Cuproin による食品中の微量銅定量法の検討

(昭和 38 年 4 月 22 日 受理)

内 山 充* 福原美喜子*

Determination of Copper in Foodstuffs with 2, 2'-Biquinoline

Mitsuru UCHIYAMA and Mikiko FUKUHARA

(Institute of Pharmacy, Tohoku University School of Medicine
: Kita 4-bancho, Sendai)

2, 2'-biquinoline was used for the determination of copper in foodstuffs. Analytical results were compared with those obtained by diethyldithiocarbamate method. Presented method was recognized to be more suitable than carbamate method for the following reason: negligible blank value, formation of stable color, less interference by other cations, possibility for determining cuprous and cupric ion separately.

(Received April 22, 1963)

食品あるいは衛生化学上の諸試料中に存在する微量の銅の定量法については現在 diethyldithiocarbamate を用いる比色法が提唱されている。これは銅に特異的でもかなり鋭敏な方法であって一般に使用される分析法である。このほか近年他のキレート試薬として phenanthroline または bipyridyl 系統の有機試薬が銅の定量の目的でも研究され、分析化学や臨床分析方面で実用に供されている¹⁾²⁾。食品中の銅の定量にも 2, 9-dimethyl-1, 10-phenanthroline を用いた報告³⁾が見られる。本報では著者らは Cuproin (2, 2'-biquinoline) をとり上げ、この試薬を食品等の銅含有量の定量に応用した。すなわち試料を壊機後 pH を調整しそれに Cuproin 試薬を加えて銅とのコンプレックスを作り、感度を上げ共存イオンの影響を少なくする目的で、このコンプレックスをイソアミルアルコールで抽出して比色定量する方法である。Cuproin は一価の銅とのみ特異的に結合し発色する⁴⁾ので還元剤の添加が必要である。つぎにこの実験結果を従来の diethyldithiocarbamate 法と比較検討した結果、共存イオンによる影響、呈色の安定度、呈色色調、空試験値等において Cuproin 法の方が diethyldithiocarbamate 法に比しすぐれていることを認めた。

実験方法

1. 検液の調製法

乾式灰化：磁製ルツボに試量一定量 (1~5 g, Cu として 10 μ g 以上を含むもの) をとり、液体の多い場合は蒸発乾涸してから電気炉で充分炭化させたのち熱灼灰化し、冷後希塩酸に溶解して検液としつぎの定量操作に移す。

湿式壊機：試料 1~5 g をケルダールフラスコにとり常法⁵⁾に従って硫酸壊機を行なう。壊機の終期に過塩素酸 1 滴を加えて加熱し壊機を完全ならしめる必要がある。

塩酸抽出法：比較的柔らかい試料で着色料を含まぬものについては、試料に同量の水を加えてホモジネートを作り、さらに水と同量の 5 N 塩酸を加えてホモジナイズする。これを少量の水で遠心管に流し込み 40° の水浴中に 15 分間保つ。これに 10% トリクロル酢酸を塩酸と同量加えてかきまぜ、3,000 rpm, 15 分間遠心分離して上清を検液とする。

2. 試薬

Cuproin-イソアミルアルコール試液：Cuproin 5 mg をイソアミルアルコールに溶かし 100 ml とする。

銅標準液：CuSO₄ · 5 H₂O 0.3930 g を水に溶かし硫酸 1 ml を加え全量を 1,000 ml とする。これを原液とし、

* 東北大学医学部薬学科：仙台市北四番丁 85

この10倍希釈液を標準液とする。標準液 1 ml は Cu^{++} 10 μg を含む。

10%酒石酸溶液

10%ヒドロキシルアミン塩酸塩溶液

アンモニア水 28% (局方)

3. 定量操作

検液 1~5 ml (Cu^{++} として 1~10 μg を含むもの) を 15 ml の共栓試験管にとり、酒石酸溶液 1 ml とヒドロキシルアミン溶液 1 ml を加えたのち、アンモニア水で pH を 5~6 に調整する (試験紙 BCG および MR を使用)。Cuproin-イソアミルアルコール試液を正確に 2 ml 加え 1~2 分間激しく振とうしたのち 2,000~3,000 rpm で 5 分間遠心分離する。光電比色計を用いてイソアミルアルコール層を 550 $\text{m}\mu^*$ で比色する。対照にはイソアミルアルコールを用いる。別に銅標準液を用いて同様に操作し検量線を作成しておく。

一二価銅の分離定量を行なうには上記操作中ヒドロキシルアミン溶液を加えることなく操作して、イソアミルアルコール層を 550 $\text{m}\mu$ で比色し一価の銅を定量したのち、比色液を試験管にもどしこれにヒドロキシルアミン溶液 1 ml を加えて再び激しく振とうして遠心分離する。ここに得るイソアミルアルコール層の比色定量によって総銅量を知り、前記一価銅の定量値との差から二価銅の量を求める。

