〔衛 生 化 学〕
THE JOURNAL OF
HYGIENIC CHEMISTRY
17 (2) 109-111 (1971)

金属キレート陽イオンによる陰イオンの溶媒抽出 (第48報¹⁾)

食酢中のサリチル酸の比色定量

山本勇麓, 熊丸尚宏, 林 康久, 高橋直子

広島大学理学部²⁾

The Spectrophotometric Determination of Anions by Solvent

Extraction with Metal Chelate Cations. XLVIII.¹⁾

A Colorimetric Method for the Determination of Salicylic Acid in Vinegar

YUROKU YAMAMOTO, TAKAHIRO KUMAMARU,

YASUHISA HAYASHI and NAOKO TAKAHASHI

Department of Chemistry, Faculty of Science, Hiroshima University²⁾

(Received November 16, 1970)

A spectrophotometric method is proposed for the determination of salicylic acid in commercial vinegar. This method is based on solvent extraction of salicylate anion with tris(1,10-phenanthroline)-iron(II) chelate cation using nitrobenzene as a solvent. A linear relationship was observed between the absorbance (516 nm) of the extract and concentration of salicylic acid up to 5.5 ppm when the aqueous phase was buffered at pH 6.5. This method was applied to analysis of salicylic acid in commercial vinegar and the results were in good agreement with those by official ultraviolet method.

近年、食生活の多様化につれて合成保存料、人工甘味料、合成着色料などのいわゆる食品添加物がいろいろな食品に使用される度合が激増するに至り、それとともに、これら食品添加物の人体に与える影響が大きな社会的問題となっていることは周知のとおりである。

このような現状にかんがみ、食品中の添加物を精度よく、高感度で迅速に定量する方法を研究することは重要なことと考えられる。

著者らは有色の金属キレート陽イオンによる陰イオンの溶媒抽出比色法により各種の食品添加物を定量する一連の研究を行ってきた。これまでに、人工甘味料とし

て用いられるサッカリン,³⁾ サイクラミン酸ナトリウム⁴⁾ および合成保存料としてのデヒドロ酢酸,⁵⁾ サリチル酸⁶⁾ についてトリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II)キレート陽イオン-ニトロベンゼン抽出による新しい比色分析法を報告した。また、サリチル酸についてはトリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II)-酢酸ブチル抽出による高感度比色定量法⁷⁾ も研究した。本報ではサリチル酸の分析の実試料への応用としてさきに報告した清酒⁸⁾ に引きつづき市販食酢中の微量サリチル酸の定量法について検討した結果を述べる。また、保存料試験法(公定法)⁹⁾ に採用されている紫外吸収法による定量

- 1) 分析化学討論会で発表, 福岡, 1970年6月; 第47報: 山本勇麓, 熊丸尚宏, 林 康久, 三浦 進, 木村 繁和, 日化, **92**, 64 (1971).
- 2) Location: Higashisenda-machi, Hiroshima (広島市東千田町).
- 3) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 林 康久, 山手万知子, 小林太郎, 田中凉一, 薬誌, **88**, 28 (1968).
- 4) Y. Yamamoto, T. Kumamaru, Y. Hayashi, T. Kobayashi, R. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **15**, 1437 (1967).
- 5) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 林 康久, 登 芳男, 薬誌, **87**, 1346 (1967).
- 6) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 林 康久, 大槌光枝, 分化, **18**, 354 (1969).
- 7) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 坪内正弘, 沖村一三, 分化, **16**, 937 (1967).
- 8) 厚生省編, "衛生検査指針Ⅲ 食品衛生検査指針(Ⅱ) [Ⅲ] 保存料検査法," 1963.

