インドフェノール法による食品中の総窒素定量法

Determination of Kjeldahl Nitrogen in Foodstuffs as Indophenol

Yasushi Mihashi and Saiko Fukuchi

(Tokyo College of Pharmacy)

東京薬科大学 三橋 靖, 福地 彩子

The indophenol method for determining Kjeldahl nitrogen has been studied and has been applied to the analysis of foodstuffs. A photometric determination of ammonia is based on the reaction with phenol and hypochlorite, to give an indophenol which is intensively blue in an alkaline medium.

The procedure is better in reproducibility than previously reported methods. The indophenol method may be considered a general method for the determination of Kjeldahl Nitrogen in foodstuffs. The results obtained from the analysis of certain foodstuffs and organic compounds by the indophenol method are compared with those obtained by the semimicro-Kjeldahl method.

ケルダール窒素定量法は、試料の分解、アンモニアの蒸留および滴定の三操作によって行われるが、著者の一人は、セミマイクロケルダール窒素定量法において、アンモニアの蒸留操作を行わずに、分解液中のアンモニアを pH 8.5 のアルカリ性水溶液で次亜臭素酸で酸化し過剰の次亜臭素酸をヨウ素滴定して食品中の総窒素定量を行う方法を立案し、好結果を得たので、すでに本誌¹⁾に報告した。今回は、さらに分解液中のアンモニアを直接に比色法によって定量する方法を研究した。

アンモニアの比色定量法は、ネスラー法とインドフェノール法とが広く用いられているが、ケルダール窒素定量法とネスラー比色法あるいはインドフェノール比色法を組合せた方法も報告されている。ネスラー法を組合せた方法^{2,3,4)}は、ネスラー試薬の調製法が難しく、かつ試薬調製後徐々に変化し、また発色時に混濁物を生じ易いなどの難点があるため、比色法の条件を厳密に守らないと再現性に乏しいといわれている。またネスラー比色法の代わりに、インドフェノール法^{5,6,7)}を用いる方法も報告されているが、この方法は、定量操作および発色条件に十分に注意しないと正確な定量値が得られないという⁸⁾。この他、ニンヒドリン試薬、あるいはピリジノーピラゾロン試薬を応用した有機窒素定量法^{9,10)}も報告されている。著者等は、一般食品中の総窒素定量法においては、

窒素として 2~3 mg に相当する試料の量を用いて窒素定量を行うのが実用上便利であるという点と、またなるべく特殊の装置や高価な試薬の使用をさけて簡便に定量を行いたいという目的から、前回の報告と同様に、セミマイクロケルダール窒素定量法¹¹⁾とインドフェノール法とを組合せて、食品中の総窒素定量法の立案を試みた、最近 Bolleter¹²⁾ 等がインドフェノール法によるアンモニアの比色定量法を報告している。著者等は、この方法を追試したところ操作も比較的簡単で、しかも再現性がよいことを知り得たので、セミマイクロケルダール窒素定量法に組合わせて、検討を行った結果、食品中の総窒素定量法として良好な成績を得たので報告する。

インドフェノール法によるアンモニアの呈色機構は一般につきのように考えられている。

すなわちアンモニアと次亜塩素酸とからクロラミンを生成し、クロラミンがフェノールと反応してキノクロラミンを生じ、さらに 1 モルのフェノールと結合しインドフェノールを生ずるものと思われる。この場合インドフェノールは黄色¹³⁾であるが、アルカリ性で青色にな

