

食品中の窒素と無機元素の定量法
の開発と改良に関する研究

安井明美

1

食品中の窒素と無機元素の定量法 の開発と改良に関する研究

安井明美

目 次

第一章	序論	1
第二章	窒素定量のためのケルダール法の改良	
第1節	クロスチェック試験によるケルダール改良法の検討	9
第2節	各種のケルダール改良法による窒素定量法の比較検討	32
第三章	アルミニウム箔容器を用いる乾式灰化法の開発	43
第四章	アルシン-原子吸光法によるヒ素定量のための湿式分解法の開発	54
第五章	原子吸光法による金属元素定量のための塩酸抽出法の開発	68
第六章	原子吸光法によるカルシウム定量のための干渉除去剤添加法の改良	84
第七章	ヒ素の化学形態による分別定量法の開発	
第1節	塩酸溶液からのトルエン抽出を用いる無機態3価、5価及び有機態ヒ素の分別定量法の開発	102
第2節	ヒジキ及びアラメ中の水溶性ヒ素化合物の検討	121
第八章	総論	129

第一章 序論

心身を健全に発育・増進させ、健康を保持し、疾病を予防するために、我々は食物から適量の各栄養素を摂取している。この必要摂取量を摂取対象別に一日当りの数値で示したものが、栄養所要量である。我が国においては厚生省により1989年に定められた第四次改定のもを、第三次改定のもの（1984）とともに表1-1に示す^{1, 2)}。諸外国でも、ほぼ同様の目的から栄養所要量が設定されている。そのうちのアメリカ合衆国のRDA（Recommended Dietary Allowance：推奨栄養所要量）も表1-1に示す^{2, 3)}。いずれも、前回のものから、新しい知見、新しい分析法の確立等に基づいた変更がなされている。

現実に市場に出廻っている食品中の各栄養素の含有量についてのデータは、我々が毎日口にする食物からの各栄養素の摂取量を把握するために必要である。食品行政からは、国民の健康の維持・増進を図り、栄養状態を評価指導する上で、日常摂取する食品の成分を明示することは、極めて重要であり、また、食糧の安定確保をめざす食糧需給計画策定の基礎としても必要である。食品中の栄養成分が収載されているものに、科学技術庁資源調査会がまとめた「四訂日本食品標準成分表」⁴⁾（1982）（以下、四訂成分表と呼ぶ）、「改訂日本食品アミノ酸組成表」⁵⁾（1986）（四訂成分表のフォローアップI）、「日本食品脂溶性成分表」⁶⁾（1989）（四訂成分表のフォローアップII）がある。四訂成分表には、食品中の水分、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分、無機質（カルシウム、リン、鉄、ナトリウム及びカリウム）及びビタミン〔A（レチノールとカロチ

表 1-1

成人一日あたりの栄養所要量

	日 本 (1989) (1984)		アメリカ合衆国 (1989) (1980)	
エネルギー	2550 (2000)	2500 (2000) kcal	2900 (2200)	2700 (2000) kcal
たん白質	70 (60)	70 (60) g	63 (50)	56 (44) g
脂肪エネルギー比率	20~25	20~25%		
K	2~4*	2~4* g	2000~	1875~5625 mg
Cl			750~	1700~5100 mg
Na	3.9 g 以下*	3.9 g 以下*	500~	1100~3300 mg
Ca	600	600 mg	800	800 mg
P	600*	600* mg	800	800 mg
Mg	300* mg		350 (280)	350 (300) mg
Fe	10 (12)	10 (12) mg	10 (15)	10 (18) mg
Zn	△	△	15 (12)	15 mg
Mn			2.0~5.0	2.5~5.0 mg
F			1.5~4.0	1.5~4.0 mg
Cu	△	△	1.5~3.0	2.0~3.0 mg
Mo			75~250	150~500 μg
Cr			50~200	50~200 μg
Se			70 (55)	50~200 μg
I	△	△	150	150 μg
ビタミンA (RE)	600 (540)	600 (540) μg	1000 (800)	1000 (800) μg
ビタミンB ₁	1.0 (0.8)	1.0 (0.8) mg	1.5 (1.1)	1.4 (1.0) mg
ビタミンB ₂	1.4 (1.1)	1.4 (1.1) mg	1.7 (1.3)	1.6 (1.2) mg
ナイアシン (NE)	17 (14)	17 (13) mg	19 (15)	18 (13) mg
ビタミンC	50	50 mg	60	60 mg
ビタミンD	2.5	2.5 μg	5	5 μg
ビタミンE (α-TE)	8 (7)* mg	△	10 (8)	10 (8) mg
ビタミンK	△		80 (65)	70~140 μg
ビタミンB ₆	△	△	2.0 (1.6)	2.2 mg
パントテン酸			4~7	4~7 mg
ビオチン			30~100	100~200 μg
葉酸	△	△	200 (180)	400 μg
ビタミンB ₁₂	△	△	2.0	3.0 μg

() は女性、日本のものは、20歳以上30歳未満の身長推計基準値、生活活動強度II (中程度) の人の栄養所要量、*は目標摂取量を示している。△ は付録に記載のあるもの。アメリカ合衆国のもの (1989) は、25~50歳の男性体重79kg、女性体重63kgの人の推奨栄養所要量、範囲で示しているものは安全かつ十分とされる摂取量、K、Cl、Naは最少必要量を示している。(1980)のものは、23~50歳の男性体重70kg、女性体重55kgの人の推奨栄養所要量を示している。

ン)、B₁、B₂、ナイアシン及びC)の含有量が、改訂日本食品アミノ酸組成表には18種のアミノ酸が、日本食品脂溶性成分表には脂肪酸組成、コレステロールとトコフェロール(α 、 β 、 γ と δ)の含有量が収載されている。これらの成分表は、我が国における食品成分の基礎データを提供するものとして、学校給食、病院給食等の給食管理面、食事制限・治療食等の栄養指導面はもとより、国民の栄養・健康への関心の高まりとともに一般家庭における日常生活面においても広く利用されている。また、国民栄養調査の実施、食糧需給計画の作成等の行政面や教育、研究面でも広く利用されている。

このような成分表作成のための分析の実施に当たっては、前処理法も含めた分析法の統一を図り、基準分析法とも呼ぶべき統一的な分析法を適用してデータを集積することが不可欠である。

食品成分の定量法を確立することは、単に成分量を明らかにするのみならず、例えば食品加工の過程での栄養素成分の変化の把握や成分表示の的確化、また栽培の面では栽培条件による成分量の変動や特定の成分を目標としての育種・改良の状況を把握する上でも必要である。

このような意味において、食品総合研究所では食糧研究所としての設置時より「食品分析法の確立と基準化」の研究課題が設定され、その時代に合致した新分析法の適用が検討されてきた。また、食品中の各成分の含有量についての確立だけでなく、多数点の試料の分析のため、方法の迅速化、現場での測定のための簡易化等も要請されている。

著者は、食品を扱う様々な分野で信頼できる食品成分の定量法が

必要なことから、正確さ、精度、経済性、迅速性、簡易性を考慮した信頼できる前処理法を含めた定量法の開発あるいは改良の研究に従事してきた。本論文は、上記主旨のもとで、食品総合研究所の主要研究課題の「食品分析法の確立と基準化」の中で行なってきた研究の一部であり、「食品中の窒素と無機元素の定量法の開発と改良」としてまとめたものである。

身体に不可欠な元素は必須元素と呼ばれ、私達はこれを食物から摂取している。必須元素には有機物を構成する酸素、炭素、水素、窒素、カルシウム、リン、イオウ、カリウム、ナトリウム、塩素、マグネシウムの主要元素のほか、微量元素として、鉄、フッ素、亜鉛、ケイ素、マンガン、銅、バナジウム、セレン、ヨウ素、モリブデン、ニッケル、クロム、ヒ素およびコバルトが含まれる⁷⁾。また、スズ⁸⁾、鉛⁹⁾、カドミウム¹⁰⁾などについても必須性を検討した報告もあるが、まだ一般には認められていない。

食品中の窒素の定量は、タンパク質量を求めるために行われている。得られた窒素量に窒素-タンパク質換算係数を乗じてタンパク質量を求める。タンパク質の栄養素としての第一の意義は、体タンパク質の合成に必要なアミノ酸を供給することにある。アミノ酸は体内で大部分がタンパク質の合成に費やされるが、一部はオリゴペプチド性の生理活性物質、核酸、補酵素、ATPなどのヌクレオチド、色素中のポルフィリンなどの合成にも使われる。第二の意義はアミノ酸が体内で分解をうけ、二酸化炭素、水、尿素などに至る過程でエネルギーを供給することにある。

無機元素は、食品中には、ふつう100g当たりカリウムが最も多く

100~1000mgの単位で含まれ、ついでリン、イオウ、塩素、マグネシウム、ケイ素が10~100mg、カルシウム、ナトリウムが1~100mg、マンガン、鉄、亜鉛が0.1~1mgの単位で存在するが、その他の元素は、 μg 単位のごく微量である。無機元素は、体液の調節、身体を支える硬組織の構成や生体成分の共同因子として、また生体内諸反応の触媒として機能している。体液の等張性の維持には、ナトリウム、カリウム、塩素が働いている。身体を支える硬組織（骨や歯）を構成する主要な無機元素はカルシウム、リンおよびマグネシウムである。鉄はヘモグロビン、ミオグロビンやフェリチン、ヘモシデリンの構成成分として酸素の運搬や貯蔵に、また細胞呼吸に関与している。鉄、亜鉛、銅及びマンガンなどの金属元素の多くは金属酵素の構成成分あるいは酵素の活性因子として生体内での触媒作用に関与している。リンはリン酸としてATPや核酸の構成元素として代謝等に関与している。

我が国の食品成分表では、微量元素のうち、鉄については値の記載があり、亜鉛と銅については現在分析の作業を行なわれているが、その他の微量元素については分析が行なわれておらず、今後の重要検討課題である。

これらの成分を正確に定量するためには、従来は比色法、スパーク発光分析法、蛍光法、キレート滴定法などが用いられてきたが、20年前より原子吸光法の開発、普及があり、高感度、高精度の測定が一般的になってきた。この新測定法を用いて、食品を分析対象にした場合は、そのマトリックスが多様であるため、測定対象元素、食品の種類に応じて、適切な前処理法及び適切な測定法を設定する必要があった。著者らは、特に前処理法に重点を置いて、各種の方

法を検討してきた。ナトリウム含量は三訂成分表では、四訂成分表に比してかなり高い値であったが、その原因は、主として従来の測定用試料溶液の調製にあたって用いた磁器やガラス器具等から溶出したナトリウムの混入によるものと推定されている⁴⁾。これは前処理法の重要性を認識させる一例である。前処理法は、正確な測定値を得るために注意をはらってきたことは勿論であるが、経済性、簡易性、迅速性についても十分に考慮して検討を行なってきた。食品試料はそのままの形で分析できることは少なく、多くの場合、前処理を行なって試料溶液を調製することが必要である。従って、前処理法のほとんどは、いかにして試料を溶液化するかという点に帰結する。

第二章で窒素定量のための試料の溶液化、すなわち二酸化チタン、硫酸銅、硫酸カリウムと硫酸を用いるケルダール分解を含むケルダール改良法のクロスチェック試験による精度の検討、及び各種のケルダール改良法の方法間共同試験によるかたよりについて検討を行なった。無機元素定量のための前処理法である溶液調製法は乾式灰化法、湿式分解法及び希酸抽出法に大別されるが、それぞれに長所、短所があり、試料及び測定元素に対応して、前処理法を選択することが望ましい。第三章では経済的かつ簡便であるアルミニウム箔カップを用いる乾式灰化法、第四章ではヒ素定量のための硝酸-硫酸-過塩素酸の三種の混酸を用いる湿式分解法、第五章では簡便かつ外部汚染の少ない塩酸抽出法について検討した。

無機元素の測定法としては、調製した試料溶液を直接噴霧する原子吸光法が最も一般的であるが、第四章ではヒ素定量のための水素化物発生-原子吸光法を、第六章ではアセチレン-空気フレームを

用いた時の干渉除去剤を添加する原子吸光法によるカルシウム定量法を検討した。

無機元素の生体に対する有効性や毒性は、その化学形態によって大きく異なることが分かってきており、食品中の成分評価においても全量だけではなくてその化学形態別の含量を把握することが重要になってきている。第七章では海産物に多いヒ素の分別定量法を検討した。

文 献

- 1) 厚生省保健医療局健康増進栄養課監修：“第四次改定日本人の栄養所要量”，（1989），（第一出版）。
- 2) 厚生省保健医療局健康増進栄養課監修：“第三次改定日本人の栄養所要量”，（1984），（第一出版）。
- 3) 食の科学，1990，4月号，p.56。
- 4) 科学技術庁資源調査会編：“四訂日本食品標準成分表”，（1982），（大蔵省印刷局）。
- 5) 科学技術庁資源調査会・資源調査所編：“改訂日本食品アミノ酸組成表”，（1986），（大蔵省印刷局）。
- 6) 科学技術庁資源調査会編：“日本食品脂溶性成分表”，（1989），（大蔵省印刷局）。
- 7) 小原哲二郎，木村修一監訳：“最新栄養学—専門領域の最新情報—”，（1987），（建帛社）。
- 8) K.Schwarz, D.B.Milne, E.Vinyard: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 40, 22(1970)。
- 9) K.Schwarz, J.Spallholz: *Fed. Proc.*, 35, 255, Abstr.(1976)。

10) M.Kirchgessner, A.M.Reichlmayer-Lais: J.M.Howell, J.M. Gawthorn, C.L.White eds, "Tracer element metabolism in man and animals", p.390 (1981), (Australian Academy Science).

第二章 窒素定量のためのケルダール法の改良

第1節 クロスチェック試験によるケルダール改良法の検討

1. はじめに

食品中のタンパク質量は、食品の栄養評価に際して重要な特性項目である。従来からタンパク質量は全窒素を測定し、これに窒素-タンパク質換算係数を乗じて求めるように定義されている。試料をケルダール分解し、生成したアンモニアを蒸留した後に滴定して窒素含量を求めるケルダール法は、古くからタンパク質定量の基準法として用いられてきた。それだけに試料の分解方法には種々の変法があるが、濃硫酸に硫酸カリウムを加え、さらに触媒として酸化水銀(II)を加える方法が最も優れているといわれている^{1, 2)}。しかし、近年、水銀が環境汚染物質として注目されて以来、これに代る触媒の検討が行われ、二酸化チタンと硫酸銅を用いる方法が、窒素の回収率及び分解の迅速性の点で酸化水銀(II)触媒法に匹敵するとして報告された³⁾。この二酸化チタンと硫酸銅を触媒として用いるケルダール改良法について予備検討を行ったところ、その効果が確認できたので、数箇所の試験研究機関でクロスチェック試験を行って、分析試験室内精度、室間精度及び許容差を検討し、窒素定量法の標準法としての適否を判定した。

2. 実験方法

2. 1 クロスチェック試験参画機関

次の4分析試験室がクロスチェック試験に参画した。

愛知県食品工業試験場、加工食品部、農産加工課

新潟県食品研究所、研究第1課

(財)日本食品分析センター、基礎試験部、基礎分析課

農林水産省食品総合研究所、分析栄養部、分析研究室

2. 2 試料の調整及び配布

クロスチェック試験には、試料として窒素含量が1%以上の食品(きなこ、小麦、小麦粉及び精白米)と低窒素含有食品[コーンスターチ及びはちみつ2種(中国産アンバーはちみつ及びアルゼンチン産クローバーはちみつ)]を用いた。農林水産省食品総合研究所、分析研究室で、きなこ、小麦、小麦粉、精白米及びコーンスターチは、各試料1kgをポリエチレン袋中で充分振り混ぜて均質化したのち、約250gずつをポリエチレン袋に分配し、二重に包装したものを、クロスチェック試験参画分析試験室に配布した。小麦及び精白米については、粒のまま配布し、各分析試験室で30メッシュに粉砕したものを分析用試料として、二重のポリエチレン袋に保存した。はちみつは、試料1kgをガラス瓶に入れ、完全に密封した状態で、60°C前後の水浴中に入れて時々振り混ぜ、はちみつの粘度が小さくなった後、ガラス棒でよくかき混ぜながら約250gずつを中ふた付のポリエチレン瓶に分注したものを配布した。から試験用の精製ガラメも同一品を配布した。

2. 3 分析試験の組立

各分析試験室は、窒素含量が1%以上の食品試料については、マクロ・ケルダール改良法及びセミマクロ・ケルダール改良法で、低窒素含有食品については、マクロ・ケルダール改良法の変法で、3点平行試験を異なる日に3回繰り返した。分析は、試料の配布後3

ヵ月以内に実施され、結果は所定の試験報告書に記入後、食品総合研究所、分析研究室に送付された。

2. 4 窒素の定量

試料の分解法及び測定方法は次のように設定した。

(1) マクロ・ケルダール改良法

(i) 装置及び器具

分解用加熱装置：ガス、又は電熱式の分解用架台を用いる。熱源の強さは、装置自体をガスの場合10分間、電熱の場合30分間予熱し、これにイオン交換水 250mlと沸石を入れた分解フラスコをのせて加熱したときに、約5分間で沸き立つように調節する。

ケルダール分解フラスコ：容量800~1000ml又は500mlを用いる。

アンモニア蒸留装置：直接蒸留用の装置を用いる。熱源の強さは、分解用加熱装置と同様に調節する。

ビュレット：0.05mlの目盛付き

(ii) 試薬

濃硫酸、硫酸カリウム、二酸化チタン等の試薬はすべて試薬一級以上を用いる。

硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)：20メッシュ以上に粉砕する。

中和用水酸化ナトリウム溶液 (45w/v%)：水酸化ナトリウム450gをイオン交換水500mlに溶解後、イオン交換水でほぼ1lに希釈する。

沸石：10~20メッシュ程度の粒度の陶土板

ホウ酸溶液 (4w/w%)：ホウ酸40gにイオン交換水960mlの割合で加温溶解後、冷却する。

混合指示薬：0.1%メチルレッドと0.2%ブロムクレゾールグリー

ンの95%エタノール溶液を2:1の割合に混合し、終点近くの汚無色が滴定時に明らかに出現するように、2つの指示薬溶液のいずれかを追加して調整する。

酸標準溶液：N/10硫酸標準溶液を用いる。（標準溶液による誤差をなくすために、和光純薬製に統一した。）

(iii) 標準操作

試料（きなこ、小麦、小麦粉、又は精白米）をポリエチレン袋中で充分振って均質化したのち、約2 g (S g) を0.001gまで量り、分解フラスコに入れる。フラスコの首の部分に試料が付着した時は、少量のイオン交換水で洗い落とす。硫酸カリウム15 g、二酸化チタン0.5g、硫酸銅0.5g、ついで濃硫酸25mlを加え、沸石5～6粒を加え、硫酸が試料に充分に浸透するまで穏やかに振り混ぜたのち、分解用加熱装置で加熱する。フラスコの内容液が透明になってから、さらに60分加熱を続けて分解を完了させる。冷却後、イオン交換水200mlを加え、25℃以下に冷却した後、少量の砂粒状亜鉛を加えてから、静かに中和用水酸化ナトリウム溶液70mlを加え、振り混ぜずにアンモニアの直接蒸留装置に連結する。蒸留装置の留液の出口にホウ酸溶液50mlを入れた三角フラスコを装着した後、分解フラスコを振り動かして内液を混合する。蒸留装置で30分間加熱蒸留して、留液120～150mlを集める。混合指示薬5～6滴を加え、N/10硫酸標準溶液で滴定する。青色→青緑色→汚無色→桃色になったところを終点とする (V_1 ml)。別から試験として試料の代りに精製ゼラメを試料と同量量り取り、前記試料と同様に操作して、分解、蒸留、ついで滴定する (V_2 ml)。なお、きなこについては、分解液をメスフラスコで200ml定容とした後、この50mlについて直接蒸留、

滴定を行う。

(iv) 計算及び表示

試料の窒素含量 (%) は次式によって計算し、小数第3位を四捨五入して小数第2位まで表示する。

$$\text{試料の窒素 (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times f \times 1.4 \times M}{10 \times S}$$

f : 用いたN/10硫酸標準溶液のファクター

M : 試料分解液の採取量に基づく倍数

(2) セミマイクロ・ケルダール改良法

(i) 装置及び器具

次の点以外は、マクロ・ケルダール改良法に準拠する。

ケルダール分解フラスコ：容量200～300mlのものを用いる。

アンモニア蒸留装置：水蒸気蒸留装置を用いる。

(ii) 試薬

次の点以外は、マクロ・ケルダール改良法に準拠する。

酸標準溶液：N/20硫酸標準溶液（和光純薬製）を用いる。

(iii) 標準操作

次の点以外は、マクロ・ケルダール改良法に準拠する。

試料分解液はメスフラスコで200ml定容とした後、その10～50mlを全量ピペットで水蒸気蒸留装置のフラスコに採取し、中和用水酸化ナトリウム溶液を20あるいは40ml加える。蒸留装置の留液の出口にホウ酸溶液25mlに混合指示薬2滴を加えた三角フラスコを装着し、約10～15分間水蒸気蒸留を行う。三角フラスコの内容液につき、N

/20硫酸標準溶液で滴定する。

(iv) 計算及び表示

$$\text{試料の窒素 (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times f \times 0.7 \times M}{10 \times S}$$

表示の仕方、記号はマクロ・ケルダール改良法に準拠する。

(3) マクロ・ケルダール改良法 (変法)

(i) 装置及び器具

マクロ・ケルダール改良法に準拠する。

(ii) 試薬

次の点以外は、マクロ・ケルダール改良法に準拠する。

濃硫酸、硫酸カリウム、二酸化チタン等の試薬はすべて試薬特級以上を用いる。

酸標準溶液：N/20硫酸標準溶液（和光純薬製）を用いる。

(iii) 操作

a. はちみつの試料採取方法：多量の結晶と液体とが明らかに分離している場合は、完全に密封した状態で、60°C前後の水浴中において時々振り混ぜながら結晶を溶解し、よく混和した後、25°C前後に冷却後ただちに約50gを小ビーカーにとり、内径7~10mm、長さ10cmのガラス管を入れ、全体の重量を量り、ついでのはちみつをガラス管に吸い込んで分解フラスコ中に約5g分を移す。ついでガラス管をビーカーに戻し、再度重量を量って前後の重量差をもって試料採取量とする。はちみつがフラスコの首の部分に付着した場合は、熱したイオン交換水で洗い落とす。

b. コーンスターチの試料採取方法：ポリエチレン袋中で充分振って均質化した後、約5gを量り取る。

c. 標準操作

次の点以外は、マクロ・ケルダール改良法に準拠する。

試料は約5gを0.01gまで量って分解フラスコに入れる。濃硫酸は40mlを加える。中和用水酸化ナトリウム溶液は90ml加える。滴定はN/20硫酸標準溶液で行う。

(iv) 計算及び表示

試料の窒素含量(%)の計算式は、セミマイクロ・ケルダール改良法に準拠するが、計算は小数第5位を四捨五入して小数第4位まで表示する。

2. 5 水分の定量

水分の定量法は、次のように設定した。

小麦、小麦粉、精白米、コーンスターチ（小麦と精白米は30メッシュに粉碎したもの）については、試料2～3gをアルミニウム製小型ひょう量容器に量り取り、常圧、 $135 \pm 1^\circ\text{C}$ で1時間乾燥する加熱乾燥法により2点平行試験を行ない水分値を求める。

きなことについては、常圧、 $130 \pm 1^\circ\text{C}$ で1時間乾燥する加熱乾燥法により、他は前記と同様にして水分値を求める。

はちみつについては、操作が煩雑なこと、及び中ぶた付きのポリエチレン瓶に入れて配布したので、水分の変動はほとんどないと考えて水分の測定は行わなかった。

2. 6 試験結果の解析

試験結果の解析及び許容差の算出は、J I S Z 8402-1974の分析・試験の許容差通則⁽⁴⁾に従った。

3. 結果及び考察

3. 1 試験報告書の検討

各試料の分解所要時間を表 2-1に示した。分析試験室間の分解所要時間の違いは、使用した熱源（各室ともガスを使用した）の強弱によるものと考えられた。規定された熱源の強さであれば、マクロ法による試料の分解時間は30～60分であるが、D分析試験室では熱源が弱かったために分解にかなりの時間がかかった。しかし、測定値は他の分析試験室のものと比べてかたよがりが見られず、長い分解時間は測定値に影響を及ぼさないと考えられたので、測定値はそのまま採用した。

セミマイクロ法の水蒸気蒸留装置は、各分析試験室所有のものを用いた。すなわち、A、B分析試験室は塩入・奥田式、C、D分析試験室はバルナス・ワグナー型であった。

3. 2 試料の水分含量による窒素測定値の補正

試料は配布から試験の実施までに、かなりの時間が経過し、又、小麦と精白米では各分析試験室で粉碎を行なったためと考えられるが、分析試験室によって水分が表 2-2に示すように異なっていた。そこで、報告された窒素測定値を水分で補正し、乾重量当たりの窒素測定値を算出した（表 2-3～7）。はちみつ以外の試料については、以下の解析はすべて、乾重量当たりの窒素測定値を用いて行なった。はちみつは、報告された測定値（表 2-8,9）をそのまま使用して以下の解析を行なった。

3. 3 実験結果の解析

(1) 異常値の検討

各分析試験室の、各方法、各試料についての9点の測定値の範囲

表 2-1 各試料の分解所要時間 (分)

分析試料	方法	分析試験室			
		A	B	C	D
きなこ	マクロ	44(38~56)	40	100(79~142)	222(175~280)
	セミマクロ	84(52~140)	40	213(200~240)	213(145~295)
小麦	マクロ	28(18~39)	29(25~30)	76(69~83)	130(115~160)
	セミマクロ	35(20~100)	30	167(145~200)	140(115~165)
小麦粉	マクロ	24(20~33)	35	64(50~89)	136(110~160)
	セミマクロ	26(19~34)	35	174(145~215)	133(115~175)
精白米	マクロ	24(19~35)	29(25~30)	82(75~89)	151(110~200)
	セミマクロ	26(23~36)	30	162(180~200)	136(100~165)
コーンスターチ	マクロ錠	43(35~40)	36(30~40)	59(55~70)	106(85~135)
中国産はちみつ	マクロ錠	45(35~55)	31(30~35)	45(38~61)	110(90~150)
70ピソソ産はちみつ	マクロ錠	45(40~50)	42(40~45)	44(35~73)	104(70~160)

平均値で示した。()内は範囲を示す。

表 2-2 各分析試験室における配布試料の分析時の水分 (%)

試料	分析試験室			
	A	B	C	D
きなこ	5.82	5.00	4.46	5.18
小麦	13.85	12.43	14.54	12.77
小麦粉	12.75	12.51	13.15	12.68
精白米	14.64	13.45	14.97	13.79
コーンスターチ	14.82	14.86	15.10	14.92

表 2-3 きなこについての窒素含量測定値 (%、乾物)

マクロ・ケルダール法						セミミクロ・ケルダール法					
分折試験室	くりかえし	窒素測定値			平均値	範囲(R)	窒素測定値			平均値	範囲(R)
A	1	6.45	6.43	6.42	6.424	0.08	6.42	6.39	6.41	6.403	0.09
	2	6.46	6.42	6.43			6.40	6.40	6.46		
	3	6.43	6.40	6.38			6.38	6.37	6.40		
B	1	6.51	6.56	6.68	6.502*	0.35*	6.39	6.43	6.45	6.415	0.08
	2	6.49	6.46	6.40			6.42	6.45	6.44		
	3	6.60	6.49	6.33			6.41	6.38	6.37		
C	1	6.44	6.43	6.46	6.417	0.13	6.40	6.48	6.42	6.376	0.21*
	2	6.40	6.43	6.43			6.40	6.35	6.43		
	3	6.33	6.42	6.42			6.27	6.35	6.29		
D	1	6.41	6.41	6.45	6.412	0.07	6.35	6.39	6.42	6.393	0.07
	2	6.40	6.38	6.43			6.39	6.36	6.42		
	3	6.43	6.42	6.38			6.41	6.38	6.42		
				6.439 (6.418)	0.158					6.397 (6.404)	0.113
D \bar{R}				0.286						0.204	

