

## 2・6-キシレノール比色法による食品中の硝酸イオンの定量

宮本 文夫 永田 知子 佐伯 政信

## Colorimetric Determination of Nitrate in Foods by Use of 2・6-Xylenol

Fumio MIYAMOTO, Tomoko NAGATA and Masanobu SAEKI

## Summary

Colorimetric method for the determination of nitrate in foods by the use of 2・6-Xylenol was studied and modified.

Nitrate in foods were extracted with alkaline water containing zink sulfate and filtrated. Interfering chloride and nitrite ions in the test solution were removed with silver sulfate and sulfamic acid, and the latter was reacted with 2・6-Xylenol in the presence of sulfuric acid. Reaction product (4-Nitro-2・6-Xylenol) was extracted with benzene and 1% sodium carbonate solution, showing the absorbance at 432 nm.

Recoveries of nitrate from several foods at 2.5~200 ppm  $\text{NO}_3\text{-N}$  were 78~129 %.

Measured contents of nitrate in several foods by the method proposed above were compared with those obtained by the cadmium column and sodium salicylic acid method, and the values of the proposed method approximately agreed with those of the former method.

## I 緒言

食品や飼料中の硝酸イオンは乳幼児や家畜(牛, 羊)等での硝酸塩中毒<sup>1)</sup>の原因となるばかりでなく, ガン原性を有するニトロソ化合物の前駆体<sup>2-4)</sup>としても注目されている。

食品中の硝酸イオンの分析法は数多く報告<sup>5-10)</sup>されているが, 簡便な方法は精度が低い場合が多く, 精度の高い方法は煩雑さを伴う場合が多い。日常検査で用いる分析法は簡便かつ正確であるとともに, 広範囲な食品への適用性を持つことが望ましい。

堀尾らによって報告された2・6-キシレノール比色法は簡便であり, 精度も良好な方法であるが, 塩素イオンや亜硝酸イオンの含有量の高い食品への適用例は報告されていない。

著者らは従来の2・6-キシレノール比色法を基に, 多くの食品への適用と微量測定が可能な方法に改良した。

さらに, 硝酸イオンの分析法として確立しているカド

ミカラム法<sup>5)</sup>及びサリチル酸法<sup>7)</sup>との比較を試みたので, それらの結果についても報告する。

## II 実験方法

## 1. 試料

みりん干し, 煮干し, あじ干物, ソーセージ, ロースハム, ベーコン, ハム原料肉, チーズ, 粉乳, すいか, トマト, なす, キャベツの市販品13品目を用いた。

## 2. 試薬及び試液

硫酸, 硫酸銀及びその他の試薬はすべて特級品を用いた。

10%酢酸アンモニウム緩衝液: 酢酸アンモニウム100gを水800mlに溶解し, 10%アンモニア水でpH 9に調整した後水を加えて全量を1ℓとした。

10%2・6-キシレノール溶液: 2・6-キシレノール1gをエタノールで溶解し10mlとした。

15%硫酸銀溶液: 硫酸銀15gを硫酸に溶解し, 100mlとした。

2%スルファミン酸溶液: スルファミン酸2gを10%硫酸で溶解し, 100mlとした。

## 2・6-キシレノール比色法による食品中の硝酸イオンの定量

硝酸性窒素標準溶液：硝酸カリウムを110°Cで4時間乾燥した後、その0.722gを精密に量り、水に溶解して1ℓとした。この溶液10mlに水を加えて100mlとし、さらにその液20mlをとり、10%酢酸アンモニウム緩衝液10ml及び水を加えて100mlとした。この標準溶液は2μg NO<sub>3</sub>-N/mlである。

### 3. 装置

分光光度計：(株)日立製作所製181型

二波長分光光度計：(株)日立製作所製557型

### 4. 定量方法

#### 1) 測定溶液の調整

試料を細切し、充分混和した後、10gを秤取し、80°Cの温湯50mlを加えホモジナイズした。これを100mlメスフラスコに移し、0.5N水酸化ナトリウム溶液10mlを加え、振とうした後、12%硫酸亜鉛溶液10mlを加えた。80°C20分加温した後、冷却し、10%酢酸アンモニウム溶液10mlと水で100mlとした。内容物をろ過(ろ紙No.5Cを用いる)し、その5mlあるいは1mlに水4mlを加えたものを50ml比色管にとる。それに2%スルファミン酸溶液0.2mlを加え、10分間放置した。さらにそれに15%硫酸銀溶液2mlを添加して20分間放置した。濃硫酸5mlを水で冷却しながらこれに滴下し、10%2・6-キシレノール溶液0.2mlを加える。40°C水浴中で30分間加温反応させ、水浴してベンゼン25mlを加える。それらの溶液を充分振とうした後、ベンゼン20mlを分取して、それを1%硫酸溶液で洗浄した。そして、ベンゼン層に1%炭酸ナトリウム溶液5mlないし25mlを加え、振とうして炭酸ナトリウム層を取り、それを測定溶液とした。