る。しかし、この呈色反応は室温で行った場合は、色調が淡緑青色であって、フェノールを加えてから加熱した場合に青色を呈する。しかも青色は pH によって変化し、pH 10.0~10.1 で最も色調が強く、かつ安定である。この溶液の吸収曲線を測定したところ 635 m μ の波長で最大吸光度を示した。この呈色反応をセミマイクロケルダール窒素定量法に応用するとき、当然試料の分解液中に Cu²⁺ が存するので、その影響を検したが、セミマイクロケルダール法で用いる CuSO₄ · 5H₂O 100 mg では、呈色に影響がないことを認めた。また食品分析の際、試料中にしばしば Fe³⁺ が夾雑するが、一般に食品の試料（窒素含量 2~3 mg に相当する量）中の鉄の量は、Fe³⁺ として 0.02 mg が最大であるから、この鉄の量に対する影響も検したが、全く障害は認められなかった。なお試料の分解液は、水で希釈したのち、ホウ砂溶液で予め pH 3.5~3.6 に調整し、前記のインドフェノール反応の発色時の pH が 10.0~10.1 になるようにした。以上のような考慮の下に、つぎのように定量法を設定した。すなわち試料（窒素含量 2~3 mg に相当する量）に濃硫酸 3 ml および分解促進剤 0.5 g (CuSO₄ · 5H₂O : K₂SO₄ = 1 : 4) を加え、加熱分解し、分解液を 100 ml に希釈し、窒素量 10~40 γ に相当する液量を取り、0.05 M ホウ砂液で、pH 3.5~3.6 に調整し、全量を水で 100 ml とし、この液 25 ml に塩素水 5 ml、8% フェノール液 5 ml を加え、水浴中で 3 分間加熱し、冷後 3 N 水酸化ナトリウム液 5 ml を加え、水で全量を 50 ml とし、吸光度を測定する。

本定量法でスルファミン酸、アセトアニリド、バルビタール、フェニールアラニン、大豆粉、白米、粉乳等の窒素定量を行い、セミマイクロケルダール窒素定量法と比較したが、ほとんど同じ測定値が得られたので、食品中の総窒素量法として便利に使用し得る方法であると認められる。

本研究に御援助を賜った東京薬科大学村山学長、寺阪部長に深く謝意を表する。

実験の部

1. 試薬の調製

- ① 分解酸：特級濃硫酸
- ② 0.05 M ホウ砂液：特級ホウ砂 (Na₂B₄O₇ · 10H₂O) 19.10 g を水にとかして全量 1 L とする
- ③ 塩素水：100 g の水に塩素ガス 0.73 g を溶解したもの（水温 20°C の飽和溶液）
- ④ 8% フェノール液：再留フェノールを使用
- ⑤ 3 N 水酸化ナトリウム液：特級水酸化ナトリウム使

用

⑥ 分解促進剤：K₂SO₄ : CuSO₄ · 5H₂O = 4 : 1

⑦ 蒸留水：CO₂ を含まないものを使用

2. アンモニアの定量

純 (NH₄)₂ SO₄ 0.4720 g を水にとかして正確に全量を 100 ml とし（1 ml は窒素 1 mg を含む）、これを検液とする。検液 2 ml に硫酸 3 ml を加えて 1 時間加熱し、冷後水で全量を 100 ml とし、この分解希釈液を 8 ml 取り、0.05 M ホウ砂液にて pH 3.5~3.6 に調整し、水で全量を 100 ml とし、この液 25 ml を 50 ml の三角フラスコに取り、塩素水 5 ml を加えよくふりまぜ、つぎに 8% フェノール液 5 ml を加えて再びよくふりまぜる。フラスコは小ビーカーでふたをして沸騰水浴中で正確に 3 分間加熱したのち、直ちに氷水中にて冷却する。液が室温になってから 3 M 水酸化ナトリウム液 5 ml を加えて水で全量を 50 ml（窒素 40 γ ）とする、分光光度計で吸収曲線を測定したところ、Fig. 1 のように 635 m μ の波長で最大吸光度を示した。

Fig. 1 Absorption spectra of indophenol

以下の比色には、光電比色計の 10 mm キュベットに呈色液を取り、フィルター 634 m μ を用い測定した。

呈色の安定性については、Table 1 のような良好な結果を得た。

Table 1

Time(min)	0	20	30	60	90	120	150
Absorbance	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.248	0.245

また前記と全く同様な操作を行い、検量線を作製し、Fig. 2 のような結果を得た。

Fig. 2 The absorbance of indophenol at 634mμ as a function of the amount of nitrogen.

