寒天中のホウ酸の簡易迅速分析法

(昭和 63 年 4 月 12 日受理)

林 弘 道* 宮川あし子*
石原 祐 治* 原 田 行 雄*

Simple and Rapid Method for Quantitative Analysis of Boric Acid in Agars

Hiromichi HAYASHI, Ashiko MIYAGAWA, Yuuji ISHIHARA and Yukio HARADA

(Nagano Research Institute for Health and Pollution: 1978, Komemura, Amori, Nagano, Japan)

A method was developed for the rapid and simple analysis of boric acid in agar and seaweed.

Hard glass beakers and flasks were used to dissolve the samples in diluted sulfuric acid (0.1~1.8N) by boiling. The optimum boiling times were 3 min for agar and 10 min for seaweed. These sample solutions did not gel even if the temperature fell to below 20°C. The concentration of boric acid in the solution was immediately determined by the spectrophotometric curcumin method after extraction with 2-ethyl-1,3-hexanediol in chloroform.

A time of only 1.5 to 2.0 hours was required to analyze several samples simultaneously. The duplicate analysis showed good precision, and the relative standard deviation was 5.4~6.8% for boric acid at levels corresponding to 1,000 mg/kg in dry samples.

The value obtained by the present method was about 20 to 25% higher than the value obtained by the official method based on titration.

(Received April 12, 1988)

Key words: 寒天 agar; てんぐさ類 *Gelidium* sp.; ホウ酸 boric acid; クルクミン curcumin; 2-エチル-1,3-ヘキサジオール 2-ethyl-1,3-hexanediol; 比色定量 colorimetry

緒 言

寒天中のホウ酸の分析法は食品衛生法の成分規格¹⁾で示されている。この成分規格の試験法は、試料を高温灰化後中和滴定によってホウ酸を求める方法で、分析法の迅速性、簡便性の点で問題が多い。

食品中の微量ホウ酸の定量法としては、カーミン、キナリザリン、アンスリミド、アリザリン、クルクミンなどを用いた比色定量法が比較的良好に知られ²⁾、中でも 2-エチル-1,3-ヘキサジオール (EHD) 抽出-クルクミン比色法^{3), 4)}は共存塩類の影響を除くことができ、所要時間の短縮と操作の簡便化が図られた良好な方法と考えられる。しかし、分析操作全般についてみると、いずれの食品でもアルカリ性下で高温灰化する前処理を行うため、操作に時間を要し効率的ではない。

一方、寒天溶液は酸性下で加熱すると、冷後生じたゲルのジェリー強度が著しく減少し、更には凝固性も失う

性質⁵⁾があり、冷時でも固まらない寒天溶液を容易に調製することができる。また生物組織中ではホウ素は主にホウ酸として存在し、炭水化物などの水酸基と錯化合物を形成⁶⁾していると言われることから、反応性の EHD とは容易に錯体形成をするものと考えられる⁷⁾。

そこで著者らはこの凝固しない寒天溶液を調製し、EHD 抽出-クルクミン比色法を利用し、分析時間の短縮と操作の簡便化についての諸条件を検討し、その結果、ほぼ満足の方法を見いだした。また、この方法を寒天原料の紅藻類海藻にも適用し、十分応用可能であることが分かった。これらの検討結果を以下に報告する。

実験方法

1. 試 料

昭和 60 年 12 月から昭和 61 年 2 月までの冬期に国内で製造された糸、角寒天及び製造原料の国内産、外国産テングサ、オゴノリを実験に用いた。寒天の場合はあらかじめ 100°で 3 時間乾燥し、手揉みで粉碎混合した。

* 長野県衛生公害研究所: 長野県長野市大字安茂里字米村 1978

Fig. 1. Relation between amount of found boric acid and concentration of sulfuric acid in agar solution
Boiling time: 3 min

また、原藻類は十分水洗して砂、小石などの異物を除いた後、 100° で1昼夜乾燥し、細切し試料とした。

2. 試薬

ホウ酸標準溶液: 関東化学(株)製試薬特級品をポリエチレン製メスフラスコ中で精製水に溶解し、0.5 mg/ml濃度の標準原液を調製し、密栓してポリエチレン瓶に保存し、用時、精製水で100倍希釈して5 mg/Lの標準溶液を調製した。