#### 2) 定量

##### (1) 吸光光度法による定量

硝酸イオン標準溶液から得た測定溶液の極大吸収波長の吸光度を測定した。試料から調整した測定溶液の吸光度を測定し、両者の吸光度を比較することによって、試料中の硝酸イオン濃度を算出した。

##### (2) ベースライン法による定量

標準溶液から得た測定溶液の極大吸収波長の吸光度E<sub>1</sub>及び極大吸収波長±20nmの吸光度E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>を測定し、それらの吸光度からΔEを下記の式により算出した。

$$\Delta E = E_1 - \frac{E_2 + E_3}{2}$$

試料から得た測定溶液のΔEを求め両者のΔEを比較することによって、試料中の硝酸イオン濃度を算出した。

##### (3) 微分分光光度法による定量

標準溶液から得た測定溶液の1次微分スペクトル(Δλ=5nm)を測定し、その長波長側のピークにおける極大

吸収波長の吸光度E<sub>1</sub>及び極大吸収波長±30nmの吸光度E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>を求め、それらの値からΔE'を下記の式により算出した。

$$\Delta E' = E_1' - \frac{E_2' + E_3'}{2}$$

試料から得た測定溶液のΔE'を求め両者のΔE'値を比較することによって、試料中の硝酸イオン濃度を算出した。

## III 結果及び考察

### 1. 呈色試薬の検討

硝酸イオンの発色は、2・6-キシレノールの他にもサリチル酸ナトリウム<sup>7)</sup>、チモール<sup>11)</sup>及びパラオキシ安息香酸等でもおこることから、各呈色試薬を用いた場合の吸光度を比較した。標準溶液5mlに各呈色試薬2%溶液0.5mlを加え、硫酸を添加し、40°Cで30分間反応させ、それをクロロホルムと1%水酸化ナトリウム溶液で抽出し、各々の反応生成物の極大吸収波長の吸光度を測定した。

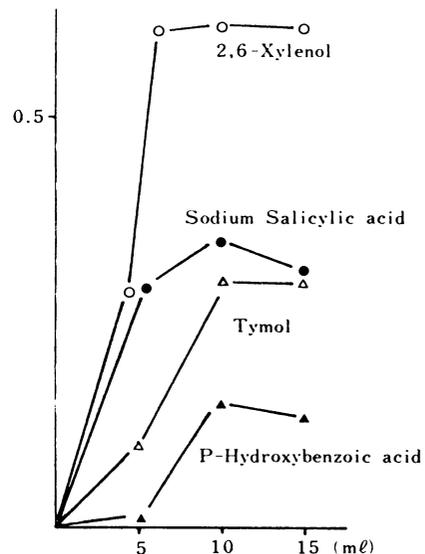


Fig. 1. Absorbance of the reaction product of nitrate with several kinds of reagent. NO<sub>3</sub>-N: 10 μg

結果はFig. 1に示したように2・6-キシレノールが最も吸光度が高かった。この2・6-キシレノールの反応生成物の極大吸収波長は433nmであり、他の呈色試薬より長波長側に存在することから、食品由来の妨害スペクトルの影響を受けにくいことが考えられる。

反応に用いる硫酸は7ml以上で吸光度が一定したため、試験溶液5mlに対し7mlの硫酸を用いることとした。

2. 抽出溶媒

反応生成物の抽出溶媒として、9種の有機溶媒について適用性を検討した。標準溶液と2・6-キシレノールの反応液を各有機溶媒20mlと1%水酸化ナトリウム溶液で振とう、反応生成物を抽出し、その吸光度を測定した。

結果をTable 1に示した。n-ヘキサン、シクロヘキサン以外の溶媒が反応生成物を完全に抽出していると考えられたので、抽出溶媒は最も極性の小さいベンゼンを選定した。

Table 1. Effect of organic solvent on the extraction of reaction product.

