

[Technical Brief]

ワインの亜硫酸分析

遊離型亜硫酸分析に及ぼす温度の影響、並びにリップパー法における検体の希釈の影響

後藤（山本）奈美*、上用みどり、沼田美子代、神本真紀、小山和哉
 独立行政法人酒類総合研究所 〒739-0046 東広島市鏡山 3-7-1

Analysis of Sulfur Dioxide in Wine
 Effects of Temperature on Free Sulfur Dioxide Determination
 and Sample Dilution on Ripper Determination

Nami GOTO-YAMAMOTO, Midori JOYO, Mineyo NUMATA,
 Maki KAMIMOTO, and Kazuya KOYAMA

National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-0046, Japan

The determination of free SO₂ concentration is critical for the quality control of wine. In this study, the effects of analytical conditions of SO₂ were examined. First, we examined the effect of sample temperature on the determination of free SO₂. When we analyzed 400 mg/L potassium pyrosulfite solution at 0°C and around 25°C by the aeration-oxidation method and the Ripper method, almost the same concentrations (209.1 ± 3.4 mg/L to 214.4 ± 0.9 mg/L) of free SO₂ were obtained. Then, we analyzed 400 mg/L potassium pyrosulfite solution to which 220 mg/L sodium pyruvate was added, and the free SO₂ concentrations determined by the aeration-oxidation method were 87.5 ± 0.9 mg/L and 127.2 ± 0.0 mg/L at 0°C and 25°C, respectively. When we carried out an additional aeration for 15 min., 1.7 ± 0.1 mg/L and 8.2 ± 0.1 mg/L of free SO₂ were detected at 0°C and 25°C, respectively. These results indicate that in addition to the dissociation of bound SO₂ during aeration, the equilibrium between bound and free SO₂ changes to generate a higher concentration of free SO₂ at a higher temperature. Thus, it is recommended that free SO₂ determination be conducted at temperatures similar to cellar temperature. Next, we examined the effect of sample dilution on SO₂ determination by the Ripper method. Since the Ripper method uses the iodine-starch reaction to detect the endpoint, it is difficult to use this method for red wine. Therefore, wine samples were diluted 10 times and subjected to SO₂ determination by the Ripper method. The determined free and total SO₂ were 1.2-6.5 times higher than those determined by the aeration-oxidation method without dilution. Sample dilution was shown to result in the overestimation of SO₂ concentration by the Ripper method.

Key words: sulfur dioxide, temperature, ripper determination

緒言

ワインの遊離型亜硫酸濃度は、酸化及び微生物汚染の防止の観点から必須の管理項目である。現在、ワイナリーの工程管理としての遊離型亜硫酸濃度の測定に

は、国税庁所定分析法に定められている通気蒸留・滴定法（ランキン法）の他、ヨード滴定によるリップパー法、リップパー法に酸化還元電位計を用いて自動化した方法、HPLC 等多くの方法が紹介されている。このうち、通気蒸留・滴定法の検体の温度について、海外のワインの分析書の多く（Margalit 1997, Ough and Amerine 1988, Zoecklein *et al.*, 1995）やわが国の「衛生試験法・

*Corresponding author (email: gotoh_n@nrib.go.jp)

2015年11月4日受理

注解」(日本薬学会編 2010)では、フラスコ B (ワインとリン酸溶液を入れ、通気するフラスコ) を氷水浴につける、またはあらかじめ検体を 0°C に氷冷する、と書かれている。“Wine analysis and production”では、Supplemental Notes として、高温では結合型亜硫酸の解離が促進されるため、少なくとも 20°C 以下で分析を行い、それ以上の場合は氷冷する必要がある、と記載されており (Zoecklein *et al.*, 1995)、国税庁所定分析法においても「20°C 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。」としている。

一方、Burroughs and Sparks (1964) は、本方法では検体を加熱すると結合型亜硫酸が解離することで総亜硫酸濃度を測定していることから分かるように、結合型亜硫酸の生成は温度依存的であり、冷蔵保存した検体をそのまま測定することは好ましくない、と指摘している。また、“Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts”には、検体はワインセラーの温度に合わせることを望ましい、と記載されている (Iland *et al.*, 2004)。そこで、検体温度が遊離型亜硫酸濃度の測定値にどの程度影響を及ぼすか確認するとともに、その原因について考察した。