実験結果ならびに考察

1. 検液の調製法について

乾式灰化によって作成した検液ではきわめて良好な定量結果をうることができた。ルツボは磁製と白金製との間に定量値の差は見られなかった。

試料がタンパク性 (特に動物タンパク) の場合には湿式壊機において通常の硫酸壊機を行なうと発色妨害物質の残存が認められる。この妨害物質は壊機の終末期に過塩素酸を滴加して加熱し、壊機を完全にすることにより除去することができる⁹⁾。また湿式壊機によって残存する少量の酸化性窒素はヒドロキシルアミンによって除かれるので影響を示さずシュウ酸アンモニウム等の添加は不要である。塩酸抽出法は人工着色料を含む試料には適用できないが、天然の試料を用いる場合には本法では良好な結果を得る。diethyldithiocarbamate 法の場合には塩酸抽出法によって検液を作成すると、大量のトリクロル酢酸を用いて除タンパクしてもなおタンパク質の影響で定量値が低くなり不適である。

2. 定量法に関して

Cuproin は一価の銅と特異的にコンプレックスを作り紅色に発色する。Klotz⁹⁾ は Cuproin- 水酢酸溶液を用いて銅の定量を行なっているが、Cuproin が水に不溶

であることと、感度を上げる目的のためにイソアミルアルコール中にコンプレックスを抽出する方法をとった。銅をすべて一価に還元するためにヒドロキシルアミンを加え、また共存金属イオンの影響を少なくするため酒石酸を添加する。還元剤としてシステインやアスコルビン酸を用いる方法もあるが実験の結果、呈色後の色調の安定性に欠けることが認められた。

定量に際しての検液の pH による呈色度の変化は Fig. 1 に示すごとくである。すなわち至適 pH は 5~6 である。Breckenridge ら⁷⁾ は至適 pH を 2~9 と報告している。

Fig. 1. Influence of pH of test solution on the determination of copper ($10\mu\text{g Cu}^{++}$) with Cuproin

標準液を用いて作成した検量線を Fig. 2 に示す。diethyldithiocarbamate 法においては銅として 1 μg 程度の空試験値を示す⁸⁾ が、Cuproin 法では空試験値はきわめて低くほとんど 0 である。このため微量の銅の定量にかなりの精度が期待できる。

Fig. 2. Calibration curve of Cuproin method for copper determination

3. 呈色後の安定性

Cuproin による呈色はきわめて安定であって、温度、日光等により影響を受けず 72 時間は変化しない。diethyl-

* 最大吸収は 545 $\text{m}\mu$ である。

dithiocarbamate による発色は安定性が低く、直射日光を避けて保存しても6時間程度で退色しはじめる。また比色液に微量の水分が残留すると20~30分間で混濁を示す。Cuproin 法ではこのような現象は見られない。

4. 共存金属イオン影響

diethyldithiocarbamate 法では Fe^{++} , Hg^{++} , Mn^{++} 等の金属イオンの存在により発色が阻害されることが知られている⁹⁾。Cuproin は銅に対し鋭敏かつ特異的な発色試薬であり、共存イオンによる影響は diethyldithiocarbamate 法に比べて少ない。ここでは上記 Fe^{++} , Hg^{++} , Mn^{++} をはじめ数種の金属イオンにつき発色に対する影響を比較検討した。Table 1 にその結果を示す。検液: $10 \mu\text{g Cu}^{++}$ in 5 ml.

Table 1. Maximum Permissible Amount of Other Metal Contamination for Copper Determination with Cuproin and Carbamate

Cuproin method	Metals	Carbamate method
>50 mg	Mn^{++}	50 mg(+)
20 mg(+)	Fe^{+++}	0.5 mg(+)
20 mg(-)	Hg^{++}	0.3 mg(-)
40 mg(-)	Si^{++}	0.5 mg(-)
10 mg(-)	Sn^{++}	10 mg(-)
>50 mg	Pb^{++}	>50 mg
>50 mg	Zn^{++}	>50 mg
>50 mg	As^{+++}	>50 mg

(+) indicates the increase and (-) indicates the decrease of optical density.

5. 定量例

Table 2, 3 および 4 に各種壊機法を用いた場合の実験試料の分析と、それらに銅を添加したものの定量結果を示す。ここで明らかのように本法によって微量の銅がきわめて回収率よく定量される。

Table 2. Results for Copper Determination Using Wet Digested Sample

Sample (g)	Cu^{++} added (μg)	Copper found by Cuproin method	Carbamate method
Skimmed Milk 0.16	0	0.4(μg)	0.3(μg)
Skimmed Milk 0.16	4.0	4.4	4.3
Sucrose 0.16	0	0.4	0.3
Sucrose 0.16	4.0	4.3	4.2
Casein 0.16	0	0.3	0.3
Casein 0.16	4.0	4.4	4.2

