

2-2 牛乳中のカルシウムの分析

人間がカルシウムを摂取する上で牛乳は非常に効率がよく、普通牛乳には 100 g あたりおよそ 110 mg 程度のカルシウムが含まれている（日本食品標準成分表）とされている。牛乳のカルシウムが効率よく人体に吸収されるのは、その多くがカゼイン（酸性で凝析するタンパク質）と結合した状態で存在しているからである。ここではキレート滴定法を用いて、カゼインを除いた牛乳（乳清。ホエー）中のカルシウムの定量を試み、カルシウムの溶存状態の一端に触れる。同時に溶液中のコロイドの安定性についても検討する。

キレート滴定はキレート試薬を用いて金属イオンを定量する滴定法であり、錯滴定とも呼ばれる。これは金属キレート化合物（金属多座配位子錯体）が安定であることを利用した滴定法である。キレート試薬としては EDTA（エチレンジアミン四酢酸）が最も広く用いられている。牛乳にはマグネシウムも含まれており、pH を調節してマグネシウムを沈殿分離するなどして、キレート滴定でマグネシウムとカルシウムを分離定量する手法もあるが、マグネシウム含量がカルシウムの 1/10 程度なので、ここではカルシウムとマグネシウムの合量を、カルシウム量として扱うことにする。

2-2-1 試料溶液・試薬の調製

<概要>

牛乳に塩酸を加えて pH を下げ変性させた後、水酸化カリウムを加えて pH を上げてカゼインを凝析・分離した試料と、酢酸を加えてカゼインを凝析・分離した試料とを用意する。カゼインの等電点は pH 4.6 程度で、pH が 4.6 程度になると凝析・分離が起きる。なおここで凝析するカゼイン成分はいわゆるカッテージチーズと言われるものに相当する。

<試薬>

- (1) 1 mol/L 塩酸：用意してあるものをそのまま用いる。
- (2) 1 mol/L 水酸化カリウム溶液：用意してあるものをそのまま用いる。
- (3) 1 mol/L 酢酸：用意してあるものをそのまま用いる。
- (4) 0.01 mol/L EDTA 溶液
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物 ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ 、式量 372.24) 約 0.37 g を精密にはかり取り（資料編 I-6 参照）、イオン交換水に溶解しメスフラスコを用いて精確に 100 mL にする。
- (5) 塩化アンモニウム-アンモニア緩衝溶液（アンモニア緩衝溶液 pH 10.7）
塩化アンモニウム 6.75 g と 57 mL のアンモニア水にイオン交換水を加えて、全量を 100 mL としたもの。（実験 1-2 で調製したもの）
- (6) 0.01 mol/L 塩化亜鉛溶液：用意してあるものをそのまま用いる。

<操作>

- (1) 2つのビーカーにそれぞれ 10 g 程度の牛乳を 0.01 g まで精確に取り、それぞれ水を約 20 mL 加えて希釈する（A、B とする）。

- (2) Aには1 mol/L塩酸を2 mL加えて振り混ぜ10分程度静置した後、カゼインの凝析・分離が起きるまで振り混ぜながら1 mol/L水酸化カリウム溶液を加える(約1.5 mL程度必要)。しばらく静置して清澄な上澄みが生じないようなら水酸化カリウム溶液を追加する。簡易型pH計でpHを測定し、pHが4~5になっていることを確認する。
- (3) Bには1 mol/L酢酸を1 mLを加えて振り混ぜ静置する。しばらく静置して清澄な上澄みが生じることを確認し、簡易型pH計でpHを測定する。
- (4) A、Bそれぞれについて、凝析したカゼインをキッチンペーパーを用いて漉しとる。凝析したカゼインを20 mL程度の水で洗浄し、洗液を合わせて、メスフラスコを用いて精確に100 mLにして、試料溶液AとBとする。

2-2-2 牛乳中のカルシウムの直接滴定

<概要>

牛乳中にはカゼイン以外にもリン酸等が溶存し、カルシウムと錯体を形成している。このため錯形成していないカルシウムとEDTAの反応が一端当量に達し、EBT指示薬が赤色から青色に変色しても、錯体からのカルシウム溶出が起きる結果、徐々に赤色を呈するようになる(復色)。このため精確な滴定値を得るのは困難である。ここではこの現象を確認し、おおまかな当量点を得る。したがってホールピペットやビュレットを使用した精確な操作は必要ない。

