

食品中亜硝酸根の小スケール迅速分析法の検討

野村千枝* 吉光真人* 阿久津和彦* 尾花裕孝*

当所で実施する食品中の亜硝酸根 (NO_2^-) 濃度の比色検査において、これまで一部の高タンパク・高脂質試料(魚卵等)の抽出液が発泡・白濁する例が認められ、検査手順のろ過・定容操作の遅延化・煩雑化の要因となっていた。そこで、操作時間の短縮および試薬量の削減を目的としてディスポーザブル遠心管を用いる簡便迅速な前処理法について検討した。その結果、前処理法は従来法と比較して操作時間が約1/2に短縮、試薬量が1/4に削減されたことから、本迅速分析法は亜硝酸根検査の操作性の向上に有用であることが確認された。

キーワード: 食品、亜硝酸根 (NO_2^-)、比色法、小スケール法、ディスポーザブル遠心管

key words: food, nitrite, colorimetric method, small-scale method, disposable centrifugation tube

亜硝酸ナトリウムは食肉製品や魚卵等に発色剤の用途で使用が認められている食品添加物である。使用基準は亜硝酸根(亜硝酸イオン、 NO_2^-)としての最大残存量で、食肉製品では70 $\mu\text{g/g}$ 以下、魚肉ソーセージおよび魚肉ハムでは50 $\mu\text{g/g}$ 以下、いくらや筋子、たらこでは5.0 $\mu\text{g/g}$ 以下と定められている¹⁾。

亜硝酸根の分析は、食品中の亜硝酸塩を弱アルカリ性条件下で抽出し、除タンパク処理後、ジアゾ化による発色を利用した比色法により行うのが一般的である²⁻⁴⁾。当所においても、食品衛生検査指針(2003)³⁾に記載された亜硝酸根定量法を基にして栗津らが一部改良を加えた変法⁵⁾を用いて行政検査を実施している。

しかし従来の検査において、タンパク質・脂質が多い魚卵や食肉製品で、除タンパク処理不足による試料溶液への夾雑物の残存やろ過速度の低下が問題となる例が認められた。すなわち従来法では、ホモジナイズ抽出・除タンパク処理後、遠心分離し、上清を200 mL容のメスフラスコに移し水で定容した後、一部をろ紙

No. 5Cによりろ過し試験溶液としていたが、魚卵のように可溶性タンパクを多く含む発泡しやすい試料の場合、定容時にメスフラスコ内液上部の発泡層の厚さが5 mmを超え定容が困難になることが多かった。そのため、従前は定容前に泡が収まるまで20分間~1時間程度の静置時間を必要とし、この静置操作が試験操作の律速段階となっていた。また、魚卵等では遠心後にも卵膜等の固形物が上清に浮遊し、正確な定容操作を妨害することがあった。これらの試料については、試料量を削減して再分析することで夾雑物の影響を抑えることが可能であったが、必然的にこの方法は試験溶液中の亜硝酸根含量の低下を伴うことから、定量下限値(0.5 $\mu\text{g/g}$)付近の亜硝酸根を含む試料の測定が困難となる問題があった。

そこで、操作時間の短縮および試薬量の削減を目的として、ディスポーザブル遠心管を用いる小スケールかつ簡便迅速な前処理法について検討を行ったので報告する。

方法

1. 試料

試料は大阪市内で購入した亜硝酸ナトリウム使用表示のないハム、魚肉ソーセージ、たらこを添加回収試験に供し、亜硝酸ナトリウム使用表示のあるたらこ、

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課

Studies on a Small-Scale Method for the Rapid Determination of Nitrite Ion in Foods
by Chie NOMURA, Masato YOSHIMITSU, Kazuhiko AKUTSU, and Hiroataka OBANA

ハム、ロースハム、ベーコン、フィッシュハム、鯨ベーコンを陽性検体として用いた。

2. 標準溶液および試薬

標準品および試薬類はいずれも和光純薬工業製の試薬特級品を用いた。なお、ろ紙は ADVANTEC 製の定量ろ紙 No.5A および No.5C を用いた。

亜硝酸根標準溶液：亜硝酸ナトリウム 30 mg (亜硝酸根として 20 mg 相当) を正確に量り精製水 (以下、水) に溶解して 200 mL としたものを調製し、亜硝酸根として 100 µg/mL 標準原液とした。この標準原液を水で適宜希釈し、亜硝酸根標準溶液とした。