また、ヨウ素溶液による酸化還元滴定に基づくリッパ法は、通気蒸留が不要であるため、短時間で亜硫酸の測定が可能であり、必要な器具も通気蒸留・滴定法よりも少ないというメリットがある。しかし、この方法はアスコルビン酸や高濃度のフェノール化合物が含まれると滴定値が実際よりも高くなると指摘されている (Iland *et al.*, 2004, Ough and Amerine 1988)。さらに、ヨウ素デンプン反応によって終点を検出するため、赤ワインの分析は困難という問題もある。これらの問題を解決するため、酸化還元電位計を用いた、リッパ法による亜硫酸分析装置も開発されているが、利用は一部に限られている。そこで、ワインを希釈して分

析できないか検討をしたので、併せて報告する。

方法

通気蒸留・滴定法は、国税庁所定分析法に従い、必要な場合は検体を入れたフラスコ B の温度を変えて測定を行った。なお、検体はあらかじめ所定の温度に保ったうえで採取し、フラスコ B を 0°C の場合は氷水浴、35°C の場合は恒温水浴をして通気蒸留を行った。

リッパ法は、0.02 N ヨウ素溶液による滴定法 (Ough and Amerine 1988) で行った。遊離型亜硫酸は、検体 50 mL を 200 mL 容三角フラスコにとり、0.5% 可溶性デンプン液 5 mL、及び 25% 硫酸 5 mL を加え、0.02 N ヨウ素溶液で青色になるまで滴定した。総亜硫酸は、検体 20 mL に 1 N NaOH 25 mL を加え、シールをして 10 分間静置後、遊離型亜硫酸と同様に可溶性デンプンと硫酸を加え、ヨウ素滴定を行った。亜硫酸濃度は次式で求めた。

$$\text{SO}_2(\text{mg/L}) = V \times 0.02 \times 32 \times 1000/v$$

$$V: \text{滴定値 (mL)}, v: \text{検体量 (mL)}$$

検体温度を変える場合は、あらかじめ硫酸を加えた検体を所定の温度に保ち、手早く滴定を行うこととした。

結果及び考察

1. 遊離型亜硫酸分析における温度の影響 (ワインを用いた予備試験)

予備的に、白ワイン 1 点を用いて検体温度を 0°C、室温 (20°C 程度)、及び 35°C として通気蒸留・滴定法及びリッパ法で遊離型亜硫酸濃度を測定した。その結果 (Table 1)、どちらの分析方法でも検体温度が高い方が測定値が高くなり、0°C と室温で 2 倍程度の差異が認められた。

Table 1 Effect of sample temperature on determination of free SO₂ (mg/L) in wine (preliminary test).

	Aeration-oxidation method	Ripper method
0°C	7.8	9.1 ^b
Room temperature ^a	17.5	17.2 ^b
35°C	23.3	25.0

^a Around 20°C.

^b Average of two determinations. The other determination was carried out once.

遊離型亜硫酸の測定値が温度の影響を受けることは、経験的に知られており、貴腐ワイン(糖分 74 g/L、アセトアルデヒド 70 mg/L)を用いた分析例では、0、15、及び 30°C で総亜硫酸の測定値には変化がないが、遊離型亜硫酸の測定値は 0°C 68 mg/L、15°C 85 mg/L、30°C 100 mg/L と大きく異なることが報告されている (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006)。そこで、次に遊離型亜硫酸のみ、及び遊離型と結合型を含む亜硫酸水溶液を用いて温度を変えた分析実験を行った。

2. 遊離型亜硫酸分析における温度の影響 (亜硫酸水溶液の分析)

400 mg/L のピロ亜硫酸カリウム水溶液、及びこれに 100 g/L のグルコース、または 220 mg/L のピルビン酸ナトリウムを添加した水溶液を検体に用い、0°C と室

温 (25°C 程度) で通気蒸留・滴定法、及びリッパ法で遊離型亜硫酸濃度を測定した。また、通気蒸留中の結合型亜硫酸の解離が測定値に及ぼす影響を推定するため、Burroughs and Sparks (1964) に倣い、15 分間の通気蒸留終了後、H₂O₂ を入れたフラスコ A を新しいものと取り換え、さらに 15 分間通気蒸留を行い、留出する亜硫酸濃度を求めた。その結果 (Table 2)、遊離型亜硫酸のみが含まれるピロ亜硫酸カリウム水溶液では、分析法と温度が異なる 4 条件ではほぼ同等の測定値となった。一方、ほぼ半量の結合型亜硫酸を含むグルコースやピルビン酸を添加した区では、両方法とも、室温の方が 0°C よりも高い測定値を示した。したがって、温度による遊離型亜硫酸濃度の測定値の違いには、結合型亜硫酸の解離が影響していると考えられる。

Table 2 Determination of free SO₂ in aqueous solution with/without bound SO₂ at 0°C and room temperature.