Table 3. Results for Copper Determination Using Ashed Sample

Sample (g)	Cu^{++} added (μg)	Copper found by Cuproin method	Carbamate method
Milk 0.8	4.0	4.6(μg)	4.6(μg)
Potato 0.4	4.0	4.1	4.1
Beef liver 0.4	4.0	5.3	5.5
Canned peas 2.0	0	7.5	7.3
Grape juice 2.0	0	0.9	0.8

Table 4. Results for Copper Determination Using HCl-Extraction

Sample (g)	Cu^{++} added (μg)	Copper found by Cuproin method	Carbamate method
Beef liver 0.5	0	1.5(μg)	—*
Beef liver 0.5	10.0	11.4	—
Milk 2.0	0	1.1	—
Milk 2.0	10.0	11.1	—
Egg white 3.0	0	0.8	—
Egg white 3.0	10.0	11.0	—
Potato 2.0	0	0.5	0.5
Potato 2.0	10.0	11.0	11.0

* Carbamate method is not applicable when the sample contains high protein.

結 論

Cuproin (2, 2'-biquinoline) を用いて食品中の銅の微量定量を行ない良好な結果を得た。さらにこの方法を従来の diethyldithiocarbamate 法と比較した結果つぎの諸点においてすぐれていることを認めた。すなわち、i) 空試験の値がほとんど0であり微量域における精度が高いこと。ii) 発色後の色調の変化がきわめて少なく安定であること。iii) 呈色色調が $550 \text{ m}\mu$ 付近に最大吸収を有し測定に便利であること。iv) 共存イオンの影響が少なく誤差の危険が少ないこと。v) 塩酸抽出法による検液の調製が可能であること。vi) 目的によっては銅の一二価の分離定量が可能であること。

文 献

- 1) R. E. Peterson, M. E. Bollier: Anal. Chem. 27, 1195 (1955).
- 2) G. Felsenfeld: Arch. Biochem. Biophys. 87, 247 (1960).

- 3) P. D. Jones, E. J. Newman : The Analyst **87**, 637 (1962).
- 4) J. Hoste, J. Gillis, J. Eeckhout : Anal. chim. Acta **9**, 263 (1953).
- 5) 衛生試験法注解：“有害性金属試験法”p. 137 参照 (1957).
- 6) I. M. Klotz, T. A. Klotz : Science **121**, 477 (1955).
- 7) J. G. Breckenridge, R. W. J. Lewis, L. A. Quirk : Can. J. Research **17 B**, 258 (1939).
- 8) 衛生試験法 (昭和38年度追加) p. 62 (1963).
- 9) G. H. Morrison, H. Freiser : “Solvent Extraction in Analytical Chemistry” (1957).

薄層クロマトグラフィーによる色素の分析について (第1報)

油溶性色素について

(昭和38年4月22日受理)

藤井清次* 神蔵美枝子*

Thin Layer Chromatography of Coal-Tar Dyes (I) Oil-Soluble Dyes

Seiji FUJII and Mieko KAMIKURA

(National Institute of Hygienic Sciences : Tamagawayoga-machi, Setagaya-ku, Tokyo)

Thin layer chromatography with silica gel was applied to 15 oil-soluble dyes (Table 1) and 12 solvents (Table 2) have been studied as developer.

The results obtained were as follows :

- 1) Azobenzene, *p*-aminoazobenzene, Butter Yellow, *p*-methoxyazobenzene, *p*-hydroxyazobenzene, Sudan G could be separated by dichloroethane (1, 2).
- 2) Oil Yellow AB and Oil Yellow OB could be separated by xylene or pentachloroethane.
- 3) Sudan III, Sudan IV and Oil Red OS could be separated by dichloroethane, chloroform or trichloroethane (1, 1, 2), respectively.
- 4) Quinoline Yellow SS could be separated from above-mentioned dyes by chloroform.

(Received April 22, 1963)

油溶性色素は従来逆相クロマトグラフィー¹⁾またはカラムクロマトグラフィー²⁾による分離が種々検討されてきた。最近、色素分析に薄層クロマトグラフィー³⁾が応用されるようになり、Davidek ら⁴⁾はアルミナのプレート傾斜法を用いて油溶性色素の分離を行ない、また Montag⁵⁾はシリカゲルを用いて天然色素および油溶性色素の分離を行なっている。

著者らは15種類の油溶性色素について、シリカゲルの

薄層を用い、まず単独溶媒によるこれらの色素の分離状態を検索する目的で基礎実験を行なったのでここにその結果を報告する。

実験方法

使用した色素は Table 1 に示す15種類である。

Table 1 の色素は0.05%クロロホルム溶液として用いた。ただしアゾベンゼン、*p*-アミノアゾベンゼン、*p*-メトキシアゾベンゼン、*p*-ヒドロキシアゾベンゼンについては0.1%クロロホルム溶液として用いた。

展開溶媒としては Table 2 に示す12種類を用いた。薄層の作成には、スイス CAMAG 社製の装置を用い、

* 国立衛生試験所食品添加物部：東京都世田谷区玉川用賀町 2-203