

## 亜硝酸根測定における酢酸アンモニウム溶液の使用

小林 淳<sup>1)</sup> 田中 守<sup>2)</sup> 池田啓一<sup>3)</sup> 杉山英男<sup>4)</sup>

(2018年9月28日受付, 2018年12月17日受理)

Use of ammonium acetate solution for nitrite measurement

Jun KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Mamoru TANAKA<sup>2)</sup>, Keiichi IKEDA<sup>3)</sup> and Hideo SUGIYAMA<sup>4)</sup>

(Received : September 28. 2018, Accepted : December 17. 2018)

## 要 旨

衛生試験法に従い亜硝酸根を測定する場合、食品からの抽出時に酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9) を使用する。この溶液は酢酸アンモニウムにアンモニアを添加しpHを調整する必要があり、用いる他の試薬と比べて煩雑性を伴う。またアンモニアは揮発性であるため、調製後保管中にも濃度・pH変化を引き起こす。さらに酢酸塩は環境微生物の栄養源となるため、室温での保管により細菌繁殖しやすい。これらの理由から調製した試薬は、長期間の使用に堪えない。そこで本研究では、酢酸アンモニウム緩衝液を酢酸アンモニウム溶液 (pH 6) で代用することについて検討した。その結果、試薬変更における測定データの変化は短時間での操作であれば特に認められないことがわかり、省力化に寄与すると思われた。

キーワード：抽出試薬, pH調節剤, 酢酸アンモニウム

## Abstract

When nitrite concentration is measured using health science analysis methods, ammonium acetate buffer (pH 9) is used for extraction from foods. As this solution requires ammonia to be added to ammonium acetate to adjust the pH, its preparation is complicated compared with the other reagents used. Because ammonia is volatile, it causes concentration and pH change even after preparation. So acetic acid serves as a nutrient source for environmental microorganisms, storage at room temperature may cause mold growth in the solution and deteriorate quality. For these reasons, the prepared reagent cannot withstand long-term use. In this study, we investigated the effects of swapping ammonium acetate buffer with ammonium acetate solution itself (pH 6). As a result, any difficulties in changing the reagent are not recognized, particularly if the operation is short. It seemed to contribute to labor saving.

Key words: extraction reagent, pH regulator, ammonium acetate

---

1) 高知県立大学健康栄養学部・教授・博士 Faculty of Nutrition, University of Kochi. Professor. Ph. D

2) 中部大学応用生物学部・講師・博士 College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University. Assistant Professor. Ph. D

3) 北陸大学薬学部・講師・博士 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University. Assistant Professor. Ph. D

4) 国立保健医療科学院生活環境研究部・客員研究員・博士 Department of Environmental Health, National Institute of Public Health. Visiting Researcher. Ph. D

## 緒言

亜硝酸ナトリウムは、食品添加物の中で発色剤に分類されている物質である。この化合物は、亜硝酸部分 (NO<sub>2</sub>, 以下、亜硝酸根と称する) が食肉中のヘモグロビン, ミオグロビンと結合し、鮮赤色を呈することから、食品に添加することにより見栄えを良くし新鮮であるかのように見せることが出来る。また病原性大腸菌O157やボツリヌス菌等の細菌繁殖を抑え、腐敗防止に役立つとの報告もある<sup>1-4)</sup>。一方、食品中のアミン類と結合して有毒なニトロソアミンを形成することやメトヘモグロビン血症の原因となることが知られており、また発ガンとの関わりも指摘されている<sup>5,6)</sup>。従って発色の効果を得るためには一定濃度以上の添加が必要である一方、過剰に添加することは人の健康を考える上で好ましくない。亜硝酸根の基準値は、ソーセージやハムなどの食肉加工品で0.07 g/kg以下、イクラや数の子などの魚卵では0.005 g/kg以下である。

食品中の亜硝酸根濃度の測定法は、公定法である衛生試験法において食品からの抽出法と抽出液中の定量法が規定されている<sup>7)</sup>。抽出に用いられる試薬は、硫酸亜鉛溶液、水酸化ナトリウム溶液と酢酸アンモニウム緩衝液であり、硫酸亜鉛と水酸化ナトリウムはコロイド状の水酸化亜鉛を形成し、表面に脂肪やタンパク質を吸着させて除去するために用いられる。酢酸アンモニウム緩衝液は、ろ液を一旦中和し後段の強酸性下の定量反応の妨害とならないために使用される。定量に用い