注: D₄=1.816 (n=9), * : 異常と判定されたもの, () 内は異常値を除いた平均値

表 2-4 小麦についての窒素含量測定値 (%、乾物)

マクロ・ケルダール法						セミミクロ・ケルダール法					
分折試験室	くりかえし	窒素測定値			平均値	範囲(R)	窒素測定値			平均値	範囲(R)
A	1	2.63	2.62	2.63	2.623	0.02	2.62	2.61	2.61	2.610	0.02
	2	2.63	2.63	2.63			2.62	2.60	2.62		
	3	2.61	2.61	2.62			2.60	2.61	2.60		
B	1	2.66	2.60	2.58	2.612	0.08	2.54	2.56	2.60	2.571	0.12
	2	2.59	2.59	2.62			2.59	2.62	2.57		
	3	2.63	2.64	2.60			2.50	2.58	2.58		
C	1	2.64	2.63	2.62	2.631	0.07	2.69	2.64	2.69	2.678	0.07
	2	2.62	2.63	2.63			2.69	2.71	2.71		
	3	2.66	2.66	2.59			2.64	2.66	2.68		
D	1	2.59	2.64	2.61	2.614	0.05	2.60	2.58	2.53	2.575	0.07
	2	2.61	2.61	2.64			2.57	2.59	2.58		
	3	2.59	2.61	2.63			2.58	2.57	2.58		
				2.620	0.055					2.609	0.070
D \bar{R}				0.100						0.127	

注: D₄=1.816 (n=9)

表 2-5 小麦粉についての窒素含量測定値 (% , 乾物)

分折 試料室	くりか えし	マクロ・ケルダール法				セミミクロ・ケルダール法					
		窒素測定値			平均値	範囲(R)	窒素測定値			平均値	範囲(R)
A	1	1.83	1.82	1.83	1.826	0.01	1.83	1.82	1.84	1.820	0.04
	2	1.82	1.83	1.83			1.83	1.81	1.81		
	3	1.83	1.82	1.83			1.83	1.80	1.81		
B	1	1.83	1.83	1.75	1.810	0.10*	1.81	1.85	1.84	1.827	0.04
	2	1.82	1.85	1.78			1.81	1.85	1.81		
	3	1.82	1.85	1.76			1.82	1.81	1.85		
C	1	1.82	1.83	1.82	1.814	0.05	1.81	1.83	1.90	1.841	0.09
	2	1.81	1.82	1.82			1.85	1.83	1.84		
	3	1.81	1.78	1.82			1.84	1.83	1.84		
D	1	1.81	1.82	1.82	1.815	0.02	1.76	1.78	1.74	1.770	0.06
	2	1.82	1.82	1.82			1.79	1.78	1.80		
	3	1.81	1.80	1.82			1.78	1.74	1.76		
				1.817	0.045					1.815	0.058
D ₄ \bar{R}				0.082						0.104	

注: D₄=1.816 (n=9), * : 異常と判定されたもの

表 2-6 精白米についての窒素含量測定値 (% , 乾物)

分折 試料室	くりか えし	マクロ・ケルダール法				セミミクロ・ケルダール法					
		窒素測定値			平均値	範囲(R)	窒素測定値			平均値	範囲(R)
A	1	1.16	1.13	1.16	1.154	0.03	1.15	1.15	1.15	1.156	0.05
	2	1.16	1.16	1.16			1.17	1.16	1.15		
	3	1.15	1.15	1.16			1.19	1.15	1.14		
B	1	1.22	1.22	1.24	1.213	0.05	1.18	1.22	1.19	1.184	0.06
	2	1.21	1.21	1.21			1.18	1.16	1.20		
	3	1.20	1.22	1.19			1.19	1.16	1.18		
C	1	1.18	1.19	1.19	1.178	0.03	1.20	1.20	1.16	1.198	0.07
	2	1.16	1.19	1.16			1.22	1.20	1.23		
	3	1.19	1.16	1.19			1.18	1.19	1.21		
D	1	1.17	1.18	1.17	1.170	0.03	1.13	1.15	1.10	1.133	0.05
	2	1.16	1.15	1.18			1.11	1.14	1.14		
	3	1.17	1.18	1.17			1.14	1.15	1.14		
				1.179	0.035					1.168	0.058
D ₄ \bar{R}				0.064						0.104	

注: D₄=1.816 (n=9)

表 2-7 コーンスターチについての窒素含量測定値 (% , 乾物)

分 試 験	析 室	くり かえし	窒 素 測 定 値			平 均 値	範 圍(R)	R.S.D.(%)
A		1	0.0557	0.0589	0.0587	0.05842	0.0025	1.22
		2	0.0584	0.0579	0.0596			
		3	0.0571	0.0586	0.0576			
B		1	0.0531	0.0574	0.0613	0.05714	0.0082*	3.88
		2	0.0572	0.0556	0.0585			
		3	0.0562	0.0571	0.0579			
C		1	0.0571	0.0572	0.0567	0.05706	0.0009	0.64
		2	0.0567	0.0572	0.0567			
		3	0.0568	0.0576	0.0576			
D		1	0.0584	0.0560	0.0589	0.05645	0.0037	2.27
		2	0.0559	0.0556	0.0559			
		3	0.0560	0.0562	0.0552			
						0.05727	0.00383	
$D_4\bar{R}$							0.00695	

(注) $D_4=1.816$ (n=9), * : 異常と判定されたもの

表 2-8 はちみつ (中国産アンバー) についての窒素含量測定値 (%)

分 試 験	析 室	くり かえし	窒 素 測 定 値			平 均 値	範 圍(R)	R.S.D.(%)
A		1	0.0288	0.0287	0.0284	0.02844	0.0014	1.48
		2	0.0286	0.0275	0.0283			
		3	0.0286	0.0282	0.0289			
B		1	0.0447	0.0427	0.0417	0.04246*	0.0095*	6.63
		2	0.0403	0.0392	0.0424			
		3	0.0418	0.0487	0.0407			
C		1	0.0277	0.0271	0.0277	0.02725	0.0014	1.68
		2	0.0271	0.0268	0.0271			
		3	0.0265	0.0274	0.0279			
D		1	0.0268	0.0269	0.0274	0.02691	0.0015	1.85
		2	0.0269	0.0273	0.0273			
		3	0.0264	0.0259	0.0273			
						0.03126 (0.02753)	0.00345	
$D_4\bar{R}$							0.00626	

(注) $D_4=1.816$ (n=9), * : 異常と判定されたもの, () 内は異常値を除いた平均値

表 2-9 はちみつ (アルゼンチン産クローバー) についての窒素含量測定値 (%)

分 試 験	析 査 か え し	窒 素 測 定 値			平 均 値	範 圍(R)	R. S. D.(%)
A	1	0.0235	0.0227	0.0233	0.02316	0.0015	1.89
	2	0.0233	0.0239	0.0231			
	3	0.0233	0.0224	0.0230			
B	1	0.0285	0.0312	0.0388	0.03248*	0.0105*	10.93
	2	0.0325	0.0313	0.0283			
	3	0.0326	0.0318	0.0374			
C	1	0.0227	0.0223	0.0218	0.02231	0.0010	1.33
	2	0.0225	0.0228	0.0222			
	3	0.0221	0.0222	0.0222			
D	1	0.0217	0.0217	0.0222	0.02175	0.0015	2.33
	2	0.0220	0.0216	0.0211			
	3	0.0224	0.0222	0.0209			
					0.02493 (0.02241)	0.00363	
$D_4\bar{R}$						0.00658	

(注) $D_4=1.816$ ($n=9$). * : 2回と測定されたもの. ()内は真値を缺いた平均値

(R)を検討した結果、きなこで、マクロ法のB分析試験室とセミマイクロ法のC分析試験室、小麦粉でマクロ法のB分析試験室、コーンスターチとはちみつでB分析試験室の範囲が上方管理限界D、Rを越えており異常と判定された。

又、各分析試験室の平均値をDixonの方法によって検定した結果、きなこのマクロ法では危険率5%で、中国産アンバーはちみつでは危険率1%で、アルゼンチン産クローバーはちみつでは危険率5%で、B分析試験室の平均値が異常に大きいと判定された。

B分析試験室からは「滴定時の指示薬による終点の変色が明瞭でなく、滴定量が多くなりすぎた可能性がある。」との報告があり、指示薬の調製が厳密でなかったことが、測定値が大きくなった原因と考えられた。B分析試験室内での測定値のばらつきは、RSDでコーンスターチ3.88%、中国産はちみつ6.63%、アルゼンチン産はちみつ10.93%と、マクロケルダール法の精度として通常いわれている「RSDで1~2%」に比べても大きかった。これらのことから、B分析試験室で異常値がでたのは、方法としての問題ではなくて、分析試験室での問題と考えられ、異常値は棄却してもよいと判断した。

しかし、許容差の算出にあたっては、なるべく異常値を含めて行なうことが望ましいので、以下の解析を行なった上で、最終的な判断をすることにした。

(2) 分散分析

試験方法ごとに各試料について、分析試験室間、繰り返し試験、平行試験を要因とする一元一変量の分散分析を行なった。「異常値の検討」で、異常と判定された分析試験室の測定値については、そ

れらを含む場合と、棄却した場合につき、別個に分散分析を行ない、許容差を算出した。その結果、小麦粉についてはマクロ法で、コーンスターチについてはマクロ変法で、B分析試験室の測定値を含んだ分散分析から算出した許容差が、許容差の設定条件を満足したので、B分析試験室の測定値は棄却しなかった。しかし、きなこについては、マクロ法でB分析試験室の測定値を、セミマイクロ法でC分析試験室の測定値を、はちみつ2種については、マクロ変法でB分析試験室の測定値をすべて棄却しなければならなかった。

いずれの分散分析表(表 2-10~16)においても、繰り返し試験の精度は平行試験の精度とくらべ、危険率5%のF検定で違いがあるとはいえなかった。そこで、これらの分散をプールして分析試験室内精度を求め、分析試験室間精度を検定した。以下の検定はすべて危険率5%で行なった。

なお、分析試験室内精度、同室間準精度及び同室間精度は、分散分析の結果から、次の式によって推定した。

$$(i) \text{ 室内平行精度 } \sigma_{w1} = \sqrt{V_{E1}}$$

$$(ii) \text{ 室内繰り返し精度 } \sigma_{w2} = \sqrt{V_{E2}/3} = \sqrt{\sigma_e^2 + \sigma_{w1}^2/3}$$

$$(iii) \text{ 室内精度 } \sigma_w = \sqrt{V_E}$$

$$(iv) \text{ 室間準精度 } \sigma_b = \sqrt{(V_L - V_E)/9}$$

$$(v) \text{ 室間精度 } \sigma_x = \sqrt{V_L/9} = \sqrt{\sigma_b^2 + \sigma_w^2/9}$$

(3) 分析試験室内精度

マクロ法、セミマイクロ法、マクロ変法とも、分析試験室内での繰り返し試験の精度は、平行試験の精度に対して危険率5%で有意差がみられず、分析試験室内での再現性は極めて良いことを示してい

表 2-10 きなこについての分散分析表

マクロ・ケルダール法					セミマイクロ・ケルダール法				
要因	S	f	V	Fo	S	f	V	Fo	
全室室	体間	0.02040	26	$V_L = \sigma_w^2 + 9\sigma_b^2$ $V_E = \sigma_w^2$	n.s. 0.41	0.02045	26	n.s. 1.47	
	室内	0.00067	2			0.00034	0.00223		2
繰返し	室内	0.01973	24	0.00082	n.s. 1.63	0.01822	24	0.00076	
	平	0.00693	6	0.00116		0.00655	6	0.00109	
行	0.01280	18	0.00071	$V_{E2} = \sigma_w^2 + 3\sigma_r^2$ $V_{E1} = \sigma_w^2$	0.01167	18	0.00064		

注: n.s.; 有意差なし Fo < F, F(2, 24; 0.05) = 3.402, F(6, 18; 0.05) = 2.661

表 2-11 小麦についての分散分析表

マクロ・ケルダール法					セミマイクロ・ケルダール法				
要因	S	f	V	Fo	S	f	V	Fo	
全室室	体間	0.01490	35	0.00068	n.s. 1.70	0.08616	35	0.02231	37.1**
	室内	0.00203	3			0.00040	0.06696		
繰返し	室内	0.01287	32	0.00020	n.s. 0.43	0.01920	32	0.00060	
	平	0.00160	8	0.00047		0.00580	8	0.00073	
行	0.01127	24	0.00047		0.01340	24	0.00056		

注: n.s.; 有意差なし Fo < F, F(3, 32; 0.05) = 2.901, F(8, 24; 0.05) = 2.355

** : 危険率 1% で有意差 Fo > F, F(3, 32; 0.01) = 4.460

表 2-12 小麦粉についての分散分析表

マクロ・ケルダール法					セミマイクロ・ケルダール法				
要因	S	f	V	Fo	S	f	V	Fo	
全室室	体間	0.01480	35	0.00045	n.s. 1.07	0.03890	35	0.00868	21.7**
	室内	0.00136	3			0.00042	0.02605		
繰返し	室内	0.01344	32	0.00013	n.s. 0.25	0.01285	32	0.00040	
	平	0.00104	8	0.00052		0.00258	8	0.00032	
行	0.01240	24	0.00052		0.01027	24	0.00043		

注: n.s.; 有意差なし Fo < F, F(3, 32; 0.05) = 2.901, F(8, 24; 0.05) = 2.355

** : 危険率 1% で有意差 Fo > F, F(3, 32; 0.01) = 4.460

表 2-13 精白米についての分散分析表

マクロ・ケルダール法					セミマイクロ・ケルダール法				
要因	S	f	V	Fo	S	f	V	Fo	
全室室	体間	0.02168	35	0.00559	n.s. 1.50	0.03350	35	0.00766	23.2**
	室内	0.01676	3			0.00015	0.02299		
繰返し	室内	0.00491	32	0.00021	n.s. 1.50	0.01051	32	0.00033	
	平	0.00164	8	0.00014		0.00284	8	0.00036	
行	0.00327	24	0.00014		0.00767	24	0.00032		

注: n.s.; 有意差なし Fo < F, F(3, 32; 0.05) = 2.901, F(8, 24; 0.05) = 2.355

** : 危険率 1% で有意差 Fo > F, F(3, 32; 0.01) = 4.460

表 2-14 ニーンスターチについての分散分析表

要因	S × 10 ³	f	V × 10 ³	F ₀
全体	7.6152	35		
室間	1.8432	3	0.6144) 3.41*
室内	5.7720	32	0.1804	
繰返し	0.9567	8	0.1196) 0.59**
平 行	4.8153	24	0.2006	

(注) n.s.: 有意差なし F₀ < F, F (8,24; 0.05) = 2.355

*: 危険率 5% で有意差 F₀ > F, F (3,32; 0.05) = 2.991

表 2-15 はちみつ (中国産アソパー) についての分散分析表

要因	S × 10 ³	f	V × 10 ³	F ₀
全体	1.6743	26		
室間	1.1650	2	0.5825) 27.44**
室内	0.5093	24	0.0212	
繰返し	0.1487	6	0.0248) 1.23**
平 行	0.3607	18	0.0200	

(注) n.s.: 有意差なし F₀ < F, F (6,18; 0.05) = 2.661

** : 危険率 1% で有意差 F₀ > F, F (2,24; 0.01) = 5.61

表 2-16 はちみつ (アルゼンチン産クローバー) についての分散分析表

要因	S × 10 ³	f	V × 10 ³	F ₀
全体	1.3467	26		
室間	0.9096	2	0.4548) 24.97**
室内	0.4371	24	0.0182	
繰返し	0.0764	6	0.0127) 0.64**
平 行	0.3607	18	0.0200	

(注) n.s.: 有意差なし F₀ < F, F (6,18; 0.05) = 2.661

** : 危険率 1% で有意差 F₀ > F, F (2,24; 0.01) = 5.61

た。そして、マクロ法とセミマイクロ法の分析試験室内精度は、ほぼ同じであり、きなこ、小麦及び小麦粉の場合には、2方法間に有意差はみられなかった。室内精度についてのRSD%は0.5~1.5%であり、技術的に満足な値であった。低窒素含有食品であるコーンスターチについての、A、B、C及びD分析試験室における9個の測定値のRSD%は、それぞれ1.22、3.88、0.64及び2.27%であり、中国産アンバーはちみつについては、A、C及びD分析試験室におけるRSD%は、それぞれ1.48、1.68及び1.85%、アルゼンチン産クローバーはちみつについては、それぞれ1.89、1.38及び2.33%であり、技術的に満足な値であった。

(4) 分析試験室間精度

F検定の結果、きなこでは、マクロ法、セミマイクロ法とも分析試験室の平均値間に有意差はみられなかった。又、室間精度も、2方法間に有意差はみられなかった。

小麦と小麦粉については、マクロ法では各分析試験室の平均値間に有意差はみられなかったが、セミマイクロ法では有意差があった。又、室間精度はマクロ法の方が有意に良かった。セミマイクロ法で各平均値間に有意差があったこと及び室間精度が悪かったのは、「分解液の定容化、その一部の水蒸気蒸留」と、操作が一段複雑なこと、分解液の一部しか用いないためのばらつきの拡大、又、小麦では各分析試験室での粉砕の影響が原因と考えられた。

精白米では、2方法とも各分析試験室の平均値間に有意差があった。室内精度はマクロ法の方が有意に良かったが、室間精度は、2方法間に有意差はみられなかった。分解液の全量を直接蒸留するマクロ法の利点、室間精度の良いところに現われていると考えられ

た。しかし、各分析試験室での粉砕の影響と窒素含量が約1%と低いことのために、各分析試験室の平均値間に有意差がでたと考えられた。窒素含量が小麦粉の値以上の試料では、マクロ法の測定は各分析試験室の平均値間に有意差がみられず、極めて再現性の良いことが確認された。

コーンスターチでは、マクロ変法による各分析試験室の平均値間に危険率5%で有意差があり、はちみつでは2種類とも、各分析試験室の平均値間に危険率1%で有意差があった。

(5) マクロ法とセミマイクロ法間のかたよりの検討

きなこでは、2方法の室間精度間に有意差がなく対応のない(乗却分析室が異なる)場合で、小麦及び小麦粉では、2方法の室間精度間に有意差のある場合で(Welchの方法)で、精白米では室間精度間に有意差がなく対応のある場合で検討した結果、いずれの試料においても2方法間にかたよりがあるとはいえなかった。

(6) 許容差

きなこ、小麦及び小麦粉では、マクロ法とセミマイクロ法の室内精度間に有意差がみられず、かつその値がよく一致していたので、2方法の室内精度をプールして許容差を算出し、表 2-17~18に示した。

室内許容差は、試料の窒素含量が小さくなるに従って小さくなった。しかし、室間許容差は試料の窒素含量が異なっても、マクロ法では2分析試験室間の場合、0.06~0.08窒素%、セミマイクロ法では2分析試験室間の場合、0.08~0.10窒素%とほぼ一定であった。

マクロ法のきなこ、小麦及び小麦粉における室間許容差は室内許容差と同じであり、これは前述したように、マクロ法は室間再現性

表 2-17 許 容 差 (窒素%, 乾物)

試 料	方 法	平均値	R.S.D %	σ_w	室内許容差*		$\sqrt{\sigma_b^2 + \sigma_w^2}$	室間許容差**	
					$D_1(0.95)\sigma_w$ (2)	(3)		$D_2(0.95)\sqrt{\sigma_b^2 + \sigma_w^2}$ (2)	(3)
きなこ	マ ク ロ	6.411	0.44	0.028	0.078	0.093	0.028	0.078	0.093
	セ ミ ミ ク ロ						0.029	0.080	0.096
小 麦	マ ク ロ	2.615	0.85	0.022	0.062	0.074	0.022	0.062	0.074
	セ ミ ミ ク ロ						0.054	0.150	0.179
小麦粉	マ ク ロ	1.816	1.11	0.020	0.056	0.067	0.020	0.056	0.067
	セ ミ ミ ク ロ						0.036	0.100	0.119
精白米	マ ク ロ	1.174	1.04	0.012	0.034	0.040	0.027	0.075	0.089
	セ ミ ミ ク ロ		1.54	0.018	0.050	0.060	0.034	0.094	0.113

表 2-18 許 容 差 (窒 素 %)

試 料	平均値	σ_b についての R. S. D (%)	σ_w	室内許容差*		$\sqrt{\sigma_b^2 + \sigma_w^2}$	室間許容差**	
				$D_1(0.95)\sigma_w$ (2)	(3)		$D_2(0.95)\sqrt{\sigma_b^2 + \sigma_w^2}$ (2)	(3)
ユ ー ン*** スターチ	0.05727	2.35	0.001343	0.003720	0.004445	0.001512	0.004188	0.005004
はらみつ (中国産)	0.02735	1.67	0.000460	0.001276	0.001524	0.000914	0.002532	0.003026
はらみつ (アルゼン チン産)	0.02241	1.90	0.000426	0.001182	0.001412	0.000816	0.002262	0.002703

(注) $D_1(0.95)=2.77$ ($n=2$), $D_2(0.95)=3.21$ ($n=3$)

* 室内許容差: 同一分析試験室内で、検査し試験 (あるいは平行試験) を 2 回あるいは 3 回行ったときの、測定値間の許容差

** 室間許容差: 2 あるいは 3 分析試験室で、各 1 回行った測定値間の許容差

*** ユーン・スターチでは乾燥あたりの値で示した

が極めて良いことを示している。そして、室間精度がセミマイクロ法よりも良いことから、標準法としての適用が可能である。セミマイクロ法は室間許容差が室内許容差の3倍以内であることから、これも標準法として適用することができるが、室間精度はマクロ法に比べて、やや劣り、許容差で1.3~2.5倍劣った。

マクロ変法は、いずれの試料についても、各分析試験室の平均値間には有意差があったが、これは統計的な処理の結果であって、むしろ実際に分析手法を試料に適用する際の良い指標であると考えられる許容差でみるならば、室間許容差は室内許容差の2倍以内であり、室間での再現性もかなり良いことを示していた。このことから、窒素含量の少ない食品の窒素定量に当たり、マクロ・ケルダール改良法(変法)は標準法として適用することが可能であると考えられた。

このマクロ法あるいはセミマイクロ法を用いて、窒素含量が1%以上の食品、あるいはマクロ法(変法)を用いて低窒素含有食品の同一試料につき、特定分析試験室内あるいは異なる分析試験室間で窒素含量を測定した場合、その測定値間の差が上述の許容差未満であれば問題はないが、分析試験室内で許容差以上となった場合は測定のやり直し、分析試験室間で許容差以上となった場合は、異分析試験室のいずれか一方あるいは両方の測定に問題があると考えられるので、装置、器具、試薬、操作などについて検討する必要がある。

4. 要約

ケルダール改良法、すなわち濃硫酸に硫酸カリウムを加え、触媒として二酸化チタンと硫酸銅を加え、試料の分解を行ない、アンモ

ニアを蒸留して、ホウ酸溶液に捕捉後、硫酸標準溶液で滴定する方法について、4分析試験室が参画して、マクロ法及びセミマイクロ法を、きなこ、小麦、小麦粉、及び精白米の4共通試料に、マクロ変法を低窒素含有試料のコーンスターチ及びはちみつ2種類の3共通試料に適用して、クロスチェック試験を行なった。測定値を統計的に処理して、分析試験室内精度、同室間精度及び許容差を算出した。マクロ法とセミマイクロ法間にかたよりはみられず、両法とも室内精度はほぼ同じであり、RSD%は0.5~1.5%と良好であった。マクロ法は、きなこ、小麦及び小麦粉で各分析試験室の平均値間に有意差がみられず、室間での再現性も極めて良く、標準法として適用できることが分かった。又、セミマイクロ法も標準法として適用できるが、室間精度はやや劣った。マクロ変法の室内精度はRSD%で1.67~2.35%と良好であった。室間許容差は室内許容差の2倍以内であり、室間での再現性もかなり良いことを示していた。このことから、分解用硫酸の添加量を通常の約2倍の40mlとしたマクロ・ケルダール改良法の変法は窒素含量の少ない食品の窒素定量に標準法として適用できることが分かった。

5. 文 献

- 1) R.B.Bradstreet: The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen (Academic Press, New York), (1965).
- 2) 福島正美, 菅原 潔: 蛋白質の定量法, 初版, (東京大学出版会), p.21(1971).
- 3) P.C.Williams: J.Sci.Food Agric., 24, 343(1973).
- 4) J I Sハンドブック 品質管理1974, 第1版, (日本規格協

第2節 各種のケルダール改良法による窒素定量法の比較検討

1. はじめに

第1節において、二酸化チタンと硫酸銅を触媒として用いるケルダール改良法について、共通試料を用いてあらかじめ指示された試薬、操作手順に従ってクロスチェック試験を行ない、この方法の室内精度、室間精度について検討を加え、標準法として適用が可能であることを明らかにしてきた。しかし、実際には、窒素定量のためのケルダール改良法の標準法は特定の試料に関して個々に決められているだけで、各研究室がいろいろなケルダール改良法の変法を用いて分析を行なっている。そこで、窒素の定量を日常良く行なっていて、かつ異なる方法を用いている3箇所の研究機関が参画して、共通試料の窒素の定量を行ない、その精度等について、先のクロスチェック試験の精度等と比較検討した。

2. 実験方法

2.1 共同試験参画機関

次の分析試験室が共同試験に参画した。

農林水産省食糧庁、検査実験室

農林水産省食品総合研究所、分析栄養部、栄養化学研究室

農林水産省食品総合研究所、分析栄養部、分析研究室

2.2 試料の調整及び配布

窒素含量の異なる3種類の穀類について、食糧庁検査実験室で次のように調製したものを、約250gずつポリエチレン袋に入れて配布した。

小麦粉：強力粉、市販品

小麦：全粒粉を調製した。ハンマータイプの粉砕機で粉砕したのち、60メッシュの篩を通過させた。

精白米：小麦試験用粉砕機（ブラベンダー社製）で粉砕したのち、30メッシュの篩を100%通過させた。

から試験用の精製ザラメ（試薬特級以上）についても、同一品を配布した。

2.3 分析試験の組立

各試料について、各分析試験室は日常用いている方法で、5点平行分析を行なった。分析は配布から4ヵ月以内に行なわれ、結果は、食品総合研究所、分析研究室に報告された。

2.4 窒素の定量

各分析試験室が用いた窒素の定量法は次の通りである。

(1) 標準計測方法（食糧庁）のタンパク質定量法¹⁾（S法と呼ぶ）食糧庁・検査実験室はこの方法によって分析した。試料約1gを精秤し、容量100ml前後の分解フラスコに投入した。分解助剤（硫酸カリウム94、二酸化チタン3及び硫酸銅3の割合で混合したもの）5g、濃硫酸10mlを加え、試料に硫酸をよく浸透させてから、あらかじめ加熱した分解台上で分解を行なった。液が透明になってから、さらに90分間加熱を続けた。放冷後、水50mlを加え軽く振り混ぜて固形物等を溶解し、容量100mlのメスフラスコに洗い込み、定容とした。

蒸留は、食糧庁式バルナス・ワグナー型水蒸気蒸留装置を用いた。容量100mlの三角フラスコに2w/v%ホウ酸溶液10mlとメチルレッド-メチレンブルー混合指示薬1~2滴を加え、蒸留器の溜出口に装

着した。100mlに定容化した分解液から25mlを全量ピペットで水蒸気蒸留装置のフラスコにとり、中和用45w/v%水酸化ナトリウム溶液9mlを加え、水蒸気蒸留を行なった。熱源の強さは、溜出液が10分間で50~60mlとなるようにあらかじめ調整しておく。