0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 10 g を水 500 mL に溶解した。

9% (w/v) 酢酸亜鉛溶液：酢酸亜鉛二水和物 45 g を水 500 mL に溶解した。

飽和ホウ酸ナトリウム溶液：四ホウ酸ナトリウム十水和物 5 g を温水 100 mL に溶解後、冷却した。

スルファニルアミド溶液：スルファニルアミド 0.5 g を加温した塩酸 (1→2) 溶液 100 mL に溶解後冷却した。

ナフチルエチレンジアミン溶液：N- (1-ナフチル) エチレンジアミン二塩酸 0.12 g を水 100 mL に溶解した。

3. 機器

フードプロセッサーは SQ-7 (東芝製) を用いた。高速ホモジナイザーはポリトロン PT10 (KINEMATICA 製) を使用し、シャフトは PT20S または PT10S を用いた。高速冷却遠心機は、himacSCR20B (日立工機製) を使用し、ローターは RPR12-2 または R12A5 を用いた。恒温振とう槽は WL-1 (宮本理研製) または BW100 (ヤマト科学製) を用いた。分光光度計は UV-3600 (島津製作所製) を用いた。

4. 試料溶液の調製

試料溶液の調製法について従来法と改良法を比較した。操作の詳細は図 1 に示した。いずれの方法においても、水を試料として同様に操作し、空試料液を調製した。

従来法：食品衛生検査指針食品添加物編³⁾の変法⁵⁾。試料 10 g に 80°C の温水 80 mL を加えてホモジナイズ後、水酸化亜鉛ゲルで試料中のタンパク質および脂質を除去し、試料溶液を調製した。

改良法：従来法を 1/4 に小スケール化し、80°C 加温時に恒温振とう槽による自動振とう操作を加えた。さらに従来法の定容操作の前にもろ紙 No. 5A によるろ過工程を追加した。