EHD-クロロホルム溶液: 和光純薬工業(株)製試薬一級品 EHD 10 ml にクロロホルムを加えて100 ml として混合し、ポリエチレン製容器に保存した。

クルクミン溶液: 和光純薬工業(株)製試薬特級品 0.1 g を酢酸に溶かして100 ml とし、ポリエチレン製容器に保存した。

その他の試薬はいずれも特級品を使用した。

3. 器具及び装置

分光光度計: (株)島津製作所製 UV-120-02 型

4. 試験溶液の調製

寒天: 試料 1 g を正確に 200 ml ビーカーに採取し、0.7N 硫酸 100 ml を加え直火で加熱し、静にかきまぜながら3分間煮沸した後室温に冷却し、精製水を加え正確に100 ml とした。本溶液はポリエチレン製容器に保存した。

原藻類: 試料 1 g を透明割合せ 250 ml の丸底フラスコに正確に採取し、0.7N 硫酸 90 ml を加え、球付き冷却器を付して直火で10分間加熱還流した。直ちにNo. 5 種 A ろ紙で吸引ろ過し、冷後、精製水を加えて正確に100 ml とし、ポリエチレン製容器に保存した。

5. 定量方法

試験溶液中のホウ酸濃度は、EHD 抽出-クルクミン比色法⁹⁾に従って求め、更に試料当りの濃度に換算した。

Fig. 2. Effect of boiling time on amount of found boric acid in agar solution at 0.7N sulfuric acid

Fig. 3. Effect of boiling time on amount of found boric acid in algae extracted solution at 0.7N sulfuric acid
—△—: *Gracilaria verrucosa*; —○—: *Gelidium*

結果と考察

1. 硫酸濃度とホウ酸定量値との関係

それぞれの容器に同重量の角寒天粉末試料を採取し、規定度の異なる硫酸の同量を加え、3分間同一加熱条件で煮沸後、一定量として各溶液中のホウ酸濃度を求めた。ホウ酸の定量値と寒天溶液の硫酸濃度との関係を Fig. 1 に示した。なお、EHD-クロロホルム溶液によるホウ酸の抽出は、各溶液の硫酸濃度がそれぞれ異なるため、50%硫酸の添加量を加減し、約3Nに調節した後行った。

ホウ酸の定量値は0.1~1.8Nの広い硫酸濃度範囲についてほぼ一定であり、濃度による影響は見られなかった。また、3分間煮沸後の溶液の色は、硫酸濃度が高くなるにつれて淡黄色から褐色に着色し、特に0.7N以

Table 1. Mean Value and Variations of Boric Acid Levels in Blank Examination

Glassware ^a	n ^b	H ₃ BO ₃ (μg)		
		Range	Mean	S. D. ^c
Beaker A	10	0~20	7.9	7.2
Beaker B	6	3~17	11.2	6.1

^a Beaker A and B are made from borosilicate glass of each manufacturer.

^b Numbers of vessel

^c Standard deviation

上ではこの着色が顕著であった。しかし、この着色は EHD-クロロホルムには移行しないこと、及び広い硫酸濃度範囲にわたってホウ酸濃度が一定であることから、定量値には何ら影響を及ぼさないと考えられる。

一方、これらの溶液は普通寒天培地⁸⁾とほぼ同割合の寒天分を含有しているため、硫酸無添加の溶液は冷後明らかに凝固したが、0.1~1.8N の硫酸で前処理を行った場合には、いずれもゲル形成は見られなかった。

2. 煮沸時間とホウ酸の定量値との関係

最適加熱時間を知るため、寒天粉末試料及び原藻について、溶液中のホウ酸濃度と煮沸時間との関係を調べ、それぞれ Fig. 2, Fig. 3 に示した。

寒天粉末試料の場合、溶液中のホウ酸濃度は、沸騰開始直後から約 100 秒間経過までは暫増傾向が見られたが、それ以降はほぼ一定の値を示した。Fig. 2 のグラフから、寒天粉末試料の場合は少なくとも 3 分間以上の沸騰加熱が必要と考えられる。