滴定はN/20硫酸で行ない、受器内の緑色の液が無色となったところを終点とした。

別から試験として精製ザラメ1gについて、同様の操作を行なった。

(2) 標準測定法(穀粉科学研究会)のタンパク質定量法²⁾の変法(K法と呼ぶ)

食品総合研究所、栄養化学研究室は、この方法によって分析した。

試料は小麦、小麦粉では約1.4g、精白米では約1.8gを採取し、さらに0.001gまで精秤し、容量300mlの分解フラスコに投入した。硫酸カリウム10g、硫酸銅1g及び濃硫酸20mlを加え、試料に硫酸をよく浸透させたあと、加熱分解を行ない、液が透明となってから(約40分で透明となる)、さらに60分間加熱を続け、分解を終了した。

冷却後、水120mlを加え、沸石を入れた後、中和用の45w/v%水酸化ナトリウム溶液90mlを加え、直接蒸留装置に接続した。溜液の溜出口にN/10硫酸標準液25mlを入れた三角フラスコを装着し、分解フラスコの内容液をよく振り混ぜて混合したあと、加熱を行なった。フラスコ内容液が突沸を始める直前まで溜液を集める。これを自動滴定装置(三田村理研製、ポテンシオグラフタイトレーター)に装着し、N/10水酸化ナトリウム標準溶液で滴定した。

(3) 食品分析研究会報告書のタンパク質定量法³⁾(B法と呼ぶ)

食品総合研究所、分析研究室は、この方法によって分析した。

試料約2 gを0.001gまで量り、容量500mlの分解フラスコに入れる。硫酸カリウム15 g、二酸化チタン0.5g、硫酸銅0.5g、ついで濃硫酸25mlを加え、沸石5～6粒を加え、硫酸が試料に十分に浸透するまで穏やかに振り混ぜたのち、分解用加熱装置で加熱する。フラスコの内容液が透明になってから（約30分で透明となる）、さらに60分加熱を続けて分解を完了させた。

冷却後、イオン交換水 200mlを加え、25°C以下に冷却した後、少量の砂粒状亜鉛を加えてから、静かに中和用水酸化ナトリウム溶液70mlを加え、振り混ぜずにアンモニアの直接蒸留装置に連結した。蒸留装置の留出口に4w/v%ホウ酸溶液50mlを入れた容量300mlの三角フラスコを装着した後、分解フラスコを振り動かして内液を混合した。熱源の強さは、30分間加熱蒸留して、留液 120～150mlが得られるようにあらかじめ調整しておく。混合指示薬（メチルレッドとブロムクレゾールグリーン）5～6滴を加え、N/10硫酸標準溶液で滴定する。青色→青緑色→汚無色→桃色になったところを終点とする。別から試験として精製ザラメ2gについて、試料と同様に操作して、分解、蒸留、ついで滴定する。

2. 5 計算及び表示

試料の窒素含量（%）は次式によって計算し、小数第4位を四捨五入して小数第3位まで表示する。

$$\text{試料の窒素 (\%)} = \frac{a \times (V_1 - V_2) \times f \times b \times M}{10 \times S}$$

V_1 : 試料についての滴定量 (ml)

V_2 : から試験での滴定量 (ml)

f : 用いた滴定標準溶液のファクター

M : 蒸留時の試料分解液の採取量に基づく倍数

S : 試料採取量 (g)

a : 酸による滴定の場合は、 $a = 1$

アルカリによる逆滴定の場合は、 $a = -1$

b : N/10の滴定標準液を使った場合は、 $b = 1.4$

N/20の滴定標準液を使った場合は、 $b = 0.7$

滴定に用いる標準溶液の違いによって起こるかたよりを防ぐために、同一ロットのN/10硫酸標準溶液を各分析試験室に配布し、これを用いるか、あるいは、各実験室の標準液は、共通標準液でチェックして補正した後用いた。

2. 6 水分の定量

試料は分析までの保存中に水分が変動することが考えられるので、窒素の定量時に水分の定量を行なった。

水分の定量は、試料3gをアルミニウム製の秤量容器にとり、常圧135°Cで1時間乾燥する方法で2点平行で行なった。

3. 結果及び考察

3. 1 試料の水分含量

各分析試験室で行なった水分測定値を表2-20に示した。窒素測定値は水分で補正し、乾重量当たりの窒素含量として表2-21に示した。栄養化学研究室の測定値は分析研究室で測定した水分値で補正した。

3. 2 試験結果の解析

(1) 分析試験室内精度

表 2-19 各ケルダール改良法の定量条件の比較

方 法	S 法	K 法	B 法	
分 解	試料量 (g)	1.0	1.4~1.8	2.0
	分解フラスコ容量 (ml)	100	300	500
	分解の熱源	電熱(1kw)6本かじ	ガスバーナー	ガスバーナー
	分解剤の種類	{K ₂ SO ₄ : 4.7 TiO ₂ : 0.15 CuSO ₄ : 0.15	{K ₂ SO ₄ : 10 CuSO ₄ : 1	{K ₂ SO ₄ : 15 TiO ₂ : 0.5 CuSO ₄ : 0.5
	分解剤の使用量 (g)			
蒸 留	濃硫酸使用量 (ml)	10	20	25
	分解終了の目安	透明後 90分	透明後 60分	透明後 60分
	分解全所要時間 (分)	130	100	90
蒸 留	希釈量 (ml)	100ml に定容化	120ml の水を加える	200ml の水を加える
	蒸留供試液量 (ml)	25	全量	全量
	中和用濃度	45% NaOH	45% NaOH	45% NaOH
	アルカリ使用量 (ml)	9	90	70
	蒸留の形式	水蒸気	直接加熱	直接加熱
蒸 留	蒸留所要時間 (分)	10	突沸直前まで	30
	溜出液量 (ml)	50	100~120	120~150
	アンモニアの種類	2% H ₂ BO ₃	N/10 H ₂ SO ₄	4% H ₂ BO ₃
	捕捉液使用量 (ml)	10	25	50
	滴定標準液	N/20 H ₂ SO ₄	N/10 NaOH	N/10 H ₂ SO ₄
指示薬	MR, MB 混合	pH メーター	MR, BCG 混合	
備 考		自動滴定装置使用		

表 2-20 各分析試験室における配布試料の分析時の水分含有量 (%)

分析試験室	食糧庁 検査実験室	食総研 栄養化学研	食総研 分析研
小麦粉	13.51	—	13.73
小麦全粒粉	10.94	—	10.86
精白米粉	14.67	—	14.92

いずれの試料についても、各分析試験室の室内精度は相対標準偏差 (RSD) で0.1~0.6%と非常に良く、いずれの分析方法でも室内での再現性には問題はないと考えられる。しかし、精度について検討してみると、試料採取量、試料の性状及び分析方法によって傾向があることが分かった。マクロスケールで2gの試料を採取して、分解後直接蒸留するB法の標準偏差 (SD) が、いずれの試料についても、他の方法 (セミミクロスケールで1.4~1.8gの試料を採取して分解後、直接蒸留する方法及びミクロスケールで1.0gの試料を採取して分解、定容化後、その一部について水蒸気蒸留する方法) よりも小さく、精度がよかった。特に、均一化が他の試料よりも難しいと考えられる小麦全粒粉でその傾向が明らかであった。試料採取量は多いほうが、試料の不均一性に由来する測定値の変動が小さくなることを示している。又、このことはK法で精白米では1.8g採取したために、そのSDが1.4g採取の他の試料に比べて、小さくなることから確かめられた。

(2) 分析試験室間精度

室間精度について検討するために、表2-21の測定値を使って、室間を要因とする一元配置の分散分析を行なった。結果は表2-22に示すように、いずれの試料についても、室間に有意差が認められ、最小有意差を計算すると、K法の平均値が他の2法の平均値と有意に違っていることが分かった。実験方法の内容をみると、S法及びB法が、混合触媒として二酸化チタンと硫酸銅を使っているのに対して、K法は硫酸銅を使っていること、S法とB法がアンモニアの蒸留において、ホウ酸に捕捉した後、硫酸で直接滴定しているのに対し、K法は硫酸に捕捉したのち、水酸化ナトリウム溶液で逆滴定を

していることなど大きな違いがあり、これが平均値に差をもたらし
た原因とも考えられる。アルカリ滴定については、空気中の二酸化
炭素の吸収の影響を無視できない場合があり、たとえば自動ビュレ
ットで、空気圧で滴定液をビュレットに満たす方式のものは、空気
の通る経路に二酸化炭素の吸収剤を入れてあっても、徐々に二酸化
炭素が滴定液に吸収され、そのさい終点の遅れが観察され、滴定液
の入り過ぎにより窒素の測定値が小さくなることが指摘されている。
今回の共同試験でも、アルカリ滴定を用いたK法の窒素測定値が他
に比べて相対的に低い値となっている。しかし、栄養化学研究室の
自動ビュレットは先に述べた方式ではなくて、機械的にピストンで
吸い込む方式をとっており、終点も明瞭にわかるとのことであるの
で、二酸化炭素の影響ではないと考えられるが、測定値が相対的に
低い理由については、標準溶液の違い、あるいは硫酸銅のみの分解
によるためか、更に詳細な検討が必要であろう。

しかしながら、室内精度が非常に良いために、わずかな平均値の
差も有意差として検出してしまうことも事実である。実際面では、
許容差から判断した方が有用な場合が多いと考えられるので、許容
差からも室間の精度を検討した。許容差は前項のクロスチェック試
験において算出したものを、5点測定の前平均値の許容差に計算し直
して、表2-23に示したものをを用いた。今回の各試料についての測定
値の前平均値の範囲を、この許容差と比較してみると、マクロスケー
ルのケルダール改良法の3室間許容差内には入らなかったが、セミ
ミクロスケールのケルダール改良法の許容差とでは、いずれも許容
差以下であった。クロスチェック試験が統一した方法で行なったも
のであるのに対して、今回の共同試験は、分解のスケールが、マク

表 2-21 各試料についての窒素含量測定値 (%、乾物)

試料方法	窒素測定値 (%)					平均値	範囲(R)	S. D.	R. S. D. (%)	
小麦粉	S	2.555,	2.547,	2.547,	2.534	2.5460	0.021	0.00755	0.296	
	K	2.497,	2.503,	2.501,	2.504,	2.514	2.5038	0.017	0.00630	0.252
	B	2.553,	2.549,	2.554,	2.558,	2.552	2.5532	0.009	0.00332	0.129
小麦全粒粉	S	2.508,	2.501,	2.494,	2.492,	2.485	2.4960	0.023	0.00880	0.352
	K	2.437,	2.465,	2.460,	2.431,	2.457	2.4500	0.034	0.01500	0.614
	B	2.503,	2.505,	2.507,	2.503,	2.507	2.5050	0.004	0.00206	0.082
精白米粉	S	1.287,	1.287,	1.287,	1.282,	1.274	1.2834	0.014	0.00568	0.443
	K	1.257,	1.263,	1.258,	1.260,	1.253	1.2582	0.010	0.00370	0.294
	B	1.289,	1.284,	1.286,	1.286,	1.284	1.2858	0.005	0.00205	0.264

表 2-22 各試料についての分散分析表

試料	要因	S × 10 ³	f	V × 10 ³	F ₀
小麦粉	全体	7.55134	14		
	室間	7.12174	2	3.56087	99.46**
	室内	0.42960	12	0.03580	
小麦全粒粉	全体	9.93334	14		
	室間	8.70334	2	4.35167	42.45**
	室内	1.23000	12	0.10250	
精白米粉	全体	2.53840	14		
	室間	2.33760	2	1.16880	69.86**
	室内	0.20080	12	0.01673	

(注) **: 危険率 1% で有意差, F₀ > F, F (2, 12; 0.01) = 6.926

表 2-23 共同試験の平均値間の差と、クロスチェック結果から計算した、5点測定の平均値間の許容差

	5点測定 of 平均値 (%)			範囲 (R)	マクロ・ケルダール改良法		セミマクロ・ケルダール改良法	
	S	K	B		3室間許容差		3室間許容差	
					$\sqrt{\sigma_b^2 + \frac{\sigma_w^2}{5}}$	$3.31 \times \sqrt{\sigma_b^2 + \frac{\sigma_w^2}{5}}$	$\sqrt{\sigma_b^2 + \frac{\sigma_w^2}{5}}$	$3.31 \times \sqrt{\sigma_b^2 + \frac{\sigma_w^2}{5}}$
小麦粉	2.5460,	2.5038,	2.5532	0.0494	0.00894	0.0296	0.03124	0.1034
小麦全粒粉	2.4960,	2.4500,	2.5050	0.0500	0.00984	0.0326	0.05029	0.1664
精白米粉	1.2834,	1.2582,	1.2858	0.0276	0.02477	0.0820	0.02995	0.0991

ロ（2gの試料を容量500mlの分解フラスコで）、セミマイクロ（1.4～1.8gの試料を容量300mlの分解フラスコで）、マイクロ（1gの試料を容量100mlの分解フラスコで）と異なり、分解助剤の種類及び割合が異なり、蒸留は直接蒸留と水蒸気蒸留、滴定は酸滴定とアルカリ滴定と異なっていることを考えると、方法間においても、測定値は実用的目的において良い一致を示していると考えられる。

このように、今回検討した3方法間ではかなり精度がよいことが分かった。特にS法とB法による測定値は、いずれの試料についても、極めてよく一致した。しかし、このような形の共同試験では、測定値そのものについて相対的な大小しかいえず、方法の正確さについては推定のみで、明確にすることはできない。今後は窒素含量が保証されている標準試料を用いて、方法の正確さについても検討していくことが必要と考えられる。

第1節のクロスチェック試験を行なった方法（今回のB法）を標準法として適用することになっても、各室の方法を今回のような共同試験を行なって、標準法と比較したときに、室内精度がほぼ同じで、平均値間の差も、標準法そのものの許容差以内であることを確認できれば、その分析試験室の方法を引き続き使用しても、その測定値は標準法による測定値と比較することが可能となる。このような意味において、早い時期に標準法の設定が行なわれることが望まれる。現在のところ、分解の迅速性、精度の良いことなどから、B法が標準法として、最も適当と考えられる。

4. 要 約

3種類の窒素含量の異なる穀類（小麦粉、小麦全粒粉及び精白米

粉)の共通試料を用いて、3箇所の分析試験室でケルダール改良法による窒素定量の共同試験を行なった。3つの分析試験室はそれぞれ異なるケルダール改良法で5点平行の測定を行なった。

分析試験室内精度は各方法ともRSDで、0.1~0.6%と非常に良かった。室間精度については、前項のクロスチェック試験で求めた許容差と比較したところ、各方法の平均値間の範囲は、いずれの試料についてもセミクロススケールのケルダール改良法の許容差以内となり、各方法間の精度もかなり良いことが分かった。

5. 文 献

- 1) 食糧庁：標準計測方法，p.16 (1974).
- 2) 澱粉科学研究会：標準測定法(1)，澱粉科学研究会研究報告第5号別冊，p.6 (1963).
- 3) 農林水産技術会議事務局：48年度食品分析研究会報告書，p.1 (1974).

第三章 アルミニウム箔容器を用いる乾式灰化法の開発

1. はじめに

無機元素を定量するための前処理法としては、乾式灰化法、湿式分解法、塩酸抽出法などが用いられている。塩酸抽出法は操作が簡単で迅速であるので、多くの試料に適用が試みられ、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、マンガン、銅の定量に適用できることが確かめられているが^{1, 2)}、鉄の抽出率は不完全であり、全鉄の定量には適用できない。そのため鉄を含む多元素定量の前処理としては、乾式灰化法が用いられる事が多い。乾式灰化のための容器としては、白金皿が最も適しているが、高価であるので個数を揃えることが難しく、多数点の試料を分析するには不向きである。

著者らは、水分、灰分の測定に市販のアルミニウム箔を成型して作った容器を用いているが³⁾、この容器をさらに無機元素定量の前処理としての乾式灰化に用いる事をアメリカ合衆国国立標準化局(NBS)のStandard Reference MaterialであるWheat Flour(SRM 1567)、Rice Flour(SRM 1568)、Citrus Leaves(SRM 1572)、Orchard Leaves(SRM 1571)及びOyster Tissue(SRM 1566)を用いて検討し、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、亜鉛、マンガン、銅の原子吸光法による定量およびリンのパナドモリブデン酸吸光度法による定量において、白金皿を用いる方法と同様に標準試料の元素の保証値と良く一致する結果を得た。

2. 実験方法

2. 1 装置および器具

原子吸光分光光度計：日本ジャーレルアッシュ社製AA-781型を用いた。バーナーは水冷式10cmスリットバーナー(SA-62)をアセチレン(1.5 l/m)-空気(6.5 l/m)フレイムで用いた。光源は浜松ホトニクス社製ホローカソードランプのナトリウム(L233-11NB、589.6及び330.3nm)、カリウム(L233-19NB、769.9及び404.4nm)、マグネシウム(L233-12NU、285.2nm)、カルシウム(L233-20NU、422.7nm)、マンガン(L233-25NU、279.5nm)、鉄(L233-26NU、248.3nm)、銅(L233-29NU、324.8nm)及び亜鉛(L233-30NQ、213.9nm)をそれぞれの波長で用いた。ビームはバーナーヘッド上8mmを通した。

分光光度計：島津製作所製UV-210Aを用いた。

電気炉：池田理化製MFP-400Nを用いた。

ホットプレート：家庭用、温度目盛最高200°Cのものを用いた。

ガラス器具：ホウケイ酸ガラス製のものを、一晚20%塩酸に浸せきしておき水洗後風乾して用いた。

アルミニウム箔カップ：直径15cmのアルミニウム箔を容量100mlのポリプロピレン瓶を用いてカップ型に成型した(底面の直径4cm、高さ5.5cm)。これを二重にして電気炉600°Cで2~3時間加熱したものを用いた。

2. 2 試薬および標準溶液

1%塩酸は、精密分析用20%塩酸(和光純薬製)を水で、20倍に希釈した。

水はイオン交換処理した水を逆浸透膜(Milli-R0、ミリポア製)を通し、さらに活性炭-イオン交換樹脂-マイクロフィルター(0.45μm)(SuperQシステム、ミリポア製)を順次通したのものを用いた。

標準溶液：それぞれの原子吸光分析用標準溶液（関東化学製、1000ppm）を、1%塩酸で希釈して検量線作成用標準溶液を作成した。ナトリウムとリンは、それぞれ標準試薬の塩化ナトリウム(NaCl)と特級リン酸二水素カリウム(KH₂PO₄)から調製した。

バナドモリブデン酸試薬⁴⁷：熱水400ml にモリブデン酸アンモニウム・四水和物{(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O} 20g を溶かし、放冷する。熱水150ml にメタバナジン酸アンモニウム(NH₄VO₃) 1g を溶かし、放冷後、60%過塩素酸263ml を加える。かき混ぜながら、バナジン酸溶液に、徐々にモリブデン酸溶液を加え、1l に希釈する。

ランタン溶液：塩化ランタン溶液（関東化学製、原子吸光分析用）、ランタンとして(10±0.3)w/v %

2. 3 試料

Wheat Flour およびRice Flourの乾重量は、85°C24時間の常圧通風加熱乾燥法で求めた。

Orchard LeavesおよびCitrus Leaves の乾重量は、それぞれ90°C、24時間及び85°C、2時間の常圧通風加熱乾燥法で求めた。

Oyster Tissue の乾重量は、コールドトラップを用いた室温24時間の減圧乾燥法で求めた。

2. 4 試料溶液の調製

(1) 白金皿乾式灰化法

試料約0.5～1gを白金皿に採取し、電気炉で灰化した。用いた電気炉の温度上昇が急激であるので、最初 350°Cに設定してこの温度で1時間加熱して試料を炭化させたのち、550°Cに再設定し、550°Cで2～3時間保って灰化した。灰化後とり出し、灰を水で湿らせた後、20%精密分析用塩酸約5mlを加え、家庭用ホットプレート上で

加温溶解させた。ケイ酸分離を行なうために、蒸発乾固させ、さらに乾燥器中で110°Cで1時間加熱した。冷却後、1%塩酸を加え、家庭用ホットプレート上で蒸発残留物を加温溶解させてメスフラスコに洗い込み、100ml定容とした。

(2) アルミニウム箔カップ乾式灰化法

試料約0.5～1gをアルミニウム箔カップに採取し、白金皿乾式灰化法と同様にして灰化した。灰化後、二重のアルミニウム箔カップの外側カップを外し、内側カップを漏斗の上に乘せてひだがなくなるように出来るだけひろげる。下にコニカルピーカーをおいてから、カップの底を先端を細くしたガラス棒で突き破って、灰をピーカーに落とし、次いで、カップの内側を1%塩酸で良く洗った。水で洗う方法も比較検討した。洗液は約30mlとなった。ピーカーを家庭用ホットプレート上に移し、洗液を蒸発乾固させた。20%精密分析用塩酸5mlを加え、家庭用ホットプレート上で蒸発残留物を加温溶解後、再び蒸発乾固させた。さらに、乾燥器中で110°Cで1時間加熱した。冷却後、1%塩酸を加え、家庭用ホットプレート上で蒸発残留物を加温溶解させてメスフラスコに洗い込み、100ml定容とした。

また、20%塩酸処理を省略した方法、1%塩酸洗液の蒸発乾固と20%塩酸処理を両方も省略して、そのまま1%塩酸で定容とする方法も比較検討した。

2.5 無機元素の定量

全ての試料溶液中のナトリウム、マグネシウム、鉄、マンガン、銅、亜鉛及びOrchard Leaves、Citrus Leavesを除く試料溶液中のカリウムは、そのまま直接噴霧原子吸光法で定量した。Orchard Leaves、Citrus Leavesの試料溶液中のカリウム、カルシウムは適宜

1%塩酸で希釈したのち、直接噴霧原子吸光法で定量した。カルシウムは、Wheat Flour、Rice Flourでは、測定溶液中のランタン濃度が1%、Oyster Tissue ではランタン濃度が 0.5 %となるように調製して原子吸光法で定量した⁹⁾。リンは試験管に試料溶液2mlをとり、水6mlを加え、バナドモリブデン酸試薬2mlを加えて、よく振り混ぜ、15分以上放置してから、分光光度計で400nmの吸光度を測定して定量した。

3. 結果及び考察

3.1 乾式灰化後のアルミニウム箔カップの状態

Orchard Leaves、Citrus Leaves のような果樹葉では、試料は良くやけていて、灰はさらさらの状態で容器の表面に変化は認められなかった。これは、カルシウムが極めて多いためと考えられる。一方、Wheat Flour、Rice Flour では、容器表面はひどく収縮していた。これらの試料はアルカリ、アルカリ土類元素に比べてリンが多く、灰化によって生成したリン酸のために灰が酸性となり、これがアルミニウム箔に影響を及ぼしたと考えられる。Oyster Tissue では、灰は容器表面に融着したようになっていたが、容器表面の変化はみられなかった。このように、灰の状態や容器表面の状態は異なっていたが、今回測定した元素はいずれも1%塩酸で洗うことによって溶液中に回収され、アルミニウム箔容器に吸着されたり、あるいは結合したりすることはなかった。

3.2 アルミニウム箔カップ中の灰を洗う液の検討

乾式灰化した後の灰をカップの底をガラス棒で突き破って落したあとに、カップの内壁面を洗う液として1%塩酸と水を検討した。

試料はOyster Tissue を用いた。いずれも洗液はホットプレート上で蒸発乾固させたあと、20%塩酸5mlを加えて蒸発乾固、110°C乾燥を行った。表 3-1に示すように、1%塩酸で洗った場合は、白金皿乾式灰化法による値および保証値とも良く一致した値となり、適当であると判断したが、水で洗った場合は、いずれの元素も回収率が低くなり、洗う液としては不適當であることがわかった。又、1%塩酸で容器を洗った場合の試料溶液中にアルミニウムが溶出されることが考えられたので、アセチレン—酸化二窒素の高温フレームを用いる原子吸光法でアルミニウムを測定したが、検出されなかった。アルミニウムの原子吸光法は感度が悪いので、厳密に「溶出しなかった」と結論できないが、たとえ溶出していても今回測定した元素については、定量に影響を及ぼしていないので問題はない。また、アルミニウム箔には鉄が約 0.4%含まれていることが分かったが、その溶出は認められなかった。

3.3 アルミニウム箔カップ乾式灰化法における20%塩酸処理の必要性の検討

乾式灰化した灰を20%塩酸で溶解後、蒸発乾固させる処理を行わないと、鉄の定量値が低くなるため、白金皿乾式灰化法では、20%塩酸処理を行っているが、アルミニウム箔カップ乾式灰化法では洗液を蒸発乾固させる過程を含むため、洗う液に1%塩酸を用いる時の20%塩酸処理の必要性を検討した。試料にWheat flour を用いて、①蒸発乾固を一切行わずに、灰を1%塩酸で洗って、そのまま定容とする、②1%塩酸洗液の蒸発乾固のみを行なう、③1%塩酸洗液の蒸発乾固と20%塩酸処理の両方を行なう、の3方法を検討した。②および③の検討には、他のSRM も用いた。表 3-2に示すように、

蒸発乾固を一切行わない①では、鉄およびマンガンの定量値が低くなった。しかし、その他の元素の定量値は良く一致した。②と③では(表3-2,3)、鉄はほぼ一致した値となったが、鉄含量の高いOrchard Leavesで、20%塩酸処理を省略した方法の定量値が若干低くなった。他の元素の定量値はよく一致した。

しかし、1%塩酸溶液の蒸発乾固の過程では、まず水の蒸発が起こり、ついで塩酸濃度が6.6Nとなってから水と塩酸の共沸が起こることから、20%塩酸による処理も必然的に行われていると考えられるので、20%塩酸添加—蒸発乾固の操作の必要性について、Orchard Leavesを用い、分析の平行試験点数を増やして再検討を行った。

白金皿乾式灰化法、アルミニウム箔カップ乾式灰化法ともに、5点平行分析を行い、から試験はいずれも2点ずつ行った。結果は、表3-4に示すように、鉄を含めて測定したすべての元素で、2方法間の分析値は極めて良く一致し、精度も高かった。また、分析値は保証値ともほぼ一致した。1回目のアルミニウム箔カップ乾式灰化法によるOrchard Leavesの鉄の分析値が、白金皿乾式灰化法による分析値よりも小さかった原因は明確ではないが、1回目は2点平行分析であったことから、再検討の結果の信頼性がより高いと考えられる。したがって、20%塩酸添加—蒸発乾固の処理はアルミニウム箔カップ乾式灰化法から省略できると判断した。

ナトリウムの定量に関しては、乾式灰化による試料溶液の調製の過程で、ガラス製のメスフラスコやコニカルビーカーを使用するため、これらの容器からのナトリウムの溶出があり、ナトリウム含量の小さい試料への適用は困難である。そのため、表3-1と3-3に、ナトリウム含量の大きいCitrus Leaves、Oyster Tissueの結果の

表 3-1 Comparison of pretreatment methods for 9 elements in NBS-SRM 1566 Oyster Tissue

Method of pretreatment	Na	K	Mg	Ca ($\mu\text{g/g}$, on dry basis)	Mn ($\mu\text{g/g}$, on dry basis)	Fe ($\mu\text{g/g}$, on dry basis)	Cu	Zn	P	
Certified value	5100 ± 300	9690 ± 50	1280 ± 90	1500 ± 200	17.5 ± 1.2	195 ± 34	63.0 ± 3.5	852 ± 14	(8100)	
Pt dish dry ashing ^{a)}	5027	9921	1271	1473	17.0	197	62.1	869	7622	
Al foil cup dry ashing ^{b)}	1% HCl ^{c)}	5037	10010	1270	1394	17.4	190	60.6	870	7765
	Water ^{c)}	3639	7594	1001	1285	14.8	171	49.2	741	—

a) Mean of duplicate analysis. b) Mean of triplicate analysis. c) Liquid with which inside of Al foil cup was washed. After washing solution was dried up on hot plate, 5 ml of 20% HCl was added and dried up.

