食品中の EDTA の分析 (I)

コバルトイオンおよび過酸化水素による呈色反応の検討

(昭和 42 年 11 月 18 日 受理)

下 川 洪 平* 堀 部 信 好*

Analysis of Ethylenediamine Tetraacetic Acid in Foods (I) Studies on the Color Reaction of EDTA with Cobalt Ion and Hydrogen Peroxide

Kohei SHIMOKAWA and Nobuyoshi HORIBE

(Gifu Prefectural Institute of Public Health: 1,3-chome,
Yatsuume-cho, Gifu-shi)

It was previously reported by Vogel et al. that EDTA reacted with cobalt ion and hydrogen peroxide with development of reddish purple color, and the reaction was applied to the analysis of EDTA in edibles, e. g. wine or fruit juice.

The present experiment was undertaken to see in detail about some conditions necessary for the color reaction, and results obtained were as follows.

1) Amount of cobaltous nitrate solution to be added was found to be equivalent by mole ratio to amount of EDTA.

2) The color intensity was maximum when the concentration of hydrogen peroxide in sample solution was over 1.25 M.

3) The color intensity was maximum when sample solution was at pH 3 to 4, whereas at pH 1 to 2 or at pH 5 it was lower than in the former case and at pH 6 the color was decomposed while heating.

4) There was no significant difference of absorbance between the procedure involving heating twice and the one involving heating once, respectively after adding the two reagents. In the latter procedure, the absorbance was stabilized by heating for 10 to 15 minutes at pH 1 to 4, but at pH 5 it reached to the maximum by heating for 5 minutes and declined by following heating.

5) The color produced within the pH range 1 to 4 was stable for 24 hours at room temperature.

(Received November 18, 1967)

1. 緒 言

EDTA の分析法は、そのほとんどが金属イオンとの錯形成反応を利用したもので、金属イオンとしては、ニッケル¹⁾、クロム²⁾³⁾、銅⁴⁾、コバルト⁵⁾⁶⁾、鉄⁷⁾などを用いた種々の方法が報告されているが、これらの報告は、そのほとんどが生体試料、とくに尿中の EDTA の分析に関するもので、食品中の EDTA の分析に関するものは Vogel ら⁶⁾の報告のみである。また、上記各報告にみ

られる各分析方法はその鋭敏度、操作の難易、妨害物質の影響などに関してそれぞれ一長一短があるが、特殊な試薬を要せず、操作が簡易な点からいえば Vogel らの方法が最もすぐれていると考えられるのでこれを取りあげ追試を行なった。原報には、ブドウ酒中の EDTA の分析方法についての簡略な記載があるのみで、呈色反応に関する種々の条件について詳細な記載がないので、これらの点について検討を行なったところ若干の知見を得たので報告する。

* 岐阜県衛生研究所：岐阜市八ツ梅町 3-1

2. 実験方法

2.1 装置および試薬

分光光度計：日立 EPU-2 A 分光光度計，光路長 10 mm のセルを用いた。

硝酸コバルト溶液：硝酸コバルト ($\text{Co}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，特級) の 1% 水溶液

過酸化水素：30% (特級)

酢酸：氷酢酸 (特級)

2.2 呈色反応操作 (Vogel 原法準拠)

検液 20 ml を 25 ml のメスフラスコにとり，酢酸 1 ml および硝酸コバルト溶液 1.0 ml を加え，水浴中で 15 分間加熱したのち約 40° まで冷却し，さらに過酸化水素 2.5 ml を加えて水浴中で 10 分間加熱する。冷後水を加えて標線まで満たして得た呈色液について波長 530 m μ における吸光度を測定する。

3. 実験結果および考察

3.1 硝酸コバルト溶液の添加量

連続変化法により，硝酸コバルト溶液の添加量と呈色度との関係について検討を行なった。

それぞれ滴定法により力価を正しく定めた 10 mM EDTA および 10 mM $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ を調製し，X ml の EDTA と (10.0 - X) ml の $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ とを混合したものにつき，2. 実験方法に示す方法により呈色反応を実施し，試薬ブランクを対照として吸光度を測定した。結果は Fig. 1 のとおりである。

