食品添加物の分析に関する研究(第7報)^{*1}ピリジン・チオシアン酸法による銅の定量法と
食品添加物, 医薬品, 水等に対する応用例

(昭和40年7月1日受理)

菅野三郎^{*2} 詫摩真澄^{*2} 中岡正吉^{*2}Studies on Analysis of Food Additives (VII)
Determination of Copper Ion by Pyridine·Thiocyanate Method
and Its Application to Food Additive Drugs and Water

Saburo KANNO, Masumi TAKUMA, and Tadayoshi NAKAOKA

(Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory:

52-2, Nakao-cho, Hodogaya-ku, Yokohama)

The diethyldithiocarbamate method of copper ion is generally used as the assay method of copper ion. However, the color obtained by this method is unstable.

In this report, the experimental conditions of the colorimetric method are described, in which pyridine and ammonium thiocyanate are used as the reagents. The new method is more excellent than the diethyldithiocarbamate method in the following points.

- (1) Chloroform is very effective in case of extraction of the colored substance.
- (2) The colored chloroform solution ($\lambda_{\max}$. 407 $m\mu$) is stable through 24 hours.
- (3) The method is not interfered by the coexistence of most of cations and anions except ferrous ion. The interference of ferrous ion, however, is able to be avoided by the addition of potassium persulfate.
- (4) The method is able to be applied to the determination of copper in foods, drugs and water. For example, in case of water containing 1 ppm of copper ion, about 0.33 is obtained as the absorbance (the volume of the sample water: 200 ml, the length of the cell: 10 mm).

(Received July 1, 1965)

I まえがき

食品, 医薬品および水道水中の銅の含有量についてはそれぞれ法律上の規制があり, たとえば Table 1 のようになっている。

銅の定量法としては, 従来ジエチルジチオカルバミン酸法¹⁾が繁用されており, その他ポーラログラフイー²⁾による測定法もある。ジエチルジチオカルバミン酸法は感度は鋭敏であるが, 他の金属イオンの妨害を受けやす

いこと, したがってその妨害を除くために試験溶液の調製法が煩雑になること³⁾および pH の調整が困難等の欠点がある。

今回著者らは, ピリジン・チオシアン酸塩による銅の呈色反応を利用する定量法⁴⁾について検討した。この反応については, 数多くの報告⁴⁾があるが, それによると銅イオンはピリジンおよびチオシアン酸塩と反応して $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{N})_2](\text{CNS})_2$ なる錯化合物を作り, このものはクロロホルムもしくはブロモベンゼンに可溶であり, 定量可能であると報告されているが, 各種妨害イオンの影響, 呈色液の安定性, クロロホルムによる呈色物質の抽

^{*1} 第6報: 食衛誌. 5, 318 (1964).

^{*2} 神奈川県衛生研究所: 横浜市保土ヶ谷区中尾町52—2

Table 1. Maximum Allowable Concentration of Copper

Group	Articles	Maximum allowable concentration
Foods	Vegetable and fruit to be preserved	100 ppm (as Cu)
	Tangle (dried)	150 ppm
	Chewing gum	50 ppm (in case of sodium copper chlorophyllin) 40 ppm (in case of copper chlorophyll)
	Agar in canned "Mitsumame"	4 ppm
Drugs	For example, Combined vitamin preparations Minerals containing multi-vitamin preparations	Quantity shown in each recipe
Water	Drinking water	1 ppm

* Sweetened, boiled bean mixture, in airtight containers

出効率等の詳細な点については必ずしも明らかにされていない。そこで、これらの点につき詳細に検討を加えた結果、つぎのような特徴を有することが判明した。

(1) 妨害イオンの影響をほとんど受けない。すなわち Ca^{2+} , Mg^{2+} , As^{3+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} および PO_4^{3-} , CrO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} は Cu^{2+} の 200 倍量あっても妨害しない。 Fe^{3+} は 75 倍量あっても妨害しない。 Al^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} は 20 倍量あっても妨害しない。 Sn^{2+} , Sn^{4+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} はわずかながら妨害するが通常の銅添加物食品およびミネラル剤等中の銅の試験の場合には妨害しない。 Fe^{2+} はきわめて強く妨害するが、過硫酸カリウムによる酸化処理 ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) を加えることにより全く妨害しなくなる。