表 3-2 Comparison of pretreatment methods for 6 elements in NBS-SRM 1567 Wheat Flour and 1568 Rice Flour

Sample	Method of pretreatment	K	Mg	Ca ($\mu\text{g/g}$, on dry basis)	Mn ($\mu\text{g/g}$, on dry basis)	Fe	Zn
Wheat Flour							
	Certified value	1360 \pm 40	—	190 \pm 10	8.5 \pm 0.5	18.3 \pm 1.0	10.6 \pm 1.0
	Pt dish dry ashing [†]	1301	396	199	8.4	18.3	10.8
	Al foil cup dry ashing						
	① 20% HCl treatment [†]	1238	368	190	8.1	17.3	10.4
	② 1% HCl treatment	1331	390	193	8.7	15.3	10.7
	③ no treatment [†]	1302	388	192	7.5	8.3	11.4
Rice Flour							
	Certified value	1120 \pm 20	—	140 \pm 20	20.1 \pm 0.4	8.7 \pm 0.6	19.4 \pm 1.0
	Pt dish dry ashing [†]	1093	479	154	20.1	8.6	19.5
	Al foil cup dry ashing						
	① 20% HCl treatment [†]	1120	472	149	20.4	7.9	18.6
	② 1% HCl treatment	1117	467	145	20.2	10.5	18.1

[†] Mean of duplicate analysis. ① Ash was washed with 1% HCl and made up to the volume; ② ash was washed with 1% HCl, then washing solution was dried up; ③ after ② treatment, 5 ml of 20% HCl was added and dried up.

表 3-3 Comparison of pretreatment methods for 9 elements in NBS-SRM 1571 Orchard Leaves and 1572 Citrus Leaves

Sample	Method of pretreatment	Na	K	Mg	Ca ($\mu\text{g/g}$, on dry basis)	Mn ($\mu\text{g/g}$, on dry basis)	Fe	Cu	Zn	P
Orchard Leaves										
	Certified value		14700 \pm 300	6200 \pm 200	20900 \pm 300	91 \pm 4	300 \pm 20	12 \pm 1	25 \pm 3	2100 \pm 100
	Pt dish dry ashing†		15155	6236	19740	95.0	288	14.8	26.6	2015
	Al foil cup dry ashing									
	20% HCl treatment†		15045	5859	18898	92.8	288	13.3	24.0	1987
	1% HCl treatment†		15294	5819	19115	93.4	265	13.9	24.5	1984
Citrus Leaves										
	Certified value	160 \pm 20	18200 \pm 600	5800 \pm 300	31500 \pm 1000	23 \pm 2	90 \pm 10	16.5 \pm 1.0	29 \pm 2	1300 \pm 200
	Pt dish dry ashing†	173	17868	5929	30500	22.1	85.6	16.0	27.2	—
	Al foil cup dry ashing									
	20% HCl treatment†	168	17953	5654	30964	23.4	86.3	16.8	28.9	1337
	1% HCl treatment	172	17549	5618	30509	23.4	87.7	17.3	30.0	1319

† Mean of duplicate analysis

表 3-4 Comparison of pretreatment methods for 7 elements in NBS-SRM 1571 Orchard Leaves.

Method of pretreatment	K	Mg	Ca ($\mu\text{g/g}$, on dry basis)	Mn ($\mu\text{g/g}$, on dry basis)	Fe (%)	Cu (%)	Zn (%)
Certified value	14700 \pm 300	6200 \pm 200	20900 \pm 300	91 \pm 4	300 \pm 20	12 \pm 1	25 \pm 3
Pt dish	14364 \pm 145 ^{a)}	6097 \pm 104	19319 \pm 271	89.9 \pm 1.9	271 \pm 8.6	13.6 \pm 0.7	26.1 \pm 0.8
dry ashing	(1.01%) ^{b)}	(1.71%)	(1.40%)	(2.11%)	(3.18%)	(5.29%)	(3.07%)
Modified Al foil	14515 \pm 223	5955 \pm 75	19437 \pm 172	88.8 \pm 2.7	272 \pm 3.2	12.5 \pm 1.0	23.9 \pm 1.6
cup dry ashing	(1.54%)	(1.26%)	(0.88%)	(3.06%)	(1.18%)	(8.21%)	(6.74%)

a) Mean of quintuplicate analysis \pm standard deviation.

b) () : Relative standard deviation.

み記載した。又、Wheat Flour、Rice Flourの銅含量も小さいため、今回調製した試料溶液では、測定値の変動が大きく不正確であるので、表への記載は省略した。鈴木らは、石英皿を用いるハクサイの乾式灰化法において、銅の定量値が容器への固着のため低くなると考察しているが¹⁾、灰がアルカリ性になるOrchard Leaves、Citrus Leavesでも容器に白金皿あるいはアルミニウム箔カップを用いた今回の試験では、銅の定量値が低くなることはなかった。この違いは容器の材質によるものと考えられる。

3. 4 アルミニウム箔カップごと塩酸に溶解させる方法の予備検討

アルミニウム箔カップの内壁を1%塩酸で洗い、その洗液を蒸発乾固する過程は、神経を使い、又、時間がかかることから、灰をカップごと20%塩酸に溶解させることを考え、その予備検討として、アルミニウム箔に含まれる他元素含量を測定した。カップの成型に用いる円形アルミニウム箔の約1/4(約0.23g)をコニカルピーカーにとり、20%塩酸5mlを加えて、ホットプレート上で加熱溶解させたあと、蒸発乾固させ、さらに110°Cで乾燥後、蒸発残留物を1%塩酸で加熱溶解させ、メスフラスコに洗いこみ、定容とし、原子吸光法で定量した。結果($\mu\text{g/g}$ 、2回の試験の平均値)は、マンガン 33.5、鉄 4204、銅 35.3、亜鉛 19.3であった。このように、アルミニウム箔自体がかなりの鉄を含んでいるため、この方法は適用できなかった。

4. 要 約

円形のアルミニウム箔をカップ状に成形、二重にし、あらかじめ

600°Cで加熱処理したものを無機元素定量の前処理としての乾式灰化容器に用いることを、NBSのSRMであるWheat Flour、Rice Flour、Orchard Leaves、Citrus Leaves及びOyster Tissueを用いて検討した。550°Cで灰化後、内側カップを取りだし、漏斗上でカップの底をガラス棒で突き破って灰をコニカルピーカーに落とし、更にカップ内側を1%塩酸で洗った。洗液を家庭用ホットプレート上で蒸発乾固させてから、110°Cで乾燥し、蒸発残留物を1%塩酸で加温溶解して試料溶液を調製した。この試料溶液の原子吸光法によるカリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、マンガン、亜鉛、銅及びバナドモリブデン酸吸光光度法によるリンの定量値は、保証値および白金皿を用いる乾式灰化法による値と良く一致した。アルミニウム箔カップを用いる乾式灰化法は、容器自体が極めて安価に作成できるため、多数点の試料の前処理に極めて有効である。

5. 文 献

- 1) 鈴木妃佐子, 南 廣子, 安部公子, 平岩ひろみ, 内田哲男:
分析化学, 33, T 5 (1984).
- 2) 安井明美, 小泉英夫, 堤 忠一: 日本食品工業学会誌, 32,
226 (1985).
- 3) 堤 忠一: ふんせき, 1985, 814
- 4) 堤 忠一: "食品分析法", 日本食品工業学会食品分析法編
集委員会編, p.360(1982), (光琳).
- 5) 安井明美, 小泉英夫, 堤 忠一: 分析化学, 30, T 65(1981).

第四章 アルシン—原子吸光法によるヒ素定量のための湿式分解法の開発

1. はじめに

微量ヒ素の定量方法としては、試料分解液中のヒ素をアルシンに還元してから、アルゴン—水素フレーム中に導入して測定する原子吸光法が、感度、精度、正確さとも優れているといわれ、種々の試料に適用されて^{1)~5)}、良好な結果が報告されている。

試料の分解溶液を得る前処理方法としては、一般に湿式分解法あるいは乾式灰化法が用いられているが、食品の場合、乾式灰化法を用いている報告が多い^{7)~11)}。Leblanc らは¹¹⁾ 硫硝酸を用いる湿式分解法は測定値がばらつき、再現性が悪いと指摘している。著者らも、硫硝酸分解ではしばしば測定値が大きくばらつくことを経験した。

湿式分解法は、多量の試料の取り扱いが困難であること、使用する酸の不純物によってから試験値が高くなる可能性があることなどの短所が指摘されるが、乾式灰化法に比べて、装置が簡単なこと、分解時間が速いこと、目的元素の揮散と容器への吸着が少ないことなど多くの長所を持っているので、測定値の精度、正確さが向上すれば、食品への適用は有効と考えられる。

又、食品衛生法は特定食品において、試料10gを硫硝酸分解して確認限度試験を行い、試料中ヒ素0.2ppm以下のとき「検出せず」としている。このような微量の定量に際し(0.05~1.0)μgで定量的測定が可能なアルシン—原子吸光法によるなら、試料採取量は2.5gでも十分に遂行できるので、このような比較的少量の分解には湿式

分解法が有効と考えられる。

Martinieらは¹²⁾、硝酸-過塩素酸による分解では、分解液が透明となっても、有機物が残存していることを指摘している。これと同様のことが食品試料の硫硝酸分解においても起こり、測定値のばらつきの原因となっていると考えられたので、完全分解をはかるために、硝酸-硫酸-過塩素酸による分解方法の食品試料への適用性を検討した。

2. 実験方法

2. 1 試薬

試薬はすべて試薬特級を用い、又水はイオン交換樹脂を通したイオン交換水を用いた。

硝酸、硫酸及び過塩素酸は、それぞれ市販60%水溶液、市販95%水溶液、及び市販60%水溶液を用いた。

ヒ素(無機態)標準原液：三酸化ヒ素(As_2O_3) 0.100gを量り取り、20%水酸化ナトリウム溶液5mlを加えて溶かし、水約400mlを加え、リトマス試験紙により10%硫酸で中和し、更に10%硫酸10mlを加え、水で1000mlとした(三酸化ヒ素として100ppm)。

ヒ素(有機態)標準原液： p -アルサルニル酸($NH_2 \cdot C_6H_4 \cdot AsO(OH)_2$) 0.145gを量り取り、20%炭酸ナトリウム溶液10mlを加えて溶かし、水を加えた後、10%硫酸10mlを加えて、中和、酸性化を行い、水で500mlとした(ヒ素として100ppm)。

以上の標準原液は、使用時に5mlを採り、10%硫酸10mlを加えた後、水で500mlに希釈して用いた。

塩化スズ(II)塩酸溶液(20w/v%)：塩化スズ(II) ($SnCl_2$

H₂O) 20gを濃塩酸に溶かし100mlとした。

ヨウ化カリウム溶液(20w/v%) : ヨウ化カリウム(KI) 20gを
水に溶かして100mlとし、かつ色びんに貯えた。

亜鉛末錠剤 : バインダー配合亜鉛末(日本ジャーレルアッシュ社
製) 25gに水4mlを加えて、ペースト状にする。このペーストをア
ルミニウム製の成型板に詰め、80°Cで乾燥する。錠剤1個の重量は
約0.9gである。

希釈酸液 : 濃塩酸を4倍に希釈して3N塩酸とした。

2. 2 装置

原子吸光分析装置 : 日本ジャーレルアッシュ社製AA-781型を使
用した。バーナーは水冷式10cmスリットバーナーを用い、アルゴン
-水素フレームを使用した。光源は浜松ホトニクス社製ヒ素中空陰
極ランプを使用した。

アルシンの発生・捕集装置 : 日本ジャーレルアッシュ社製微量ヒ
素測定付属装置ASD-1A型を使用した。

記録計 : 柳本製作所製YR-110型

ホットプレート : 電熱式、1.5kW、電源3段切り替え。市販ケ
イ砂を水で洗浄後、乾燥させたものを敷いて使用した。

無ヒ素ホウケイ酸ガラス器具 : 容量100mlのバイレックスビーカ
ー及びバイレックス時計ざらを使用した。

本装置による測定条件を表4-1に示した。

3. 結果及び考察

3. 1 定量操作

アルシンを一定量捕集した後、アルゴン-水素フレームに導入し

て原子吸光測定する場合の基礎的諸条件については、山本ら²⁾、片桐ら¹⁾、及び江波戸ら¹³⁾が詳細な検討結果を報告している。これらの報告を参考にし、又、後述の定量条件の検討結果に基づき、定量操作を次のように定めた。

内容積100mlのガラス反応そう（日本ジャーレルアッシュ社製）に、三酸化ヒ素として1 μg 以下を含むように、試料分解溶液（1～25）mlを採り、これに希釈酸液（3 N塩酸）を加え、合せて25mlにする。20%ヨウ化カリウム溶液1ml、20%塩化スズ(II)塩酸溶液0.5mlを加えてよく混和し、約15分間放置する。次いで反応そうを微量ヒ素測定付属装置内に置き、亜鉛末錠剤1個を加えて、すばやくインピージャーを降ろして、反応そうをアルシンの捕集容器に連結する。次いで、マグネチックスターラーでかき混ぜてアルシingasを発生させる。捕集容器内のガス圧力が0.5kg/cm²となったところで、捕集したアルシingasを補助アルゴンガスでアルゴン-水素フレーム中に導入する。このとき同時に記録計を作動させて、ヒ素の原子吸光値を測定する。別に、試薬から試験溶液について、同様に測定してから試験値を差し引き、検量線から試料中のヒ素量を求める。

3. 2 湿式分解による試料溶液の調製方法

(1) 硝酸-硫酸-過塩素酸分解法

試料分解操作は、後述の分解条件の検討結果に基づき、次のように定めた。

食品試料 { (0.25～2.5) g乾物 } をビーカーに採り、硝酸10mlを加えてよく混和した後、時計ざらでふたをし、ホットプレート上で穏やかに加熱する { 外温 (170～220) °C }。激しい反応が終わった

ら、ホットプレートより降ろして冷却後、硝酸3ml、硫酸2.5ml、過塩素酸5mlを加えて、再びホットプレート上で強熱{ (300~380) °C}。もし分解液が黒化しはじめたら、直ちにホットプレートから降ろして少量の硝酸を追加する。分解液が透明又は淡黄色となり、もはや黒化しなくなったら時計ざらを外し、分解液が1ml以下になるまで濃縮する。冷却後、希釈酸液(3N塩酸)でメスフラスコに洗い込み、25mlあるいは50ml定容とし、この一部を使ってアルシン-原子吸光測定を行う。

(2) 硫硝酸分解法¹⁷⁾

3. 2(1)の分解法から過塩素酸の使用を除くのみで、後の操作は、3. 2(1)に準拠する。ただし、分解液を濃縮する前に、硫酸の白煙が出た後ホットプレートより降ろして冷却し、測定時の窒素酸化物による干渉を除去するために飽和シュウ酸アンモニウム水溶液10mlを加えて再分解を行う操作を追加する。

3. 3 希釈液の検討

片桐らは¹⁾、希釈酸液として1.8N硫酸-2.4N塩酸を用いているが、操作の簡便性と硫酸による器具の汚染を防ぐために、塩酸のみを使うことを検討した。すなわち三酸化ヒ素0.3 μ gを反応そうに採り、希釈酸液として1.8N硫酸-2.4N塩酸あるいは3N塩酸25mlを加えた後、3. 1の定量法に準拠して測定したところ、両者のピーク高には有意差がなかったので、3N塩酸を使用することにした。

3. 4 試料分解液の中和の必要性の検討

従来のヒ素の測定法であるグツツァイト法、モリブデンブルー法などは、一定時間アルシンを発生させることが基本となって組み立てられていたため、試料分解液の酸度は一定にしなければならな

った。そのため、分解後に、アンモニア水で中和する必要があった。しかし本実験に用いた装置は、アルシンを発生したガスの圧力を指標として貯留したうえで、フレームに導入する方式を採っているので、中和の必要はないと考えられた。又、中和によって生成する硫酸アンモニウムは、ガスの発生を抑えて所定圧到達時間を長くする欠点があった。そこで、分解液中の硫酸の残量範囲を想定して、中和の必要性を検討したところ、表 4-2に示すように、測定容器中に硫酸は2mlまでの存在なら、所定圧到達時間が短縮されるだけで、測定値には影響を及ぼさないことが分かったので中和の操作は省略することにした。

3. 5 硝酸、硫酸、および過塩素酸の使用量の検討

湿式分解時の酸使用量については、従来かなりの報告があるが¹⁴⁾¹⁸⁾、一般的な方法として、食品衛生法注解の硫硝酸分解法では¹⁷⁾、乾物試料(5~10g)に対し、水20ml、硝酸(30~40)mlで最初穏やかに分解した後、硫酸10mlを加え、硝酸を追加しながら再加熱している。これを試料2.5g当りに縮小し、最初の予備分解に要する硝酸量を10mlに固定したうえで、硫酸と過塩素酸の量を検討した。表 4-3に示したように、硫酸量は2.5mlで十分であり、過塩素酸量はAOC法(分解液が硫硝酸分解によって黒化しなくなってから、70%過塩素酸0.5mlずつを3回追加して分解)¹⁹⁾などに比べて、やや多量を添加しているが、硝酸の追加操作を減らし、かつ脂質含量が高い試料の場合に効率的に分解するためには、5mlが適当と考えられた。

3. 6 硝酸-硫酸-過塩素酸分解法におけるシウ酸アンモニウム添加の必要性の検討

表 4-1 Working conditions for atomic absorption spectrophotometry

Wavelength	193.7 nm
Lamp current	10 mA
Slit width	75 μ m
Height of light beam above burner	8 mm
Flame	{Ar flow†
	{H ₂ flow††
Auxiliary Ar flow	5 l/min

† Oxidant flow meter; †† Fuel flow meter

表 4-2 Effect of residual H₂SO₄ on arsine generation

As ₂ O ₃ added (μ g)	H ₂ SO ₄ added (ml)	Peak height† (mm)	Reaction time†† (s)
0.3	0	59.22(a)†††	33
0.3	1	61.58(a)	23
0.3	2	58.94(a)	18
0.3	4	46.92(b)	9

† Mean of 3 analyses; †† Time till gas pressure reaches 0.5 kg/cm²; ††† Not significant at 5% error between same letters

表 4-3 Volume of acids required to accomplish decomposition

Sample	Volume used (ml)			As†† found (ppm)	Time††† (min)
	HNO ₃	H ₂ SO ₄	HClO ₄		
Brown rice†	10+3+2+1	2.5	1.0	0.14	130
	10+3+2	2.5	2.5	0.15	125
rice†	10+3	2.5	5.0	0.15	128
	10+3	5.0	5.0	0.15	140

Taken sample 2.5g; † Passed 30 mesh screen after milling;

†† Mean of 3 analyses; ††† Time to accomplish decomposition

従来用いられている硫酸分解法では、3.2(2)に記述したように、飽和シュウ酸アンモニウム水溶液を加えて再分解を行う操作があるが、この操作が硝酸-硫酸-過塩素酸分解法においても必要かどうかを検討した。すなわち、玄米を粉碎して30メッシュを通過させたものを試料とし、3.2(1)の分解操作に準拠して分解したものと、3.2(1)の分解操作における分解液の濃縮の前に、硫酸の白煙が出たところで飽和シュウ酸アンモニウム水溶液10mlを加えて再分解を行ったものとを比較したところ、両者の測定値には有意差は見られなかった。硫酸の残量が1ml以下になるまで濃縮するなら、その過程で窒素酸化物は完全に追い出されると考えられた。これによって、シュウ酸アンモニウムを添加し再分解する操作は必要ないことが分かった。

3.7 硝酸-硫酸-過塩素酸分解法と硫硝酸分解法の比較検討

玄米を粉碎して30メッシュを通過させたものについて、両法による分解を行って比較した。表4-4に示すように、硝酸-硫酸-過塩素酸分解法は、RSDが5.2%と精度として満足できるものであった。しかし、硫硝酸分解法は測定値が大きくなばらつきを示し、平均値も低い値であり、かつ、分解時に硝酸を数回に分けて追加する必要がある。これにより、硝酸-硫酸-過塩素酸分解法のほうが、精度、正確さ、操作性の点で優れていることが分かった。

3.8 加熱温度の検討

硝酸-硫酸-過塩素酸分解法による分解操作を、硝酸のみでの分解(第1期)と硫酸、過塩素酸を加えてからの分解(第2期)に分けて、第2期における加熱温度の効果を調べたところ、表4-5に示すように第2期において強熱しても、ヒ素の揮散は観察されず、又

分解所要時間が約半分に短縮されて迅速化できることが分かった。

4. 食品試料中のヒ素の定量

4. 1 硝酸-硫酸-過塩素酸分解法における標準添加回収試験

この分解法に対する食品のマトリックスによる影響及び添加するヒ素の形態による影響を検討するために、各種食品についてヒ素の添加回収試験を行った。ヒ素は無機態のヒ素として三酸化ヒ素、有機態のヒ素として *p*-アルサニル酸を添加した。

玄米、小麦（以上二つは粉碎して30メッシュを通過させたもの）、きなこ、トマトピューレ、鶏卵及びマグロ水煮（ホモジナイズ後、凍結乾燥したもの）の各試料について、三酸化ヒ素あるいは *p*-アルサニル酸を標準添加し、3.2(1)に準拠して分解を行った。表4-6に示した試料量のとき、脂質の多いきなこで(3~4) mlの硝酸を追加する必要がある、1g当たりの硝酸必要量は(8~9) mlであった。その他の試料では硝酸を追加する必要はなく、乾物試料1g当たりの硝酸必要量は、およそ(5~6) mlと考えられた。この分解液を原子吸光測定した結果は表4-6に示すように、回収率(93~105)%と満足できるものであり、食品のマトリックスによる影響は認められなかった。又、添加ヒ素の形態による差も認められず、この分解法は全ヒ素測定のための前処理法として有効と考えられた。

4. 2 硝酸-硫酸-過塩素酸分解法の高濃度食塩含有食品への適用

高濃度食塩含有食品への適用を想定し、小麦を粉碎して30メッシュを通過させたもの2.0gに三酸化ヒ素 4.0 μ gを標準添加し、(0.1~1.0) gの塩化ナトリウムを添加した合成試料について、3.2(1)

表 4-4 Comparison of HNO_3 - H_2SO_4 - HClO_4 and HNO_3 - H_2SO_4 decomposition method

Sample	Method	Consumed volume of acids (ml)	As found†† (ppm)	R. S. D. (%)	
Brown rice†	{	HNO_3	13	0.14	5.2
		H_2SO_4	2.3		
	{	HClO_4	3	0.10	27.3
		HNO_3	20-23		
	{	H_2SO_4	2.3		

Taken sample: 2.5 g; † Passed 30 mesh screen after milling;

†† Mean of 6 analyses

表 4-5 Effect of temperature on decomposition

Sample	Temp. and required time		As found†† (ppm)	R. S. D. (%)
	1st step	2nd step		
Brown rice†	(170-220)°C 0.5 h	(170-220)°C (4-3)h	0.14(a)	12.6
	(170-220)°C 0.5 h	(300-380)°C (1-1.5)h	0.15(b)	8.8

Taken sample: 2.5 g; † Passed 30 mesh screen after milling;

†† Mean of 13(a), 11(b) analyses

表 4-6 Recovery of arsenic in various foods

Sample	Taken (g)	As added (µg)	Volume of sample solution (ml)	As found††† (µg)	Recovery (%)
Brown rice†	2.50	0	25	0.070	—
	(2.00)	(0)	(25)	(0.037)	(—)
	2.50	0.76	25	0.224(a)	101
	2.50	1.32	25	0.365(a)	97
	2.00	3.03	25	0.653(a)	98
Whole wheat†	2.00	0	25	N. D. (a)	—
	2.00	1.32	25	0.309(a)	102
Roasted flour of soybean	2.00	0	25	0.586(a)	97
	2.00	0	25	N. D. (a)	—
Tomato puree	2.00	1.32	25	0.218(a)	105
	2.00	3.03	25	0.579(a)	96
Hen's egg	2.00	0	25	0.005(a)	—
	2.00	3.03	25	0.299(a)	99
Boiled tuna††	2.00	0	25	0.008(a)	—
	2.00	0	25	0.214(a)	101
Brown rice†	0.50	0	50	0.119(b)	—
	0.50	1.32	50	0.274(b)	102
	0.50	3.03	50	0.401(b)	95
	0.50	6.06	50	0.689(b)	91
	0.50	0	25	0.037	—
Hen's egg	2.00	0	25	0.443(a)	97
	2.00	2.0	25	0.329(a)	95
Hen's egg	2.00	0	25	0.000(a)	—
	2.00	2.0	25	0.490(a)	98

N. D.: Not detected; † Passed 30 mesh screen after milling;

†† Lyophilized after homogenizing; ††† Mean of 3(a), or

2(b) analyses, measured 3 ml aliquots in sample decomposed solution

表 4-7 Analysis of NBS standard reference material

Sample	Taken (mg)	As found†† (μg)	As content (ppm)†††	Certified value (ppm)
Orchard leaves† (SRM 1571)	254.3	0.54	10.82±0.25	10±1
	216.4	0.54		
	246.3	0.54		
	217.3	0.51		
	254.4	0.55		

† Drying at 90°C for 24 h; †† Measured 5 ml aliquots in 25 ml sample decomposed solution; ††† Mean and standard deviation based on 5 analyses

表 4-8 Precision through decomposition by the proposed method to measurement by atomic absorption spectrophotometry

Sample	Date††	As found (μg)				S. D.	R. S. D. (%)
		max.	min.	range	mean		
Banitof	1st day(a)	0.36	0.33	0.03	0.343	0.016	
	2nd day(a)	0.36	0.35	0.01	0.351	0.005	
	3rd day(b)	0.36	0.34	0.02	0.350	0.008	
	total	0.36	0.33	0.03	0.349	0.010	2.7

† Taken sample : 2.5 g (fresh weight); †† Triplicate(a) or quintuplicate(b) on 3 different days; ††† Measured 5 ml aliquots in 50 ml of sample decomposed solution

表 4-9 Precision on measurement by atomic absorption spectrophotometry

Sample	Date††	As found (μg)				S. D.	R. S. D. (%)
		max.	min.	range	mean		
Brown rice†	1st day	0.25	0.19	0.06	0.212	0.023	
	2nd day	0.24	0.21	0.03	0.223	0.014	
	3rd day	0.23	0.20	0.03	0.218	0.011	
	total	0.25	0.19	0.06	0.218	0.017	7.5

† As₂O₃ was added; †† Quintuplicate on 3 different days; ††† Measured 5 ml aliquots in combined sample decomposed solution

に準拠して分解を行ったところ、ヒ素の回収率は(95~104)%であり、高濃度食塩(塩化ナトリウム含量50%まで)共存の影響は認められなかった。

4.3 NBS標準試料への適用

湿式分解法とアルシン-原子吸光法の正確さを調べるために、SRM 1571のOrchard Leavesについて、5点平行で3.2(1)に準拠して分解し測定した。結果は表4-7に示すように、保証値と極めてよく一致しており、正確にヒ素の定量ができることが分かった。

4.4 同一試料を用いての硝酸-硫酸-過塩素酸による分解操作及び原子吸光測定操作を通じての再現性試験

生かつおのホモジナイズ試料を用い、分解及び測定を通じて再現性を検討した。3点あるいは5点平行分析を相異なる日に3回繰り返して行った。表4-8に示すように、全体でのRSD%は2.7%、標準偏差は0.010であった。これは表4-9に示した同一試料分解液を用いて行った原子吸光測定操作のみの再現性試験(5点平行測定で相異なる日に3回繰り返した)の標準偏差が0.017であることを考えると、硝酸-硫酸-過塩素酸による分解操作そのものの再現性は極めて良いことを示していた。

5. 要約

食品中の微量ヒ素をアルシン-原子吸光法によって測定するため、試料溶液の調製方法として、硝酸-硫酸-過塩素酸による湿式分解法の適用性を検討した。硝酸と硫酸に過塩素酸を加えることで、有機物の完全分解が可能となり、測定値の正確さ、精度及び再現性を向上させることができた。又、窒素酸化物除去の目的でシュウ酸

アンモニウムを添加して再分解する操作及び分解液の中和の操作を省略し、分解後期に加熱温度を上げることで分解が迅速化できた。各種食品についての無機態あるいは有機態ヒ素の標準添加、分解次いで測定による回収試験は、回収率(93~105)%と満足できる結果であり、本分解法に対する食品のマトリックス及び添加ヒ素の形態による影響は認められなかった。分解・測定を通じての精度は、RSD%で三酸化ヒ素0.1 μ gで(5~8)%、0.3 μ gで(3~6)%、0.4 μ gで(1~4)%であった。NBSの標準試料であるOrchard Leavesを本分解法で分解したものの測定値は、保証値と極めてよく一致し、正確さも満足できるものであった。又、高濃度食塩含有食品についても、本分解法は適用でき、ほとんどの食品への適用が可能と考えられた。

5. 文 献

- 1) 片桐義博, 河合 信, 館 正知: 産業医学, 15, 67(1973).
- 2) 山本勇麓, 熊丸尚宏, 林 康久, 鎌田俊彦: 分析化学, 22, 876(1973).
- 3) 中村 靖, 永井 博, 窪田大四郎, 姫野俊治: 分析化学, 22, 1543 (1973).
- 4) 寺島 滋: 分析化学, 23, 1331(1974).
- 5) 辻野隆三, 山本秀彦, 上田貞夫, 須藤 徹, 沢崎陽次: 分析化学, 23, 1378(1974).
- 6) 見城尚義, 阿蘇谷洋子, 野田勝彦, 高橋 強: 食品衛生学雑誌, 17, 204(1976).
- 7) J.I.Morrison: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 44, 740

(1961).