本呈色反応によって生じた錯化合物における Co と EDTA のモル比は 1:1 であり，また，硝酸コバルト溶液の添加量は，EDTA に対応する量さえあれば十分であることがわかる。また EDTA 濃度 0.4~2.0 $\mu\text{mol/ml}$ の範囲で，濃度と吸光度との間に直線関係が成立し，かつ吸光度測定による濃度測定には，ほぼこの範囲が適当であることがわかる。ただし，Vogel の原法に示す

Fig. 1. Continuous variation method applied to the color reaction of EDTA with cobalt ion and hydrogen peroxide
EDTA + $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 = 100 \mu\text{mol}/25 \text{ ml}$

1% $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ の添加量 1 ml は，約 34 μmol の硝酸コバルトに相当するから，本操作においては 2 $\mu\text{mol/ml}$ (50 $\mu\text{mol}/25 \text{ ml}$) の EDTA 濃度のような場合には不足である。したがって以後の実験において 50 μmol の EDTA 量を用いた場合には硝酸コバルト溶液は 2% のものを用いた。

3.2 過酸化水素の添加量

過酸化水素の添加量と呈色度との関係について検討を行なった。

EDTA 25 μmol および 50 μmol を含む水おのの 5 ml をとり，これに酢酸および硝酸コバルト溶液を加えて加熱したのち，水を加えて 10 ml としたものに対し，5.0 M H_2O_2 を 0~10.0 ml 加え，さらに水を加えて 20 ml としてから加熱するという条件で呈色反応を実施し，以下 2. 実験方法に示す方法により吸光度 (対照：蒸留水) を測定した。結果は Fig. 2 のとおりである。

EDTA 添加量 50 μmol の場合では，吸光度は 5.0 M H_2O_2 添加量 5 ml あたりで最高値に達した。これは H_2O_2 の 25 mmol に相当するから，この場合の H_2O_2 添加量は EDTA 量に対し 500 倍に達する大過剰が必要であることがわかる。しかし，EDTA 量 25 μmol の場合は，50 μmol の場合の半量の 2.5 ml の添加では最高値に達せず 50 μmol の場合とほとんど同量を要した。

したがって過酸化水素の添加量は EDTA 量に対する比率で規定するのは適当でなく，むしろ反応液中における H_2O_2 濃度で規定されるべきものと考えられる。したがって，実験結果に示されるごとく， H_2O_2 濃度は 25 mmol/20 ml 以上，すなわち約 1.25 M 以上あればよいということになる。Vogel の原法で検液約 20 ml に対し 30% H_2O_2 (約 10 M に相当) 2.5 ml を加えることにな

Fig. 2. Effect of the amount of H_2O_2 on the color reaction of EDTA with cobalt ion and hydrogen peroxide
—○— 50 μmol EDTA/25 ml
—●— 25 μmol EDTA/25 ml

っているが、上記の結果に対してほぼ合致している。

Ringbom ら⁸⁾は、コバルトイオンの EDTA キレートと過酸化水素との反応においては、過酸化水素は単に酸化剤として作用するにすぎないと述べている。

青色

赤色

しかし、この反応はおそらくは常温における反応であって、酸性において加熱によって得られた赤色はアルカリ性にしても青色にもどらない。すなわち上式⁹⁾に示すごとく可逆的には反応しない。また、赤色は加熱により著しく濃色化し、かつ、呈色がきわめて安定であることなどをあわせ考えると、この場合は、過酸化水素付加錯体が形成されているのではないかと推定される。

3.3 pH の影響

pH と呈色度との関係について検討を行なった。

EDTA 50 μ mol を含む水 5ml をとり、0.1 N HCl 5ml を加え、これに 4 M 酢酸ナトリウム溶液あるいは 1 N HCl を滴下し、pH 1~6 に調整したものにつき、
2. 実験方法に示す方法により 呈色反応を実施し吸光度 (対照、蒸留水) を測定した。結果は Fig. 3 のとおりである。