られる試薬は、スルファニルアミド溶液とナフチルエチレンジアミン溶液であり、それぞれジアゾ化反応とカップリング反応を行わせ、亜硝酸根量に応じて赤色のアゾ色素を生成させることにより亜硝酸根濃度測定を行う。これら5種の試薬の中で、酢酸アンモニウム緩衝液は調製に最も手間を要し、保存中にアンモニア揮散による濃度・pH変動の恐れがある。また冷蔵保存するならば、冷蔵庫がアルカリ蒸気で腐食するという問題も抱えることになる。さらに本試薬の液性は中性付近であり、高濃度の酢酸を含有するため、環境微生物の栄養源となりやすく、溶液の室温や冷蔵庫での放置が長いとカビなどの微生物繁殖が起き、特に注意が必要である。従って、本研究ではこれらの点を改善する為、酢酸アンモニウム緩衝液から調製がより簡便な酢酸アンモニウム溶液に変更することに関して検討を行った。

## 実験方法

### 1. 試薬

亜硝酸根測定用試薬として、スルファニルアミド溶液はスルファニルアミド (特級, 和光純薬工業製, 大阪) 0.5 gを塩酸 (1+1) 100 mLに溶解して調製した。ナフチルエチレンジアミン溶液は、N-(1-ナフチル)エチレンジアミン塩酸塩0.12 g (特級, 和光純薬工業製) を水100 mLに溶解して調製し、アルミホイルで遮光して保管した。亜硝酸根標準溶液は、亜硝酸ナトリウム (特級, 和光純薬工業製) 0.023 gを水50 mLに溶解したものを

Table 1 Samples used in this study

Sample No.	Meats included	Moisture <sup>*1</sup>	Package	Nitrite Indication <sup>*2</sup>
1	Chicken	Semi-dry	Vinyl bag	
2	Chicken	Wet	Pouch bag	
3	Beef	Wet	Can	○
4	Chicken, Beef	Wet	Pouch bag	○
5	Chicken, Beef, Fish extract	Semi-moist	Vinyl bag	

\*1: Depending on the moisture content, semi-dry and semi-moist are 25–35%; wet is about 35%.

\*2: Whether there is an indication of sodium nitrite as an additive in the package.

標準原液とし、これをさらに水で500倍希釈したものとした ( $0.6 \mu\text{g}/\text{mL NO}_2$ に相当)。酢酸アンモニウム溶液は、酢酸アンモニウム (特級, 和光純薬工業製) 10 gに水を加えて100 mLになるように調製した。この溶液のpHはおよそ6である。酢酸アンモニウム緩衝液は、酢酸アンモニウム10 gを90mLの水に溶かし、アンモニア (特級, ナカライテスク製, 東京) を加えてpH9に調整後、水で100mLにした。水酸化ナトリウム溶液は、水酸化ナトリウム (特級, ナカライテスク製) 2 gに水を加えて100 mLとなるように調製した。硫酸亜鉛溶液は、硫酸亜鉛七水和物 (特級, ナカライテスク製) 21.4 gに水を加えて100 mLとなるように調製した。水は、 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ に超純水製造装置で精製したものをすべての実験で使用した。

今回試料としては、性状の異なる市販のペットフード5種 (Table 1) を用いた。

## 2. 装置

恒温槽は、ThermoMinder SDminiN (Taitec, 埼玉) を使用した。分光光度計は、U-5100 (日立製作所, 茨城) を使用した。超純水製造装置は、Advantage (Merck-Millipore, Billerica, MA) を使用した。

## 3. 亜硝酸根の実試料からの抽出及び測定

衛生試験法2015年版を参考とし<sup>7)</sup>、前処理はその1/4, 測定は1/10のスケールで行った。試料約2.5 gを精密に計り取り、80℃の湯を少量加え乳鉢, 乳棒を使用してホモジナイズした。これを50 mLチューブに全量移した。ホモジナイズに使用した器具は湯で数回すすぎ、これもチューブに加えた。この時チューブ内の液量は約35 mLとした。これに水酸化ナトリウム溶液と硫酸亜鉛溶液を2.5 mLずつ加え、よく振り混ぜた後、80℃の恒温槽中で20分加温した。その後室温まで冷却し、酢酸アンモニウム緩衝液または酢酸アンモニウム溶液5 mLを加えてから、水を加えて正確に50 mLとした。内容物をよく混和した後、4℃, 3000 rpm,

