〔衛生化学〕
EISEI KAGAKU
25 (4) 225—228 (1979)

ヘマテインによるスズの迅速比色定量法のかんじゅースへの応用¹⁾

塚田司郎, 山本郁男²⁾

北陸大学薬学部

Application of Colorimetry with Hematein to Rapid Determination of Tin in Canned Juice¹⁾

SHIRO TSUKADA and IKUO YAMAMOTO²⁾

School of Pharmacy, Hokuriku University

(Received March 30, 1979)

A rapid, simple, and accurate colorimetric method with hematein reagent was established for the determination of a trace of tin in canned juice. The sample was prepared by digesting 1.0—5.0 ml of canned juice with a mixture of sulfuric acid-nitric acid. To 0.2—1.4 ml of the sample, 0.1 ml of 10% tartaric acid and one drop of 1% phenolphthalein were added. After neutralization with alkali, 2 ml of 20% sulfuric acid and 2 ml of 1% acacia were further added. This mixture was diluted to 15 ml with water, and 5 ml of 0.3% hematein reagent was added and mixed well. This mixture was allowed to stand for 40 min at room temperature, and then was further diluted to 40 ml with 0.5% sulfuric acid. Absorbance of this solution was determined at 560 nm against the reagent blank.

Under the above condition, tin content in two kinds of canned juice was determined with a recovery of 94—111% and coefficient of variation of about 5%.

A more rapid method by the addition of hematein reagent directly without digestion of the sample juice was examined, and results obtained with canned orange and apple juice were very satisfactory, with a recovery of 96—109% and coefficient of variation of about 4%. The time required for determination of tin by this method was about 1 hr for 10 samples.

Keywords—tin determination; hematein; oxidized hematoxylin; colorimetry; canned juice

緒 言

前報³⁾において著者らは、かんじゅース中のスズ定量法として、迅速性の点で実用的価値のあると考えられる改良酸化ヘマトキシリン法を報告した。本法の原理は、試薬として用いるヘマトキシリンを過硫酸アンモニウムを酸化剤としてヘマテインに変換し、スズと(1:2)の複塩を形成、発色させたものである。そこで定量性、感度、操作の簡易性等を考慮すると、酸化反応を省くヘマテイン試薬⁴⁾を用いる方が合理的であると考えられるので、この点を検討し、前報³⁾による方法と比較した。さらに、市販かんじゅースに直接、本試薬を加え、比色定

量する方法も検討したので併せて報告する。

実 験 方 法

1. 試薬ならびに試料 試薬——ヘマテイン(和光純薬製)以外は全て前報³⁾に同じ。

ヘマテイン試液(0.3%)：ヘマテイン0.3gに40%エチルアルコール80mlを加え、沸騰水浴中で冷却管を取付け、1分間加熱、冷後40%エチルアルコールで100mlとし、ろ過後、使用した。

試料——市販の2種類のかんじゅース(オレンジ、リンゴ)を用いた。

2. 定量法 前報³⁾に従って灰化を行った後、試料

1) 本報告は日本薬学会第98年会、岡山、昭和53年4月発表。

2) Location: 3-Ho, Kanagawa-machi, Kanazawa (金沢市金川町ホ3番地)。

3) I. Yamamoto, S. Tsukada, K. Watanabe, T. Konishi, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **20**, 41 (1979)。

4) E. Asmus, H. J. Altmann, E. Thomasz, *Zeit. Anal. Chem.*, **216**, 3 (1966)。

0.2—1.4 ml (10—70 μg) をとり、酒石酸 0.1 ml, フェノールフタレイン溶液 1 滴を加え、水酸化ナトリウムで中和後、20%硫酸 2 ml, アラビアゴム溶液 2 ml を、それぞれ加えた後、水で全量 15 ml とする。さらにヘマテイン試液 5 ml を加えてよく振りまぜ、室温に 40 分間放置発色させたのち、これに 0.5%硫酸 20 ml を加えて全量 40 ml とし、試薬ブランクを対照として 560 nm で吸光度を測定する。スズ濃度はあらかじめ作成しておいた検量線から求める。