		Aeration-oxidation method	Additional 15-min aeration ^a	Ripper method ^b
400 mg/L Potassium pyrosulfite	0°C	212.7 ± 0.4 ^d	2.4 ± 0.5	214.4 ± 0.9
	Room temperature ^c	213.9 ± 0.6	0.6 ± 0.5	209.1 ± 3.4
400 mg/L Potassium pyrosulfite + 100 g/L glucose	0°C	104.6 ± 2.5	4.0 ± 2.2	105.2 ± 0.8
	Room temperature	127.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1	118.0 ± 1.3
400 mg/L Potassium pyrosulfite + 220 mg/L sodium pyruvate	0°C	87.5 ± 0.9	1.7 ± 0.1	94.9 ± 0.3
	Room temperature	127.2 ± 0.0	8.2 ± 0.1	111.6 ± 1.1

^a After 15-min. aeration, a new flask containing H₂O₂ solution was replaced and an additional 15 -min aeration was carried out.

^b Ripper method with iodine solution.

^c Around 25°C.

^d Means ± SD, n=3.

Table 3 Effect of temperature on SO₂ liberation from combined sulfites (%).

Temperature (°C)	NaHSO ₃	Acetaldehyde hydrogen sulfite	Pyruvic acid hydrogen sulfite	D-Mannose hydrogen sulfite
0	99.7±0.2	0	0.05	0
10	99.7±0.2	0.05	4.76	0.35
20	99.7±0.2	0.58	17.9	2.14

Modified from the report of Fujita *et al.* (1979).

Fujita *et al.* (1979) は、食品衛生法に採用されている通気蒸留法（吸引ではなく、N₂ ガスを吹き込む方法）で、検体温度 0°C、10°C 及び 20°C の結果を比較し、アセトアルデヒドを加えて結合型にした場合は差が小さいが、ピルビン酸及びマンノースとの結合型の場合は、10°C 及び 20°C では解離した SO₂ がある程度検出される、と報告している (Table 3)。

このように、結合型亜硫酸を含む場合に高温条件で遊離型亜硫酸の測定値が高くなる原因として

- ① 温度が高いと分子状 SO₂ の蒸気圧が高くなり、完全にパージされやすい。
 - ② 温度が高いと測定中に結合型が解離する。
 - ③ 温度が高いと結合の平衡定数 K が変化し、遊離型が増える
- の3つが想定される。

①について、0°C でさらに 15 分間通気蒸留を行った際、検出される SO₂ がほとんどないこと (Table 2) から、測定には影響を及ぼしていないと言える。②と③は結合型亜硫酸の解離によるもので、②は分析中のアーティファクトと言えるが、③は遊離型亜硫酸濃度が温度によって実際に変化することを意味する。

②については、ピルビン酸との結合型亜硫酸を含む水溶液 (Table 2) を用いた場合、室温で再度 15 分間の通気蒸留を行うと 8 mg/L 程度の測定値となったことから、測定中の解離が若干あることが確認された。しかし、0°C と室温の通気蒸留・滴定法による測定値の差は、38.5 mg/L あったことから、高温によって測定中の解離が促進される (②) だけでなく、平衡定数 K が変化し、遊離型が増える (③) ことも原因になっていると考えられる。このことは、測定に要する時間が短く、分析中の解離の影響は少ないと想定されるリッパ法でも、0°C より室温の方が測定値が高いことから推測される。

平衡定数 K は温度依存性で、アセトアルデヒドと重亜硫酸イオンの結合定数 K は、温度が 25°C から 37.5°C に上がると 5 倍大きくなると記載されている (Hornsey 2007)。その他の結合型亜硫酸の K に対する温度の影響については、報告を見つけることができなかったが、同様の影響が想定される。

②の影響について、Burroughs and Sparks (1964) は、15 分の通気蒸留の後、再度 15 分間通気蒸留を行って

測定される遊離型亜硫酸の値を、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、と述べている。しかし、③の影響については補正が難しいことから、遊離型亜硫酸の通気蒸留は常温、またはワインが保存されている温度で行うことが望ましいと考えられる。なお、この温度条件は、独立行政法人酒類総合研究所標準分析法に反映されている (<http://www.nrib.go.jp/bun/bunpdf/nb09.pdf>)。