一方、原藻類の場合、溶液中のホウ酸濃度は煮沸直後から数分間、大きな変動がみられたが、約 10 分間経過以降ではほぼ一定値を示した。この煮沸初期の著しい変動は、海藻の煮沸による多糖類粘液質の急激な溶出によって、溶液中のホウ酸濃度が一時的に不均一分布を呈したためと考えられる。また、原藻の場合も、硫酸酸性下での煮沸により溶液は冷後の凝固性を失ったが、これは寒天成分の分解⁹⁾によるものと考えられる。従って、原藻の場合、安定な定量値を得るためには、寒天に比べより長い沸騰加熱時間を必要とするが、定量法の迅速性を考慮し、10 分間の煮沸時間が適当と考えられる。

3. 盲 検 値

0.7N 硫酸を用いて試料と全く同様の前処理操作を行い、全分析操作の中で認められる盲検値について検討した。

市販 2 社のビーカーについて各ビーカー間での盲検値の変動と平均値を Table 1 に示した。これらは B₂O₃ として 12~13%⁹⁾を含有する市販のホウケイ酸ガラスで、A は新規購入のもの、B は既使用のものである。両データ間の平均値及び標準偏差には顕著な差は認められ

Table 2. Mean Value and Variation of Boric Acid Levels in Repeated Blank Examination Using same Beaker and Flask

Glassware	n ^c	H ₃ BO ₃ (μg)		
		Range	Mean	S. D. ^d
Beaker A ^a	6	6~16	10.7	3.6
Beaker B ^a	6	0~24	10.8	8.0
Flask C ^b	5	8~65	46	25

^a Samples same as in Table 1

^b Flask C are made from borosilicate glass.

^c Numbers of trials to same beaker and flask

^d Standard deviation

ず、盲検値はいずれも 10 μg 前後であった。

一方、同一器具の繰返し使用による盲検値の変動を Table 2 に示した。

ビーカーの場合、変動係数は 34~71% となり、同一社製の各ビーカー間の変動とほぼ同じであった。丸底フラスコの場合はビーカーを使用した場合のおよそ 4 倍の 46 μg を示した。

これらの盲検値は、寒天や原藻分析の場合に検出されるホウ酸量と比べ、そのおよそ 1~5% 程度となる。そこで、簡便法として本法を利用するときは、盲検値を無視しても実測値にそれほど大きな影響を与えないが、より精密な分析のためには石英製またはホウ素含有量の少ないガラス製品を選択して使用、あるいは実測値から盲検値を差し引く必要がある。

4. 定量値の再現性

3 種の実試料についてホウ酸含有量を本法に従って分析し、各データをまとめて Table 3 に示した。

実験に供した各々の試料はホウ酸としていずれも 1,000 mg/kg 前後含有し、定量値の変動係数は寒天、テングサ、オゴノリそれぞれ 5.4, 6.8, 5.7% と比較的小さく、再現性の良い分析法として、十分実用性があると考えられる。

5. 他の分析法との比較

角寒天の乾燥粉末試料について、本法による定量値と乾式高温灰化-中和滴定法¹⁾による定量値との関係を Fig. 4 に示した。

両者は相関係数 0.918 で良好な直線関係が認められた。その直線回帰式は $y=0.801x+0.034$ となり、本法による定量値はおおよそ 20~25% 程度高い値を示した。この乾式高温灰化-中和滴定法は全般にわたって操作が煩雑なため負の実験誤差の要因となりやすく、加えて、ホウ酸が高温での加熱により揮散する懸念がある²⁾。これに対し、本法は操作が簡便なため損失も少なく、EHD 抽出-クルクミン比色法では定量妨害物質の影響もほとんどない⁴⁾。このような理由で両数値間に差を生じたも