実験結果

1. 定量法の検討

1.1 検量線 濃度の異なったスズ標準液³⁾について 2 の定量法により吸光度を測定して検量線を作成した。その結果、Fig. 1 に示すごとく 10—70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度においてベールの法則が成立した。

Fig. 1. Comparisons of Calibration and Absorption Curves of Tin by the Improved Oxidized Hematoxylin Method and Hematein Method

—●— hematein, ...○... oxidized hematoxylin.

極大吸収は前報³⁾の改良酸化ヘマトキシリン法と同じ 560 nm にみられた。また、18%の感度の上昇が認められた。

1.2 ヘマテイン試液濃度と溶媒の検討 ヘマテイン試液調製のさい、ヘマテインは難水溶性物質であるため、アルコール：水系の溶媒を用いる必要がある。Asmusらは10%メチルアルコールを用いているので、種々の濃度のメチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコールおよびブチルアルコールを検討した。

Fig. 2. Effect of Four Kinds of Alcohol used on the Color Development when prepared Hematein Reagent

その結果、Fig. 2 に示すように、メチルアルコール、エチルアルコールが使用可能であり、特に40%エチルアルコールが最大吸光度を与えることが判った。従って、ヘマテイン試液の調製はヘマテイン 0.3 g を 40%エチルアルコールに溶解して 100 ml にしたものをを用いることに決定した。なお、本試液は前報³⁾で行った試液の安定性の検討と同様に 7 日経過後も呈色度は安定であった。

1.3 ヘマテイン試薬、酒石酸、硫酸、アラビアゴム等の添加量の検討 0.3%ヘマテイン試液、10%酒石酸、20%硫酸および1%アラビアゴム水溶液等の添加量を前報³⁾に準じて検討したが 2 に記したように前報と同条件、同量が最適であった。

1.4 妨害金属の影響 2 において最終測定溶液、40 ml 中、1 mg の添加で全く影響しなかった金属類は Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} , As^{3+} であったが、 Bi^{3+} , Sb^{3+} は正の妨害を示した。しかしながら 100 μg までは両者ともスズ定量に影響はなかった。これらの結果は、いずれも前報³⁾と同じであった。

1.5 添加回収実験 市販のオレンジ、リンゴかんジュースを使用し、スズとして 50 μg を添加し、回収実験を行ったところ Table I の結果を得た。

回収率 94—111%，添加前のジュース中のスズ含量は 1.4—4.9 ppm であった。

2. 直接添加迅速法

迅速性をさらにたかめるため、硫硝酸による灰化操作を省略する方法（以下、直接法と略す）を検討した。すなわち、試料ジュースをろ過または遠心分離を行って透明試料とした後、2 (実験方法) に従って発色定量を行っ

TABLE I. Recovery of Tin from Various Kinds of Canned Juices

Sample	No.	Sn ⁴⁺ presented ($\mu\text{g/ml}$)	Sn ⁴⁺ added (μg)	Sn ⁴⁺ found (μg)	Sn ⁴⁺ recovered (μg)	Recovery (%)
Orange juice	1	3.2	50.0	53.4	50.2	100.4
	2	2.4	50.0	56.0	53.6	107.2
	3	3.5	50.0	55.4	51.9	103.8
	4	1.4	50.0	48.5	47.1	94.2
	5	2.2	50.0	56.8	54.6	109.2
Apple juice	1	4.6	50.0	55.7	51.1	102.2
	2	4.9	50.0	58.2	53.3	106.6
	3	4.2	50.0	54.0	49.8	99.6
	4	4.0	50.0	59.5	55.5	111.0
	5	4.3	50.0	53.8	49.5	99.0

TABLE II. Comparisons of Digested and Non-digested Methods for Determination of Tin in Canned Juice with Hematein Reagent

Sample	Method	N	Recovery ^{a)}		Coefficient of variation (%)
			M $\pm$ SD (μg)	(%)	
Orange juice	Digested	10	51.8 $\pm$ 2.3	106.8	4.4
	Non-digested	10	54.7 $\pm$ 2.3	109.4	4.2
Apple juice	Digested	10	51.3 $\pm$ 2.2	102.6	4.3
	Non-digested	10	48.2 $\pm$ 2.1	96.4	4.4

a) The result was obtained from adding 50 μg , Sn⁴⁺ to the sample juice.