低い検体温度で分析した場合、実際にワインが保存される温度よりも遊離型亜硫酸濃度が低く測定されることになる。この条件で遊離型亜硫酸濃度の調整を行うと、実際の保存温度ではより高濃度の遊離型亜硫酸を含むことになり、酸化や微生物汚染を防止する観点からは問題にはならないと考えられる。しかし、このワインが常温で飲用される場合は、濃度によっては亜硫酸臭が感じられる可能性があることに注意が必要である。

3. リッパ法における希釈の影響

リッパ法において検体の希釈が測定値に及ぼす影響を調べるため、50 mg/L 亜硫酸ナトリウム水溶液、50 mg/L 亜硫酸ナトリウム添加赤ワイン（亜硫酸無添加の赤ワインに、亜硫酸ナトリウムを添加したもの）、赤ワイン 5 点、及び白ワイン 2 点を用い、通気蒸留・滴定法及びリッパ法にて遊離型亜硫酸及び総亜硫酸濃度を測定した。通気蒸留・滴定法では原液を、リッパ法では原液、精製水で希釈した 5 倍希釈液及び 10 倍希釈液を用いた。なお、亜硫酸濃度はすべて原液の濃度として算出した。

まず、50 mg/L 亜硫酸ナトリウム水溶液及び 50 mg/L 亜硫酸ナトリウム添加赤ワインの亜硫酸濃度測定結果を示す (Table 4)。リッパ法では、どちらの検体においても、遊離型亜硫酸、総亜硫酸ともに、希釈倍率が高くなるほど亜硫酸濃度値が高くなることが確認された。このことより、希釈倍率が高くなるほど測定誤差が広がることが判明した。

続いて、精製水で 10 倍希釈した赤ワイン溶液及び白ワイン原液の亜硫酸濃度測定結果を示す (Table 5)。リッパ法では赤ワインのアントシアニン色素により反応終点の判断が困難という問題点がある。Henderson (2014) は、赤ワインの亜硫酸濃度をリッパ法で測定する場合、色の強度を低くするため 2 倍希釈して測

Table 4 Free and total SO₂ contained in solutions with 50 mg/L sodium sulfite.

		Concentration (mg/L) ^a			
		Aeration-oxidation method		Ripper method	
		x1 ^b	x1 ^b	x5 ^b	x10 ^b
50 mg/L sodium sulfite ^c	Free SO ₂	21.9 ± 0.6	21.4 ± 0.6	23.1 ± 0.4	24.1 ± 0.8
	Total SO ₂	23.1 ± 0.4	21.2 ± 0.1	25.9 ± 0.6	34.2 ± 4.5
Red wine ^d with 50 mg/L sodium sulfite	Free SO ₂	18.7 ± 0.3	-	22.8 ± 1.1	23.9 ± 2.0
	Total SO ₂	28.0 ± 1.2	-	29.1 ± 1.7	37.2 ± 4.8

^a Means ± SD, n=3.^b x1 means non-diluted solution. x5 and x10 mean 5- and 10-fold diluted solution, respectively.^c This aqueous solution contained 24.7 mg/L SO₂ theoretically.^d Sulfur-dioxide-free red wine.Table 5 Free and total SO₂ contained in wine samples.

	Concentration (mg/L) ^a			
	Free SO ₂		Total SO ₂	
	Aeration-oxidation method ^b	Ripper method ^c	Aeration-oxidation method ^b	Ripper method ^c
red wine 1	2.7 ± 0.1	14.2 ± 2.8	5.5 ± 0.3	35.6 ± 1.6
red wine 2	9.1 ± 0.3	20.4 ± 1.0	31.9 ± 0.2	54.0 ± 2.4
red wine 3	7.3 ± 0.1	28.4 ± 1.8	30.2 ± 0.4	59.6 ± 3.7
red wine 4	6.0 ± 0.4	30.3 ± 1.3	35.9 ± 0.5	58.4 ± 1.6
red wine 5	4.7 ± 0.3	19.9 ± 0.5	39.2 ± 0.4	46.9 ± 2.0
white wine 1	3.5 ± 0.7	7.9 ± 0.2	52.80 ± 1.3	36.6 ± 3.5
white wine 2	39.6 ± 0.7	41.1 ± 0.8	119.6 ± 1.1	105.6 ± 1.5

^a Means ± SD, n=3^b Non-diluted wine was used as test sample.^c 10-fold diluted red wine and non-diluted white wine were used as test samples.