Organic solvent	Absorbance
n-Hexane	0.10
Cyclohexane	0.14
Benzen	0.28
Toluene	0.29
Xylene	0.29
Isopropylether	0.29
Chloroform	0.29
Ethylether	0.29
Ethylacetate	0.30

NO<sub>3</sub>-N : 5 μg

3. 亜硝酸イオン及び塩素イオンの影響

食品の種類によっては亜硝酸イオンあるいは塩素イオンを多量に含む可能性がある。この両イオンは硝酸イオン定量時に妨害することが考えられるので、その影響度を調べた結果、Fig. 2のように亜硝酸イオンは正の妨害、塩素イオンは負の妨害を示した。

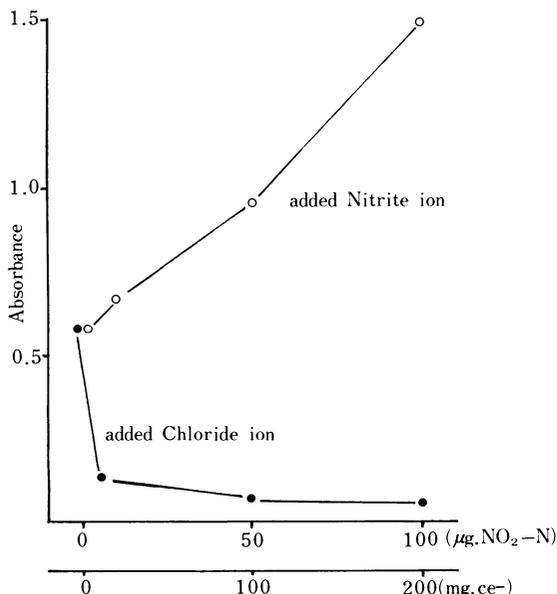


Fig. 2. Influence of nitrite ion or chloride ion on the absorbance. NO<sub>3</sub>-N : 10 μg.

4. 亜硝酸イオンの除去

除去試薬としてスルファミン酸を用い、その添加量と除去効果について調べた。2%溶液0.2 ml 添加で100~200 μg NO<sub>2</sub>-Nがほとんど分解し、硝酸イオンの発色に対する影響はほとんど認められなかったため、添加量は2% 0.2 mlとした。

5. 塩素イオンの除去

塩素イオンの影響を除去するため、堀尾<sup>6)</sup>らは硫酸銀を用いている。その場合、使用する硫酸銀量は塩素イオン量の多寡に左右されるため、多種の食品へ適用するには改良を必要とする。そこで、塩素イオン100mg (試料の塩化ナトリウム含量として16%に相当)を10 μg NO<sub>3</sub>-Nの硝酸イオンに添加し、塩素イオンの除去効果を検討した。堀尾らに準じて200~1000 mgの硫酸銀を添加し、除去効果を調べた結果、600 mg以上の硫酸銀の添加で塩素イオンの影響がなくなることがわかった。

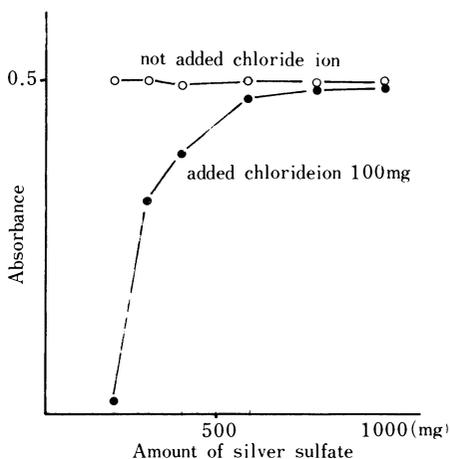


Fig. 3. Effect of the addition of silver sulfate on the interference of chloride ion.

100mgの塩素イオンに対応する硫酸銀は理論上300mgで充分であるが、600mgを必要としたのは塩素イオンとの反応が不十分なことが推測されたので、反応時間を20分としたところ、硫酸銀300mgで塩素イオンの影響は消失した。

6. 硫酸銀の発色への影響

Fig. 3における最大吸光度は、Fig. 1の最大吸光度と比較するとやや低く、硫酸銀の添加による吸光度の減少が考えられた。そこで、硫酸銀の添加による影響を調べたところ、無添加に比べて、10mg 添加では94%、70 mgでは91%、300 mgでは90%と添加量の増加に従い、吸光度が低下する傾向を示した。