法と比較した結果、両者による定量値は良好な一致を示し、本法がじゅうぶん実用に供し得るばかりでなく、感度は本法のほうが高いことがわかった。

実験の部

試薬 試薬類はとくにことわらないかぎり特級品を用いた。また、水はイオン交換水を用いた。

1. サリチル酸標準溶液——エタノール-水混合溶媒で再結晶して精製したサリチル酸 (mp 158—159°) の 0.6976 g を水に溶かして 500 ml とし、 $1.00 \times 10^{-2} M$ の貯蔵液を調製して、硫酸酸性⁶⁾ (pH 1.7) に保つこととした。実験に際しては $2.0 \times 10^{-4} M$ にうすめて使用した。

2. トリス (1,10-フェナントロリン) 鉄(II) キレート溶液——1,10-フェナントロリン (和光純薬製) 7.93 g と硫酸第一鉄アンモニウム ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) (和光純薬製) 3.922 g をとり、1 H_2SO_4 5 ml と約 50 ml の水に溶解し、さらに水で全量を 500 ml に希釈して、トリス (1,10-フェナントロリン) 鉄(II) キレートとして $2.0 \times 10^{-2} M$ 溶液 (pH 2) を調製した。

3. リン酸塩緩衝液——0.6M KH_2PO_4 溶液と 0.6M Na_2HPO_4 溶液を適当に混合して所定の pH のものを調製した。

4. ニトロベンゼン——市販品をそのまま使用した。

装置 1. 分光光度計——日立製 139 型光電分光光度計を使用した。吸収セルは光路長 10 mm のガラス製および石英製のものを使用した。

2. pH メーター——日立-堀場製 H-5 型 ガラス電極 pH メーターを使用した。

3. ふりまぜ器——イワキ製 KM 型を用いた。

標準操作 1. 食酢中のサリチル酸の分離——公定法⁸⁾ に準じて操作した。すなわち、試料 100 ml を分液漏斗にとり、10% HCl 2 ml を加え、50 ml のエーテルで 4 回抽出する。ついで全エーテル溶液を合併して、これを約 1/10 容量の水で洗浄する。つぎにエーテル層を蒸発せらるに移し、エーテルの大部分を留去したのち、自然に揮散させ残留物を少量の温水に溶かして、水で 250 ml に希釈する。この溶液をサリチル酸の定量に供試する。

2. サリチル酸の定量——25 ml 容量のメスフラスコに試料溶液 (サリチル酸 $2.0 \times 10^{-4} M$ 以下を含む) 5 ml, リン酸塩緩衝液 (pH 6.5) 5 ml およびトリス (1,10-フェナントロリン) 鉄(II) キレート溶液 ($2.0 \times 10^{-2} M$) 5 ml を加え、水で希釈したのち、全量を分液漏斗に移す。ついでニトロベンゼン 10.0 ml を加え約 2 分間ふりまぜる。分相のため約 20 分間静置したのち、有機相を分離して、無水硫酸ナトリウム約 1 g で脱水し、試薬ブラ

ンクまたはニトロベンゼンを対照として、波長 516 m μ の吸光度を測定する。

検量線 標準操作に従い、サリチル酸標準溶液を用いて操作し、検量線を作成した。その結果は Fig. 1 のとおりで、5.5 ppm ($4.0 \times 10^{-5} M$) 以下のサリチル酸濃度で再現性の良い直線が得られた。また、サリチル酸の濃度を $4.0 \times 10^{-5} M$ に保って 10 回の繰り返し精度を求めたところ、平均吸光度 0.322 に対して標準偏差は 0.91% であった。

Fig. 1. Calibration Curve

定量条件の検討 サリチル酸を定量する場合の基礎的条件については既報⁶⁾ に詳述したので、ここでは補足的に抽出溶媒および共存物質の影響について検討を行なった。

1. 抽出溶媒——本実験ではニトロベンゼンのほかに誘電率が比較的大きな類縁溶媒 (ベンズニトリル, ニトロエタン, ニトロメタンなど) について、トリス (1,10-フェナントロリン) 鉄(II) キレート陽イオンによるサリチル酸の抽出挙動を検討してみた。その結果, Table I に示すようにニトロエタンが最高の吸光度を示し、ついでニトロベンゼン, ベンズニトリルの順でイオン対が抽