(2) 呈色液の安定性がきわめてよい (24 時間以上安定)。

(3) クロロホルムによる呈色物質の抽出効率がきわめてよく、再現性もよい。

(4) 試薬は精製しなくともそのまま使用できる。

などの諸点を有することを見いだした。上記の種種の特長を有するので、本法は感度は劣るが (Cu として 40 μg 以上)、食品、医薬品、水等に応用し (水道法による銅の規格 1 ppm の水 200 ml を用いた場合、吸光度は約 0.33 付近)、従来のジェチルジエチルカルバミン酸法に比べてはるかに実用性および確実性を有することを認めたので報告する。

II 定量法

A. 食品、医薬品等の場合

(1) 試薬

銅標準溶液：硫酸銅 (結晶) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) [特級]

1.5718 g を精密に量り、水に溶かして正確に 1,000 ml とし、その 100 ml を正確にとり、水を加えて正確に 1,000 ml とし、これを銅標準溶液とする。

銅標準溶液 1 ml = 40 μg Cu

(2) 試験溶液の調製

銅として 80~800 μg を含むようにして粉碎した試料適量を精密に量り、分解フラスコ中に入れ、沸石 2~3 個、水 10~25 ml および硝酸 30 ml を加えゆるやかに加熱し、放冷後硫酸 10 ml を加え、さらに加熱を続ける。液が無色または淡黄色透明になったら、いったん冷却し、水 75 ml および飽和シュウ酸アンモニウム溶液 25 ml を加え無水硫酸の白煙が生じるまで加熱を続ける。冷後フェノールフタレイン試液 2~3 滴を加え強アンモニア試液で中和したのち、水を加えて正確に 200 ml とし、これを試験溶液とする。

(3) 試験操作

試験溶液 100 ml および銅標準溶液 10 ml をとり、水で 100 ml としたものをそれぞれ分液漏斗中に入れ、これに 20% 酒石酸溶液各 1 ml を加え、アンモニア試液で中和する。ついで水酢酸 3 ml, 10% チオシアン酸アンモニウム溶液 3 ml およびピリジン 2.5 ml を加えよく混和する。つぎにクロロホルム 20 ml を正確に加え、強く振り混ぜたのち静置して上層は捨てる。呈色したクロロホルム層を無水硫酸ナトリウム 1 g を置いた乾燥ろ紙でろ過する。はじめのろ液数 ml を捨て、つぎに得たる液について層長約 10 mm で波長 407 m μ 付近における吸光度を測定し、それぞれ A および A_0 とする。

対照液は水 100 ml について同様に操作したものを用いる。

銅の含量 C (ppm) および C' (%) は次式から算出される。

$$C (\text{ppm}) = 800 \times \frac{A}{A_0} \times \frac{1}{\text{試料採取量 (g)}}$$

$$C' (\%) = 800 \times \frac{A}{A_0} \times \frac{1}{\text{試料採取量 (g)}} \times \frac{1}{10,000}$$

B. 水の場合

(1) 試薬

A. (1) と同じ。

(2) 試験操作

検水 200 ml および銅標準溶液 10 ml をとり水で 200 ml としたものをそれぞれ分液漏斗中に入れ、これに 20% 酒石酸溶液各 1 ml および 2% 過硫酸カリウム溶液 5 ml を加え振り混ぜて 1 分間以上放置したのち、フェノールフタレイン試液 1 滴を加えアンモニア試液で中和する。以下 A. (3) の試験操作に従って試験を行なう。

ただし、対照液は水 200 ml について同様に操作したものを用いる。

このとき銅の含量 C (ppm) は次式から算出される。

$$C (\text{ppm}) = 400 \times \frac{A}{A_0} \times \frac{1}{\text{検水採取量 (ml)}}$$

Ⅲ 実験の部

1. 感 度

従来の衛生試験法記載のジエチルジチオカルバミン酸法によれば、銅の測定限界は約5 μg 以上（吸光度約0.06）、またピリジン・チオシアン酸法によれば約40 μg 以上（吸光度 約0.06）である。吸光度として0.6を得るための濃度は、前者においては約40 μg 、後者においては約400 μg でなければならない。ただし、前者は溶媒として四塩化炭素15 ml を用い後者はクロロホルム20ml を用いた場合である。