5分間遠心した後、ろ紙 (アドバンテック東洋, 東京) を用いてろ過し、得られたろ液を試験溶液とした。

試験溶液2 mLにスルファニルアミド溶液0.1 mLを加えて混和し、次いでナフチルエチレンジアミン溶液0.1 mLを加えてよく混和後、波長540 nmの吸光度A1を測定した。また、ろ液自体の濁りを考慮するため、スルファニルアミド溶液, ナフチルエチレンジアミン溶液の代わりに水を用いたものの吸光度A0も測定した。[A1 - A0] で得られる吸光度を用いて、検量線より亜硝酸根濃度を求めた。検量線は亜硝酸根標準溶液を水で希釈し、亜硝酸根として0-0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当の溶液2 mLずつを、それぞれ試験溶液と同様に操作して作成した。なお酢酸アンモニウム溶液を用いた実験を今回は主に行い、酢酸アンモニウム緩衝液を用いた少数の実験結果と吸光度的に比較・考察することにした。

## 結果及び考察

### 1. 操作性の比較

酢酸アンモニウム緩衝液は、濃い酢酸アンモニウム溶液を調製後、pHを9に合わせるためにアンモニアの添加が必要であり、さらに容積を一定量に合わせる必要がある。前述したとおり、調製後の本試薬は中性付近のpHであり、また有機物を多く含むので (酢酸アンモニウム濃度として1.3M)、もし室温放置するとカビなどの微生物の栄養源として酢酸の濃度の減少とカビの溶液内増殖が認められやすい。またアンモニアが揮発性であるため、たとえ冷蔵であっても溶液pHが酸性に傾きやすいという欠点も有する。さらに冷蔵庫がアルカリ蒸気で腐食するという問題も抱える。これらを防止するためには、耐アルカリ蒸気性の冷蔵庫への保管が必要で、それでもアンモニアは揮発し続けるため、一定時間おきにpHを確認し必要ならアンモニアを追加してpHの再調整を要する。ろ液と混合後のpHは約8.3であり、弱アルカリ性だが (著者らの予備検討)<sup>7)</sup>、これは亜硝酸

根（ろ液中では亜硝酸イオン $\text{NO}_2^-$ ）がアルカリ条件の方が酸性条件よりも安定であるということに基づいていると考えられる<sup>8,9)</sup>。ただし後から定量するという意味では強酸性下のジアゾ-カップリング反応を阻害しないために、一旦中性以下にして発色反応を行う方がよいと思われる。

他方今回調製した酢酸アンモニウム溶液の濃度は1.3Mと同じで、pHが約6である。ろ液と混合した後のpHは7弱となった。

## 2. 反応性の比較

本研究では同一試料を用いたが、試薬が異なる場合に処理は別々に行い、発色後の吸光度で比較した。結果をTable 2に示す。酢酸アンモニウム溶液での操作は複数回行い、酢酸アンモニウム緩衝液での操作は1回のみ行った。すべてそれぞれ3重測定で行い、同時発色における吸光度の安定性は事前に確認済みである。酢酸アンモニウム溶液を用いて発色した際の吸光度の範囲は、酢酸アンモニウム緩衝液を用いた際の吸光度にほぼ含まれ、発色強度に明らかな違いは認められなかった。前者の吸光度に幅がみられるのは、試料として用いたペットフードが不均一であること、含まれる亜硝酸根量が少なく（添加物として加えられたのではなく、食品生産工程で0.2mg/kg程度生じたと考えられ）誤差が生じやすいこと、用いたその他の試薬の濃度や反応温度が日によって異なり反応性が異なったことによると考えられた。他の論