- 8) J.L.Morrison, G.M.George : J. Assoc. Off. Anal. Chem.,
52,930(1969).
- 9) L.R.Stone : J. Assoc. Off. Anal. Chem.,50, 1361(1967).
- 10) H.K.Hundley, J.C.Underwood : J. Assoc. Off. Anal. Chem.,
53,1176(1970).
- 11) P.J.Lebanc, A.L.Jackson : J. Assoc. Off. Anal. Chem.,
56,383(1973).
- 12) G.D.Martinie, A.A.Schilt : Anal. Chem., 48, 70(1976).
- 13) 江波戸拳秀, 天川映子, 山野辺秀夫, 鈴木助治, 戸谷哲也 :
食品衛生学雑誌, 15, 469(1974).
- 14) 久保彰治 : 分析化学, 11, 864(1962).
- 15) Analytical Methods Commitee : Analyst, 85, 643(1960).
- 16) A O A C : "Official Methods of Analysis", 12th Ed.,
p.429 (1975),(Washington,D. C.).
- 17) 日本薬学会編 : " 衛生試験法注解", p.273(1973), (金原
出版) .
- 18) J.A.Fiorino, J.W.Jones, S.G.Gaper : Anal. Chem., 48,120
(1976).

第五章 原子吸光法による金属元素定量のための塩酸抽出法の開発

1. はじめに

原子吸光法による金属元素定量のための試料の前処理法としては、一般に乾式灰化法あるいは湿式分解法が用いられている。これらの方法は有機物を分解することによって、測定対象元素を試料のマトリックスから分離する方法であるが、元素によっては抽出のみでマトリックスから分離できるものもある。抽出による前処理法が適用できれば、操作が簡便化され前処理時間の大幅な短縮を可能にする。

Baker らは、植物組織中のカルシウム、マグネシウム、カリウム、マンガン、銅および亜鉛の測定の前処理法として、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液抽出法を用いて測定した値が乾式灰化法を用いて測定した値とよく一致する結果を与えたと報告している¹⁾。キレート剤の代りに酸を使えば、より簡便な方法にすることができる。

著者らは、すでに植物性食品中のナトリウムおよびカリウムの原子吸光法による定量のための前処理法として1%塩酸抽出法を検討し、ほとんどすべての植物性食品に適用できること、又、玄米および野菜類についてはナトリウム、カリウムのほかにマグネシウムの定量にも適用できることを明らかにした²⁾。そして、四訂日本食品標準成分表に収載されたナトリウムおよびカリウムの測定には、1%塩酸抽出法が全面的に用いられた。しかし、他のアルカリ土類金属および重金属元素については検討していなかった。

鈴木らは、ハクサイ (湿物) および Tomato Leaves (NBS SRM 1

577) 中のナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、銅、マンガン及び亜鉛の定量の前処理法として2%塩酸加温抽出法を乾式灰化法、湿式分解法および密閉容器分解法と比較検討し、実用上推奨できる方法であるとしている³⁾。

著者らは、塩酸抽出法の適用性をより明確にするために、穀類試料としてアメリカ合衆国国立標準化局(NBS)の標準試料である Wheat Flour (SRM 1567)と Rice Flour (SRM 1568)、果樹葉試料として Citrus Leaves (SRM 1572) および標準試料以外の試料としてきりたんぼと各種海藻類を用い、これらの試料中のナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、マンガン、鉄、銅及び亜鉛の定量について、1%あるいは3%塩酸抽出法を乾式灰化法および湿式分解法と比較検討した。

2. 実験方法

2.1 装置および器具

原子吸光分光光度計：日本ジャーレルアッシュ社製AA-781型を用いた。バーナーは水冷式10cmスリットバーナー(SA-62)をアセチレン(1.5 l/m) - 空気(6.5 l/m) フレームで用いた。光源は浜松トホクス社製ホローカソードランプのナトリウム用(L23-11NB、589.0nm)、カリウム用(L233-19NB、766.5nm)、マグネシウム用(L233-12NU、285.2nm)、カルシウム用(L233-20NU、422.7nm)、マンガン用(L233-25NU、279.5nm)、鉄用(L233-26NU、248.3nm)、銅用(L233-30NQ、213.9nm)をそれぞれの波長で用いた。ビームはバーナーヘッド上8mmを通した。

電気炉：自動温度制御装置付きの大きさ25×35×15cm、上限温度

1200°C、電気容量5kWのものを用いた。

ホットプレート：電源3段切り換え、電気容量1.5kWのものに、市販けい砂を水で洗浄後乾燥させたものを敷いて使用した。

ガラス器具：ホウケイ酸ガラス製のものを一晚以上1：1塩酸に浸漬しておき水洗後風乾して用いた。

ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶：一晚以上1：1塩酸に浸漬しておき水洗後風乾して用いた。

2.2 試薬および標準溶液

1%および3%塩酸は、精密分析用20%塩酸（和光純薬製）を水で、それぞれ20倍および6.7倍に希釈した。硝酸、硫酸および過塩素酸は、それぞれ試薬特級の市販60%水溶液、市販95%水溶液および市販60%水溶液を用いた。

水はイオン交換処理した水を逆浸透膜（Milli-R0、ミリポア製）を通し、さらに活性炭-イオン交換樹脂-マイクロフィルター（0.45μm）（SuperQシステム、ミリポア製）を順次通したものを用いた。

標準溶液：ナトリウムおよびカリウムはそれぞれの塩化物、カルシウムは炭酸塩、マグネシウムはマグネシウムリボン、マンガンは過マンガン酸カリウム、鉄、銅及び亜鉛はそれぞれの金属を用い、1%あるいは3%塩酸で1000ppmの保存溶液を調製した。測定にあたっては、これらの保存溶液を適宜希釈して用いた。

ランタン溶液：塩化ランタン溶液（関東化学製、原子吸光分析用）、ランタンとして（10±0.3）w/v%。

2.3 試料

(1) 穀類

標準試料：NBSのWheat Flour (SRM 1567) および Rice Flour

(SRM 1568)を用いた。乾重量は85°C、24時間の常圧通風加熱乾燥法で求めた。

きりたんぼ：コメの加工品である「きりたんぼ」（1本約60g）の約1/4を切りとり、約8mm角にステンレス製包丁で切断後、アルミニウム箔カップに採取し、135°Cで3時間常圧通風加熱乾燥後、磁製乳鉢中で粉碎して均質化試料とした。乾重量は135°C、3時間の常圧通風加熱乾燥法で求めた。

(2) 果樹葉（標準試料）

NBSのCitrus Leaves (SRM 1572)を用いた。乾重量は85°C、2時間の常圧通風加熱乾燥法で求めた。

(3) 海藻類

アオサ、アラメ、ナガコンブ、マコンブ、ミツイシコンブ及びホソメコンブ：いずれも風乾物で入手したものを105°Cで一晩常圧通風加熱乾燥後、磁製乳鉢中で粉碎し、42メッシュのサラン網製の篩を通過させて分析用の均質化試料とした。乾重量は105°C、2時間の常圧通風加熱乾燥法で求めた。

2.4 試料溶液の調製

(1) 塩酸抽出法

標準試料は約0.5～1g、きりたんぼは1～2g、海藻類試料は0.5～2gを容量100mlのポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に採取し、穀類試料では1%塩酸50～100ml、果樹葉試料では1%あるいは3%塩酸50～100ml、海藻類試料では1%あるいは3%塩酸30～100mlを加えてふたをし、時々振り混ぜながら、約1～2時間放置した後、その上澄み液を採取するかあるいはJIS6種の濾紙で濾過し、初めの濾液10～20mlは濾紙からのナトリウム汚染があるので捨て、

その後の濾液を採取し、1%あるいは3%塩酸抽出試料溶液とした。

(2) 乾式灰化法

標準試料は約1~2g、きりたんぼは約1g、海藻試料は約5g
(ミツイシコンブ及びホソメコンブは約1g)を白金皿に採取し、
電気炉で常温から50~70°C/時間で550°Cまで上昇させ、550°Cに数
時間保って灰化した。灰化試料に炭素が残っている場合は、少量の
水を加えホウケイ酸ガラス棒で固まりをつきくずし、乾燥後電気炉
で再灰化した。灰化後とり出し、灰が飛ばないように白金皿をホウ
ケイ酸ガラス製時計皿で覆いながら、灰に20%精密分析用塩酸約5
~10mlを加え、家庭用ホットプレート上で加温溶解させた。ケイ酸
分離を行なうために、時計皿を外して蒸発乾固させ、さらに乾燥器
中で110°Cで1時間加熱した。冷却後、灰に1%ないし3%塩酸を
加え、家庭用ホットプレート上で加温溶解し、1%ないし3%塩酸
で濾紙を通してメスフラスコに洗い込み、定容として乾式灰化試料
溶液とした。

(3) 湿式分解法

海藻類試料にのみ適用した。試料約0.5gを容量100mlのホウケイ
酸ガラスビーカーに採取し、濃硝酸10ml、濃硫酸1mlおよび60%過
塩素酸2mlの混酸で、ホウケイ酸ガラス製時計皿でふたをし、ホッ
トプレート(380°C)上で加熱分解した。溶液が透明もしくは淡黄
色となったのちふたを外し、硫酸の白煙が生じるまで蒸発濃縮させ
た。冷却後、3%塩酸でメスフラスコに洗い込み定容とし、湿式分
解試料溶液とした。

2.5 原子吸光法による測定

2.4で得た試料溶液中のナトリウム、カリウム、マンガン、鉄、

銅及び亜鉛は適宜1%あるいは3%塩酸で希釈したのち直接噴霧原子吸光法で定量した。マグネシウムは直接噴霧法あるいはランタン添加法(測定溶液中のランタン濃度; 1%)、カルシウムは直接噴霧法およびランタン添加法(測定溶液中のランタン濃度; 1%)あるいはストロンチウム添加シュウ酸塩共沈分別-原子吸光法を用いた⁴⁾⁵⁾。

3. 結果及び考察

各試料中のナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、マンガン、鉄、銅及び亜鉛の測定結果を、穀類および果樹葉試料については表 5-1及び 5-2に、海藻類試料については表 5-3及び 5-4に示した。以下に各元素への適用性について考察する。

3. 1 ナトリウム

穀類の標準試料では、前処理に乾式灰化法を用いた測定値が保証値よりもかなり高くなった。ここでの乾式灰化法は白金皿を用いているが、20%塩酸処理のあと1%塩酸で加温溶解させてホウケイ酸ガラス製メスフラスコに濾紙を通して洗い込む操作があったため、濾紙およびガラスからのナトリウムの溶出による混入汚染があったと考えられる。この影響はナトリウム含有量が少ない場合には顕著であるが、含有量が Citrus Leavesのように多くなると無視することができた。湿式分解法もガラス容器からの混入汚染が考えられるが、海藻類はナトリウムが高含量であるため明瞭な影響は認められず乾式灰化での値とほぼ一致する値が得られた。塩酸抽出法は、穀類および果樹葉では1%塩酸50倍量以上を使用し1時間抽出で保証値とよく一致し、ナトリウム高含量の海藻類でも1%塩酸50倍量以

表 5-1 Comparison of pretreatment procedures for determination of metal elements in cereals and leaves ($\mu\text{g/g}$ on dry basis)

Element	Sample	Certified value	Dry ashing* ¹	HCl extraction**				
				Concn. of HCl (%)	$\times 25^{**}$	$\times 50$	$\times 100$	$\times 200$
Na	Wheat flour**	8.0 \pm 1.5	24.7	1		8.5		
	Rice flour**	6.0 \pm 1.5	21.4	1		6.3		
	<i>Kiritampo</i>	—		1			2015	
	Citrus leaves**	160 \pm 20	173	1		162	165	174
K	Wheat flour	1360 \pm 40	1305	1		1317		
	Rice flour	1120 \pm 20	1092	1		1135		
	<i>Kiritampo</i>	—	780	1	774		817	
	Citrus leaves	18200 \pm 600	18100	1		18400	18000	18300
				3			18400	18600
Mn	Wheat flour	8.5 \pm 0.5	8.4	1		8.8		
	Rice flour	20.1 \pm 0.4	20.1	1		20.9		
	<i>Kiritampo</i>	—	10.1	1	9.0		9.4	
	Citrus leaves	23 \pm 2	22.1	1		20.2	21.0	21.0
				3			20.2	20.5
Fe	Wheat flour	18.3 \pm 1.0	18.3	1		8.5		
	Rice flour	8.7 \pm 0.6	8.6	1		4.0		
	<i>Kiritampo</i>	—	3.1	1	1.7			
	Citrus leaves	90 \pm 10	85.6	1		33.0	40.2	43.3
				3			47.5	50.5
Cu	Wheat flour	2.0 \pm 0.3	2.0	1		1.7		
	Rice flour	2.2 \pm 0.3	2.8	1		1.6		
	Citrus leaves	16.5 \pm 1.0	16.0	1		12.6	14.5	16.8
				3			15.7	15.9
Zn	Wheat flour	10.6 \pm 1.0	10.8	1		11.3		
	Rice flour	19.4 \pm 1.0	19.5	1		20.5		
	<i>Kiritampo</i>	—	13.5	1	11.2		13.7	
	Citrus leaves	29 \pm 2	27.2	1		26.6	26.7	28.0
				3			29.4	29.8

Mean of duplicate analyses

*¹: Ashing for 5 to 8 hours at 550°C, **²: 1 hour extraction, **³: Multiple of used volume to sample weight, **⁴: NBS-SRM 1567, **⁵: NBS-SRM 1568, **⁶: NBS-SRM 1572

表 5-2 Comparison of pretreatment procedures for determination of magnesium and calcium in cereals and leaves ($\mu\text{g/g}$ on dry basis)

Element	Sample	Certified value	Dry ashing		HCl extraction									
			D**	La**	Concn of HCl (%)	$\times 25$		$\times 50$		$\times 100$		$\times 200$		
						D	La	D	La	D	La	D	La	
Mg	Wheat flour	—	396	391	1			387	394					
	Rice flour	—	479	479	1			451	454					
	<i>Kiritampo</i>	—	169	186	1	178	190			188				
	Citrus leaves	5800 \pm 300	4970	5480	1	3			5440	5430	5620	5720	5630	5550
													5720	5630
Ca	Wheat flour	190 \pm 10	128	199	1			135	205					
	Rice flour	140 \pm 20	93	154	1			99	150					
	<i>Kiritampo</i>	—	19.5	56.7	1	26.5	55.9			36.9				
	Citrus leaves	31500 \pm 1000	31200	30500	1	3			18500	17900	23300	23300	25700	25900
													31000	31100

** : Direct aspiration AAS, ** : La addition AAS (La concentration in determining solution is 1%).
The other experimental conditions were the same as Table 1.

表 5-3 Comparison of pretreatment procedures for determination of metal elements in marine alga ($\mu\text{g/g}$ on dry basis)

Element	Sample	Dry ashing* ¹	Wet digestion* ²	HCl extraction					
				Concn. of HCl (%)	$\times 15^{*3}$	$\times 50^{*4}$	$\times 100^{*4}$	$\times 200^{*5}$	
Na	<i>Aosa</i>	28 800	27 300	3	22 500		32 400	33 400	
	<i>Arame</i>	23 400	23 500	3	18 000		21 700		
	<i>Nagakonbu</i>	30 300	29 000	3	25 800		33 100	31 400	
	<i>Makonbu</i>	33 300	29 200	3				29 300	
	<i>Mitsuishikonbu</i>		29 500	31 700	1		30 000	30 300	32 200
					3		29 900	30 500	31 600
	<i>Hosomekonbu</i>		27 500	28 700	1		26 800	27 100	29 900
					3		26 700	27 100	28 100
K	<i>Aosa</i>	7 280	6 710	3	5 980		6 900		
	<i>Arame</i>	40 800	36 000	3	30 800		37 500		
	<i>Nagakonbu</i>	61 600	55 300	3	46 500		58 200	59 300	
	<i>Makonbu</i>	65 800	63 500	3				64 300	
	<i>Mitsuishikonbu</i>		34 800	37 600	1		35 100	34 700	36 500
					3		34 500	35 700	36 000
	<i>Hosomekonbu</i>		41 900	42 900	1		40 700	40 900	43 300
					3		39 800	40 800	40 300
Fe	<i>Aosa</i>	62		3	36				
	<i>Arame</i>	164		3	48		57		
	<i>Nagakonbu</i>	49		3	29				
	<i>Mitsuishikonbu</i>		64		1		20	22	24
					3		36	39	42
	<i>Hosomekonbu</i>		23		1		9	9	10
					3		12	12	13
	Mn	<i>Mitsuishikonbu</i>	2.8		1		2.8	2.9	2.5
				3		2.7	2.8	2.5	
<i>Hosomekonbu</i>		2.6		1		2.6	2.3	2.5	
				3		2.4	2.4	2.6	
Zn	<i>Arame</i>	7.6		3	6.3				
	<i>Nagakonbu</i>	11.0		3	5.8				
	<i>Mitsuishikonbu</i>	10.2		1		9.4	10.0	10.9	
				3		10.0	10.9	10.3	
	<i>Hosomekonbu</i>	7.2		1		7.2	6.9	7.2	
				3		7.3	7.8	8.2	
Cu	<i>Mitsuishikonbu</i>	2.3		1		0.6			
				3		1.1			
	<i>Hosomekonbu</i>	2.0		1		0.9			
				3		1.1			

Mean of duplicate analyses

*¹: Ashing for 5 to 8 hours at 550°C, *²: Digestion with the mixture of HNO₃, H₂SO₄ and HClO₄, *³: 2 hour extraction, *⁴: 1 hour extraction, *⁵: 3 hour extraction for *Aosa*, *Arame*, *Nagakonbu* and *Makonbu*, 1 hour extraction for *Mitsuishikonbu* and *Hosomekonbu*

表 5-4 Comparison of pretreatment procedures for determination of magnesium and calcium in marine alga ($\mu\text{g/g}$ on dry basis)

Element	Sample	Dry ashing				HCl extraction								
		D	*1		Wet digestion	Concn. of HCl (%)	×15		×50		×100		×200	
			Sr	co			La	D	La	D	La	D	La	D
Mg	<i>Aosa</i>	14 700			12 800	3	9 980			14 500			14 800	
	<i>Arame</i>	5 710			5 770	3	4 560			5 450				
	<i>Nagakonbu</i>	6 440			6 520	3	5 060			6 740			6 370	
	<i>Makonbu</i>	6 140			6 690	3							6 300	
	<i>Mitsuishikonbu</i>	6 300		6 100	6 040	1			6 510	6 010	6 320	6 280	6 590	6 400
						3			6 190	6 030	6 360	6 230	6 320	6 290
	<i>Hosomekonbu</i>	6 960		6 600	6 660	1			6 680	6 560	6 780	6 720	7 060	6 970
						3			6 700	6 510	6 650	6 750	6 740	6 960
	Ca	<i>Aosa</i>	10 800	11 200		8 950	3	7 350			10 500			11 200
		<i>Arame</i>	6 950	8 370		5 790	3	7 260			6 940			
<i>Nagakonbu</i>		4 550	5 320		3 900	3	5 060			5 150			5 210	
<i>Makonbu</i>		6 900	7 890		6 440	3							8 170	
<i>Mitsuishikonbu</i>		5 120		7 150	4 530	1			5 410	6 850	5 760	7 090	6 450	7 140
						3			5 390	7 090	5 900	7 210	6 040	6 790
<i>Hosomekonbu</i>		7 400		9 030	6 500	1			7 540	8 510	8 340	8 750	8 270	9 090
						3			7 630	9 010	8 330	8 840	9 080	8 820

*1: AAS determination after coprecipitation as oxalate with Sr and collection
The other experimental conditions were the same as Table 3.

上を使用し1時間抽出で乾式灰化での値とほぼ一致したことから、ナトリウムはこの条件で完全に抽出されたと考えられる。

3.2 カリウム

標準試料では乾式灰化法で保証値とよく一致する結果が、海藻類では乾式灰化法と湿式分解法でほぼ一致する結果が得られた。塩酸抽出法は、穀類および果樹葉では1%塩酸50倍量以上を使用し1時間抽出で保証値とよく一致し、カリウム高含量の海藻類でも1%塩酸50倍量以上を使用し1時間抽出で乾式灰化での値とほぼ一致したことから、カリウムはこの条件で完全に抽出されたと考えられる。

3.3 マグネシウム

穀類では乾式灰化試料溶液の直接噴霧法とランタン添加法はよく一致した値を与えた。Citrus Leavesでは乾式灰化試料溶液の直接噴霧法は保証値よりも低い値であったが、ランタン添加によって保証値とよく一致した。海藻類では乾式灰化法と湿式分解法でよく一致する結果が得られた。塩酸抽出法は、穀類および果樹葉では1%塩酸50倍量以上を使用し1時間抽出で乾式灰化での値あるいは保証値によく一致し、海藻類では1%塩酸50倍量以上を使用し1時間抽出で乾式灰化での値によく一致したことから、マグネシウムはこの条件で完全に抽出されたと考えられる。塩酸抽出試料溶液ではランタン添加の必要性はいずれの試料でも認められなかった。

3.4 カルシウム

穀類では、乾式灰化試料溶液、塩酸抽出試料溶液とも直接噴霧ではリン酸とマグネシウムの干渉で測定値が低くなるためランタン添加を行わなければならなかったが、果樹葉ではカルシウムがリンに比べてはるかに多いので、乾式灰化・塩酸抽出のいずれの試料もラ

ンタンを添加する必要はなかった。海藻類での湿式分解法は硫酸を用いているため、硫酸カルシウムの生成が起こり、測定値が乾式灰化での値よりも低くなった。塩酸抽出法は、穀類では1%塩酸50倍量以上を使用し1時間抽出で得た試料溶液にランタンを添加することで、保証値とよく一致する値を与えることから、カルシウムはこの条件で完全に抽出されたと考えられる。しかし、果樹葉のようにカルシウム含有量が多い場合には、1%塩酸では200倍量使用でも1時間では抽出不完全であり、3%塩酸100倍量以上を使用し1時間抽出で、保証値とよく一致する値を与えた。海藻類では1%塩酸50倍量以上を使用し1時間抽出で得た試料溶液にランタンを添加することで乾式灰化試料溶液にランタン添加して得た値とよく一致する値が得られた。

3.5 マンガン

乾式灰化では保証値とよく一致する値が得られた。塩酸抽出法では1%塩酸50倍量以上を使用し1時間抽出で保証値あるいは乾式灰化での値とよく一致する結果が得られ、この条件でマンガンは完全に抽出されたと考えられる。

3.6 鉄

標準試料では乾式灰化法を用いると保証値とよく一致する結果が得られたが、塩酸抽出法ではほとんどの試料で保証値あるいは乾式灰化での値よりもかなり低い値であった。Citrus Leaves についての3%塩酸抽出法でも1%塩酸抽出に比べて抽出率が若干増加する程度で、約60%しか抽出できなかった。抽出されない鉄は組織と強固に結合していると考えられる。

3.7 銅

濃縮操作を行わずに直接噴霧法で測定したために、含有量の少ない試料では正確さが悪くなっていると考えられるが、乾式灰化法では Rice Flour を除いて保証値とよく一致する値が得られた。塩酸抽出法は、Citrus Leavesでは、1%塩酸200倍量以上、3%塩酸100倍量以上を使用し1時間抽出で保証値とほぼ一致する値を与えることから、これらの条件で銅はほぼ完全に抽出されたと考えられる。Citrus Leaves 以外の試料への塩酸抽出法の適用については、含有量が少ないためにフレーム原子吸光法では定量値の正確さが悪いので、より高感度のファーンズ原子吸光法を用いての検討が必要である。

3.8 亜鉛

乾式灰化法では保証値とよく一致する値が得られた。塩酸抽出法では1%塩酸50倍量以上を使用し1時間抽出で保証値あるいは乾式灰化での値とよく一致する結果が得られ、この条件で亜鉛は完全に抽出されたと考えられる。

従来から前処理法として用いられている乾式灰化法はカリウム、マグネシウム、カルシウム、マンガン、鉄、銅及び亜鉛の定量においては正確な方法であることを確認した。ナトリウムは試料溶液調製過程でガラス容器を用いるとそれからの混入汚染があり、ナトリウム含有量の少ない試料には適用できなかった。また、湿式分解法はナトリウム、カリウム及びマグネシウムの定量において、乾式灰化での値と一致し、正確な方法であることを確認した。カルシウムの定量においては、硫酸を使用するため硫酸カルシウムの生成によって測定値が低くなり、適用できなかった。

塩酸抽出法は、元素の種類、試料中の元素含有量によって、使用する塩酸濃度、使用塩酸量、抽出時間を選択する必要があった。穀類および海藻類試料のナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、マンガン及び亜鉛については、1%塩酸50倍量以上を使用し1時間で完全抽出が行なわれた。銅は含有量が少ないために明確な結果は得られなかった。果樹葉試料のナトリウム、カリウム、マグネシウム、マンガン及び亜鉛については、1%塩酸50倍量以上を使用し1時間で完全抽出が行なわれたが、カルシウムは極めて高含量であったため、3%塩酸100倍量以上を使用し1時間抽出が必要であった。銅は1%塩酸で200倍量以上、3%塩酸では100倍量以上を使用し1時間でほぼ完全に抽出が行なわれた。カルシウムの測定において、穀類および海藻類試料の乾式灰化および塩酸抽出試料溶液の直接噴霧法ではリン酸、マグネシウムなどによる減感干渉をうけたので、干渉除去剤添加あるいはストロンチウム添加シュウ酸塩共沈の操作が必要であったが、果樹葉試料ではカルシウムがリンに比べて25倍とほかに多いために干渉は認められなかった。鉄は1%、3%塩酸のいずれでも抽出はきわめて不完全で、全鉄定量の前処理法としては適用できなかった。

果樹葉試料中のナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、マンガン、銅及び亜鉛の7元素について、穀類および海藻類試料中のナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、マンガン及び亜鉛の6元素について塩酸抽出法が適用できることがわかった。本法により多数点の試料について、経済的な負担を少なく、簡便かつ迅速に原子吸光測定するための前処理をすることが可能となる。

4. 要 約

原子吸光法によるナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、マンガン、鉄、銅及び亜鉛の定量のための前処理法として、塩酸抽出法の適用性を NBS の標準試料である穀類 (SRM 1567 の Wheat Flour 及び SRM 1568 の Rice Flour) と果樹葉 (SRM 1572 の Citrus Leaves)、コメ加工品の「きりたんぼ」および各種海藻類 (アオサ、アラメ、ナガコンブ、マコンブ、ミツイシコンブおよびホソメコンブ) の乾燥品を用いて乾式灰化法および湿式分解法と比較検討した。

試料をポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に量り取ってから、1%ないし3%塩酸の50倍から200倍量を加えて、時々振り混ぜながら抽出することで、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、マンガン、銅及び亜鉛はほぼ完全に抽出され、鉄を除いた7元素の定量に塩酸抽出法が適用できることが分かった。

塩酸抽出法は元素の種類、試料中の元素含有量によって使用する塩酸濃度、使用量、抽出時間を選択する必要があった。穀類および海藻類試料中のナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、マンガン及び亜鉛、果樹葉試料中のナトリウム、カリウム、マグネシウム、マンガン及び亜鉛は1%塩酸50倍量を使用して1時間で抽出され、果樹葉中の高含量カルシウムおよび銅は3%塩酸100倍量を使用して1時間で抽出された。

この方法によって多数点試料を廉価、簡便かつ迅速に前処理することができる。

5. 文 献

- 1) Baker, J.H. and Greweling, T. : J. Agr. Food Chem., 15, 340(1967).
- 2) 堤 忠一・小泉英夫・吉川誠次・森井ふじ・小林 純：食総研報, 34, 132(1979).
- 3) 鈴木妃佐子・南 廣子・安部公子・平岩ひろみ・内田哲男：分析化学, 33, T5(1984).
- 4) 安井明美・小泉英夫・堤 忠一：分析化学, 30, T65(1981).
- 5) 堤 忠一・栗田香澄・永原太郎：日本分析化学会第27年会(金沢)講演要旨集, p.471(1978).