2. 吸収スペクトル

ジエチルジチオカルバミン酸法の呈色液の色は淡かった色であり、その最大吸収波長は430 m μ にあり、ピリジン・チオシアン酸法の色は黄緑色で407 m μ に最大吸収波長を有する。Fig. 1は2つの方法によるそれぞれの吸収曲線を示したものである。

Fig. 1. Absorption spectra obtained by pyridine-thiocyanate method and diethyldithiocarbamate method

3. 安 定 性

ピリジン・チオシアン酸法による安定性をみるにあたり、ジエチルジチオカルバミン酸法についても調べてみた。その結果 Fig. 2 に示すごとく、ジエチルジチオカルバミン酸法に比べピリジン・チオシアン酸法は非常に安定性がよく24時間放置しても全く変化しない。このときの実験はスペクトロニック20型比色計で測定を行なったが、比色管に入れた溶媒の蒸発を防ぐためゴムセンを

施し放置した。

Fig. 2 からわかるとおり、ジエチルジチオカルバミン酸法は徐々に退色するが、ピリジン・チオシアン酸法は24時間放置しても安定であることがわかる。

Fig. 2. Stability of colored solution of Cu^{2+} obtained with pyridine-thiocyanate method and diethyldithiocarbamate method

4. 検 量 線

(1) ジエチルジチオカルバミン酸法による検量線

Table 2 に示すような標準系列を作る。ただし、各標準系列の銅含有量は10, 20……50 μg とし、水溶液の液量は25, 100 および 200 ml の3種の条件を採用した。各条件下における検量線を描くと Fig. 3 のごとくなる。

Fig. 3 からわかるとおり銅量は同じでも銅水溶液の液量が違えば検量線が異なってくることがわかる。このことは銅とジエチルジチオカルバミン酸との反応によって得られた呈色物質を水溶液から四塩化炭素によって抽出する際、抽出効率が悪く一挙に転溶しないことを示す。たとえば、銅40 μg を含む水溶液100 ml の場合と200 ml の場合とについて実験した結果についていうと、第1回目の抽出操作をしたのち、さらに第2回目の四塩化炭素15ml による抽出を行なうとき吸光度は前者の場合0.07、後者の場合0.180を示し、第1回の抽出操作をしたあとも水溶液中に相当量の呈色物質が残存していることになる。このように四塩化炭素による抽出効率が水溶液の液量によって異なり、かつ不良であることはジエチルジチオカルバミン酸法の欠点である。

Table 2. Standard Series by Diethyldithiocarbamate Method

No.	Standard solution (Cu 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	H ₂ O (ml)	Citric-EDTA solution (ml)	pH Adjusted with thymol blue	Diethyldithio- carbamate solution (ml)	CCl ₄ (ml)
1	0	25 100 200	10	9.6	1	15
2	2	23 98 198	10	9.6	1	15
3	4	21 96 196	10	9.6	1	15
4	6	19 94 194	10	9.6	1	15
5	8	17 92 192	10	9.6	1	15
6	10	15 90 190	10	9.6	1	15

Fig. 3. Calibration curve of Cu^{2+} obtained with diethyldithiocarbamate method

Fig. 4. Calibration curve of Cu^{2+} obtained with pyridine·thiocyanate method

(2) ピリジン・チオシアン酸法による検量線

Table 3 に示すような標準系列を作る。ただし、各標準系列の銅含有量は80, 160……400 μg とし、水溶液の液量は25, 100および200 ml の3種の条件を採用した。各条件下における検量線は Fig. 4 のごとくなる。

Fig. 4 からわかるとおり、液量が1:10 近くの開きがあっても検量線はほとんど同一傾斜であり、このことは銅とピリジン・チオシアン酸との反応によって得られ

た呈色物質を水溶液からクロロホルムによって抽出する際、抽出効率がきわめて良好であること、したがって再現性も良好であることを示している。しかし、Table 4 に示すとおり、液量が200 ml を越すと抽出効率は急速に低下するので、抽出する際の試験溶液の液量は200 ml 以内とし、また条件を同一にする意味から実際の実験に際しては、標準溶液および試験溶液の液量は、それぞれ同一にして抽出操作を実施するに越したことはない。

