

発色剤

## 亜硝酸ナトリウム

Sodium Nitrite

NaNO<sub>2</sub> : 69.00

### 1. 分析法の概要

食品中の亜硝酸ナトリウムは、ジアゾ化反応を利用した比色法により亜硝酸根 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) として定量する。必要があれば分子量比を乗じて亜硝酸ナトリウムの量として求める。食品中には、微生物により硝酸塩が亜硝酸塩に還元されて分布している場合があり、検体にこれらの食品が素材として含有されている場合がある。また、食肉製品や鯨肉ベーコンでは、発色剤として添加された硝酸カリウム又は硝酸ナトリウムが還元されて亜硝酸塩が生じ得る。したがって、本法で得られる定量値は、これら由来の亜硝酸塩と亜硝酸塩として添加されたものとの合計値である。(2008年改正、2023年改正)

### 2. 分析法 (比色法)

#### (1) 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

#### (2) 試験溶液の調製

試料<sup>1)</sup>約5gを精密に量り、ホモジナイズ容器に入れ<sup>2, 3)</sup>、1.0mol/L水酸化ナトリウム溶液12mL及び水(80~90℃)40mLを加え<sup>4, 5)</sup>、直ちにホモジナイズ(2分間、10000回転/分)する<sup>6, 7)</sup>。内容物をトールビーカーに移し、ホモジナイズ容器を水(80~90℃)約35mLで洗い、トールビーカーに移す。酢酸亜鉛溶液(18→100)7.5mL<sup>8)~10)</sup>を加えて混和し、80~90℃の水浴中に入れ、約5分毎に泡を液中に押し込むようにしてつぶしながら混和し、80~90℃で20分間加温する。氷水中で10分間以上冷却した後、吸引ろ過し、ろ液を100mLの短形メスフラスコに受ける<sup>11, 12)</sup>。トールビーカー及び残渣を水で洗ってろ過し、ろ液を合わせ、水を加えて正確に100mLとし、この液を水で正確に2倍に希釈し<sup>13)</sup>、試験溶液とする。

#### (3) 空試験溶液の調製<sup>14)</sup>

試料約5gの代わりに水5mLを用い、(2)試験溶液の調製と同様に操作した後、遠心し<sup>15)</sup>、上清を空試験溶液とする。

#### (4) 検量線用標準溶液の調製<sup>16)</sup>

亜硝酸ナトリウム0.150gを量り、水を加えて溶かして正確に1000mLとし、標準原液とする(濃度 亜硝酸根として100µg/mL)。標準原液1mLを正確に量り、水を加えて正確に

100mLとし、標準溶液とする（濃度 亜硝酸根として1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。標準溶液0.5、1、2、4、6 mL及び8 mLをそれぞれ正確に量り、水を加えてそれぞれ正確に20mLとし、検量線用標準溶液とする（濃度 亜硝酸根として0.025~0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

#### (5) 測定法

##### ① 測定条件

分光光度計を用い、波長540nmにおける吸光度を測定する。

##### ② 測定<sup>17)</sup>

試験溶液及び空試験溶液5 mLずつを正確に量り、それぞれ10mLのメスフラスコa及びbに入れる。各メスフラスコにスルファニルアミド溶液1 mLずつを加えて振り混ぜ、更にナフチルエチレンジアミン溶液1 mLずつを加えて振り混ぜた後、水を加えてそれぞれ正確に10mLとし、よく振り混ぜる。20分間放置して発色させた後に<sup>18,19)</sup>水を対照として波長540nmにおけるメスフラスコa及びbの液の吸光度を測定し、それぞれ $A_{T_a}$ 、 $A_b$ とする。

また、試験溶液5 mLを正確に量り、10mLのメスフラスコcに入れ、これに塩酸(1→2)1.0mL及び水を加えて正確に10mLとし、水を対照として波長540nmにおける吸光度を測定し、 $A_{T_c}$ とする<sup>20)</sup>。

吸光度の差 $\Delta A$  [ $A_{T_a} - (A_b + A_{T_c})$ ]を求める。なお、 $A_{T_c}$ がマイナスである場合は、0として計算する。

##### ③ 検量線

検量線用標準溶液及び水5 mLずつを正確に量り、それぞれ10mLのメスフラスコ $a_1 \sim a_6$ 及びメスフラスコ $b_1$ に入れ、スルファニルアミド溶液1 mLずつ及びナフチルエチレンジアミン溶液1 mLずつを加えて振り混ぜた後、水を加えてそれぞれ正確に10mLとする。20分間放置した後、水を対照として波長540nmにおけるそれぞれの吸光度を測定して $A_{S_{a_1}} \sim A_{S_{a_6}}$ 及び $A_{S_{b_1}}$ とし、 $A_{S_{a_1}} \sim A_{S_{a_6}}$ と $A_{S_{b_1}}$ との各吸光度の差を用いて検量線を作成する。