また食品の濃硫酸による加熱分解の際は、分解促進剤として硫酸銅を用いるので、 Cu^{2+} の比色定量におよぼす影響を検討した。すなわち前記のようにアンモニア検液 2 ml にそれぞれ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を 100 mg (Cu^{2+} 25 mg), 125 mg (Cu^{2+} 32 mg), 250 mg (Cu^{2+} 64 mg), 375 mg (Cu^{2+} 95 mg), 500 mg (Cu^{2+} 129 mg), ずつを加え、硫酸で加熱したのち、希釈しホウ砂液で pH を調整し、発色せしめ、吸光度を測定したが、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 375 mg 以下の添加では、影響は見られなかった、さらに $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 mg に K_2SO_4 400 mg を混合したものをを用いても全く影響がないことを確めた。また本実験において Fe^{3+} を 0.02 mg を添加しても影響がなかった。

3. 食品中の総窒素の定量

試料 100~200 mg を小ガラス秤量管にとり、これを分解フラスコに入れ、分解促進剤 0.5 g および硫酸 3 ml を加えて加熱分解する。冷後水で希釈し全量 100 ml とする。この分解希釈液中の窒素含量 2~3 mg に対応する液を取り、セミマイクロケルダール法にてその窒素量を定量した。また分解希釈液中の窒素含量が、40~160 γ に対応する液量を取り、0.05M ホウ砂液で pH 3.5~3.6 に調整したのち水で全量を 100 ml とし、その 25 ml を

用いて、前記(2)のように反応、呈色せしめて、その吸光度を求め、検量線より試料中の窒素量を求めた。その実験の結果は、Table 2 のようである。

Table 2 Comparison of results obtained by the proposed and Kjeldahl methods

Sampl	Sample-taken mg	Nitrogen found %		Theoretical nitrogen %
		Proposed method	Semimicro-Kjeldahl	
Sulfamic acid	100.0	14.15	14.32	14.43
Acetanilide	100.0	10.33	10.13	10.36
Barbital	100.0	14.00	14.85	15.21
Phenylalanine	100.0	8.77	8.6	8.48
大豆粉	100.0	5.50	5.6	
白米	200.0	1.07	0.99	
粉乳	100.0	2.30	2.48	

(37.7.16)

文 献

- 1) 三橋靖, 小林文子: 衛生化学, **5**, 117 (1957)
- 2) G. L. Miller, E. S. Miller.: Anal. Chem., **20**, 481 (1948)
- 3) J. F. Thompson, G. R. Morrison: Anal. Chem., **23**, 1153 (1951)
- 4) C. A. Lang: Anal. Chem., **30**, 1692 (1958)
- 5) E. D. Noble: Anal. Chem., **27**, 1413 (1955)
- 6) 勝又一郎: 千葉医学会誌, **29**, 207 (1953)
- 7) 八木国夫, 奥田潤: 蛋白質・核酸・酵素, **4**, 139 (1959)
- 8) 中井秀了, 土屋文安: 分析化学, **10**, 387 (1961)
- 9) G. Fels, R. Veatch: Anal. Chem., **31**, 451 (1959)
- 10) 笠木求, 伊藤正之: 分析化学, **9**, 105 (1960)
- 11) 日本薬学会 衛生試験法註解, p.15 (1956); 三橋靖, 辰己雅子: 東京薬科大学研究年報, 第3号, p.13 (1953); *ibid.*, 第6号 p.42 (1956)
- 12) W. T. Bolleter, C. J. Buschman, P. W. Tidwell: Anal. Chem., **33**, 592 (1961)
- 13) E. H. Rodd, "Chemistry of Carbon Compounds" Vol. III. p.721 (1956).