Vogel らの報告においては、「検液が酸性 (pH 2~3) でないときは水酢酸適量を少量加える」ことになっているので、2. 実験方法のところでは水酢酸の添加量 1ml なる条件を設定した (pH 約 2.5 となる)。しかし、本実験によれば、吸光度は pH 3~4 の条件で最高値を示しそれ以下あるいはそれ以上であると吸光度は低下し、とくに pH 6 以上になると、加熱操作中に呈色物は分解する。Fig. 4 は pH 1 および pH 3 において呈色反応を実施して得た呈色液の吸収スペクトルであるが、これ

Fig. 3. Effect of pH on the color reaction of EDTA with cobalt ion and hydrogen peroxide

Concn. of EDTA: $50 \mu\text{mol}/25 \text{ ml}$

Fig. 4. Absorption spectra of the color formed by the reaction of EDTA with cobalt ion and hydrogen peroxide

-o-o- pH 3

—●—●— pH

Concn. of EDTA: $50 \mu\text{mol}/25 \text{ ml}$

によれば、Fig. 3 の pH 3 以下における吸光度の低下は、吸収極大波長の移動によるものではないことがわかる。また、Vogel の原法においては $530\text{ m}\mu$ における吸光度を測定することになっているが、Fig. 4 の実験結果によれば、長波長側の吸収極大は $540\text{ m}\mu$ 付近にあり、したがってこの波長における吸光度を測定の方が合理的であると思われる。

3.4 加熱方法

Vogel の原法における加熱方法は、まず硝酸コバルト溶液を加えてから水浴中で15分間加熱し、冷後さらに過酸化水素を加えてから瞬時沸騰させるという方法である。2. 実験方法のところでも示した過酸化水素を加えてから水浴中で10分間加熱する方法は、国立衛生試験所の方法¹⁰⁾で、実験に際しての条件設定に便利であると考えてこの部分のみはこの方法をとった。いずれにしても、このような加熱→冷却→加熱という煩雑な方法が、はたして必要であるかどうかを確かめるためにつぎのような実験を行なった。

EDTA 10~50 μmol を含む水を取り、2. 実験方法に示す方法により呈色反応を実施した。別に、同様に調製した EDTA 水溶液について、硝酸コバルト溶液を加えたのち直ちに過酸化水素を加えて水浴中で25分間方法（以下、直接加熱法と略称）を実施した。結果は Table 1 のとおりである。両加熱方法によって得られた呈色液の各濃度における吸光度の間に有意の差は認められない。したがって加熱を2回にわたって行なう必要はないと考えられる。

つぎに直接加熱法における加熱時間と呈色度との関係

Table 1. Effect of the Procedure of Heating on the Color Reaction of EDTA with Cobalt Ion and Hydrogen Peroxide

Amount of EDTA, μ mol	Absorbance	
	Procedure A	Procedure B
10	0.125	0.125
20	0.245	0.250
30	0.377	0.374
40	0.488	0.489
50	0.580	0.580

Procedure A: Sample soln. 20 ml + AcOH 1 ml + 1% $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 2.0 ml $\rightarrow$ heat in boiling water for 15 min $\rightarrow$ cool to about 40°C + 30% H_2O_2 2.5 ml $\rightarrow$ heat in boiling water for 10 min $\rightarrow$ cool to room temp. $\rightarrow$ dilute to 25.0 ml with water $\rightarrow$ measure the absorbance v. s. reagent blank at 530 $m\mu$

Procedure B: Sample soln. 20 ml + AcOH 1 ml + 1% $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 2.0 ml + 30% H_2O_2 2.5 ml $\rightarrow$ heat in boiling water for 25 min $\rightarrow$ follow the Procedure A after cooling to room temp.