##### ④ 定量<sup>21)</sup>

吸光度差 $\Delta A$ と検量線から試験溶液中の亜硝酸根含量C ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を求め、次式によって試料中の亜硝酸根含量 ( $\text{g}/\text{kg}$ )を計算する。

$$\text{亜硝酸根含量 (g/kg)} = \frac{C \times V \times K}{W \times 1000}$$

C : 試験溶液中の亜硝酸根含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

W : 試料の採取量 (g)

V : 試験溶液調製時の定容量 (mL) (100mL)

K : 試験溶液調製時の水での希釈倍率 (2)

$$\text{亜硝酸ナトリウム含量 (g/kg)} = \text{亜硝酸根含量 (g/kg)} \times 1.500$$

##### ⑤ 定量限界 亜硝酸根として0.001 g/kg

#### 試薬・試液等

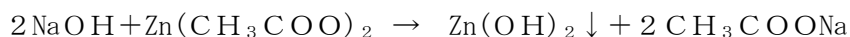
1. 亜硝酸ナトリウム：〔特級〕
2. 水酸化ナトリウム：〔特級〕
3. 1.0mol/L水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 4.0 g を量り、水を加えて溶かし、100mL とする。ポリエチレン瓶に保存する。
4. 酢酸亜鉛二水和物：〔特級〕
5. 酢酸亜鉛溶液（18→100）：酢酸亜鉛二水和物 18 g を量り、水を加えて溶かし、100mL とする。
6. スルファニルアミド：〔特級〕
7. 塩酸：〔特級〕
8. スルファニルアミド溶液：スルファニルアミド 0.50g を塩酸（1→2）100mL に加え、超音波処理をして溶かす。
9. *N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩：市販品を用いる。
10. 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塩 0.12 g を水 100mL に溶かす。

#### [注]

- 1) 食肉及び魚肉製品、魚卵（すじこ、いくら）等。
- 2) カップ付カッター型ホモジナイザーを用いる場合の操作方法である。シャフト型ホモジナイザーを用いる場合は、試料をトルビーカーに量り、1.0mol/L水酸化ナトリウム溶液 12mL 及び水（80～90℃）40mL を加えて、直ちに、試料の塊が残らないように注意しながら、ホモジナイズ（2分間、10000回転/分）を行う。シャフトを、水（80～90℃）約 35mL を用いて洗い、洗液をトルビーカーに加える。また、シャフト型ホモジナイザーを用いる場合は、シャフトでビーカーを破損しないように注意する。
- 3) たらこのような高脂肪かつ高タンパク質の試料で、水酸化ナトリウム溶液添加により、強力な泡沫が形成される場合には、大きいサイズの容器を使用する。
- 4) 抽出溶媒に温湯を用いると、食品中に含まれる有機酸が抽出される。その有機酸により食品抽出液の pH が低くなり、亜硝酸イオンが損失する<sup>文献1)</sup>。これを防ぐため、水酸化ナトリウム溶液を添加する。また、塩基性条件にすることでタンパク質が溶解し、抽出効率が高まる。
- 5) パスツールピペットなど未洗浄の器具に亜硝酸が含まれることがある。そのため、あらかじめ亜硝酸を含まないことを確認した器具を使用する。
- 6) カップ付カッター型ホモジナイザーを用いる場合、ホモジナイズが終了した際に容器の中を確認し、壁に試料が付着して十分混和できていない場合は樹脂製スパーテルでこそぎ落とした後、樹脂製スパーテルを少量の水（80～90℃）で共洗いしてから再度ホモジナイズ（2分間、10000回転/分）を行う。

7) 水酸化ナトリウム溶液及び水 (80~90℃) を加えた後、ホモジナイズまでの時間を空けると温度が下がり抽出効率が低下する。

8) 次式に示す  $Zn(OH)_2$  のコロイド性沈殿形成により除タンパクを行う<sup>文献2)</sup>。



除タンパクの際、アルカリ性が強すぎると白濁、ろ過速度の低下の原因となるが、中性付近でも白濁が認められる場合があり、酢酸亜鉛の添加量の増加により防止できるとされている<sup>文献3)</sup>。また、清澄な試験溶液の場合、ろ液の液性は pH 試験紙で 7.5~8.5 付近で、混濁した液では pH9.5 付近であったとされている<sup>文献4)</sup>。そこで、加温中 (5分程度経過後) に沈殿しない場合は、酢酸亜鉛溶液を数滴~0.5mL 程度添加して様子を見る。それでも沈殿が生じない場合はさらに酢酸亜鉛溶液を添加する。