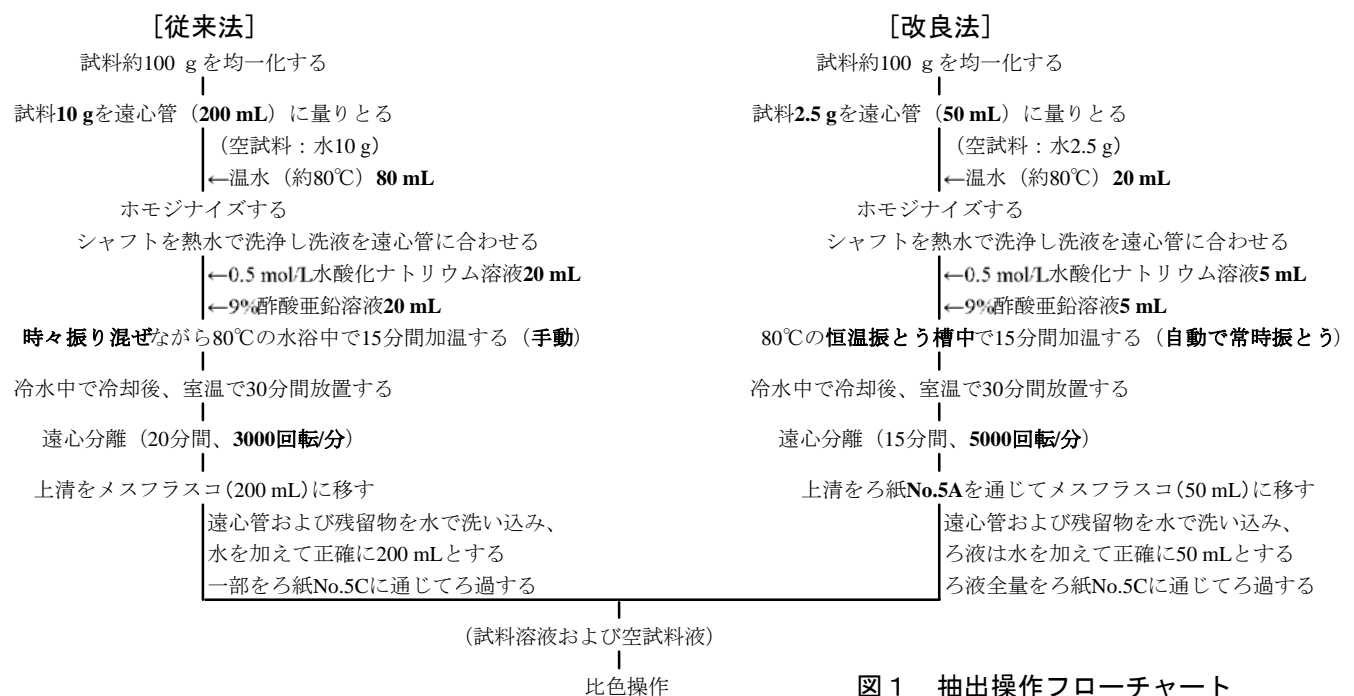


図 1 抽出操作フローチャート

5. 比色操作および測定

原材料欄にアスコルビン酸等還元剤の使用表示のある検体や、一部の魚卵試料（たらこ等）においては、発色操作時の試料溶液の採取量が多いほど、亜硝酸根の測定値が低くなることが報告されている^{5, 6)}。また、アスコルビン酸等の還元性物質は、発色操作時に亜硝酸根の分解反応を促進することが知られており、この影響を最小化するためにはジアゾ化反応の迅速化等が有効であることが示唆されている⁶⁾。測定値の低下を防止するためには、発色操作に供する試料溶液量を少なくし、試料成分に対する発色試薬の相対比率を高めることが効果的である。そこで定量可能な範囲内で、発色操作に供する試料溶液量を可能な限り削減して発色操作を行うこととした。

試料溶液 2~20 mL を 25 mL 容メスフラスコに正確に採取し、スルファニルアミド溶液 1.0 mL を加えてよく混和し、次にナフチルエチレンジアミン溶液 1.0 mL を加えてよく混和し発色させた。これに水を加えて正確に 25 mL とした後、室温で 20 分間放置した。放置後、分光光度計を用いて波長 540 nm の吸光度を測定し、予め亜硝酸根標準溶液を用いて作成した検量線より亜硝酸根濃度を求めた。空試料液についても同様の発色処理を行い、その吸光度値で試料発色液の吸光度値を補正した。なお、濁りや着色のある試料溶液については、空試料液 20 mL に塩酸（1→2）溶液 1 mL を加え、全量を 25 mL としたものを検体ブランク液とし、その吸光度値で試料発色液の吸光度を補正した。

結果および考察

1. 試料溶液調製法

(1) ろ紙 No. 5A によるろ過操作の追加

定容時の妨害となる遠心後に浮遊する卵膜等の固形物や泡を除くために、ろ紙 No. 5A を用いたろ過操作（以下、5A ろ過）について検討した。まず、ろ過操作の追加が回収率に影響を及ぼすか否かを検証するために、従来法を用いて 5A ろ過なし・ありの 2 種類の条件における添加回収試験を実施した。

水を試料として、定量下限値の倍量（1.0 μg/g）およびたらこの使用基準値の半量（2.5 μg/g）の添加濃度で各 3 回繰り返して添加回収試験を行った。その結果、表 1 に示した通り、いずれの条件においても良好

表 1 ろ過の有無による亜硝酸根回収率の比較

亜硝酸根			
添加量 (μg/g)	平均回収率 (%) ±SD, n=3		比 ^{*1)}
	5A ろ過なし	5A ろ過あり	
1.0	104.0±1.9	102.0±0.8	1.0
2.5	100.6±1.1	96.8±2.0	1.0

*1) 比=5Aろ過あり/5Aろ過なし

な回収率が得られ、5A ろ過の追加による影響は認められなかった。そこで改良法では、定容前に 5A ろ過操作を追加して上清中の浮遊物を除去することにした。

(2) 実験方法の小スケール化

操作時間の短縮と試薬量の削減を目的として実験方法の小スケール化について検討した。改良法では試料の抽出・遠心時に使用する遠心管をこれまでの 200 mL 容から 50 mL 容に変更することにより、恒温振とう槽および遠心分離機に配架可能な遠心管数が約 2~4 倍に増加し操作性が向上した。さらに、従来 3000 回転/分であった遠心速度を 5000 回転/分まで上昇させることが可能となった。遠心速度の上昇により、遠心上清中に残留する浮遊物および白濁成分が明らかに減少し、ろ過速度も改善されたことから、改良法では 5000 回転/分の遠心速度を基本条件とした。以上の改良により発泡が減少し、定容時のメスフラスコ内液上部の泡の高さはすべて 5 mm 以下となり、定容前の静置時間が短縮され、一連の操作時間は約半分に減少した。