Table 3. Standard Series by Pyridine·Thiocyanate Method

No.	Standard solution (ml)(Cu 40 μg /ml)	H ₂ O (ml)	Tartaric acid solution(ml)	pH Adjusted with phenolphthalein	CH ₃ COOH (ml)	NH ₄ SCN (ml)	C ₅ H ₅ N (ml)	CHCl ₃ (ml)
1	0	25 100 200	1	ca. 7	3	3	2.5	20
2	2	23 98 198	1	ca. 7	3	3	2.5	20
3	4	21 96 196	1	ca. 7	3	3	2.5	20
4	6	19 94 194	1	ca. 7	3	3	2.5	20
5	8	17 92 192	1	ca. 7	3	3	2.5	20
6	10	15 90 190	1	ca. 7	3	3	2.5	20

Table 4. Results of Absorbance Obtained in case of Difference of Liquid Volume

Standard solution (ml)(Cu 40 μg /ml)	H ₂ O (ml)	CHCl ₃ (ml)	Absorbance (average of 3 times experiments)
10	0	20	0.610
10	90	20	0.670
10	190	20	0.670
10	390	20	0.590
10	590	20	0.400
10	790	20	0.270
10	990	20	0.178

5. 隠べい剤による銅の影響

ジエチルジチオカルバミン酸法では20%クエン酸溶液中に5%の割合でEDTAを混溶させているが、ピリジン・チオシアン酸法では20%酒石酸のみを用いている。ジエチルジチオカルバミン酸法は公定書に記載してあるのでピリジン・チオシアン酸法のみについて検討した。

Table 5 からわかるとおり、EDTAは銅を全く隠べいしてしまうので使用不能であるが、酒石酸およびクエン酸はいずれも添加量の増大するに従って吸光度が低下する。したがって、酒石酸ないしくエン酸の添加量は標準溶液および試験溶液とも正確に一定量を加えなければならないことがわかる。なお、クエン酸よりも酒石酸の場合の方が感度がよいことからして、試験法においては酒石酸を採用することにしその量も1 ml と規定することとした。

Table 5. Influence of Tartaric Acid, Citric Acid and EDTA on Absorbance in Case of the Determination of Cu^{2+}

Substance	Added (ml)	Absorbance	
		Pyridine-Thiocyanate method (10 ml of 40 ppm Cu^{2+} solution)	Diethyldithiocarbamate method (10 ml of 4 ppm Cu^{2+} solution)
20% Tartaric acid	1	0.670	0.657
	5	0.620	0.564
	10	0.592	0.555
20% Citric acid	1	0.605	0.664
	5	0.530	0.670
	10	0.392	0.622
5% EDTA	1	0.000	0.560
	5	0.000	0.568
	10	0.000	0.586

6. 妨害イオンの影響

食品、医薬品および水等への応用の可能性を確かめるため、妨害イオンの影響について調べた。一応考えられるイオンとして As^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} , CrO_4^{2-} , SO_4^{2-} および NO_2^- の計20種を取上げた。その結果は Table 6 のとおりである。

Table 6 からわかるとおり、 Fe^{2+} 以外のイオンは通常

Table 6. Influence of Coexisting Ions on the Determination of 400 μg of Cu^{2+}

Ions	Quantity added (μg)	Interference	Absorbance
Ca^{2+}	80,000	not interfere	0.670
Mg^{2+}	80,000	not interfere	0.670
Fe^{3+}	30,000	not interfere	0.670
As^{3+}	80,000	not interfere	0.670
Pb^{2+}	80,000	not interfere	0.670
Ba^{2+}	80,000	not interfere	0.670
Al^{3+}	8,000	not interfere	0.670
Zn^{2+}	8,000	not interfere	0.670
Cd^{2+}	8,000	not interfere	0.670
Sn^{2+}	8,000	almost not interfere	0.639
Sn^{4+}	8,000	almost not interfere	0.634
Hg^{2+}	8,000	almost not interfere	0.665
Ni^{2+}	8,000	almost not interfere	0.700
Co^{2+}	8,000	almost not interfere	0.700
Fe^{2+}	8,000	interfere	0.288
PO_4^{3-}	80,000	not interfere	0.670
CrO_4^{2-}	80,000	not interfere	0.670
Cl^-	80,000	not interfere	0.670
NO_2^-	80,000	not interfere	0.670
SO_4^{2-}	80,000	not interfere	0.670

の食品、医薬品および水の場合妨害しないと考えてよい。

たとえば、スズについてみるときかん詰のグリーンピースの銅の使用基準は 100 ppm 以下、スズの基準は 150 ppm 以下であり、したがってこの場合銅に対するスズの比率は 1.5 倍にすぎないので妨害はほとんどない。