第六章 原子吸光法によるカルシウム定量のための干渉除去剤添加法の改良

1. はじめに

食品中のカルシウムは人体にとって重要な栄養素元素であり、又品質の評価に当たっても主要な成分元素として、日常の測定頻度が高い。従って、できるだけ簡易迅速かつ正確な測定方法が要望される。

カルシウムの原子吸光法による測定は、アセチレン-空気フレームではリン酸との耐火性化合物の生成による干渉を抑制するために、カルシウムよりもリン酸との耐火性化合物を作りやすいランタンあるいはストロンチウムを高濃度で添加する方法¹⁾²⁾、又、マグネシウムを高濃度で添加する方法³⁾⁴⁾、そしてアセチレン-酸化二窒素フレームでは高温フレームであるために起こるカルシウムのイオン化を抑制するために、イオン化電位のより低いカリウムあるいはナトリウムを高濃度で添加する方法などが既に報告されている⁵⁾⁶⁾。食品試料のカルシウムの測定でも、その簡便さのためにアセチレン-空気フレームによる測定が適用され、扱う測定対象試料中のリン酸濃度に応じ、各種の干渉除去剤を種々の濃度で添加して用いるようである。しかし、正確な値の測定は煩雑でかつ時間がかかるにもかかわらず、カルシウムをシュウ酸塩として沈澱分別後、過マンガン酸カリウム溶液で滴定する方法が用いられている。それは干渉除去剤添加原子吸光法を多様な異なるマトリックスを持つ各種食品群に適用した際、それぞれのマトリックスに適合した添加量の限界が明確にされていないためであると考えられた。そこで、著者らはア

セチレン-空気フレイム及びアセチレン-酸化二窒素フレイムを用いて、カルシウムに対しリン酸濃度を変え、食品の主要な無機成分であるカリウム、マグネシウム及びナトリウムを加えて調製した合成マトリックスモデルに、干渉除去剤としての既知のランタン、ストロンチウム、マグネシウム、カリウムあるいはナトリウムを種々の濃度で加えてその干渉除去効果を検討した。その結果、マトリックスの異なる食品試料に対し、簡便なアセチレン-空気フレイムを用いた際の干渉除去剤の適正な添加量範囲を明らかにすることができた。

2. 実験方法

2.1 試薬

ランタン溶液：塩化ランタン-N/10塩酸溶液（和光純薬製、原子吸光分析用）、ランタンとして (10 ± 0.3) w/v%。

ストロンチウム溶液：塩化ストロンチウム-N/10塩酸溶液（関東化学製、原子吸光分析用、ストロンチウムとして10000ppm）あるいは塩化ストロンチウム六水和物（関東化学製、特級）30.429 gを1%塩酸に溶解して200ml 定容とし、ストロンチウム5 w/v%とした。

カリウム溶液、ナトリウム溶液はそれぞれの塩化物（和光純薬製、特級）をマグネシウム溶液は酸化物（小宗化学製、特級）を1%塩酸に溶解して調製した。

リン酸溶液：リン酸（小宗化学製、特級）を1%塩酸で希釈して用いた。

カルシウム標準溶液：乾燥した炭酸カルシウム（小宗化学製、特

級) 2.5112 gを1%塩酸に溶解して1 l定容とした。カルシウムとして1000ppm。

1%塩酸：希釈、定容操作に用いる1%塩酸は、20%定沸点塩酸(和光純薬製、精密分析用)を水で20倍に希釈した。

水はイオン交換処理した水を、逆浸透膜(Milli-R0、ミリポア製)を通し、更に活性炭-イオン交換樹脂-マイクロフィルター(0.45 μ m)(Super-Qシステム、ミリポア製)を順次通したものをを用いた。

2. 2 装置

原子吸光度計：日本ジャーレルアッシュ社製2チャンネル原子吸光度光共用分析装置AA-8500を2波長モードで用い、測定波長は中性線の422.6nm及びイオン化の程度を見るためにイオン線の393.3nmを使った。光源は浜松ホトニクス社製カルシウム用ランプL233-20NUを用い、バーナーは高温フレイム用の水冷5cmスリットバーナー、SN-64(日本ジャーレルアッシュ社製)をアセチレン(1.5 l/m)-空気(6.75 l/m)フレイム及びアセチレン(4.0 l/m)-一酸化二窒素(5.0 l/m)フレイムに用いた。実際試料溶液の測定に当たっては、アセチレン(1.5 l/m)-空気(6.75 l/m)フレイムに水冷10cmスリットバーナー、SA-62も用いた。ビーム中心は、バーナーヘッド上5mmを通した。

自動濃度計算装置：日本ジャーレルアッシュ社製マイクロプロセッサ-濃度計装置MG-10

3. 結果及び考察

3. 1 アセチレン-空気フレイムによる測定

(1) アセチレン-空気フレイムにおけるカルシウムの吸光度に及

ぼすリン酸とマグネシウムの複合干渉効果

これまで食品試料の灰化溶液を直接、アセチレン-空気フレイムで測定したときに、リン酸の干渉のみでは説明できない吸光度の大幅な低下が観察されていたが、これは図 6-1に示すように、リン酸とマグネシウムの複合干渉効果であることが分かった。カルシウムと同量のマグネシウムが共存するだけでも吸光度はかなり低下した。これは、リン酸マグネシウムの解離エネルギーのほうが小さいために、リン酸カルシウムの解離が抑えられることによると考えられる。マグネシウムの添加濃度を高くするに従い、リン酸の低濃度側ではマグネシウムが共存しないときよりもカルシウムの吸光度が増加し、リン酸による干渉を抑制する効果が見られた。しかし、図 6-1には示していないが、干渉除去剤としてマグネシウムを6000ppm なるように添加しても、カルシウムの吸光度はリン酸濃度が高くなるにしたがって徐々に低下し、更にカルシウム5ppm に対してリンが100ppmを越えると急激に低下する。このことから、マグネシウムはアセチレン-空気フレイムにおいて、干渉除去剤として使えないことが分かった。

(2) アセチレン-空気フレイムにおけるカルシウムの吸光度に及ぼすリン酸の干渉に対するカリウムあるいはナトリウムの添加効果

カルシウム5ppmに対し、カリウムは250ppm及び6000ppm、ナトリウムは500ppm及び6000ppmとなるように添加した。図 6-2に示すように、いずれにおいてもリン酸濃度の低い、リンとして(1~3)ppmのところ、カルシウムの吸光度は急激に低下し、その後一定濃度範囲で吸光度はほぼ一定となった。しかし、図 6-2には示していないが、この吸光度はマグネシウムの共存で大きく変化し、アセチ

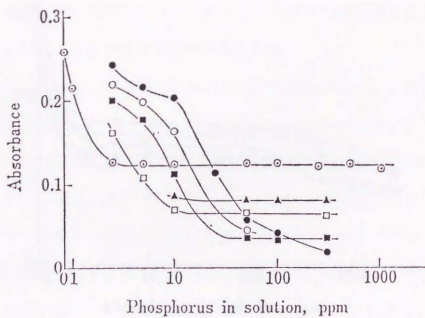


图 6-1 Effect of magnesium and phosphate on absorbance of calcium line at 422.6 nm in acetylene-air flame, solution containing 5 ppm of calcium (⊙), 5 ppm of calcium and 250 ppm (⊛), 100 ppm (○), 50 ppm (⊠), 10 ppm (□) or 5 ppm (▲) of magnesium

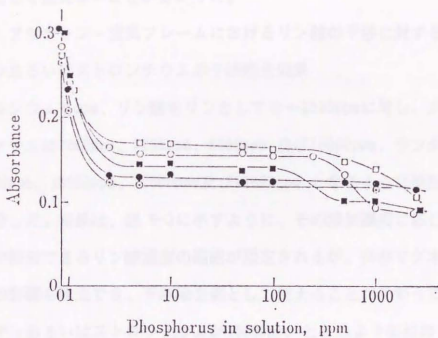


图 6-2 Effect of sodium or potassium/and phosphate on absorbance of calcium line at 422.6 nm in acetylene-air flame, solution containing 5 ppm of calcium (⊙), 5 ppm of calcium and 6000 ppm (□), 500 ppm (■) of sodium, 6000 ppm (○) or 250 ppm (●) of potassium

レン-空気フレームにおいてカリウムあるいはナトリウムは干渉除去剤として使えないことが分かった。

(3) アセチレン-空気フレームにおけるリン酸の干渉に対するランタンあるいはストロンチウムの干渉除去効果

カルシウム5 ppm、リン酸をリンとして0~2500 ppmに対し、ストロンチウムは1000 ppm、3200 ppm、6000 ppm 及び10000 ppm、ランタンは1000 ppm、10000 ppm、12000 ppm 及び15000 ppm となるように添加して測定した。結果は、図 6-3に示すように、その添加濃度に応じて干渉が除去できるリン酸濃度の範囲が限定されるが、共存マグネシウムの影響も除去でき、干渉除去剤として使えることが分かった。ランタンあるいはストロンチウムが10000 ppm となるような添加でも、カルシウム5 ppm に対してリン濃度が250 ppm 以上となるとカルシウムの吸光度は低下しはじめた。ストロンチウムは添加する濃度が高くなるに従って、カルシウムの吸光度はかなり低下するが、ランタンは若干下がるのみであり、その点では、ランタンのほうが優れていると考えられる。

必要以上に高濃度の干渉除去剤を添加することは、バーナーのスリットに塩が析出し、測定値のばらつきにもなるので、リン酸濃度に応じた濃度の干渉除去剤が好ましく、図 6-3から分かるように、カルシウム5 ppm に対してリン酸濃度がリンとして10 ppm までストロンチウム1000 ppm、リン50 ppm まではストロンチウム3000 ppm、リン100 ppm まではストロンチウム6000 ppm、リン100 ppm 以上ではランタンを10000 ppm となるように添加することで十分干渉が除去できると考えられる。

3. 2 アセチレン-酸化二窒素フレームによる測定

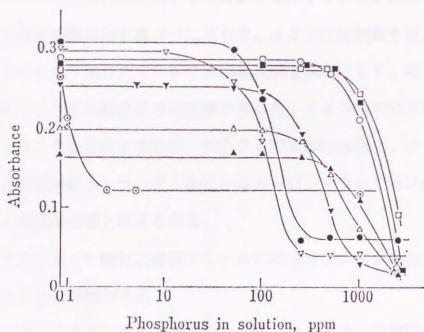


图 6-3 Effect of strontium or lanthanum/and phosphate on absorbance of calcium line at 422.6 nm in acetylene-air flame, solution containing 5 ppm of calcium(○), 5 ppm of calcium and 15000 ppm(□), 12000 ppm(■), 10000 ppm(○), 1000 ppm(●) of lanthanum, 10000 ppm(▲), 6000 ppm(△), 3200 ppm(▼) or 1000 ppm(▽) of strontium

(1) アセチレン—酸化二窒素フレイムにおける各種干渉除去剤のイオン化抑制効果

高温フレイムであるために起こるカルシウムのイオン化を抑制するための各種干渉除去剤を表 6-1に示した。イオン化抑制剤を添加しないときのイオン化したカルシウムの吸光度を基準として、各元素添加時のイオン化の割合をその比率で示した。イオン化の95%以上を抑制することを目的とすれば、カリウムでは250ppm以上、ナトリウムでは500ppm以上、ランタンあるいはストロンチウムでは1000ppm以上の濃度が必要と考えられる。

(2) アセチレン—酸化二窒素フレイムにおけるランタンあるいはストロンチウムの添加効果

ランタン及びストロンチウムはカルシウムよりもイオン化電位が低いために、イオン化抑制効果がある。しかし、図 6-4に示すように、カルシウム5ppmに対して、ストロンチウム濃度1000ppmでは、リン酸濃度がリンとして2500ppmでカルシウムの吸光度が低下し、ストロンチウム濃度10000ppmでは、リン500ppm以上になると吸光度の低下が始まった。ランタン濃度10000ppm以上では、リン濃度が2500ppmになるとカルシウムの吸光度が低下した。吸光度が10%以上低下する濃度では、溶液中に沈殿が観察され、その沈殿内にカルシウムが取り込まれるために、吸光度の低下が起こったと考えられる。しかし、この吸光度の低下も、カルシウム5ppmに対し、リン酸がリンとして500ppm以上となるような食品は通常考えられないので、実際試料の測定上は問題ない。

(3) アセチレン—酸化二窒素フレイムにおけるカリウムあるいはナトリウムの添加効果

表 6-1 Effect of ionization suppressing reagents on absorbance of calcium ion line at 393.3 nm in acetylene-nitrous oxide flame

Concentration in solution (ppm)			Ratio of absorbance† (%)
Calcium	Reagent		
5.0			100
5.0	potassium	100	11.0
5.0		250	5.1
5.0		500	2.8
5.0		1000	1.7
5.0	sodium	2500	1.1
5.0		100	14.1
5.0		250	7.6
5.0		500	5.1
5.0	lanthanum	1000	21.4
5.0		10000	5.2
5.0		1000	16.6
5.0	strontium	3200	9.9
5.0		6000	7.1
5.0		10000	4.9

† Ratio of absorbance to that of solution containing 3 ppm of calcium

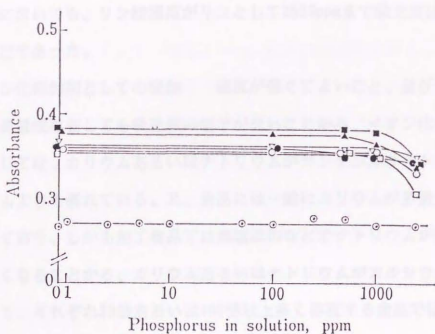


图 6-4 Effect of strontium or lanthanum/and phosphate on absorbance of calcium line at 422.6 nm in acetylene-nitrous oxide flame, solution containing 5 ppm of calcium (○), 5 ppm of calcium and 15000 ppm (□), 12000 ppm (■), 10000 ppm (●), 1000 ppm (▲) of lanthanum, 10000 ppm (●) or 1000 ppm (▽) of strontium

カルシウム5ppm に対しカリウムは250ppm、1000ppm及び6000ppm、ナトリウムは500ppm、1000ppm及び6000ppmとなるように添加した。いずれにおいても、リン酸濃度がリンとして2500ppmまで吸光度はほぼ一定であった。

イオン化抑制剤としての添加 濃度が低くてよいこと、及びリン酸が高濃度存在しても吸光度の低下がないことから、イオン化抑制剤としては、カリウムあるいはナトリウムがランタン及びストロンチウムよりも優れている。又、食品には一般にカリウムが多量に含まれており、しかも加工食品では食塩添加などでナトリウムがかなり多くなることから、カリウムあるいはナトリウムがカルシウムに対して、それぞれ50倍あるいは100倍以上多く存在する食品では、イオン化抑制剤を特に添加しなくてもカルシウムの定量が可能である。

しかし、同じ試料溶液でカルシウム以外に、カリウム、ナトリウムなどが測定対象元素になっていて、これらの元素をイオン化抑制剤として添加することが不都合な場合には、ランタンあるいはストロンチウムを10000ppmとなるように添加する方法が有効である。

3. 3 合成マトリックスモデルを使つての干渉除去剤添加効果の検討

(1) アセチレン-空気フレームによる測定

食品のマトリックスによる干渉の除去効果を検討するために、カルシウム濃度を5ppmとし、他の元素を共存させて、“とうもろこし(玄穀)”、“こめ(玄穀)”、“おおむぎ”、“りんご”、“だいず”、“ピーマン”、“かわのり”、“ほうれんそう”、“ながこんぶ”、“うるか(あゆの内臓の塩辛)”、“いか(塩辛)”、

“しろり（奈良づけ）”についての合成マトリックスモデルを作り、これに3.1(3)で述べたように、リン酸濃度を考えあわせてストロンチウムあるいはランタンを適当濃度添加して、カルシウムの吸光度を測定した。アセチレン-空気フレームにおける結果を表 6-2に示す。干渉除去剤添加前の吸光度はかなり変動しており、マグネシウムの影響がかなり大きいことは“りんご”あるいは“塩辛”のモデルで見られる。

先にストロンチウムあるいはランタンを10000ppmとなるように添加したときに、カルシウム5ppmに対してリン酸濃度がリンとして250ppm以上となるとカルシウムの吸光度が低下しはじめることを述べたが、カルシウムの検量線（1~10）ppmにおいて5ppm以下で測定するとして、リン酸濃度が問題になる食品は穀類の一部{“とうもろこし（玄穀）”及び“こめ（玄穀）”}であるが、表 6-2に示すように、ランタン濃度が10000ppmとなるような添加が有効であることが分かった。ナトリウムを多く含む食品では、 $Na/Ca \leq 150$ であれば（ほとんどのつけ物類がこれに相当する）、この“奈良づけ”モデルが示すように、リン酸濃度に対応した濃度のストロンチウム添加が有効であった。ところが、 $Na/Ca \geq 200$ の“塩辛”のように高濃度にナトリウムを含む食品では、吸光度の（5~10）%の低下がみられ、これはランタン濃度を15000ppmとなるように添加してもほとんど改善されず、アセチレン-空気フレームでは対応できなかった。

他のモデルでは、いずれも満足できる値を示した。

(2) アセチレン-酸化二窒素フレームによる測定

3.3(1)と同じ合成マトリックス容器での測定結果を表 6-2に示

した。合成マトリックスモデル溶液のみでの測定では“うるか”がカルシウム5 ppm に対してナトリウムが2500 ppmと500倍量存在し、カルシウムのイオン化はほとんど抑制されていると考えられるので、その“うるか”のマトリックスモデル溶液の吸光度を基準として、各々の吸光度を比率で示している。

マトリックス中に含まれるナトリウムあるいはカリウムのイオン化抑制効果によって、ほとんどのマトリックスモデル溶液でのカルシウムの吸光度は基準に対して90%以上となっているが、ナトリウムあるいはカリウム含有量が相対的に小さい“かわのり”では87%と低い値となっている。

次いで、これらはストロンチウムあるいはランタンの添加により、イオン化抑制の効果が示され、いずれも基準に対して98%以上とよくなった。ナトリウムに富む“塩辛”の場合にも、ストロンチウムあるいはランタンの添加で基準に対して(97~98)%となっているが、この場合はストロンチウムあるいはランタンを添加しなくてもマトリックスに含まれる高濃度のナトリウムによるイオン化抑制効果によって、十分測定できると考えられる。

3. 4 標準試料を使つての干渉除去剤添加—原子吸光法によるカルシウム定量法の正確さの検討

食品中のカルシウムをアセチレン—空気フレイムを用いて測定する際に問題となるリン酸の干渉も、アセチレン—酸化二窒素の高温フレイムでは問題とならず、イオン化抑制剤を添加して測定すればよいわけである。しかし、アセチレン—酸化二窒素フレイムは、アセチレン—空気フレイムに比べ、取扱上、及び経済上の不利がある。そこで、一般的にはアセチレン—空気フレイムによる測定のほ

うが望ましいと考えるので、このフレームによるカルシウムの測定の正確さをNBS (National Bureau of Standards, USA) のSRM 1567のWheat Flour及びSRM 1568のRice Flourを用いて検討した。約2gを85°Cで24時間乾燥後、550°Cで乾式灰化して調製した試料溶液にそれぞれのリン酸濃度を考えて、Wheat Flourではストロンチウム6000ppmとなるように、Rice Flourではランタン10000ppmとなるように添加して測定したところ、表6-3に示すように、いずれも保証値とよく一致し、この方法の正確さが確認された。この外に、玄とうもろこし(フリント種)を粉碎後、0.5mm目ふるいを通させたものを試料とし、550°C乾式灰化試料溶液を調製し、ランタン10000ppmとなるように添加して測定した。比較のために、カルシウムをストロンチウムとともにシュウ酸塩として共沈させた後分離し、塩酸に再溶解後原子吸光測定する方法のマイクロ法⁷⁾{カルシウム(10~50)μg}とセミマイクロ法{(50~500)μg}による測定も行った。Rice Flourでは、比較法による値も、保証値及び提案法による値とよく一致したが、Wheat Flour及びトウモロコシ全粒粉では、比較法による値は保証値あるいは提案法による値よりも小さく、かつばらつきが見られた。この比較法は沈殿を生成させる過程を含んでいるが、試料のマトリックスによって生成する沈殿の大きさが異なり、特に細かな沈殿物ができたトウモロコシ全粒粉の場合は、濾過の過程での損失、又、沈殿を洗浄する過程での損失も考えられた。Wheat Flourにおいても同様のことが考えられた。

トウモロコシ全粒粉200gを乾式灰化して調製した試料溶液200mlの40mlについて、従来法の過マンガン酸カリウム滴定法⁸⁾を適用したところ、生成した沈殿が微細なため及びカルシウム含有量が予想

表 6-2 Effect of interference suppressing reagents on absorbance of calcium line at 422.6 nm in matrix solutions

Model	Concentration in matrix solution (ppm)					No addition of reagent		Addition of reagent		
	Ca	P	K	Mg	Na	Ratio of abs. (%)		Concn. of reagent in matrix soln. (ppm)	Ratio of abs. (%)†††	
						C ₂ H ₂ -air†	C ₂ H ₂ -N ₂ O††		C ₂ H ₂ -air	C ₂ H ₂ -N ₂ O
Corn	5.0	300	300	150	3	5.6	94.4	La 10000	99.5	102.8
Brown rice	5.0	250	200	100	1	6.4	95.2	La 10000	99.5	102.0
Barley	5.0	110	60	10	1.5	14.4	95.9	Sr 6000	95.6	101.2
								La 10000	98.0	99.9
Apple	5.0	35	350	—	2.5	33.3	99.7	Sr 1500	94.5	101.1
	5.0	35	350	10	2.5	15.0	101.5	Sr 3000	99.1	99.3
Soy bean	5.0	20	75	10	0	15.1	100.1	Sr 1500	97.5	101.1
								Sr 3000	97.5	98.3
Sweet pepper	5.0	15	110	7.5	0.5	15.3	99.1	Sr 1500	100.2	102.9
								Sr 3000	99.6	98.0
KAWANORI	5.0	10	5	5	1	19.2	86.9	Sr 1000	96.7	100.9
Spinach	5.0	5	70	10	2	29.3	96.0	Sr 1000	100.1	101.4
NAGAKONBU	5.0	3.5	75	7.5	30	37.9	99.4	Sr 1000	96.7	101.9
SHIOKARA (URUKA)	5.0	75	—	—	2500	53.2	(100)	Sr 6000	92.1	97.3
	5.0	75	60	6	2500	36.2	100.1	Sr 6000	91.9	98.8
								La 10000	90.7	97.5
								La 15000	91.9	97.5
(JKA)	5.0	50	—	—	1000	47.2	—	Sr 3000	94.1	—
								Sr 6000	95.2	—
								La 15000	96.7	98.5
NARAZUKE (SHIROURI)	5.0	20	—	—	750	46.2	—	Sr 3000	97.8	—

Acetylene (1.51/m)-air (6.751/m) flame, acetylene (4.01/m)-nitrous oxide (5.01/m) flame, AA-8500 (NJA), SN-64 burner (NJA), beam height: 5 mm above the burner head; † Ratio of absorbance to that of solution containing 5 ppm of calcium; †† Ratio of absorbance to that of "URUKA" matrix solution; ††† Ratio of absorbance to that of solution containing 5 ppm of calcium and respective concentration of reagent

表 6-3 Determination of calcium in dry ashed sample solutions of NBS standard reference materials and corn

Sample	Certified value of calcium (ppm)	Observed value (ppm)			
		Proposed AAS method		AAS method after coprecipitation with strontium as oxalate	
		C ₂ H ₂ -air†† flame	C ₂ H ₂ -N ₂ O†† flame	(micro)	(semimicro)
SRM-1567					
Wheat Flour†	190 ± 10	199 197		181 173	183 179
SRM-1568					
Rice Flour†	110 ± 20	119 146	146 144	151 145	
Corn†††		35.1	33.9	29.2 26.9 26.1	29.3

† Drying the sample in air in an oven at 85°C for 24 h; †† Wheat Flour: measured at solution containing 6000 ppm of strontium, Rice Flour and corn: measured at solution containing 10000 ppm of lanthanum; ††† Pulverized and passed through 30 mesh screen

よりも少なすぎたために、N/50過マンガン酸カリウム水溶液の消費量がわずかで、信頼性のある定量値は得られなかった。

ランタン濃度が10000ppmとなるように添加した Rice Flour 及びトウモロコシ全粒粉の乾式灰化試料溶液を、アセチレン—酸化二窒素フレイムを用いて測定した値は、保証値及びアセチレン—空気フレイムを用いる提案法で測定した値とよく一致し、この方法の正確さも確認できた。

これらのことから、食品をあらかじめそのカルシウム含有量とリン含有量の比に応じてグループ分けしておき、その乾式灰化溶液にそれぞれに対応するランタンあるいはストロンチウムを添加して、アセチレン—空気フレイムで測定する方法は、簡便、迅速かつ正確な方法であり、ナトリウム含有量に対し 200倍以上存在する塩類を除くほとんどの食品に適用できる。

4. 要 約

食品中のカルシウムを、試料の乾式灰化溶液に干渉除去剤を添加後、原子吸光法で定量する方法を、アセチレン—空気フレイムとアセチレン—酸化二窒素フレイムを用いて検討した。アセチレン—酸化二窒素フレイムではリン酸による干渉はないので、イオン化抑制剤（カリウムでは250ppm以上、ナトリウムでは500ppm以上、ランタンあるいはストロンチウムでは10000ppm以上）を添加するだけで正確な測定ができた。しかし、取扱い上の不利がある。アセチレン—空気フレイムは操作しやすく、簡便であるが、リン酸による干渉を受けやすい。しかしながら、 PO_4/Ca 比に対応する各種干渉除去剤の適応範囲を明らかにし、又、食品の合成マトリックスモデ

ルを用いてマトリックスの影響を検討した結果、P/Ca比が0~2、2~10、10~20及び20~60に対して、リン酸の干渉除去のために、それぞれストロンチウム1000ppm、3000ppm、6000ppm及びランタン10000ppm溶液にしての測定が有効であった。アセチレン-空気フレームを用い、干渉除去剤を適量添加して測定する方法の正確さを検討するために、NBSの標準試料である Wheat Flour 及び Rice Flour に適用したところ、その測定値は保証値とよく一致した。

5. 文 献

- 1) J.B. Willis : Anal. Chem., 33, 556(1961).
- 2) 後藤秀弘, 池田重良, 厚谷都夫 : 分析化学, 13, 111(1964).
- 3) D. J. David : Analyst(London), 84, 536(1959).
- 4) 森 大蔵, 後藤郁子, 長田博光 : 栄養と食糧, 21, 18(1968).
- 5) 白石 実, 土器屋由紀子, 不破敬一郎 : 日本分析化学会第21年会講演要旨集, p.199(1972).
- 6) W.J. Adrian, M.L. Stevens : Analyst(London), 102, 446(1977).
- 7) 堤 忠一, 栗田香澄, 永原太郎 : 日本分析化学会第27年会講演要旨集, p.471(1978).
- 8) 永原太郎, 岩尾裕之, 久保彰治 : “全訂食品分析法”, p.153(1964), (柴田書店) .