硫酸銀の影響は添加する液量を少なくすることで、最小

## 2・6-キシレノール比色法による食品中の硝酸イオンの定量

限に抑え得ることがわかったので、15%硫酸銀2 mlを用いることとした。

また、呈色試薬添加の際、エタノールによって硫酸銀が析出し、これも、吸光度を低下させることが考えられたので、エタノール添加量を0.5 mlから0.2 mlに変えたところ、Fig. 1の最大吸光度に、より近い値が得られた。

### 7. 2・6-キシレノール量の発色への影響

2・6-キシレノールの量が発色に影響することが考えられたので、10 mgと20 mgについて比較した。その結果、20 mgの添加が吸光度も高く、再現性も良好であったので試薬量は20 mg (10%液 0.2 ml)とした。

### 8. 食品への適用

以上の実験結果を検討した後、著者らが改良した方法により食品中の硝酸イオンを分析したところ、糖質を多く含有する食品では、妨害スペクトルが生じることがわかった。その妨害スペクトルは反応後、直接ベンゼンで抽出、ベンゼンから1%炭酸ナトリウム溶液で反応生成物を抽出する方法を用いた結果、妨害スペクトルは消失した。

### 9. 食品への硝酸イオンの添加回収実験

魚介肉類及び野菜果実類13品目14試料について、硝酸イオン2.5~200 ppm  $\text{NO}_3\text{-N}$ を添加し、回収率を求めた。結果はTable 2に示したように、魚介肉類では77~129

%果実野菜類では98~126%であった。

測定方法は吸光度法を用いた。

Table 2. Recoveries of nitrate from several foods.

Sample	Added (ppm)*	Found (ppm)*	Recovery (%)
Sausage	0	8.08	
	5	14.53	129
Bacon I	0	6.62	
	5	11.47	97
Bacon II	0	3.48	
	5	8.88	108
Salted pork	0	13.08	
	5	18.68	112
Hum	0	18.84	
	5	24.89	121
Dried Japanese pilchard	0	6.26	
	5	11.66	108
Seasoned and dried Japanese pilchard	0	2.42	
	5	6.34	78
Dried horse mackerel	0	2.63	
	5	7.58	99
Cheese	0	5.61	
	5	9.46	77
Milk powder	0	3.42	
	5	8.77	107
Tomato	0	5.93	
	2.5	8.68	110
Watermelon	0	4.57	
	2.5	7.72	126
Cabbage	0	129.8	
	200	326.0	98
Eggplant	0	71.8	
	200	276.0	102

\*  $\text{NO}_3\text{-N}$  ppm

Table 3. Determination of nitrate in various foods by three methods.

Sample	2,6-Xylenol method			Cadmium column method		Sodium Salicylate method		
	a)	b)	c)	a)	b)	a)	b)	c)
	Absorbance method	Baseline method	Differential method	Absorbance method	Baseline method	Absorbance method	Baseline method	Differential method
Dried horse mackerel	2.6	3.7	3.9	3.7	4.2	N.D.	N.D.	N.D.
Sausage	8.1	7.8	8.5	7.4	8.2	0.3	N.D.	N.D.
Bacon	6.6	7.8	8.0	8.3	8.5	0.3	N.D.	N.D.
Hum	18.8	20.8	18.6	20.1	20.4	13.7	5.7	6.9
Cheese	5.6	5.9	6.1	6.3	6.4	0.7	N.D.	N.D.
Milk powder	3.4	2.1	3.1	2.0	1.8	16.9	N.D.	N.D.
Tomato	5.9	3.2	3.5	3.5	4.1	1.4	N.D.	N.D.
Watermelon	4.6	4.3	4.9	5.4	5.7	9.1	N.D.	N.D.
Cabbage	130	141	128	130	157	96	86	88
Eggplant	72	59	73	75	70	53	44	46

N.D. : non detect.

( $\text{NO}_3\text{-N}$  ppm)

a) Nitrate values were obtained by absorbance of measurement solution.

b) Nitrate values were obtained by the use of baseline technique for the spectrum of measurement solution.

c) Nitrate values were obtained by differential spectrum of measurement solution.