文において、我々はすでに酢酸アンモニウム溶液が使用可能であることを前提として実試料を用いた研究を行っており、特に問題は生じていない<sup>10)</sup>。先行研究で酸性条件下の分解について調査されており、pH2.6, 4.1, 6.5, 8.0の際の亜硝酸水溶液中の亜硝酸イオンの半減期がそれぞれ9, 24, 739時間及び $\infty$ であるという報告がある<sup>8)</sup>。ただしこれは0.3%溶液のみに基づいたデータで、マトリックスや緩衝液の組成が変わっても同じかどうかは不明であった。今回1回の操作全体にかかった時間は1日以内であり、酢酸アンモニウム溶液を加えてから発色させるまでにかかった時間は、長くても3時間以内であった。これは先に述べた様に、日常的に定めている操作時間内に含まれるため、試薬の保存安定性に比べるとほとんど問題とならないと考えられる。仮に試薬が劣化した場合、今回の酢酸アンモニウム溶液の方が再調製は非常に簡便で短時間で行えると言える。

今回同一試料であっても別々に処理を行った結果、得られたデータには日差変動を含んだ。今後さらに検討するためには、試料を均質化してから反応に用いたり、同じ日に行った反応溶液（ろ液）を途中から分配し酢酸アンモニウム緩衝液か酢酸アンモニウム溶液を添加して比較するなどの検討が必要かもしれない。これにより、今回問題と考えられる日差間で生じうる他の条件の影響を少なくして検討結果を得ることが可能になると思われる。

Table 2 Measured absorbance using different reagents

Sample No.	Ammonium acetate solution (pH 6)	Ammonium acetate buffer (pH 9)
1	0.0100-0.0389	0.0143
2	0.0457-0.1953	0.0446
3	0.1865-0.3596	0.2019
4	0.0337-0.0358	0.0318
5	0.0167-0.0197	0.0205



## まとめ

今回衛生試験法における亜硝酸根測定法で、抽出に用いられる酢酸アンモニウム緩衝液を酢酸アンモニウム溶液に変更することに関して検討した。その結果、日常的な操作として1日以内に測定が終了する場合には、亜硝酸根の分解は問題とならず発色に差は特に認められなかった。酢酸アンモニウム溶液の方が酢酸アンモニウム緩衝液よりも簡便に調製出来、ガス発生などによるpH変化も起こりにくく、利便性が高く省力化に帰すると考えられる。現在著者らは学生実習等への適用を考え、習熟していない学生自身に試薬を調製させることについて検討している最中である。これについては今後報告したいと考えている。

## 参考文献

- 1) 永田致治, 安藤則秀 (1971) 塩づけ剤, 調味料, リン酸塩および防腐剤が亜硝酸塩の挙動に及ぼす影響について—Cooked cured meat colorの発色に関する基礎的研究 (第1報) . 栄養と食糧, 24: 489-495.
- 2) 安藤芳明 (1981) ボツリヌス中毒およびその発生防止法をめぐる最近の問題点. 食品衛生学雑誌, 22: 455-461.
- 3) 中島英夫, 鮫島 隆, 山中洋之, 竹下和子, 秋山 茂, 鈴木 昭 (1989) ブイヨン及び豚挽肉中における亜硝酸ナトリウムと食塩の抗菌効果について. 食品衛生学雑誌, 30: 411-416.
- 4) 日置昭二, 加藤秀雄, 板谷 一, 島田謙一郎, 辰巳隆一, 西邑隆徳, 服部昭仁 (1997) ソーセージの品質特性に及ぼす亜硝酸塩および食塩の効果. 北海道大学農学部農場研究報告, 30: 55-60.
- 5) 酒井綾子, 谷村顕雄 (1971) 食品中のニトロソアミンに関する研究 (第1報) . 食品衛生学雑誌, 12: 170-176.
- 6) 谷村顕雄 (1972) ニトロソアミンと調理. 調理科学, 5: 19-25.
- 7) 日本薬学会 編 (2015) 亜硝酸～ジアゾ化法による定量～. 衛生試験法・注解 2015, 金原出版, pp.359-360.
- 8) 野田浩司, 峯本正夫, 江藤精二, 野田敦子, 松山賢治 (1984) 亜硝酸イオンの水溶液中における安定性ならびにウサギ血中からの消失. 薬学雑誌, 104: 409-412.
- 9) 伊藤和男, 山本信彦, 伊藤美都子 (1993) 調理による食品中の添加物の減少 (1) —ハム中の亜硝酸塩の減少—. 調理科学, 26: 27-29.
- 10) Jun Kobayashi, Keiichi Ikeda, Hideo Sugiyama (2018) Improving the Stability of Nitrite in Food Extracts. Jpn J. Food Chem. Safety, 25, 53-59.