<操作>

- (1) 溶液A(Bでもよい)を約10 mLコニカルビーカーに取り、その重さを0.01 gまで精確にはかった後、イオン交換水10 mL程度加える。ここに塩化アンモニウム-アンモニア緩衝溶液約1 mL、EBT指示薬を数滴加える(注1)。
- (2) コニカルビーカーを天秤において重さをはかり、駒込ピペットを用いて0.01 mol/L EDTA溶液を溶液の赤みが消えるまで振り混ぜながら滴下して、所要量を求める。
- (3) しばらく静置して色の変化を見て、赤みが出てきたら赤みが消えるまでEDTA溶液を加える。この操作を1、2回行う。

(注1) Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンが存在するとEBTとの錯形成により溶液は赤紫色を呈する。EDTAと Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンとのキレートは無色で、EBT- Ca^{2+} 、EBT- Mg^{2+} 錯体より安定である。資料編V-20 <金属指示薬>参照。。

2-2-3 牛乳中のカルシウムの逆滴定

<概要>

試料溶液に過剰量のEDTAを加えてしばらく置き、種々の溶存状態のカルシウムとEDTAのキレート生成反応が完結した後、過剰のEDTAの量を塩化亜鉛溶液で滴定することで、試料溶液中のカルシウム量を得る。この滴定では、塩化亜鉛溶液の滴下とともに赤みが出現するところが滴定終点となることに注意する。

<操作>

- (1) ビュレットに 0.01 mol/L 塩化亜鉛溶液を入れる。
- (2) 【空滴定】 0.01 mol/L EDTA をホールピペットを用いて精確に 10 mL コニカルビーカーに取り、イオン交換水を 20 mL 程度加え、塩化アンモニウム-アンモニア緩衝溶液約 1 mL、EBT 指示薬を数滴加えて、塩化亜鉛溶液で滴定する。
- (3) 【試料溶液の滴定】 溶液 A をホールピペットを用いて精確に 10 mL コニカルビーカーに取り、イオン交換水を 10 mL 程度加える。
- (4) ここに 0.01 mol/L EDTA 溶液をホールピペットを用いて精確に 10 mL 加えた後、塩化アンモニウム-アンモニア緩衝溶液約 1 mL、EBT 指示薬を数滴加えて塩化亜鉛溶液で滴定する。
- (5) 同様にして溶液 B の滴定を行う。

<検討：牛乳中のカルシウム>

- (1) 逆滴定の結果から、塩酸で処理した場合(A)、酢酸で処理した場合(B)、それぞれについて牛乳中のカルシウム量（カルシウムとマグネシウムの含量）を評価せよ。
- (2) 元の牛乳に EDTA を加え、カルシウムを EDTA キレートにしたらどうなるか試してみよ。
- (3) 牛乳と混ぜるだけで、ゼリー状のものになるというペクチンを含むフオーチェという食品がある。実際に牛乳と混ぜてゼリーを作り、そこに EDTA 二ナトリウムの固体を数%オーダー加えた時にどのような変化が起きるか調べてみよ。また塩化カルシウムを使ったらどうか？

2-2-4 コロイド粒子の電荷の反転

<概要>

牛乳のカゼインの凝集は、カゼインの持つ電荷が中和される pH（等電点）付近で起きる。同様の現象は難溶性塩のコロイドでも見られ、塩化物イオンを硝酸銀溶液で滴定する沈殿滴定の終点判定にも利用されている（Fajans 法）。塩化銀の沈殿は塩化物イオンが過剰な状態では負に帯電し、銀イオンが過剰な状態では正に帯電することが知られている。ここでは定性的なレベルで、塩化物イオンの溶液に硝酸銀溶液を滴下した時の塩化銀の沈殿の様相の変化と、沈殿へのフルオレセインの吸着挙動の変化を調べる。

<試薬>

- (1) 0.1 mol/L 塩化ナトリウム溶液：用意してあるものをそのまま用いる。
- (2) 0.1 mol/L 硝酸銀溶液：用意してあるものをそのまま用いる。
- (3) 0.2 %フルオレセイン溶液：用意してあるものをそのまま用いる。

<操作>

- (1) 試験管に 0.1 mol/L 塩化ナトリウム溶液を 0.5 mL 取り水を 2 mL とフルオレセイン溶液を 1 滴加える。
- (2) 振り混ぜながら 0.1 mol/L 硝酸銀溶液を滴下して、溶液の変化を観察する。

<検討：塩化銀の沈殿生成>

- (1) 硝酸銀溶液の滴下とともに、塩化銀の沈殿がミルクのような白濁した状態から、凝集した沈殿になり、フルオレセインが赤く呈色するようになることを確認せよ。
- (2) 一端硝酸銀を加えて、赤みを帯びた塩化銀の沈殿ができた状態で、塩化ナトリウム溶液を滴下していくとどうなるか調べてみよ。