問題は鉄であるが、食品、医薬品等の場合、そ解によって第 2 鉄イオンになってしまうので、 Fe^{3+} が Cu^{2+} の 75 倍程度共存しても妨害しないことはこの方法の特長である。たとえば医薬品の場合、強力ペンビタン M は 1 錠中銅 0.75 mg、鉄 5 mg、強力ミネビタールは銅 0.5 mg、鉄 5.5 mg、ポボン S 錠は銅 (硫酸銅として) 1 mg、鉄 16 mg を含んでいるので、この種の医薬品の銅の定量は鉄によって妨害されない。

Fe^{2+} はきわめて強く妨害するが、 Fe^{2+} の共存は水の場合にありうることであり、しかしこの場合でも過硫酸カリウムの添加により Fe^{3+} に酸化されるので妨害を阻止することができる。なおこの場合、過硫酸カリウムの存在はこの方法を妨害しない。

7. 応用例

Table 7 に鉄含量の多い身近な食品の例として緑茶葉を取上げ銅の回収試験の結果をみた。

Table 7. Recovery Test of Cu^{2+} in 1g of Green Tea

	Absorbance	Recovery (%)
Standard solution (Cu^{2+} 400 μg /100ml)	0.670	100.0
Cu^{2+} 400 μg	0.663	99.0
Cu^{2+} 400 μg + Fe^{2+} 30mg	0.661	98.7

Table 8 にかん詰グリーンピース中の銅の定量結果を示した。

Table 8. Results of Determination of Cu^{2+} in Canned Green Pease

No. of Samples	Absorbance	Found as Cu^{2+} (ppm)
1	0.419	100.1
2	0.436	104.1
3	0.260	62.1
4	0.446	106.5
5	0.486	116.0
6	0.336	80.2
7	0.401	95.8

また水に応用する場合、水道法による銅の規格1 ppmの水200 mlを用いた場合、吸光度は0.33付近であり十分に実用性を有することがわかった。

IV むすび

銅イオンはピリジンとチオシアン酸塩によって407m μ に極大波長を有する呈色を示し、このものはクロロホルムに容易に転溶する。銅の定量法として従来繁用されているジエチルジチオカルバミン酸法に比べると、本法はつぎのような特長を有することが判明した。

(1) 妨害イオンの影響をほとんど受けない。すなわち Ca^{2+} , Mg^{2+} , As^{3+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} および PO_4^{3-} , CrO_4^{2-} , Cl^- , NO_2^- , SO_4^{2-} は Cu^{2+} の200倍量あっても妨害しない。 Fe^{3+} は75倍量あっても妨害しない。 Al^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} は20倍量あっても妨害しない。 Sn^{2+} , Sn^{4+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} はわずかながら妨害するが通常の銅添加物食品およびミネラル剤等中の銅の試験の場合には妨害しない。

Fe^{2+} はきわめて強く妨害するが、過硫酸カリウムによる酸化処理 ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) を加えることにより全く妨害しなくなる。

(2) 呈色液の安定性がきわめてよい (24時間以上安定)。

(3) クロロホルムによる呈色物質の抽出効率がきわめてよく再現性もよい。

(4) 試薬は精製しなくともそのまま使用できる。

(5) 操作が簡単である。

上記の理由により、本法はジエチルジチオカルバミン酸法に比べ、感度は約1/10であるが、食品、飲料水、医薬品の衛生試験を目的とする場合には、この程度の感度が実用上適当である。したがって鋭敏なジエチルジチオカルバミン酸法に比べて本法によるときは、精度の高い測定が可能である。

この報文の要旨は日本食品衛生学会第9回学術講演会 (昭和40年5月14日、大阪市) において発表。

文 献

- 1) J.A.O.A.C. 9, 310(1960); 日本薬学会編: "衛生試験法追加" P.60(1963); 水道協会編: "水質基準の検査方法注解" P.41 (1959); 厚生省編: "食品衛生検査指針" (II) P.25 (1963)。
- 2) 品川睦明: "ポーログラフ分析法" P.102 (1957) 共立全書。
- 3) 厚生省編: "食品衛生検査指針" (II) P.25(1963)。
- 4) Snell, Snell: "Colorimetric Methods of Analysis" 2, 124 (1958)。