2. 添加回収試験

試料に亜硝酸根使用表示のない 3 検体を用いて添加回収試験を行い、従来法および改良法を比較した（表 2）。添加量は定量下限値の 2 倍量（1.0 μg/g）および当該食品に設定されている使用基準値の半量とした。従来法で平均回収率および標準偏差（SD）が 71.0~85.9% および 0.7~3.3 であったのに対し、改良法では 79.7~100.9% および 0.2~2.0 であり、従来法と比較して改良法では全体的な回収率および精度（SD）の向上が認められた。なお、いずれの検体についても、改良法の平均回収率は従来法より高い値を示し、その相対比は 1.1~1.2 と概ね一定であった。これは自動振とう操作および高速遠心操作の追加により、従来法と比較して添加回収率が向上したためであると考えられた。

表2 従来法と改良法による亜硝酸根回収率の比較

試料	亜硝酸根				比 ^{*1)}
	試料溶液採取量(mL)	添加量(μg/g)	平均回収率(%) ±SD、n=5		
			従来法	改良法	
たらこ	10	1.0	74.1±3.3	79.7±2.0	1.1
	10	2.5	76.3±3.2	80.7±1.5	1.1
魚肉ソーセージ	10	1.0	71.0±1.5	80.3±1.2	1.1
	2	25.0	73.5±0.7	83.2±1.1	1.1
食肉製品	10	1.0	85.9±1.2	100.9±1.1	1.2
	2	35.0	81.0±1.1	92.9±0.2	1.1

*1) 比=改良法/従来法

表3 従来法と改良法による亜硝酸根定量値の比較

試料	亜硝酸根			比 ^{*1)}
	試料溶液採取量(mL)	平均値(μg/g) ±SD、n=3		
		従来法	改良法	
たらこ	10	0.8±0.05	1.1±0.02	1.4
フィッシュハム	5	8.5±2.2	9.8±0.9	1.2
ハム	2	11.5±0.2	16.2±0.2	1.4
ロースハム	5	7.5±0.05	8.2±0.08	1.1
ベーコン	2	13.9±0.08	18.7±0.1	1.3
鯨肉ベーコン	2	13.5±0.5	18.6±0.6	1.4

*1) 比=改良法/従来法

3. 陽性検体の分析

陽性検体の分析を行い、従来法と改良法を比較した(表3)。試料に亜硝酸ナトリウム使用表示のある6検体、たらこ、フィッシュハム、ハム、ロースハム、ベーコン、鯨ベーコンを用いた。分析の結果、改良法では従来法の約1.1~1.4倍の定量値が得られた。この比率は前述した両者の添加回収率の比率と概ね同程度であることから、従来法に比べ改良法における回収率が向上したことが同程度の比率となった要因であると考えられた。また、改良法で得られた定量値は、試料中の亜硝酸根濃度の真値をより正確に反映していると推測された。定量値の精度については、試料ごとの精度は従来法とほぼ同等の値が得られた。

まとめ

従来法を1/4に小スケール化し、定容前にろ紙No. 5Aによるろ過操作を追加することにより、操作の簡便化および迅速化を達成した。また、自動振とう操作および高速遠心操作を追加することにより、従来法と比較

して添加回収率が向上した。さらに従来法とほぼ同等の精度が得られたことから、改良法は亜硝酸根の迅速分析法としての有用性が確認された。

文献

- 1) 食品、添加物等の規格基準、昭和34年12月28日付厚生省告示第370号
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2005, p. 330~331, 金原出版, 東京(2005)
- 3) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針食品添加物編, p. 142~148, 日本食品衛生協会, 東京(2003)
- 4) 辻澄子, 今井昌也, 三島郁子, 石光進, 柴田正, 伊藤誉志男：比色定量法による食品中の亜硝酸根の試料溶液調製法の検討, 衛生化学, **43**, 305~310(1997)
- 5) 粟津薫, 北川幹也, 尾花裕孝, 田中之雄：大阪府立公衛研所報, **45**, 47~52(2007)
- 6) 平間祐志, 西村一彦, 中野道晴：ジアゾ化法によるタラコ中の亜硝酸イオンの定量における塩酸の効果, 北海道立衛生研究所所報, **44**, 69~72(1994)