について検討を行なった。EDTA 50 μ mol を含む水を取り、3.3 pH の影響に示す方法により pH 1~5 に調整したものについて、加熱時間を 5~25 分に変化させ直接加熱法を実施して呈色させた。結果は Fig. 5 のとおりである。

pH 3~4 の場合は、10分間の加熱で吸光度は最高値に達し、pH 1~2 の場合は、15分間の加熱により、pH

Fig. 5. Effect of heating time on the color intensity in the various condition of pH

○---○ pH 1

○—○ pH 2

○---○ pH 3, 4

○.....○ pH 5

Concn. of EDTA: 50 μ mol/25 ml

3~4 の場合より吸光度が低いなりに安定化し、また、それ以後10~15分間の加熱に対し、いずれの場合も安定であった。これに対し、pH 5 の場合は5分間の加熱により吸光度は最高に達するが、以後の加熱により低下するのを認めた。

3.5 呈色の安定性

3.4 の実験において、pH 1~4 の条件で呈色させて得た液を、室温で24時間放置したところいずれも吸光度に変化を認めなかった。

4. 総 括

コバルトイオンおよび過酸化水素による EDTA の呈色反応につき検討を行ない、つぎのような結果を得た。

(1) 硝酸コバルト溶液の添加量は、EDTA 量に対してモル比で1:1に相当する以上あればよい。

(2) 過酸化水素の添加量と呈色度の関係は、 H_2O_2 濃度が約 1.25 M 以上のときに吸光度が最高値を示した。

(3) pH と呈色度との関係は、pH 3~4 の条件のとき吸光度は最高値を示し、それ以下、あるいはそれ以上になると低下し、とくに pH 6 以上になると加熱操作中に呈色物は分解する。

(4) 硝酸コバルト溶液および過酸化水素のそれぞれを加えるたびに加熱する方法と、両試薬を一度に加えてから加熱する方法の間に、吸光度に有意の差は認められなかった。また、後者の加熱方法において、pH 3~4 の場合は10分間の加熱で、pH 1~2 の場合は15分間の加熱で吸光度は安定化し、以後10~15分間加熱しても変化は認められなかった。これに対し、pH 5 の場合は5分間の加熱で吸光度が最高値に達するが、以後の加熱により徐々に低下する。

(5) pH 1~4 の条件で発色させた場合、呈色は室温で24時間安定である。

(6) 以上の結果より、本反応による呈色および吸光度測定は、つぎのような方法をとるのが適当と考えられる。

検液適量 (EDTA 遊離酸として 0.3~1.5 mg を含む) をとり、液性を調整して pH 3.0~4.0 としたのち、水を加えて約 20 ml とし1%硝酸コバルト溶液 2.0 ml および30%過酸化水素 2.5 ml を加え、水浴中で15分間加熱し、冷後水を加えて 25.0 ml とし、試薬ブランクを対照として波長 540 $m\mu$ における吸光度を測定する。

終わりにのぞみ、本研究の機会を与えられ、ご校閲を賜わった所長井上裕正博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) A. Derby: Anal. Chem. 24, 373 (1952).
- 2) R. J. Cherney, B. Craft: ibid. 26, 1806 (1954).
- 3) R. E. Mosher, P. J. Burcar: ibid. 35, 403 (1963).
- 4) O. Menis, H. P. Hause, I. B. Rubin: ibid.

-
- 28, 1439 (1956).
- 5) K. L. Cheng. P. F. Lott: *ibid.* **28**, 462 (1956).
- 6) J. Vogel, J. Desshusses: *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **53**, 175 (1962).
- 7) B. Kratichivil, M. C. White: *Anal. Chem.* **37**, 111 (1965).
- 8) A. Ringbom, S. Sittonen, R. Saxen: *Anal. Chim. Acta* **16**, 541 (1957).
- 9) G. Shwarzenbach: *Helv. Chim. Acta* **32**, 108 (1949).
- 10) 食品衛生研究 **12** (10), 53 (1962).