第七章 ヒ素の化学形態による分別定量法の開発

第1節 塩酸溶液からのトルエン抽出を用いる無機態3価、5価及び有機態ヒ素の分別定量法の開発

1. はじめに

海産の動植物は、陸棲の動植物よりも、かなり多くのヒ素を含有していることが知られている。又、ヒ素の毒性はその化学形態によって非常に異なり、一般に有機態よりは無機態のものが毒性が強く、無機態では3価の亜ヒ酸型が5価のヒ酸型よりも毒性が強いといわれている¹⁾。

このように、各種元素の生物体への有効性あるいは毒性は、その化学形態によって大きく異なっているので、全量としてだけでなく、各化学形態の含量も把握することが必要となってくる。

海産物を多く食べる人にとっては、その海産物に含まれるヒ素の化学形態がどのようなものであるかを知ることは重要な問題である。

ヒ素をその化学形態によって分別する方法は、今までにいくつか報告されている。Lundeは、試料を6.6N塩酸で一定時間、還元剤と共に還流後、無機態のヒ素を三塩化ヒ素として蒸留し、有機態のものと分別する方法で海産の動植物中のヒ素はほとんどが有機態であることを報告した²⁾。しかし、この方法は試料の前処理条件が苛酷であると考えられた。又、BramanとForebackは、無機態の3価及び5価のヒ素、メチルアルソン酸及びジメチルヒ酸をpH 1~2の溶液から水素化ホウ素ナトリウムで、それぞれ対応するアルシンとして発生させ、これを液体窒素で冷却したコールトドラップに捕捉し、

ついでこれを温めていくことで沸点の違う各アルシンを分別しDC放電による原子発光によって測定する方法で、水、尿、貝殻、卵の殻のヒ素をはかった³⁾。Aggett と Aspell は、無機態の3価と5価のヒ素をそれぞれ異なる酸性度から水素化ホウ酸ナトリウムで別々にアルシンとして発生させ、フレイム原子吸光法で測定する方法で、水および植物試料中のヒ素を分別定量した。植物試料への適用にあたって、彼らは試料を3倍に希釈した硫硝酸で部分分解する方法を報告しているが、この方法は有機態のヒ素が分解してしまうために、有機態の分別には使えない⁴⁾。鎌田は、3価と5価の無機態ヒ素を異なるpHのもとで、APDC-MIBK抽出して、炭素炉原子吸光法で定量する分別法で、水の中のヒ素を測定した⁵⁾。

著者らは、3価の無機態ヒ素が高濃度（8N以上）の塩酸溶液から選択的にベンゼンに抽出されること^{6, 7)}に注目して、溶媒抽出によって無機態の3価、5価及び有機態のヒ素を同時に分別する方法を検討し、トルエン抽出によって無機態の3価のヒ素、5価のヒ素は3価に還元後抽出して、有機態のヒ素と分別したのち、湿式分解し、これを原子吸光法で定量する新しい分別定量法を開発した。

2. 実験方法

2.1 試薬

試薬はすべて試薬特級を用い、又、水は蒸留水をイオン交換樹脂に通したイオン交換水を用いた。

硝酸、硫酸及び過塩素酸は、それぞれ市販60%水溶液、市販95%水溶液、及び市販60%水溶液を用いた。

ヒ素（無機態3価）標準原液：亜ヒ酸ナトリウムで調製された原

子吸光分析用の標準原液（関東化学製、ヒ素として1000ppm）を用いた。

ヒ素（無機態5価）標準原液：ヒ酸ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）0.208gを水500mlに溶解して、ヒ素として100ppmの溶液を調製した。

ヒ素（有機態）標準原液：*p*-アルサニル酸（ $\text{NH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{AsO}(\text{OH})_2$ ）0.145gを量り取り、20%炭酸ナトリウム溶液10mlを加えて溶かし、水を加えた後、10%硫酸10mlを加えて、中和、酸性化を行い、水で500mlとした（ヒ素として100ppm）。

ヨウ化カリウム溶液（50w/v%）：ヨウ化カリウム（KI）50gを水に溶解して100mlとし、褐色瓶に貯えた。

2. 2 装置及び器具

（1）炭素炉原子吸光光度計

バリアン・テクトロン社製原子吸光光度計AA-1000に同社製カーボンロードアトマイザーCRA-63を装着して用いた。アトマイザーの条件設定は、乾燥105°C40秒、灰化105°C30秒、原子化2100°C3秒とした。

（2）フレイム原子吸光光度計

セイコー電子工業社製原子吸光光度計SAS-721に日本ジャーレルアッシュ社製微量ヒ素測定付属装置ASD-1Aを装着して用いた。

2. 3 分別抽出条件の検討

無機態の3価と5価のヒ素及び有機態ヒ素の分別抽出条件を決めるために、各化学形態のヒ素の各濃度の塩酸から有機溶媒への抽出率を炭素炉原子吸光法で調べた。

各化学形態のヒ素100 μg を溶かした3~12Nの塩酸溶液10mlを、ヨウ化カリウムを添加した場合と添加しない場合で、有機溶媒（ペ

ンゼンあるいはトルエン) 10mlで2分間振り混ぜ、静置した。ヨウ化カリウムは、20あるいは50%水溶液にして、その1mlを添加し、良く混合し15分間放置後、有機溶媒抽出を行なった。2層に分離後、上層の有機溶媒層から10 μ lをマイクロピペットで採り、これを炭素炉に注入して、乾燥-灰化-原子化を行ない、原子化時のヒ素の共鳴線193.7nmの吸収から定量を行なった。

2. 4 溶媒抽出操作

ヒ素を含む濃塩酸溶液10mlを分液漏斗に取り、ヨウ化カリウムを添加する場合は、50%溶液0.5mlを加えて良く混合後、15分間放置してから、有機溶媒(ベンゼンあるいはトルエン) 10mlで2分間振り混ぜる。静置して有機溶媒層が分離してから、下層の塩酸層をフラスコに移す。有機溶媒層は同濃度の塩酸溶液10mlで1分間振り混ぜて、逆洗浄を行なう。ヨウ化カリウムを添加した場合は、50%ヨウ化カリウム溶液0.5mlを含む塩酸を用いて逆洗浄を行なう。下層の塩酸層を先の塩酸溶液が入っているフラスコに移す。有機溶媒層は水10mlで1分間振り混ぜて、無機態のヒ素を逆抽出する。下層の水層を別のフラスコに移す。

有機態のヒ素を含む塩酸溶液あるいは無機態のヒ素を含む水溶液の10mlを容量100mlのコニカルビーカーに取り、硝酸-硫酸-過塩素酸による湿式分解を行なった後、アルシン発生-フレイム原子吸光法で定量する。

2. 5 抽出率の測定

炭素炉原子吸光法は、フレイム原子吸光法に比べ定量性が劣るので、正確な抽出率を決めるために、9Nの塩酸溶液で、ヨウ化カリウムを含む場合と含まない場合について、各化学形態のヒ素のトル

エンによる抽出率を調べた。ヨウ化カリウムを含まない場合は、無機態の3価のヒ素 $2.5\mu\text{g}$ あるいは無機態の5価のヒ素 $25\mu\text{g}$ を、 10ml の9N塩酸に添加した。ヨウ化カリウムを含む場合は、無機態の5価のヒ素 $2.5\mu\text{g}$ あるいは有機態のヒ素 $25\mu\text{g}$ を、50%ヨウ化カリウム溶液 0.5ml を加えた9N塩酸 10ml に添加した。溶媒抽出の操作は、2.4に従った。抽出操作の前に、無機態5価のヒ素による干渉を除去するために、無機態3価のヒ素の溶液にL-アスコルビン酸 0.1g を添加し、又、無機態3価のヒ素による干渉を除去するために、無機態5価のヒ素の溶液に30%過酸化水素水 1ml を添加した。

2.6 湿式分解⁹⁾

試料 1g 以下あるいは試料溶液 10ml 以下を容量 100ml のコニカルビーカーに採り、硝酸 10ml を加えてよく混和した後、時計皿でふたをし、ホットプレート上で穏やかに加熱する〔外温($170\sim 220$) $^{\circ}\text{C}$ 〕。激しい反応が終わったら、ホットプレートより降ろして冷却後、硫酸 1ml 、過塩素酸 2ml を加えて、再びホットプレート上で強熱する〔($300\sim 380$) $^{\circ}\text{C}$ 〕。もし分解液が黒化しはじめたら、直ちにホットプレートから降ろして少量の硝酸を加える。分解液が透明又は淡黄色となり、もはや黒化しなくなったら時計皿を外し、分解液が 1ml 以下になるまで濃縮する。冷却後、希釈酸液(3N塩酸)でメスフラスコに洗い込み、 25ml 定容とし、この一部を使ってアルシン発生-原子吸光測定を行う。

2.7 アルシン発生-フレイム原子吸光法による定量^{9, 10)}

内容積 100ml のガラス反応そう(日本ジャーレルアッシュ社製)に、ヒ素として $1\mu\text{g}$ 以下を含むように、試料分解溶液($1\sim 25$) ml を採り、これに希釈酸液(3N塩酸)を加え、合せて 25ml にする。

20%ヨウ化カリウム溶液 1 ml、20%塩化スズ (II) 塩酸溶液 0.5 ml を加えてよく混和し、約15分間放置する。次いで反応そうを微量ヒ素測定付属装置内に置き、オブラートに包んだ無ヒ素亜鉛 0.8 g を加えて、すばやくインピージャーを降ろして、反応そうをアルシンの捕集容器に連結する。次いで、マグネチックスターラーでかき混ぜてアルシンガスを発生させる。捕集容器内のガス圧力が 0.5 kg/cm^2 となったところで、捕集したアルシンガスを補助アルゴンガスで原子吸光度計のアルゴン-水素フレイム中に導入し、ヒ素の 193.7 nm の吸光度を測定する。

3. 結果及び考察

3.1 抽出有機溶媒の選定

有機溶媒としては、ベンゼンとトルエンを検討したが抽出率に差がなかったので、急性毒性の低いトルエンを用いることにした。

3.2 各化学形態のヒ素の抽出挙動

図7-1に示すように、無機態の3価のヒ素は8 N以上の塩酸から、約85%の抽出率で抽出されるが、無機態の5価および有機態のヒ素はほとんど抽出されなかった。ヨウ化カリウムを添加すると、無機態の3価、5価とも、7 N以上の塩酸溶液から、ほぼ 100%抽出された。しかし、有機態のヒ素は、この時もほとんど抽出されなかった。無機態5価のヒ素は、ヨウ化カリウムによって3価に還元されてトルエンに抽出されたと考えられる。さらに、無機態3価のヒ素の抽出率は、ヨウ化カリウムの添加で増加した。塩酸溶液からトルエンに抽出されたヒ素は炭素炉アトマイザーの灰化温度 170°C でかなりの量が失われたのに対して、ヨウ化カリウムを含んだ塩酸溶液

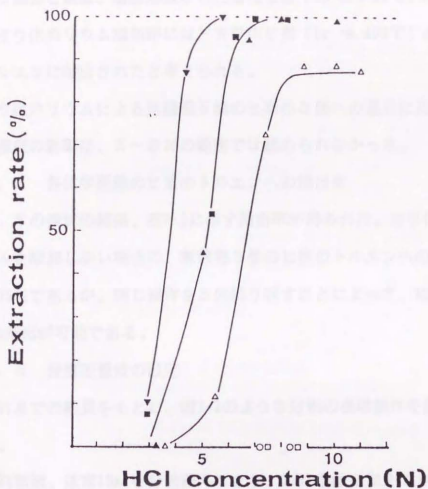


图 7-1 Effect of Hydrochloric Acid Concentration on the Extraction Rate of Inorganic As (III), (V) and Organic As with Toluene.

△, inorganic As (III) from HCl; ▲, inorganic As (III) from (HCl+0.1 M KI); ▼, inorganic As (III) from (HCl+0.43 M KI); □, inorganic As (V) from HCl; ■, inorganic As (V) from (HCl+0.1 M KI); ○, organic As from HCl or (HCl+0.1 M KI).

から抽出されたヒ素は灰化温度240°Cでも保持されたことから、無機態3価のヒ素は、塩酸溶液から三塩化ヒ素 (bp 130.21°C) の形で、ヨウ化カリウム添加時には三ヨウ化ヒ素 (bp ca.400°C) の形でトルエンに抽出されたと考えられる。

ヨウ化カリウムによる無機態5価のヒ素の3価への還元及ぼす塩酸濃度の影響は、5~9 Nの範囲では認められなかった。

3.3 各化学形態のヒ素のトルエンへの抽出率

2.5の検討の結果、表7-1に示す抽出率が得られた。ヨウ化カリウムを添加しない場合の、無機態3価のヒ素のトルエンへの抽出率は85%であるが、同じ操作を3回繰り返すことによって、ほぼ100%の抽出が可能である。

3.4 分別定量法の設定

これまでの結果をもとに、図7-2のような分別の標準操作を設定した。

試料溶液、通常10mlを分液漏斗にとり、12N塩酸を加えて9Nに調整後、トルエン10mlで2分間振り混ぜて抽出する。この操作をさらに2回繰り返して得たトルエン溶液30mlは、9N塩酸溶液10mlで逆洗浄した後、水10mlで2回逆抽出して無機態3価のヒ素を含む水溶液を得る。逆洗浄に用いた塩酸溶液を先の塩酸層に合わせた後、無機態5価のヒ素を3価に還元するために、50%ヨウ化カリウム溶液1.5mlを加えて15分間放置する。トルエン10mlで3回抽出して得たトルエン溶液は、50%ヨウ化カリウム溶液0.5mlを加えた9N塩酸10mlで逆洗浄した後、水10mlで2回逆抽出し、5価由来の3価のヒ素を含む水溶液を得る。有機態のヒ素は塩酸溶液に残る。水溶液あるいは塩酸溶液から、10mlをコニカルビーカーに取り、硝酸10ml、

表 7-1 EXTRACTABILITY OF ARSENIC INTO
TOLUENE FROM HYDROCHLORIC ACID SOLUTION

Chemical form of arsenic	Com- pound	Hydrochloric acid solution	
		9 N HCl	9 N HCl, 0.13 M KI
Inorganic	As (III) sodium arsenite	$D = 5.79$ $E = 85.3\%$	
	As (V) disodium arsenate	$D = 0.016$ $E = 1.6\%$	$D = 65.84$ $E = 98.5\%$
Organic As	<i>p</i> -arsanilic acid	$D = 0.04$	
		$E = 3.9\%$	

D : Distribution ratio,

$$D = \frac{W_{\text{tol}}/V_{\text{tol}}}{(W - W_{\text{tol}})/V_{\text{HCl}}}$$

W : Weight of arsenic added

W_{tol} : Weight of arsenic in toluene solution

V_{tol} : Volume of toluene

V_{HCl} : Volume of HCl solution (with or without KI)

E : Extraction rate $V_{\text{tol}}/V_{\text{HCl}} = 1$

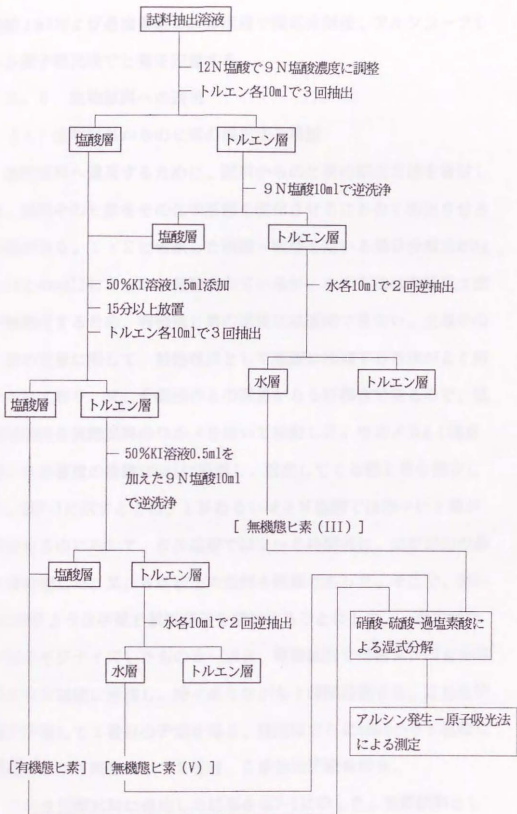


図 7-2 無機態ヒ素(III)、(V)及び有機態ヒ素の分別操作

硫酸1mlおよび過塩素酸2mlの混液で湿式分解後、アルシン—フレーム原子吸光法でヒ素を定量する。

3. 5 生物試料への適用

(1) 生物試料からのヒ素の溶出法の検討

実際試料へ適用するために、試料からのヒ素の溶出方法を検討した。試料中のヒ素をその化学形態を変化させることなく溶出させる必要がある。1:2に希釈した硝酸—硫酸を用いる部分分解法がAggettとAspellによって、報告されているが、この方法は有機態ヒ素が無機化するため、有機態ヒ素の定量には適用できない。土壤中のヒ素の定量に際して、前処理法として塩酸に浸漬する方法がよく用いられており、又、分離操作との関連からも好都合であるので、塩酸浸漬法を実際試料のワカメを用いて検討した。ワカメ5g(湿重量)を各濃度の塩酸100mlに浸漬し、溶出してくる総ヒ素を測定した。図7-3に示すように、1Nあるいは3N塩酸では徐々にヒ素が溶出するのに対して、6N塩酸では2~3時間後に、ほぼ溶出の最大値に達した。又、6N以上の塩酸も同様であった。そこで、図7-4に示すような手順で試料溶液を調製することにした。含水試料ではホモジナイズしたもの5~10g、乾燥試料では粉末1~2gを50mlの6N塩酸に浸漬し、時々振りながら1時間放置する。これを濾紙で濾過して1番目の濾液を得る。残渣はさらに50mlの6N塩酸に浸漬し、以下同様にして2番目、3番目の濾液を得る。

これを実際試料に適用した結果を表7-2に示した。実際試料としては、ワカメ、ヒジキ、アラメ、カジメの海藻類(ワカメとヒジキの乾物は市販品、それ以外は油壺で採取したものを用了)、サメ筋肉粉末試料(フトツノザメの筋肉の白身の部分を凍結乾燥後、メ

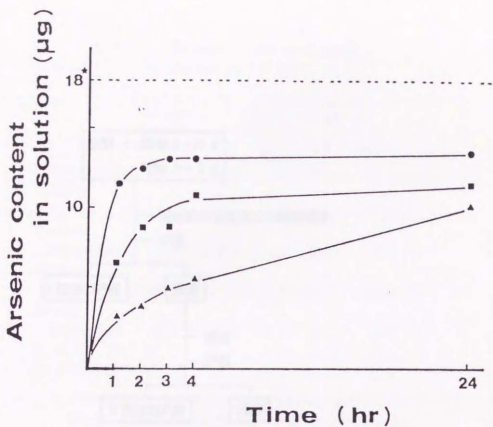


Fig 7-3 Effect of Hydrochloric Acid Concentration on Solubilization of Arsenic to Hydrochloric Acid Solution from Biological Material.

●, 6~9 N HCl; ■, 3 N HCl; ▲, 1 N HCl.

Sample; *Undaria pinnatifida* 5.0 g (fresh weight).
Solution; 100 ml of HCl.

* Total arsenic content in 5.0g of *Undaria pinnatifida*.



図 7-4 試料抽出溶液の調製法

表 7-2 SOLUBILIZATION OF ARSENIC
IN SAMPLES BY 6 N HCl

	Total As ^f content ($\mu\text{g}/\text{dry}$ weight g)	Arsenic content ($\mu\text{g}/\text{dry}$ weight g) in filtrate			
		1st	2nd	3rd	in residue
Shark muscle ^a	60.4	56.1	3.2	0	0.1
Orchard leaves ^b	10.8	8.6	2.3	0.4	0.7
<i>Undaria</i> <i>pinnatifida</i> ^{c, e}	16.4	11.6	1.9	0.5	4.7
<i>Ecklonia</i> <i>cava</i> ^{d, e}	61.5	36.3	7.8	—	12.1
<i>Eisenia</i> <i>bicyclis</i> ^{d, e}	58.5	51.8	5.2	0.5	4.7
<i>Hizikia</i> A ^e	93	66	8.6	—	9.1
<i>fusiforme</i> B ^{d, e}	82.2	65.1	10.3	—	7.5

^a Pulverized and mixed after lyophilization.⁽¹¹⁾
Shark (*Squalus mitsukurii*) was purchased at
Choshi market.

^b NBS-SRM 1571 (certified value of arsenic,
 $10 \pm 2 \mu\text{g}/\text{g}$)

^c Purchased at a market.

^d Collected in Aburatsubo bay.

^e Wet sample was used for experiment.

^f Total arsenic contents were determined after
samples were wet digested directly.

ノウ製のボールミルで粉碎、混合を行ない、50メッシュのサラシ篩を通過させたもの)および NBS-SRM 1571のOrchard Leavesを用いた。

サメ筋肉粉末試料及びOrchard Leavesは、2番目までの滷液にその総ヒ素のほとんどが溶出された。他の試料でも、2番目の滷液までに溶出されうるヒ素はほとんど溶出されると考えられた。また一部のヒ素は溶出されないうで試料中に残存するが、このヒ素は組織と強固に結合していると考えられ有機態であろうと推定される。

(2) 生物試料中のヒ素の分別

3. 5(1)で得た1番目と2番目の滷液、各5ml、計10mlを試料溶液として、先の分別の標準操作による分別を行なった。また、試料溶液に亜ヒ酸ナトリウムおよびヒ酸二ナトリウムと一緒にヒ素として各5 μ gずつ添加し、同様に分別操作をして標準添加回収試験を行なった。結果は、表7-3に示すように、サメ筋肉粉末試料、Orchard Leaves、ワカメの場合には、3価のヒ素の回収率が85%前後と若干低い値であったが、5価のヒ素の回収率は90~99%であった。3価のヒ素の回収率が低かったのは、塩酸溶液からの最初のトルエン抽出の際に生じたエマルジョンへのヒ素の吸着によるものと考えられる。しかしながら、全体としてほぼ満足できる回収率を示し共存溶出物による分別抽出に及ぼす影響はほとんどないと考えられた。しかし、ヒジキおよびカジメでは、3価のヒ素の回収率が170~200%となった。塩酸のみからのトルエン抽出の際に、トルエン層がうすくピンク色に呈色したことから、ヨウ素が抽出されていると考えられた。海藻には一般に乾物あたり0.4~0.6%のヨウ素が含まれている¹¹⁾。5価のヒ素がヨウ化物イオンによって3価に還元される

ことはよく知られている。石橋¹³⁾の比色法を改変し、海藻試料を450°Cで乾式灰化後、トルエンで抽出して、ヨウ素を定量した。9 N塩酸中の2 ppmの無機態5価のヒ素に各濃度のヨウ化カリウムを添加して3価への還元量を検討した。0.5、1.0及び12 ppmのヨウ化物の共存によって無機態5価のヒ素はそれぞれ8.5、15.5及び47.1%が3価に還元された。

実際試料のヒ素の形態別存在量は表7-4に示した。サメ筋肉粉末試料には、ほとんどが有機態で含まれていた。Orchard Leavesはそれとは対照的に、すべてが無機態であり、農薬などの外来性のものであることを示唆している。また、この3価のヒ素の値は、Aggettらが報告した別法による値とほぼ一致した。ワカメは約10%の無機態を含み、3価よりも5価のほうが若干多かった。アラメは約5%の無機態ヒ素を含んでいた。カジメ、アラメおよびヒジキでは、ヨウ化物イオンによって5価のヒ素が3価に還元されてしまうために、無機態の3価と5価の分別は、この方法では無理であるので、無機態の総量として示した。ヒジキでは、ヒ素の存在パターンが他の海藻と異なり、総ヒ素の50%以上が無機態であった。しかしながら、これはもともと易分解性の有機態として存在していたものが、試料溶液の調製過程や分離操作中に部分的に無機態に変換したことも予想され、この点に関しては、さらに新しい分別定量法を開発する必要がある。なお、ヒ酸のメチル化物であるモノメチルアルシン酸あるいはジメチルアルソン酸は有機態のヒ素であるが、この分別操作では無機態の5価のヒ素と同じ挙動を示すので、有機態のヒ素の定量値には含まれない。

表 7-3 RECOVERIES OF AS (III) AND AS (V) IN HCl EXTRACTS OF BIOLOGICAL MATERIALS

Sample	Sample ^a (dry weight g)	As (III) (μg)		As (V) (μg)		Org As found (μg)	Recoveries (%)	
		added	found	added	found		As(III)	As(V)
Shark muscle	1.0	(a) ^b	—	0	—	0.06	5.17	
		(b)	5.0	4.21	5.0	4.53	5.18	84.2
Orchard leaves	2.0	(a)	—	0.92	—	1.11	0	
		(b)	5.0	4.99	5.0	6.07	0	81.2
<i>Undaria pinnatifida</i>	1.66	(a)	—	0.08	—	0.14	2.17	
		(b)	5.0	4.34	5.0	4.95	1.91	85.2
<i>Ecklonia cava</i>	1.43	(a)	—	0.16	—	0.72	4.27	
		(b)	5.0	10.05	5.0	2.15	4.50	197.2
<i>Hizikia fusiforme</i> A	2.0	(a)	—	17.65	—	2.43	7.40	
		(b)	5.0	26.20	5.0	3.99	7.72	170.9

^a Each 50 ml of 1st, 2nd and 3rd filtrate were prepared.

^b (a) Five ml of 1st filtrate and 5 ml of 2nd filtrate were combined for analysis. Third filtrate was not combined, because it had little arsenic.

(b) Five μg of As (III) and 5 μg of As (V) were added together to combined filtrates (5 ml of 1st filtrate and 5 ml of 2nd filtrate).

表 7-4 CONTENTS OF INORGANIC AS (III), (V), ORGANIC AS AND IODINE IN VARIOUS BIOLOGICAL MATERIALS (ON DRY WEIGHT BASIS)

Sample	Total As content ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Each form content of As($\mu\text{g}/\text{g}$) in HCl extract solution			Residual As in sample ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Iodine (%)
		inorganic As(III)	As(V)	organic As		
Shark muscle	60.4	0	0.78	59.49	0.05	—
Orchard leaves	10.8	4.69 ^a	5.63	0	0.69	—
<i>Undaria pinnatifida</i>	16.4	0.48	0.87	12.37	4.73	<0.006
<i>Ecklonia cava</i>	61.45		6.15	29.83	12.12	0.201
<i>Eisenia bicyclis</i>	58.55		2.07	65.28	4.66	0.195
<i>Hizikia fusiforme</i>	A	93	50.21	18.06	9.08	0.072
	B	82.19	47.05	23.01	7.74	—

^a 4.90 $\mu\text{g}/\text{g}$ (value reported by Aggett and Aspell¹⁰).