定すると報告している。しかし、本実験では、ブドウの品種によっては2倍希釈では原液と色の強度があまり変わらない検体もあったため、10倍希釈で検討を行った。その結果、希釈した赤ワインの場合、リッパ法の方が遊離型では2.2~5.3倍、総亜硫酸では1.2~6.5倍高い値を示した。白ワイン原液の場合も、リッパ法と通気蒸留・滴定法で測定値の違いが認められたが、赤ワインのように5倍以上も異なる結果は見受けられなかった。亜硫酸ナトリウムを添加した検体(Table 4)の遊離型及び総亜硫酸、及びred wine 2~5 (Table 5)の総亜硫酸のように、通気蒸留・滴定法である程度以上の濃度が検出されるケースでは、リッパ法での結果との差は小さい傾向にあった。一方、red wine 1の遊離型及び

総亜硫酸やred wine 2~5の遊離型亜硫酸のように、通気蒸留・滴定法での測定値が低い場合には、リッパ法での測定結果との差が大きい傾向にあった (Table 5)。よって、リッパ法で希釈した赤ワインを測定する場合、遊離型亜硫酸及び総亜硫酸ともに低濃度の検体は高濃度のものと比べ、測定誤差が大きくなりやすい傾向が認められた。

赤ワインは、ヨウ素を還元するタンニンなどのフェノール化合物を多く含むため、リッパ法では反応液を強酸性にしてフェノール化合物による還元を抑制しているが、抑制は完全ではなく、測定値が高く測定されることが報告されている (Ough and Amerine 1988)。また、反応終点の判断が困難という問題も知られてい

る。これに加えて今回の検討の結果から、希釈して分析をすることによっても測定値が高くなることが示された。これは、滴定時における1滴の差が10倍希釈液の場合、原液に対し10倍大きくなることによるものと考えられ、特に亜硫酸濃度が低い検体は、その差が顕著に表れていると推察された。

以上の結果より、希釈した赤ワインの亜硫酸濃度をリッパ法で測定する場合、実際よりも濃度が高く測定される可能性が極めて高く、実際には十分な遊離亜硫酸が含まれていないにもかかわらず、必要十分であるという誤った判断をしてしまう可能性があることが明らかになった。赤ワインの酸化及び微生物汚染のリスクを減らし、品質の安全性の確保するためには、亜硫酸濃度の測定は、通気蒸留・滴定法等の他の方法で行うことが望ましいと考えられる。

要 約

遊離型亜硫酸の測定値に及ぼす検体温度の影響を検討し、結合型亜硫酸の解離が温度の影響を受けることから、検体温度はワインが保存される温度に合わせることを望ましいことを確認した。

また、希釈した赤ワインをリッパ法で測定すると、実際よりも測定値が高くなる傾向があることを明らかにした。

文 献

Burroughs, L.F. and Sparks, A.H. 1964. The determination of the free sulphite dioxide content of ciders. *Analyst* 89: 55-60.
Fujita K., Ikuzawa, M., Izumi, T., Hamano, T., Mitsuhashi, Y.,

Matsuki, Y., Adachi, T., Nonogi, H., Fuke, T., Suzuki, H., Toyoda, M., Ito, Y., and Iwaida, M. 1979. Establishment of a modified Rankine method for the separate determination of free and combined sulphites in foods. III., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 168: 206-211.
Henderson P. 2014. Sulfur dioxide: The science behind this anti-microbial, anti-oxidant wine additive. *Practical Winery & Vineyard*. Jan 2014: 54-60
Hornsey, I. 2007. 6.3.1 Sulfur dioxide. *In The chemistry and biology of winemaking*. pp. 274-285. RSC Publishing.
Iland, P., Bruer, N., Edwards, G., Weeks, S. and Wilkes, E. 2004. Sulfur dioxide (SO₂) by the aspiration method. *In Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts*. pp. 54-58. Patrick Iland Wine Promotions.
Margalit, Y. 1997. VII. Sulfur dioxide. *In Concept in wine chemistry*. pp. 253-278. The Wine Appreciation Guild.
Ough, C.S. and Amerine, M.A. 1988. Free sulfur dioxide. *In Methods for analysis of musts and wines*. pp. 229-232. Wiley.
Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., and Lonvaud, A. 2006. 8.5 Practical consequences: the state of sulfur dioxide. *In Handbook of enology*, vol. 1, 2nd ed. pp. 206-209. Wiley
Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S. 1995. Sulfur dioxide: Aeration oxidation distillation and titration procedure. *In Wine analysis and production*. pp. 497-501. Chapman and Hall.
日本薬学会編 2010. 2.3 食品添加物試験法 2.3.6 漂白剤、衛生試験法・注解 pp. 340-347. 金原出版