Table 3. Results of Determination of Boric Acid for Agar and Seaweed Samples

Name	n	Amount found (H_3BO_3 , mg/kg)			
		Replicate data		Mean	S. D.*
Agar	9	1,267, 1,318, 1,354, 1,311, 1,163, 1,250, 1,196, 1,182, 1,198		1,249	68
Seaweeds					
<i>Gelidium</i>	8	1,231, 1,185, 1,422, 1,384, 1,183, 1,315, 1,321, 1,319		1,295	88
<i>Gracilaria</i>	8	1,003, 1,000, 1,012, 1,007, 951		980	56
<i>verrucosa</i>		998, 1,021, 851			

* S. D.: Standard deviation

Fig. 4. Correlation between the concentration of boric acid in agar obtained from the present method and those from official method

のと推定される。その分析所要時間について比較すると、本分析法では数検体まとめて1.5～2時間以内に分析でき、極めて迅速である。加えて、一度に多数の検体の前処理並びに定量が可能であるため、非常に効率的である。一方、乾式高温灰化-中和滴定法¹⁾では少なくとも10時間以上の前処理を要し、かつ、器具や装置類の制約があるため、あまり多数の検体を一度期に処理することはできない。

この実験とは別に、著者らは寒天をアルカリ性下で高温灰化した後比色定量する方法についても検討したが、少量の試料で分析できるという利点がある反面、やはり高温灰化に最低1～2時間を要するため、本法に比べ迅速性の点で劣る。

原藻類について、本法による定量値とアルカリ性下で乾式高温灰化し、EHD抽出-クルクミン比色法⁴⁾で得た定量値との関係をFig. 5に示した。両者の関係は相関係数0.971で極めて良好な直線関係を示し、その直線回帰式は $y=1.038x-0.066$ となり、両試験法による定量値間に有意の差は認められなかった。

Fig. 5. Correlation between the concentration of boric acid in algae obtained from the present method and those from standard method*

* Standard method of analysis for Hygienic Chemists authorized by the pharmaceutical Society of Japan (1983)⁴⁾.

ま と め

試料を0.7N硫酸とともに加熱溶解し、直ちにEHD抽出-クルクミン比色法で定量することにより、寒天及び原藻中のホウ酸含有量を簡便かつ迅速に分析する方法を確立した。

1. 煮沸溶解した寒天溶液中のホウ酸含有量の分析値は、0.1～1.8Nの範囲で硫酸濃度による影響を受けなかった。煮沸時間は寒天で3分、原藻で10分以上を要し、この前処理により溶液の凝固性は全く失われた。

2. 定量値の変動係数は寒天、テングサ、オゴノリそれぞれ5.4, 6.8, 5.7%と良好であった。なお、盲検値は寒天分析で約10μg、原藻分析で40～50μgを示した。

3. 寒天、原藻いずれも公定試験法^{1), 4)}と比べ分析時間の短縮化が図られ、かつ能率的であり、その分析値はこれらの試験法と互いに直線的に有意の相関性を認めた。また、寒天では本法が20～25%高い値を示し、操作

中でのホウ酸の損失が極めて少ないと考えられた。

本研究の要旨は第 24 回全国衛生化学技術協議会年会 (1987 年 10 月, 東京) において発表した。

文 献

- 1) 厚生省告示第 370 号, 昭和 34 年 12 月 28 日.
- 2) 村木勇夫, 日色和夫: 分化. **6**, 319~326 (1957).
- 3) Mair, J. W. Jr., Day, H. G.: Anal. Chem. **44**, 2,015~2,017 (1972).
- 4) 日本薬学会: “日本薬学会第 103 年会・公衆衛生協議会資料” p. 53~54 (1983), 東京.
- 5) 松橋鉄治郎: ニューフードインダストリー, **22**, 17~23 (1980).
- 6) 内山 充, 近藤龍雄, 慶田雅洋, 伊藤誉志男: “食品中に存在するホウ酸について” 昭和 53 年度食品衛生調査研究.
- 7) Conner, J. M, Bulgrin, V. C.: J. Inorg. Nucl. Chem. **29**, 1,953~1,961 (1967).
- 8) 京都大学農学部農芸化学教室編: “新訂版農芸化学実験書, 第 2 巻” p. 788~795 (1974), 産業図書.
- 9) 平野四蔵著: “工業分析化学実験 (上)” p. 3~4 (1964), 共立出版.