、alcohol 処理によつて脱渋途中のもの、剥皮して常法通り干柿を作りつつあるものなどは、まだかなりの渋味を残しているにも拘らず甘柿と同様に赤紫色を呈し沈澱の生成は認められなかつた。こうして rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬による亜硫酸の比色定量法は渋柿、甘柿いずれにしても適用出来ないことは明らかである。しかし polarography を用いれば、亜硫酸の測定が可能となる。

亜硫酸ソーダ溶液を McIlvaine 緩衝液で pH 3 に調節した電解液について測定すれば -0.7 volt 付近に半波電位をもつ典型的な亜硫酸の polarogram が得られその波高は亜硫酸の濃度に比例する。磷酸で pH を調節しても、かなり明瞭な polarogram を得ることが出来るが、McIlvaine 緩衝液を用いる方が望ましい。

これに対して柿果実抽出液の polarogram は酸性、中性、アルカリ性いずれの条件でも極めて弱い還元波を示すに過ぎず、従つて酸性で polarogram を測定すれば果汁成分に妨害されることなく亜硫酸の還元波が明瞭に認められる。リンゴの抽出液の場合にも殆ど還元波が認められないので亜硫酸の検出に適用出来る。

こうして柿果汁中の亜硫酸の濃度は測定された polarogram の波高に比例することも認められ、定量に利用出来る可能性を示した。しかし柿果汁の場合の測定条件は亜硫酸ソーダ溶液のみの測定条件とかなり異なるので濃度と波高との関係をそのまま適用するこ

とは出来ない。さらにリングの場合と同様に亜硫酸塩が柿果実成分と反応して減少する可能性もあるので標準直線の調製にはさらに詳細な検討を行う必要がある。しかし亜硫酸の検出には polarography は有力な手段となるものであつて第 13 図に示すように剥皮した果実を SP に浸漬した場合充分に水洗しても多少の亜硫酸が残存していることは認められる。

総 括

(1) Rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬による亜硫酸の比色定量法を検討し、リングの場合に適用出来ることを確めた。

(2) Rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬は波柿成分では青紫色に呈色し沈澱を生じた。これに対して甘柿抽出液および tannic acid では亜硫酸と同様赤紫に発色した。さらに波柿でも成熟、alcohol 処理、干柿等脱渋過程のものは甘柿同様に赤紫色を呈した。いずれにしても rosanilin-HCl-formaldehyde 試薬は柿には利用出来なかつた。

(3) 亜硫酸の polarography について検討し、

McIlvaine 緩衝液で pH 3 に調節して測定すれば典型的な亜硫酸の polarogram が得られ、その波高は亜硫酸の濃度に比例することを確めた。

(4) 柿およびリング果実の抽出液は亜硫酸の polarogram の測定を妨害しないことが認められた。

本研究は昭和 39 年度文部省試験研究費(代表者山藤一雄)で行つたものであり、研究に際し種々御助言を賜つた水産大学校藤井実教授深謝する。

(食糧化学教室)

文 献

- 1) 藤井 実, 原田勝彦, 大島寿夫 (1964) 真空化学 12, 221.
- 2) Kolthoff, M. and Miller, C. S. (1941) J. Amer. Chem. Soc. 63, 2810.
- 3) 大村浩久, 副枝紘一郎, 山藤一雄 (1966) 九大農芸誌 22, 109.
- 4) 大村浩久, 副枝紘一郎, 山藤一雄 (1966) 九大農芸誌 22, 121.
- 5) West, P. W. and Gaeke, G. C. (1956). Anal. Chem. 28, 1816.

Summary

In order to estimate amounts of remaining sulfite in fruits after treatment with SP (sodium sulfite solution adjusted its pH to 5.5 with ortho phosphoric acid), colorimetric method with rosanilin-HCl-formaldehyde reagent was investigated.

Into 10 ml sample solution, 1 ml 0.04% rosanilin dissolved in 6% HCl and 1 ml 0.2% formaldehyde were added to develop red-violet color. Intensity of color was estimated by determining optical density of the solution at 580 m μ . Color development is rapid and reaches to constant value in a few minutes. However, this should be carried out at least at room temperature, since color intensity was decreased at 37°C. Usually SP had been employed for treatment of fruits with sulfite. Phosphoric acid had not notable influence on color development. Thus, as indicated in Fig. 3, proportionality of optical density at 580 m μ to concentration of sulfite was established. In addition, it was observed that apple juice does not disturb the estimation of sulfite, except that color intensity of sulfite added into apple juice is decreased as judged from standard curve with Na₂SO₃ solution. This decrease might be attributed to the reaction of sulfite with some native substances in apple, as supposed from protection of browning of apple with SP. Thus, rosanilin-HCl-formaldehyde reagent was proved to be useful for the determination of sulfite in fruit and juice of apple.

On the other hand, juice of astringent variety of kaki (Japanese persimmon), even without sulfite, developed blue-violet color having the absorption maximum at 590 m μ and produced precipitate. However, the juice of sweet variety of kaki as well as tannic acid developed red-violet color as with sulfite, but not produced precipitate. Owing to these coloration, it was concluded that kaki disturbed the colorimetric method of estimating sulfite with rosanilin-HCl-formaldehyde reagent.

In addition, it was observed that blue-violet coloration and precipitation were brought about only with flesh astringent kaki. When fruit of astringent variety was naturally matured, the color developed was red-violet as with sweet variety. Similar red-violet coloration was also recognized with astringent kaki which had been treated with alcohol or dried to remove astringency.

Then, polarography of sulfite was investigated to find out the suitable method estimating sulfite in kaki. A mixture of 6 or 3 ml 10^{-3} M Na_2SO_3 , 5 ml McIlvaine buffer (10^{-1} M citric acid $\sim 2 \times 10^{-1}$ M Na_2HPO_4) of pH 3 and 4 ml or 7 ml H_2O was employed for estimation of polarogram and the typical one of sulfite having half-wave potential at -0.7 volt was determined. Furthermore, it was observed that wave height has the direct relationship with concentration of sulfite. As shown in Fig. 10, the standard calibration curve of sulfite was obtained from wave height of polarograms with various concentrations of sulfite. When the mixture was acidified with phosphoric acid in stead of McIlvaine buffer, polarogram of sulfite was also determined. However, a maximum wave was detected in the polarogram, although it has half-wave potential at $-0.67 \sim -0.70$ volt.

Using the condition just established, at pH 3 with McIlvaine buffer, the distinct reduction wave of sulfite in juice of kaki was estimated, while definite polarogram could not be determined when it was estimated at pH 6 or 8. Some weak reduction waves of constituents in kaki were checked, whereas no waves were recognized in polarogram of apple juice. At any rate, it was established that juice of fruits of kaki and apple does not disturb the polarographic estimation of sulfite which should be carried out at pH 3 adjusted with McIlvaine buffer.

Laboratory of Food Chemistry,
Department of Food Science and Technology,
Kyushu University.