9) 魚肉ソーセージのように、デンプンを多く含み、試験溶液が懸濁する食品の場合は、酢酸亜鉛溶液 7.5mL を加えた後、80~90℃の水浴に入れる操作の前に、パンクレアチン 0.1g を加えて混和し<sup>文献5)</sup>、10分放置した後、80~90℃の水浴に入れ、以降の操作を同様に行い、試験溶液及び空試験溶液を調製する。カップ付カッター型ホモジナイザーを用いる場合、酢酸亜鉛溶液添加前の温度は 50~60℃程度であり、添加後はおおむね 40~45℃程度となり、パンクレアチン添加に適した温度となる。

10) シャフト型ホモジナイザーを用いる場合、カップ付カッター型ホモジナイザーを使用する場合より温度が下がりにくい。パンクレアチンを添加する場合は、酢酸亜鉛溶液添加の際に 50~60℃程度となるよう放置時間を調整するとよい。

11) 吸引ろ過には定量用ろ紙 (5種A又は5種B) を用いる。ろ紙から微量の亜硝酸根が検出される場合があるため、あらかじめ水 50mL で洗浄しておく。

12) 吸引ろ過時に泡沫が生じて操作が困難になるのを防ぐため、100mL の矩形メスフラスコの標線付近及び漏斗の足管の内側に、それぞれ消泡剤 (食品添加物シリコーン樹脂を水で 10 倍に希釈したもの) 25μL を塗布しておく。なお、試料に消泡剤を直接添加した場合、消泡効果は低下する。

13) アスコルビン酸などの還元物質や色素による影響を少なくするため 2 倍希釈する。試験溶液中の  $NO_2^-$  濃度が高いときは、濃度に応じて試験溶液調製時の水での希釈倍率を変更する。空試験溶液についても試験溶液と同じ希釈倍率で調製した後、同様に操作する。計算では、適用した希釈倍率を乗じる。

14) 水酸化ナトリウム試薬には微量の亜硝酸ナトリウムが含まれる場合があり、試薬量を一定にすることにより誤差を少なくした。したがって、空試験は必ず行う必要がある。

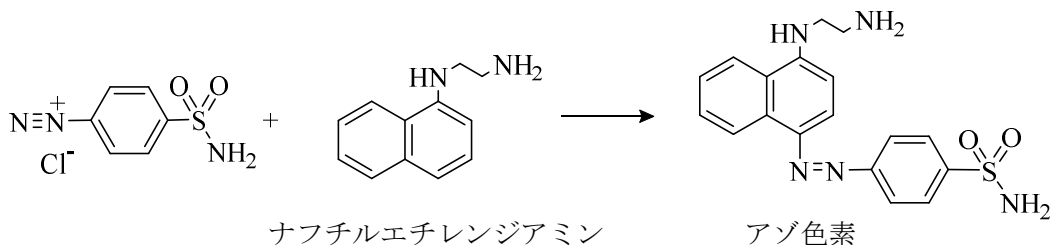
15)  $Zn(OH)_2$  の沈殿を形成しないため混濁している。そのため、遠心 (例: 5℃、12000×g、10分) する。

16) 検量線用標準溶液の濃度及び数は、必要があれば、直線性が確保できる範囲で、適宜、変更してもよい。

17) 本法の原理を次に示す。



スルファニルアミド



- 18) ジアゾ化法では、アスコルビン酸などの還元性物質が存在すると、 $\text{NO}_2^-$ が分解して失われるためにその定量は妨害される<sup>文献6)</sup>。また酸性溶液中では、 $\text{NO}_2^-$ は混在するアミノ酸と反応して分解する。したがってジアゾ化反応時間は短いほどよい。本法ではジアゾ化とカップリング反応を続けて行う方法とした。
- 19) 呈色は10分から2時間程度まで安定であるが、試験溶液の場合は少し反応が遅くなるので20分程度放置するとよい。
- 20) 試料自体の色に由来する吸光度への影響を差し引くため。
- 21) たらこ、魚肉ソーセージ及びハムに、亜硝酸ナトリウムを亜硝酸根として0.002 g/kg及び各食品の使用基準上限値(0.005、0.05及び0.07 g/kg)で添加した時の真度はいずれも80~95% (8機関, 各n=3)であった<sup>文献7)</sup>。

[文献]

- 1) 辻澄子ら：食衛誌、**34**、161 (1993)
- 2) 辻澄子ら：衛生化学、**43**、305 (1997)
- 3) 千葉美子ら：宮城県保健環境センター年報、**26**、20 (2008)
- 4) 亀井正治ら：生活衛生、**54**、153 (2010)
- 5) 佐々木隆宏ら：食衛誌、**64**、21 (2023)
- 6) 平間祐志ら：道衛研所報、**44**、69 (1994)
- 7) 佐藤恭子ら：日本薬学会第141年会要旨集、No. 28P02-223 (2021)