TABLE I. Choice of Organic Solvent

Solvent	ϵ	Absorbance	
		Net ^{a)}	Reagent blank
Nitroethane	28.1 (30°)	0.288	0.193
Nitrobenzene	34.8 (25°)	0.224	0.011
<i>o</i> -Nitrotoluene	27.4 (20°)	0.088	0.011
<i>m</i> -Nitrotoluene	23.8 (20°)	0.060	0.010
Benzonitrile	25.2 (25°)	0.163	0.015

a) salicylic acid: $3.0 \times 10^{-5} M$

出されることがわかる。ニトロエタンについては抽出能は大きい、水に対する溶解度が比較的大きく、そのためにブランク値が高くなる。ニトロベンゼンは、水への溶解度が小さく、ブランク値も低く、かつ、抽出能が比較的大きいという点で、すぐれた抽出溶媒であることを示した。

2. 共存物質の影響——食酢中に存在が予想される各種有機酸および添加物がサリチル酸の定量にどの程度影響を与えるかについて検討した結果を Table II に示す。グリシン、ブドウ糖、L-グルタミン酸、蔗糖はサリチル酸に対して5000—10000倍モル共存しても差しつかえない。また、NaCl、コハク酸および乳酸は100—250倍モル以上であれば正誤差を与えるが、NaCl およびこれらの有機酸はエーテル抽出で分離すれば、さらに200—1000倍まで共存しても差しつかえないことがわかった。しかし、これらは食酢中にわずかしかな存在しないと思われるから実試料の定量に際しては、これらの影響を考慮する必要はないであろう。主成分の酢酸については、10000倍では約6%の正誤差を与える。一方、サリチル酸の添加量が法定限度(0.06 g/liter)⁹⁾の場合には、食酢(酢酸として約5%含有)中ではサリチル酸に対して約10000倍モルの酢酸が共存することになるので、エーテル抽出による分離を行なうことが望ましい。

食酢中のサリチル酸の定量 この方法を各種市販食酢中のサリチル酸の定量に応用した。まず、この方法を直接食酢に適用して検討した。その結果、標準添加法を用いてもメーカーの違い、醸造方法の相違によって検量線の勾配が異なる場合があり、直接法による定量では誤差が大きいことがわかった。これは共存物質の違いによるものと思われる。しかし、同一ロットの食酢については標準試料(サリチル酸無添加試料)を得ることができれば、簡易法としての直接定量も可能である。以上のようことから市販の各種食酢に共通に本法を適用するた

TABLE II. Effect of Various Substances

Addition	Mole ratio to SA ^{a)}	Weight ratio to SA ^{a)}	Recovery of SA(%)	
Acetic acid	1000	430	104	
	10000	4300	106	100 ^{b)}
Succinic acid	100	80	104	
	200	160	120	100 ^{b)}
Lactic acid	250	160	103	
	1000	650	107	104 ^{b)}
L-Glutamic acid	1000	1050	99	
Gluconic acid	500	700	94	
	1000	1400	88	97 ^{b)}
Glucose	5000	6500	100	
	10000	13000	102	
Saccharose	5000	12400	100	
	10000	24800	98	
Glycine	5000	2700	103	
	10000	5400	106	102 ^{b)}
Acetaldehyde	5000	1600	100	
	10000	3200	98	
Glycerine	10000	6600	100	
Sodium chloride	100	40	103	
	1000	400	143	100 ^{b)}

a) SA(salicylic acid): $4.0 \times 10^{-5} M$ b) ether separation

TABLE III. Analytical Results of Salicylic Acid in Commercial Vinegar

Sample	Salicylic acid (g/liter)	
	Proposed method	Official method
A	0.002 ₀	0.002 ₄
B	0.002 ₀	0.002 ₈
C	0.037 ₆	0.039 ₈

めには、あらかじめ公定法のエーテル抽出によって、サリチル酸を試料から分離することが望ましい。したがって、市販食酢中のサリチル酸の定量は標準操作1, 2に従って行なうことにした。Table III に示すように、公定法の紫外部吸収法と一致する結果が得られ、この方法がじゅうぶん実用に供し得ることがわかった。

9) 日本薬学会編, “衛生試験法注解,” 金原出版, 1956, p. 165.