## 10. カドミカム法及びサリチル酸ナトリウム法との比較

同一試料について、著者らの改良法、カドミカム法及びサリチル酸ナトリウム法により分析し、定量値を比

較した。吸光度法の定量値の精度を確認するため、ベースライン法、微分光法も追加した。その結果をTable 3に示した。

改良法及びカドミカラム法では吸光光度法の値はベースライン法、微分分光法の値と近似しており、吸光光度法の値は信頼できるものと考えられる。サリチル酸ナトリウム法は、吸光光度法と他の方法の値に大きな差が見られ、吸光光度法の値は信頼し難い。

3つの分析方法の検出値は改良法とカドミカラム法においてほぼ一致していたが、サリチル酸ナトリウム法は他の2法に比べ、低い値を示した。

以上の結果から、改良法はカドミカラム法とほぼ同等であると考えられる。カドミカラム法はカラム調整が複雑であり、廃液処理にも問題があることから、改良法はカドミカラム法の代用法として適用可能と考えられる。

また、反応生成物(4-ニトロ-2・6-キシレノール)はガスクロマトグラフィー<sup>6)</sup>及び液体クロマトグラフィー<sup>12)</sup>でも定量確認が可能であり、より精度の高い分析も行うことができる。

#### IV 結論

食品中の硝酸イオンの比色定量法として2・6-キシレノールを用いる方法について検討した。

(1) 反応液からの精製に用いる抽出溶媒はベンゼンを用い、妨害イオンである亜硝酸イオン及び塩素イオンはスルファミン酸、硫酸銀の添加によりその影響を除いた。

(2) 2・6-キシレノール添加量は10%溶液0.2mlが良好であった。

(3) 食品を用いて分析法の適用性を検討した結果、反応液から反応生成物を直接ベンゼンで抽出、1%炭酸ナトリウム溶液で逆抽出することにより、食品由来の妨害物質を除去できた。

(4) 魚介肉類での硝酸イオンの添加回収率は5 ppm  $\text{NO}_3\text{-N}$ 添加で78~129%、野菜果実類での硝酸イオンの添加回収率は2.5及び200 ppm  $\text{NO}_3\text{-N}$ 添加で98~126%であった。

(5) カドミカラム法、サリチル酸ナトリウム法との比較では、本法はカドミカラム法と比較的一致した値を示し、また吸光光度法の値と他の測定法の値がほぼ一致していることから吸光光度法の値は信頼できるものと考えられる。

#### V 文献

- 1) 渡辺文男, 細谷貞夫, 久郷準, 野本貞夫, 新井則夫, 條原武昭(1973): 乳牛給与飼料中の硝酸塩について, 東京獣医学畜産学雑誌, 第19・20号: 154~162
- 2) 慶田雅洋, 津郷友吉(1969): 食品中のニトロソアミンについて, 食衛誌, 10: 59~67
- 3) 谷村顕雄(1971): 食品添加物と食品成分の反応-とくに亜硝酸塩について-, 食衛誌, 12: 277~281
- 4) 小田嶋成和(1974): N-ニトロソ化合物による発ガン研究の進歩, 15: 419~433
- 5) 原田基夫(1976): 肉製品中の亜硝酸, 硝酸イオンの定量, 食品衛生研究, 26: 1020~1034
- 6) 堀尾嘉友, 杉浦由紀子(1979): 2・6-キシレノールによる食品中の硝酸イオンの比色法またはガスクロマトグラフィーによる定量, 食衛誌, 20: 418~424
- 7) 川名清子, 和田裕, 高橋武夫, 上条昌弥, 浅倉倫子, 河村太郎, 菅野三郎(1971): サリチル酸ナトリウム法による食品中の硝酸根の定量法, 食衛誌, 12: 506~511
- 8) TOYODA, M., SUZUKI, H., ITO, Y., and IWAIDA, M. (1978): Gas-Liquid Chromatographic Determination of Nitrate and Nitrite in Cheese, Ham, Fish Sausage, Cod Roes and Salmon Rose, J. AOAC, 61: 508-511.
- 9) WU, W. S., and SASCHENBRECHER, P. W. (1977): Nitration of Benzen as Method for Determining Nitrites and Nitrates in Meat and Meat Product, J. AOAC, 60: 1137-1141
- 10) PFEIFFER, S. L. and SMITH, J. (1975): Nitrate Determination in baby Food using the Nitrate Ion Selective Electrode, J. AOAC, 58: 915-919.
- 11) 五十嵐繁(1976): チモールを用いる硝酸性窒素の比色定量, 分析化学, 25: 62~65
- 12) 功刀彰, 薦田裕, 呉地傳夫(1982) 高速液体クロマトグラフィーによる硝酸塩及び亜硝酸塩の分離定量法, 第43回日本食品衛生学会要旨: P.32