た。その結果 Table II に要約したごとく、直接法のオレンジジュースでは回収率 109.4%，変動係数 4.2%，従来法（灰化法）では回収率 106.8%，変動係数 4.4%。また、リンゴジュースでは直接法の回収率 96.4%，変動係数 4.4%，従来法では回収率 102.6%，変動係数 4.3% とほぼ同じような値を示した。しかし、トマトジュースなど赤色のものは、本法の呈色が 560 nm であるため不可能であった。なお、直接法は 10 試料でも 1 時間以内で定量出来るという利点が認められた。

考 察

ヘマテインを用いるスズの比色定量法は、すでに、1966年、Asmus ら⁴⁾ によって真鍮、青銅、ベアリング金属などの合金中に含有するスズの定量法として報告されており、ヘマテイン：スズの複塩の組成は (1:1) あるいは (2:1) であり、後者の呈色が定量に有用であるとされている。従って、前報³⁾ の改良酸化ヘマトキシリン法と本法との呈色が極大波長、560 nm と同一ピークを有する (Fig. 1) ことから、これらの複塩形成反応は

Fig. 3 のごとく考えられる。

前報でも述べたごとく、迅速性等を考える時、本法においてヘマテイン試液を用いた方がより有益である。

近時、かん詰工業の発達により、清涼飲料水および果汁をはじめとする多種類のかん詰製品が市販されており、かつてスズ異常溶出事故が発生したように、今後もその可能性が十分に懸念される。この防止にあたっては、短時間に多数の試料を分析できる簡便法の開発が実務上、緊急に必要と思われる。この場合、食品衛生法中、清涼飲料水のスズの溶出限度の規格では 150ppm とされているが、過去に発生したなかには 50—500 ppm という値が示されている。⁵⁾ 従って、実用性から考える時、1 ppm 以上のスズが再現性よく定量できるならば充分である。

ここで本法の特長を前報³⁾ の改良酸化ヘマトキシリン法と比較すると、つぎの通りである。

- (1) 試液の調製が容易である。
- (2) 定量感度は 18% 増である。

5) 静岡県，食品衛生研究，14 (No. 7)，53 (1964)。

Fig. 3. Reaction Mechanism of the Formation of Hematein-Tin Complex (2:1)

(3) 測定波長, 560 nm に影響しない試料ならば, 灰化操作を省いて直接定量が可能である。

などである。

スズ 50 μg の添加回収実験では Table I に示したように, 回収率 94—111 %, 変動係数もほぼ前報と同値 (約 5 %) を示した。さらに, 直接添加迅速法では, 回収率 96—109 %, 変動係数はオレンジジュース 4.2 %, リンゴジュース 4.4 % と良好な結果を与え, 大幅な時間短縮を行うことが出来た。

結 論

市販かんジュース中の微量のスズをヘマテイン試薬を用いて定量するための分析法を検討した。

かんジュースを湿式灰化後, 酒石酸を加え, アルカリで中和, 20 % 硫酸, 1 % アラビアゴム水溶液, さらに 0.3 % ヘマテイン試液を加え混和, 0.5 % 硫酸で 40 ml として 560 nm で比色定量する。本法によるかんジュース中のスズの約 1 ppm における回収率は 94—111 %, 変動係数は約 5 % であった。

また, 湿式灰化を行わない直接添加迅速法では回収率 96—109 %, 変動係数, 約 4 % でオレンジ, リンゴジュースに適用できる。