4. 要 約

3 価の無機態ヒ素が、9 N 以上の塩酸溶液からトルエンに選択的に抽出されることを利用した分別定量法を開発した。無機態の5 価のヒ素はヨウ化カリウムによる還元後、トルエンに抽出されるが、有機態のヒ素は抽出されないで塩酸溶液に残存した。生物試料は6 N 塩酸に2~3 時間浸漬することで全ヒ素の90~100%が溶出されたので、この溶出液を試料溶液として分別操作を行なった。トルエン溶液を逆抽出して得た水溶液及び塩酸溶液を硝酸-硫酸-過塩素酸で湿式分解したのち、3 N 塩酸溶液とし、これをアルシン発生-フレイム原子吸光法で測定し、各化学形態のヒ素を定量した。ヒ素含量の高いサメ筋肉粉末、海藻及びNBSの標準試料であるOrchard Leaves (SRM 1571) に本法を適用した。サメ筋肉粉末及び海藻(カジメ、アラメ、ワカメ)中のヒ素は、その90~100%が有機態であったが、Orchard Leavesでは、すべてが無機態であった。又、ヒジキは他の海藻と異なり、50%以上が無機態であった。

5. 文 献

- 1) D. V. Frost: *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 26, 194 (1967).
- 2) G. Lunde: *J. Sci. Food Agric.*, 24, 1021 (1973).
- 3) R. S. Braman, C. C. Foreback: *Science*, 182, 1247 (1973).
- 4) J. Aggett, A. C. Aspell: *Analyst*, 101, 341(1976).
- 5) T. Kamada: *Jalants*, 23, 835 (1976).
- 6) 田中 克: 分析化学, 9, 574(1960).

- 7) H.C.Beard, L.A.Lyerly: *Anal. Chem.*, 33, 1781(1961).
- 8) 安井明美, 堤 忠一: 分析化学, 26, 809(1977).
- 9) 江波戸拳秀, 天川映子, 山野辺秀夫, 鈴木助治, 戸谷哲也:
食衛誌, 15, 469(1974).
- 10) T.J.Forehand, A.E.Duphy, Jr., H.Tai: *Anal. Chem.*, 48, 999
(1976).
- 11) E.J.Underwood: "Trace elements in human and animal nutrition," 3rd ed., Academic Press, New York and London,
p.307(1971).
- 12) S.Toda, Y.Dokiya, M.Taguchi, K.Fuwa: "Abstracts of 26th
International congress of pure and applied chemistry,"
Tokyo, Part I, p.437(1977).
- 13) 石橋雅義, 佐原良太郎: 日本化学会誌, 61, 513(1940).

第2節 ヒジキ及びアラメ中の水溶性ヒ素化合物の検討

1. はじめに

第1節で、ヒジキ中のヒ素の50%以上は無機態あるいはメチル態であるが、他の海藻（ワカメ、カジメ、アラメ）及びサメ筋肉中のヒ素のほとんどはメチル態以外の有機態であることを明らかにしたが、このうちヒジキ及びアラメ中の水溶性ヒ素化合物について検討を行なった。

2. 実験方法

2. 1 試料からのヒ素の抽出及びゲルクロマトグラフィーによる分画

ヒジキ（市販品、ヒ素含量乾重量当たり93 $\mu\text{g/g}$ ）あるいはアラメ（宮城県で採取されたもの、ヒ素含量乾重量当たり79 $\mu\text{g/g}$ ）の粉碎した乾物5~10 gにイオン交換水100mlを加え、Ultra-turrax ディスパーザーでホモジナイズした。一晚放置後、濾紙（No. 6、東洋濾紙）を通すか、あるいは遠心分離（3000rpm、15分）して、濾液あるいは上澄み液を得る。この水抽出をもう一度繰り返す。総ヒ素及び水溶性ヒ素は、硝酸-硫酸-過塩素酸の三混酸による湿式分解後、アルシン発生-フレイム原子吸光法で定量された。

濾液あるいは上澄み液は、減圧下55°C水浴で、ロータリーエバポレーターで濃縮された。過剰のメタノールを加えて、メタノール不溶性物質を沈殿させた。沈殿を除去後、溶液を減圧下ロータリーエバポレーターで濃縮し、再び過剰のメタノールを加えて、同じ操作

を繰り返した。濃縮した抽出物はSephadex G25 (fine) のゲルカラム ($\phi 26.4 \times 905\text{mm}$) を用いて、上昇法で分離した。溶離液は0.05 M塩化ナトリウム水溶液を用い、流速は1ml/minとした。溶出液を、5あるいは10gずつ分画した後、炭素炉原子吸光法(乾燥; $220^\circ\text{C}30$ 秒、灰化; $370^\circ\text{C}30$ 秒、原子化; $2425^\circ\text{C}7.5$ 秒)で、ヒ素を定量した。

2. 2 イオン交換樹脂に対する吸着挙動

2. 1で得たヒ素を含む画分を、陽イオン交換樹脂(Dowex 50W-8X、50~100メッシュ、H⁺型、0.5N塩酸で調整)の直列につないだ短いカラム($\phi 10 \times 80\text{mm}$)と長いカラム($\phi 15 \times 290\text{mm}$)に通した。0.5N塩酸100mlをカラムに流した後、長いカラムを外し、短いカラムに順次、水20ml、0.75N水酸化アンモニウム100mlを流した。溶出液中のヒ素は炭素炉原子吸光法で検出された。溶出位置はヒ素の標準品のものと比較された。

又、2. 1で得たヒ素を含む画分の陰イオン交換樹脂(Amberlite IRA-410、Cl⁻型)に対する吸着挙動を、バッチ法で調べた。樹脂を加えた時の溶液中のヒ素の減少を、炭素炉原子吸光法で測定した。

2. 3 異なる還元条件からのアルシンの発生挙動

2. 1で得たヒ素を含む画分からのアルシンの発生挙動を、3種類の異なる還元条件{(1) 3N塩酸+亜鉛末、(2) 3N塩酸+塩化スズ(II)+亜鉛末、(3) 3N塩酸+ヨウ化カリウム+塩化スズ(II)+亜鉛末}で調べた。発生したアルシンは、フレーム原子吸光法で測定した。

3. 結果及び考察

3. 1 ゲルクロマトグラフィーによるヒ素含有画分の分離

ヒジキ中のヒ素の80%、アラメ中のヒ素の85%が水に抽出された。

ヒジキ中の水溶性ヒ素化合物は、ゲルクロマトグラフィーで2つの位置 ($K_d=0.58$ と 0.76) に溶出された。これらの画分をそれぞれヒジキI及びヒジキIIと呼ぶ。それぞれ、ゲルクロマトグラフィーで溶出されたヒ素の40及び60%を占めた。ヒ素を含む3つめの画分 ($K_d=1.0$) が現われることがあった。この画分はヒジキIIIと呼ぶ。アラメ中の水溶性ヒ素化合物は、2つの位置 ($K_d=0.54$ と 0.65) に溶出され、それぞれゲルクロマトグラフィーで溶出されたヒ素の90及び10%を占めた。それぞれ、アラメI及びアラメIIと呼ぶ。ヒジキ及びアラメ中に含まれるヒ素化合物の分配係数 (K_d) を、ヒ素の標準品の K_d とともに表 7-5に示す。ヒジキI、アラメI及びIIの分配係数は、いずれのヒ素の標準品のものと一致しなかった。一方、ヒジキIIの分配係数は、ヒ酸塩、メチルアルソン酸塩及びジメチルアルシン酸塩の分配係数の範囲にあった。ヒジキIIを放置しておくと、その溶出位置が亜ヒ酸塩の位置に変わることが観察された。これは、共存物によってヒ酸塩が亜ヒ酸塩に還元されたためと考えられる。

3. 2 分離された画分中のヒ素のイオン交換樹脂に対する吸着挙動

標準品の亜ヒ酸塩とヒ酸塩は、陽イオン交換樹脂カラムから0.5N塩酸ですぐに溶出された。メチルアルソン酸塩は0.5N塩酸で遅れて溶出された。ジメチルアルシン酸塩と p -アルサニル酸は、0.75N水酸化アンモニウムで溶出された。ヒジキI、II及びアラメIは、ヒ酸塩及び亜ヒ酸塩と同様に、すぐに溶出され、陽イオンの性質を示さなかった。ヒジキIII及びアラメIIIは量が少なく、陽イオ

表 7-5 THE DISTRIBUTION COEFFICIENTS (K_d) ON GEL CHROMATOGRAPHY,
 ADSORPTION BEHAVIOUR ON CATION AND ANION-EXCHANGE RESINS AND
 ARSINE GENERATION OF ARSENIC CONTAINING FRACTIONS OF ALGAE

Sample	K_d value ^a 0.05 M NaCl	Adsorption to		Arsine generation ^b
		Dowex 50W-8X	Amberlite IRA-410	
Sodium arsenite	1.22	No	No	(+)
Disodium arsenate	0.74	No	Strong	(+)
Disodium methylarsionate	0.74	Weak	Medium	(+)
Sodium dimethylarsinate	0.75	Strong	Weak	(+)
<i>p</i> -Arsanilic acid	1.03	Strong	Strong	(-)
Hijiki I	0.58	No	No	(-)
Hijiki II	0.76	No	Strong	(+)
Hijiki III	1.07	—	No	(+)
Arame I	0.54	No	No	(-)
Arame II	0.65	—	—	(-)

^a Gel chromatography: Sephadex G25 fine, 26.4 mm i.d. × 905 mm.

^b Reductive conditions: 3 N HCl + KI + SnCl₂ + Zn. (+) arsine generation; (-) no arsine generation.

ン交換樹脂カラムによる検討ができなかった。

中性の水溶液から、ヒ酸塩及び *p*-アルサル酸は、陰イオン交換樹脂のAmberlite IRA-410に強く吸着された。ジメチルアルシン酸塩は弱く吸着され、メチルアルソン酸塩は中程度の吸着であった。しかし、亜ヒ酸塩はほとんど吸着されなかった。ヒジキ I、III 及びアラメ I は、樹脂にほとんど吸着されなかったが、ヒジキ II は樹脂に吸着され、溶液中にはほとんどヒ素が残らなかった。

3. 3 分離された画分中のヒ素のアルシン発生挙動

ヒジキ I、アラメ I 及び II からは、(3N塩酸+ヨウ化カリウム+塩化スズ(II)+亜鉛末)の還元条件でも、アルシンは発生しなかった。このため、これらの画分に含まれるヒ素化合物は、無機態でもメチル態でもないことが分かった。図 7-5 に示すように、ヒジキ II 及び III からの異なる還元条件からのアルシンの発生挙動は、それぞれ、ヒ酸塩及び亜ヒ酸塩のものと同じであった。

3. 4 分離された画分中のヒ素化合物

ゲルクロマトグラフィーにおける K_d 値、陽イオン及び陰イオン交換樹脂への吸着挙動及びアルシンの発生挙動から、ヒジキ II 及び III に含まれるヒ素化合物は、それぞれ、ヒ酸塩及び亜ヒ酸塩であることを確認した。ヒジキ I 及びアラメ I に含まれるヒ素化合物は、メチル態以外のおそらく同一の有機態ヒ素化合物である。ヒジキ中の多量成分としてのヒ酸塩、少量成分としての亜ヒ酸塩の存在は、田川¹⁾、山内ら²⁾、森田³⁾及び福井ら⁴⁾によっても報告されている。ヒジキだけが、なぜ多量成分としてヒ酸塩を含有しているかは、非常に興味のある問題である。田川¹⁾、山内ら²⁾及び福井ら⁴⁾が存在すると報告したジメチルアルシン酸塩を、われわれは検出しなかつ

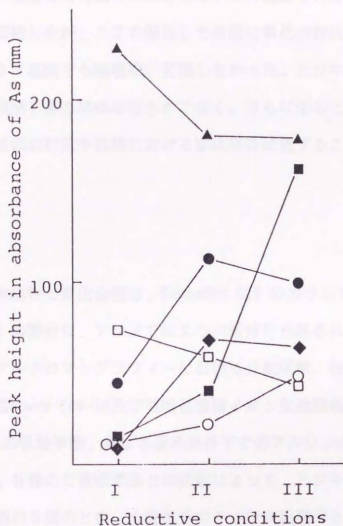


Fig. 7-5 Arsine Generation Behaviour of Fractions.

I, 3N HCl+Zn; II, 3N HCl+SnCl₂+Zn; III, 3N HCl+KI+SnCl₂+Zn. One μ g arsenic of each arsenic standard was used. (▲) arsenite; (■) arsenate; (●) methylarsenate; (◆) dimethylarsinate; (○) Hijiki II fraction; (□) Hijiki III fraction.

た。有機態のヒ素の存在は、安達ら⁵⁾及び貝瀬ら⁶⁾の報告と一致する。福井ら⁴⁾が報告した有機ヒ素化合物は、2 N 塩酸で10分間で無機態に簡単に変換したが、ここで報告した有機ヒ素化合物は、より安定であり、3 N 塩酸でも無機態に変換しなかった。ヒジキ中の有機態ヒ素と無機態ヒ素の関係は明らかでなく、さらに生のヒジキ中のヒ素化合物組成の貯蔵や乾燥における変化等を研究することが必要である。

4. 要 約

ヒジキ中の水溶性ヒ素化合物は、Sephadex G25 のカラムで2つ(ないし3つ)の画分に、アラメでは2つの画分に分離された。これらの画分のゲルクロマトグラフィーにおける分配係数、強酸型陽イオン交換樹脂Dowex 50W-X8及び強塩基型陰イオン交換樹脂Amberlite IRA-410への吸着挙動、異なる還元条件下でのアルシンの発生挙動を調べた。各種のヒ素標準品との比較によって、ヒジキ中の多量画分は無機態の5価のヒ素、少量画分の1つは無機態の3価のヒ素であることを確認した。又、ヒジキ中の他の少量画分及びアラメ中の2画分はいずれもメチル化ヒ素以外の有機態であった。ヒジキ中の少量画分とアラメ中の多量画分はゲルクロマトグラフィーの分配係数及び他の諸性質から、同一化合物であると考えられた。

5. 文 献

- 1) 田川昭治：日本水産学会誌，46,1257(1980)。
- 2) 山内 博，山村行夫：産業医学，20,47(1979)。
- 3) 森田昌敏：国立公害研究所研究発表会予稿集，p.184 (1981)。

- 4) 福井昭三, 平山晃久, 野原基司, 阪上嘉彦: 食品衛生学雑誌, 22, 513(1981).
- 5) 安達修一, 川井英雄, 細貝祐太郎: 食品衛生学雑誌, 21, 13 (1980).
- 6) 貝瀬利一, 渡辺重信, 池田陽男: 食品衛生学雑誌, 21, 58 (1980).

本論文は、食品総合研究所の食糧研究所としての設置時より現在まで継続されている主要研究課題「食品分析法の確立と基準化」の一環として担当してきた研究の一部を「食品中の窒素と無機元素の定量法の開発と改良」と題して、まとめたものである。

はじめに、食品中のタンパク質を推定する上で最も重要な窒素定量法を取り上げ検討を加えた結果を記述した。

ケルダール法は食品分析法の設定当初から窒素定量の基準法と考えられてきており、新しい方法が開発された場合は、ケルダール法による結果と対比させて、両法の相関性を検討することにより評価がなされてきた。食品のマトリックス分解の触媒として優れている酸化水銀(II)は測定者に対する健康障害及び廃液の及ぼす環境汚染の問題などから、これに代わる優れた分解触媒として二酸化チタンと硫酸銅を選び、分解によって生成したアンモニアの蒸留には直接蒸留(セミマイクロでは水蒸気蒸留)を用い、蒸留したアンモニアをホウ酸溶液で捕捉し、これを酸標準溶液で滴定する定量法を検討した。4分析試験室によるクロスチェック試験の結果、マクロスケール、セミミクロスケール、またマクロスケール変法において、試験室間の再現性が極めて良く標準法としての適用が可能であることを見出だした。その結果、触媒に二酸化チタンと硫酸銅を1:1で用いるケルダール分解法は、農産物検査法施行規則に基づく品位の検査を行なう場合、並びに当該検査業務に関連する農産物及び食品等の品質について調査、試験、検定等を行なう場合の標準的な理化学

的測定方法を定めた食糧庁の標準計測方法として採用された。この方法は、各種のケルダール改良法との差がないことから、容易に現場への導入が可能となった。さらに、ケルダール分解法は熱源の強さを調整することによって、分解時間の短縮がはかれることが明らかになった。

次に近年注目された食品中のミネラル、すなわちナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、マンガン、銅、亜鉛及びリンなどの定量法につき検討を加えた結果についてまとめた。約20年程前より発展普及した原子吸光法は簡便性、測定値の正確さ、精度とも従来法に比較して倍段の進歩をもたらした。しかし、食品分析に利用するには、原子吸光装置にかける前に処理を行ない溶液化する方法を検討する必要があった。特に、食品中の無機元素は微量であることから、主成分の有機成分を分解除去する前処理は重要であり、しかも多数の試料に対して迅速性、簡便性、経済性を考慮しながら、測定値の正確さを損なわない方法を確立しなければならない。本研究では、簡便な前処理法として、アルミニウム箔カップを用いる乾式灰化法、ヒ素定量の前処理法としての硝酸-硫酸-過塩素酸を用いる湿式分解法、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、(鉄)、マンガン、銅、亜鉛定量の前処理法としての希塩酸抽出法を検討した。正確さは生物標準試料を用いて判断し、いずれも前処理法として適当であることを確認した。

乾式灰化法は、灰化容器に白金皿を用いる方法が基準法と考えられるが、白金皿が高価であるため多数のものを揃えることは難しく、現場には不向きである。アルミニウム箔カップは、市販のアルミニ

ウム箔を適当な大きさに切って成形すれば良いため、安価であり、又、採取する試料量に応じて自由に大きさを変えることが可能である。食品中の灰分は、550°Cで加熱して水分及び有機物を分解除去した残分と定義され、食品の栄養評価にあたって重要な項目となっている。アルミニウム箔カップは、これまで用いられた乾式灰化容器の中で最も軽いため容器重量差からくる灰分測定の誤差を極めて小さくすることができた。アルミニウム箔カップ乾式灰化法は、この灰分の定量に続いて、無機元素の定量の前処理を行なうことができる。

ヒ素定量法の前処理に硫酸-硝酸を用いる湿式分解よりも硝酸-硫酸-過塩素酸の三種の混酸が有効であり、第七章で明らかにしたように、ヒ素化合物の化学形を解明する前の初期研究の一助とすることができた。

希塩酸抽出法は、四訂成分表の作成にあたって、ナトリウムとカリウムの測定に全面的に採用されたが、著者らの検討によって、穀類、果樹葉、海藻等の植物性試料中のマグネシウム、カルシウム、亜鉛、マンガン、銅の測定の前処理にも適用できることが明らかになった。さらに、引き続いての検討で、3%塩酸80°C加温抽出法が大豆及び大豆製品、動物性食品に適用できることが分かった。又、試料によっては鉄の定量も可能であることが分かってきた。実際の定量にあたっては、試料及び測定元素に応じて、これらの前処理法から最適のものを選択する必要がある。

また、試料溶液の直接噴霧によるフレイム原子吸光法では、化学干渉はほとんど観察されないが、アセチレン-空気フレイムで干渉が顕著であるカルシウムの定量法を検討し、リン酸とマグネシウム

による干渉を除去するために、P/Caの比に応じて干渉除去剤の種類と濃度を変えて適用できることを明らかにした。四訂成分表におけるカルシウムの定量は、試料の乾式灰化塩酸溶液からシユウ酸塩として沈殿分別後、過マンガン酸カリウム標準溶液で滴定する方法を採用し、カルシウム含量がかなり微量で、かつリン酸含量の少ない、砂糖、甘味料、油脂類などに干渉除去剤添加原子吸光法を適用しているが、筆者らの検討により、多量の食塩添加食品を除き、ほとんどの食品に干渉除去剤添加-原子吸光法を適用できることになった。

さらに現在、原子吸光法と並んで誘導結合プラズマ発光分析法が一般化してきたが、この方法の適用についても可能性が大きいことが分かりつつある。

無機元素定量の他の前処理法として、加圧湿式分解法が急速に発展してきている。ステンレス製の外筒を持ったテフロン容器を用いる方法は、外部からの汚染がない、揮発性元素の損失が防げるなどの長所を持っている。さらに、マイクロ波加熱を利用するためにマイクロ波透過性の樹脂外筒を持つテフロン容器を用いる方法は、分解時間の短縮を可能にしている。しかし、分解できる試料量が多くて500mgと限定される。著者らもこの分解法を検討して、比較的均一な試料においては100~200mgの試料で良い結果が得られるが、食品試料の場合、試料の不均一性が大きいため、多量の試料量が必要な場合が多く、この方法が適用できないことも考えられ、従来からの方法と相補的に使用されることになると考えられる。

ひとつの方法ですべての食品、すべての成分の測定に対応できる前処理法は不可能であるので、食品のマトリックス、測定対象無機

元素及び測定法に応じた前処理法を、整理し、まとめていくことが重要であると考えている。

我が国で、食品中の栄養成分あるいは品質に関わる成分の測定法として公定法と考えられるものに、「JAS分析試験ハンドブック・食物編」に記載された方法あるいは「衛生試験法・注解」の飲食物試験法に記載された方法などがある。しかし、必ずしもクロスチェック試験が行なわれて、室間での再現性が評価されているわけではない。クロスチェック試験ができる態勢の整備、方法をオーソライズできる機関の設置など多くの問題があるが、これらの段階を経た上での食品分析法の基準化、公定法化が必要であると考えられる。

現在、食品成分の機能性、特に第三機能としての体調調節機能が注目されているが、従来から無機質及びビタミンは体調調節因子として働いてきた。そして、無機元素もその化学形態によって、有効性や毒性が大きく異なることが分かってくるにつれて、分別定量が必要となってきた。著者は、海産物中にはヒ素が高濃度で含まれているにもかかわらず、ヒ素による中毒例が報告されていないことに注目し、海産物中のヒ素の分別定量を検討した。Lundeらの方法による分別蒸留法を追試したが成功せず、又、6.6N塩酸溶液からの蒸留という苛酷な条件は化学形の変換分解の可能性もある。このため、新しい方法を検討し、無機態の3価のヒ素が高濃度の塩酸溶液からトルエンに抽出されることを利用した方法を確立した。この方法を日本人特有の食品である海産物試料に適用したところ、サメ筋肉及び海藻（アラメ、カジメ、ワカメ）中のヒ素は、その90~100

%が有機態であったが、ヒジキ中のヒ素は他の海藻と異なり50%以上が無機態であった。ヒジキ中のヒ素の多量成分が無機態であることを示した報告はこれが世界で最初のものである。この分別定量は、食品中のヒ素の質的な評価の日本における最初のものであり、さらに、生物による海洋中におけるヒ素の循環代謝の解明の端緒とすることができた。

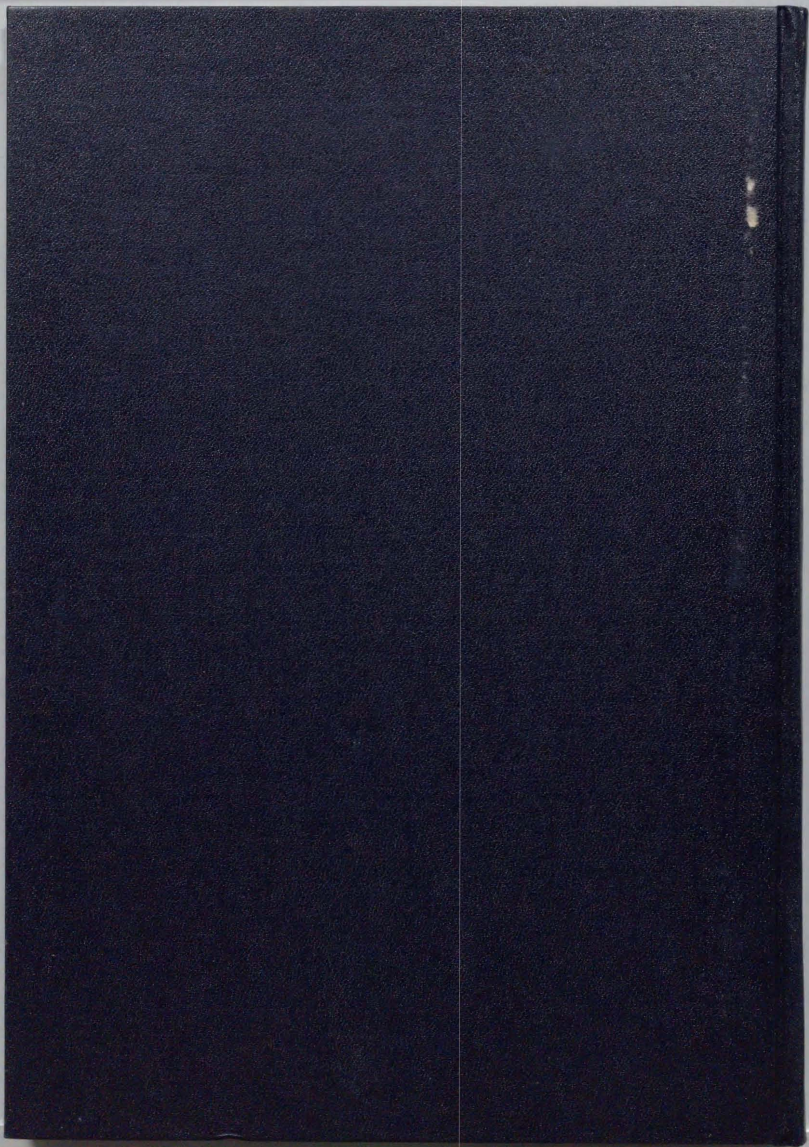
今後は、さらに他の元素の分別定量法の確立から、それらの成分の食品として、及び生物栄養の有効性を評価するための *in vitro* 法の開発が必要である。

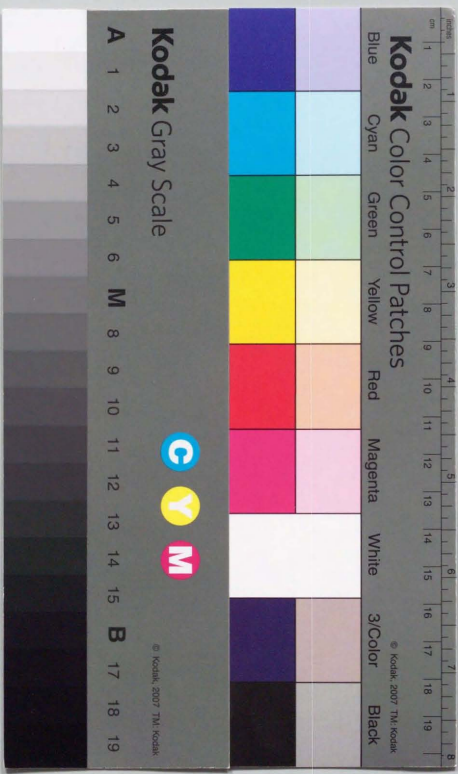
第一章の表 1-1に示したように、アメリカ合衆国に比して日本の栄養所要量が決められている元素の数は限られており、今後未決定の元素についての検討が急務である。現在、四訂成分表のフォローアップとしての無機質のマグネシウム、亜鉛、銅の成分表作成の作業が進められており、著者もこれに参加しているが、この成分表が発表された後に、これらの栄養所要量が決定されと考えられる。我が国の食品標準成分表の無機質とビタミンの収載項目は限られており、今後充実させていくことが望まれている。しかし、成分表の作成については予算面で厳しい状況が続いており、科学技術庁を中心に厚生省、農林水産省の一層の努力が必要である。

成分表の作成、栄養所要量の設定等の作業を効率的に推進して行く上で、信頼できる定量法を確立しておくことは、必須であり、今後益々重要になると考えられる。

このような意味において、本論文にまとめた食品分析法は、食品総合研究所の主要研究課題である「食品分析法の確立と基準化」全

体から見ると、ほんの一部分ではあるが、タンパク質評価のための窒素定量法及び無機元素の定量法の確立に寄与することができ、さらに将来の食品分析法の方針を示唆できたことは本論文の著者として喜びとするところである。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak