

7 キャッサバ中のシアン化水素の吸光光度計（ピリジン・ピラゾロン法）による定量法

甲斐 茂浩*, 白澤 優子*

Determination of Hydrogen cyanide in Cassava by Absorptiometric Analysis

Shigehiro KAI* and Yuko SHIRASAWA*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Sapporo Regional Center)

An analytical method for determination of hydrogen cyanide in cassava by using spectrophotometer was developed.

After acidified with citric acid buffer solution, the samples were incubated for 4 hours at 25~30°C. The cyanogenic glucoside was hydrolyzed to free cyanide, collected with steam distillation, and colored by pyridine-pyrazolone method. Hydrogen cyanide was determined by spectrophotometer.

A recovery test was conducted with cassava at spiked with cyanide ion at 0.5 and 4 mg/kg. The mean recoveries of hydrogen cyanide cassava were 79.0~90.0% and the relative standard deviations (RSD) were within 15.0%.

A collaborative study with two samples of cassavas with different concentration of hydrogen cyanide (samples A and B) was conducted in 8 laboratories. For sample A, the mean value of hydrogen cyanide was 3.18 mg/kg, and the repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were 8.0% and 9.6% respectively. For sample B, these values were 3.18 mg/kg, 8.0% and 15% respectively.

Key words: シアン化水素 hydrogen cyanide ; キャッサバ cassava ; ピリジン・ピラゾロン法 pyridine-pyrazolone method

1 緒 言

キャッサバ (Cassava = *Manihot* spp.) は、東南アジア、アフリカ、中南米などの熱帯地方に広く栽培されておりタピオカとも呼ばれ根塊が飼料として利用される。キャッサバは有毒なシアン化合物が配糖体として含まれているが、その含量は、原料の品種、栽培条件、加工処理の条件等により大きく変動するといわれている¹⁾。

キャッサバ等に含まれるシアン配糖体がそしゃくや消化の段階で、分解酵素の働きによりシアンが産生されることにより、しばしば家畜の中毒の原因となっている²⁾。

現在、キャッサバ中のシアン化水素の定量法としては、試料中のシアン化合物を弱酸性下で加水分解し、生成するシアン化水素を水蒸気蒸留してアルカリ液に捕集し、硝酸銀標準液で滴定して求める方法（以下「現行法」という）が飼料分析基準³⁾に記載されている。しかしながら一般的に硝酸銀滴定法でシアン化水素の定量を行う方法は、検出感度と定量精度が低いことが指摘^{4)~6)}されている。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

今回、JIS法^{7),8)}及び衛生試験法⁹⁾等で広く採用されている吸光光度法（ピリジン・ピラゾロン法）を用いるシアン化水素の定量法を基に分析法の検討を行ったので、その概要を報告する。

2 分析方法

2.1 試料

市販のキャッサバ（Table 1）を1 mmの網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

Table 1 Test samples in this study

Sample No.	Name	Country of origin	Shape	pH ^{a)}
1	Tapioca	Thailand	---	4.7
2	CASSABA・P	Thailand	Pellet	5.2
3	Tapioka Pellet	Thailand	Pellet	4.9
4	Tapioca	Thailand	---	5.2
5	Cassaba Pellet	Thailand	Pellet	4.6

a) Dissolved 10 g of sample in 100 mL of water, and measured pH

b) Shape was unidentified.

2.2 試薬

特記している試薬以外は特級を用いた。

1) 0.1 mol/L 硝酸銀標準液

硝酸銀 17 g を量って 1,000 mL の褐色全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えて 0.1 mol/L 硝酸銀標準液を調製し、次によりその濃度を標定した。この標準液は、褐色瓶に保存した。

塩化ナトリウム（標準試薬）（白金るつぼ中で 600°C で 50 分間加熱したもの）1.461 g を量って 250 mL の全量フラスコに入れ、水を加えて溶かし、更に標線まで水を加えた。この液 25 mL を三角フラスコに正確に入れ、水 25 mL 及びデキストリン水和物溶液（2 w/v%）5 mL を加えた。更にウラニン溶液（0.2 w/v%）数滴を加え、0.1 mol/L 硝酸銀標準液で黄緑の蛍光が消えて微紅色となったときを終点として滴定し、0.1 mol/L 硝酸銀標準液の濃度を標定した。

2) *p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン試液

p-ジメチルアミノベンジリデンロダニン 20 mg をアセトンに溶かして 100 mL とした。

3) シアン化物イオン標準原液

シアン化カリウム 0.626 g を量って 250 mL の全量フラスコに入れ、少量の水を加えて溶かし、水酸化ナトリウム溶液（0.5 mol/L）2.5 mL を加え、更に標線まで水を加えてシアン化物イオン標準原液を調製し、以下によりその濃度を標定した。

標準原液 100 mL を 200 mL の三角フラスコに正確に入れ、*p*-ジメチルアミノベンジリデンロダニン試液 0.5 mL を加えた。この液を 0.1 mol/L 硝酸銀溶液で溶液の色が黄色から赤になったときを終点として、滴定した。次式によりシアン化物イオン標準液の濃度 C (mg CN⁻/mL) を算出した。

$$C = \frac{a \times f \times 5.204}{100}$$

C : シアン化物イオン標準液 (mg CN⁻/mL)

a : 滴定に要した 0.1 mol/L 硝酸銀溶液 (mL)

f : 0.1mol/L 硝酸銀溶液の係数

4) シアン化物イオン標準液

シアン化物イオン標準原液 2.5 mL を 250 mL の全量フラスコに正確に入れ、水酸化ナトリウム溶液 (0.5 mol/L) 25 mL を加え、更に標線まで水を加えた。この液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ、標線まで水を加えて 1 mL 中にシアン化物イオンとして 1 µg を含有するシアン化物イオン標準液を使用時に調製した。この標準液の係数には、3) で求めたシアン化物イオン標準原液の係数を用いた。

5) クエン酸緩衝液

クエン酸一水和物 128.1 g 及び水酸化ナトリウム 64.4 g を水に溶かして 1,000 mL とした。使用に際して、この液の一定量を水で 10 倍に希釈し、その pH をクエン酸溶液 (2 w/v%) 及び水酸化ナトリウム溶液 (2 w/v%) で 5.9 に調整した。

6) リン酸緩衝液

リン酸二水素カリウム 3.40 g 及びリン酸水素二ナトリウム 3.55 g を水に溶かして 1,000 mL とした。

7) クロラミン T 溶液

クロラミン T 0.62 g を水に溶かして 50 mL とした (使用時に調製)。

8) ピリジン・ピラゾロン溶液

1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン 0.25 g を 75°C の温水 100 mL に溶かして室温まで冷却し (完全に溶けていなくても差し支えない)、ビス (1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン) 0.02 g をピリジン 20 mL に溶かした液をこの液に加えた (使用時に調製)。

2.3 装置及び器具

- 1) 分光光度計：日立製 U-3010 型 石英セル
- 2) 塩入・奥田式窒素蒸留装置
- 3) マイクロビュレット (10 mL 容)：柴田科学製
- 4) 恒温装置：東洋製作所製 THM062FA 型

2.4 定量方法

1) 試料液の調製

分析試料 10.0 g を量って 500 mL ケルダールフラスコに入れ、クエン酸緩衝液 100 mL を加え密栓した後、恒温装置を用いて 25~30°C で約 4 時間静置した。水酸化ナトリウム溶液 (2 w/v%) 25 mL を入れた受器を接続した水蒸気蒸留装置に連結し、留出液の液量が 100 mL に達するまで蒸留した。この時の留出速度は 2~3 mL/min とした。フェノールフタレイン溶液 (0.5 w/v%) 1 滴を留出液に加え、留出液を酢酸 (1+8) で中和した後、この液を水で 200 mL の全量フラスコに移し、更に標線まで水を加えて試料溶液とした。

2) 試料溶液の発色と測定

試料溶液 5 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、水 5 mL を加えて 10 mL とし、更にリン酸緩衝液 10 mL 及びクロラミン T 溶液 0.25 mL を加え、直ちに密栓して穏やかに混和した後 5 分間放置した。ピリジン・ピラズロン溶液 15 mL をこの液に加え、更に全量フラスコの標線まで水を加え、密栓して穏やかに振り混ぜた後、恒温装置を用いて 25~30°C で約 50 分間放置した。この液について、試料溶液の代わりに水を用いて試料溶液と同様に操作した液を対照液として、波長 620 nm の吸光度を測定した。

3) 標準液の調製、発色及び測定

シアン化物イオン標準液 0.5, 1, 2, 3 及び 4 mL をそれぞれ 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、水を加えて 10 mL とした。以下試料溶液と同様に操作した後、試料溶液の場合と同一条件で吸光度を測定した。得られた吸光度から検量線を作成し、試料中のシアン化物イオン量を算出し、この値に換算係数 1.03 を乗じて試料中のシアン化水素量を算出した。

3 結果及び考察

3.1 検量線

1 mL 中にシアン化物イオンとして 0.01, 0.02, 0.06, 0.1 及び 0.18 µg を含む各標準液を調製し、得られた吸光度から検量線を作成した。

その結果、検量線は 0.01~0.18 µg/mL の範囲で原点を通る直線性を示した。

3.2 添加回収試験

本法による回収率及び分析精度を確認するため、添加回収試験を行った。キャッサバ（2.1 の試料による）にシアン化物イオンとして 0.5 及び 4.0 mg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。なお、今回用いた試料はシアン化水素を自然に含有しているため、試料のブランク値を求めて補正を行った。

その結果、Table 2 のように平均回収率は 90.0% (0.5 mg/kg 相当量添加時) 及び 79.0% (4.0 mg/kg 相当量添加時) であり、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 15% 以下であった。

Table 2 Recovery test of cyanide ion

Spiked level (mg/kg)	Recovery (%)	Quantitative value (mg/kg)
0.5	90.0 ^{a)} (9.3 ^{b)})	3.69 ^{c)} (3.24 ^{d)})
4	79.0 ^{a)} (15 ^{b)})	6.56 ^{c)} (3.40 ^{d)})

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation (RSD)

c) Spiked sample (Mean recovery: $n=3$)

d) Not spiked sample (Mean recovery: $n=3$)

3.3 定量下限及び検出下限

本法による定量下限及び検出下限を確認するため、低濃度における繰返し試験を実施した。

シアン化水素として約 8 mg/kg 含有する試料を、7 回繰返して加水分解及び蒸留し、各留出液について、検量線上の最低濃度（シアン化物イオンとして 0.01 µg/mL 相当）付近になるよう希釈した後、それぞれ発色及び測定した。

その結果、平均値は、0.0087 $\mu\text{g/mL}$ 、標準偏差は0.0011 $\mu\text{g/mL}$ (RSD 13%)であったことから、本法の定量下限及び検出下限は、得られた標準偏差のそれぞれ10倍及び3.3倍に相当する濃度を求め試料中濃度に換算して、2.0 mg/kg 及び0.7 mg/kg と見積もられた。

3.4 現行法との比較

本法及び現行法の試験成績を比較するために、供試したキャッサバ5点について、現行法及び本法によりシアン化物イオンを定量した。その結果は Table 3 のとおりであり、分析値に有意な差は認められなかった。

Table 3 Comparison of quantitative value of hydrogen cyanide by two methods

Sample No.	This method	(mg/kg)
		Existing method (Titration by silver nitrate solution)
1	8.5	8.5
2	9.7	10.7
3	3.9	3.2
4	10.8	7.2
5	6.2	5.3

3.5 共同試験

本法の再現精度を調査するため、キャッサバ(試料 A 及び B)を用いて、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、全国酪農業協同組合連合会分析センター、独立行政法人肥飼料検査所(現(独)農林水産消費安全技術センター)本部、同札幌事務所(現 同札幌センター)、同仙台事務所(現 同仙台センター)、同名古屋事務所(現 同名古屋センター)、同大阪事務所(現 同神戸センター大阪事務所)及び同福岡事務所(現 同福岡センター)の8試験室において本法に従って共同分析を実施した。

その結果は、Table 4 のとおり、キャッサバ(試料 A)の繰返し精度及び室間再現精度は、相対標準偏差(RSD_r 及び RSD_R)として8.0%及び9.6%であり、HorRatは0.82であった。また、キャッサバ(試料 B)の繰返し精度及び室間再現精度は、相対標準偏差(RSD_r 及び RSD_R)として8.0%及び15%であり、HorRatは1.1であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した分光光度計の機種を Table 5 に示した。

Table 4 Collaborative study results

Laboratory No.	(mg/kg)			
	Sample A		Sample B	
1	7.05	8.12	2.75	2.36
2	8.92	6.97	2.58	3.05
3	8.10	8.19	2.85	3.03
4	8.07	8.07	3.34	2.92
5	7.40	7.70	3.17	3.72
6	9.62	9.57	3.15	3.15
7	10.01 ^{c)}	7.24 ^{c)}	4.10	3.86
8	8.08	8.20	3.26	3.55
Mean value (mg/kg)	8.15		3.18	
RSD _r ^{a)} (%)	8.0		8.0	
RSD _R ^{b)} (%)	9.6		15	
HorRat	0.82		1.1	

a) Relative standard deviation of repeatability

b) Relative standard deviation of reproducibility

c) Data excluded by Cochran test

Table 5 Instruments used in the collaborative study

Laboratory No.	Spectrophotometer	
1	Shimadzu	UV-240
2	Shimadzu	UV-mini1240
3	Shimadzu	UV-mini1240
4	Hitachi	U-1000
5	Shimadzu	UV-1200
6	Shimadzu	UV-mini1240
7	Hitachi	U-3210
8	Hitachi	U-3010

4 まとめ

キャッサバ中のシアン化水素の吸光光度計（ピリジン・ピラゾロン法）による定量法について検討したところ、次の結果が得られた。

- シアン化物イオン標準液の検量線は 0.01~0.18 µg/mL の範囲で直線性を示した。
- キャッサバにシアン化物イオンとして 0.5 mg/kg 及び 4.0 mg/kg 相当量を添加し、本法により添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 79.0~90.0%、その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 15%以下の結果が得られた。
- 本法の定量下限及び検出下限は、それぞれ 2.0 mg/kg 及び 0.7 mg/kg と推定された。
- 本法と現行法（硝酸銀滴定法）との定量値を比較した結果、有意差は認められなかった。
- シアン化水素の含有量の異なるキャッサバ A 及び B を用いて、8 試験室において本法による共同試験を実施した。その結果、キャッサバ A（平均定量値 8.15 mg/kg）の室内繰返し精度及び室内再現精度は、相対標準偏差（RSD_r 及び RSD_R）として 8.0% 及び 9.6% であり、HorRat は 0.82 で

あった。また、キャッサバ B (平均定量値 3.18 mg/kg) の室内繰返し精度及び室間再現精度は、それぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 8.0% 及び 15% であり、HorRat は 1.1 であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 堀井 聡, 阿部 亮, 森本 宏: 畜産試験場研究報告, 19, 63 (1969).
- 2) 飼料分析基準研究会編著: 飼料分析法・解説, 7-8 (2004). ((社) 日本科学飼料協会)
- 3) 農林水産省畜産局長通知: “飼料分析基準の制定について”, 平成 7 年 11 月 15 日, 7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 4) 近本武次, 米谷 武: 食衛誌, 25, 530 (1984).
- 5) 上田 工, 勝木康隆, 安田和男, 佐藤彌代子, 木村康夫: 東京衛研年報, 24, 269 (1972).
- 6) 勝木康隆, 安田和男, 上田 工, 直井家壽太: 東京衛研年報, 29-1, 261 (1978).
- 7) JIS K 0120: “工場排水試験法”, 127 (1998).
- 8) 環境庁水質保全局海洋汚染・廃棄物対策室監修: “産業廃棄物分析マニュアル”, 152 (1997). (日本環境測定分析協会)
- 9) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解”, 241 (2000). (金原出版)