ジフェニルベンチジン試薬によるかん詰
原料中の硝酸塩の簡易検定法について
岩本喜伴*・宮崎正則*・国里進三*・前田琇子*

Approximate determination of nitrate
in Agricultural Products with
Diphenylbenzidine Reagent

YOSHITOMO IWAMOTO, MASANORI MIYAZAKI,
SHINZO KUNISATO, and YUUKO MAEDA

A spot test method with diphenylbenzidine for rapid and approximate estimation of nitrate was examined. On tomato juice, 1 ppm. of nitrate-N was found to be detectable by this method, and the obtained values were in good agreement to those by the *m*-xylenol method of A.O.A.C. and the cadmium-column method proposed by KAMM.

(Received November 30, 1967)

近年、果汁、野菜類などのかん詰でその原料中に含まれている硝酸塩によるスズの異常溶出による事故が散発的に発生した。

かん詰使用水中の硝酸塩含量は、G.R. 硝酸試薬など¹⁾で簡単に 1 ppm 以下まで測定できるが、天然物中に含まれている硝酸塩の定量法としては、現在 *m*-xylenol 法²⁾、Cd カラム法³⁾が一般的に使用されているが、これらの方法は測定に時間を要し煩雑である。植物の窒素栄養診断の簡易検定法として diphenylamine 法（以下 DPA 法と略す）、phenyl disulphonic acid 法、Bray's 法⁴⁾などがあり、N.C.A.（米国かん詰協会）では DPA 法を採用しトマト果実中の硝酸塩の簡易測定に使用している。しかし、これらの方法はいずれも 5 ppm 以下の硝酸性窒素の測定には使用できず、DPA 法の検出限度は 6 ppm 程度であった。

著者らは、かん詰原料となる農産物および充てん前の内容物中に含まれている硝酸塩量をチェックし、かん詰となった場合のスズの異常溶出による事故を未然に防止するため、diphenylbenzidine（以下 DPB と略す）試薬⁵⁾による硝酸塩簡易測定法を採用した。この DPB 法と DPA 法を比較検討した結果、DPB 法は DPA 法よりも 6~7 倍鋭敏で、硝酸性窒素標準溶液では 1 ppm 以下まで検出でき、測定操作も非常に簡便で圃場やかん詰工場内でも現場向の測定法として適用できることが明らかとなったので、つぎに測定方法を報告する。

1. 分析方法

(1) 試薬

i) DPB 試薬：DPB 0.05 g を窒素分析用濃硫酸 50 ml に溶解し、かっ色の滴びんに貯える。試薬溶液の色が濃くなれば、比色の判定に誤差を生ずるから新しく調製する。

ii) 標準硝酸性窒素原液：純硝酸カリウム (KNO_3) 0.7218 g をとって蒸留水または脱イオン水に溶かし、全量を 1,000 ml 定容とする。本溶液は硝酸性窒素 100 ppm の原液となる。

iii) 比色標準溶液：標準硝酸性窒素原液を 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 10.0 ml を各々 100 ml 容のメスフラスコに入れる。蒸留水または脱イオン水で 100 ml 定容とする。これらの溶液は硝酸性窒素 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 10.0 ppm となる。本溶液は毎週調製して使用する。

iv) 窒素分析用濃硫酸：試薬特級品の硫酸中にも微量の硝酸塩が含まれているため、硫酸を蒸発皿に入れ、砂浴上で硫酸の白煙が発生するまで加熱し硝酸塩を除去した硫酸を使用する。

(2) 器具

i) スポットプレート

ii) 小型ベンチ

(3) 検定方法

比色標準溶液をスポットプレート上に 1 滴ずつ滴加する。別に検体を小型ベンチまたは手で圧搾して、液汁を 1 滴スポットプレート上にとる。スポットプレートを動かし検液を攪拌しながら DPB 試薬を 5~6 滴滴加する。（呈色は硫酸濃度に関係するので、試薬溶液をわずかに過剰に滴加する。）硝酸塩が存在すれば青らん色を呈する。このときの色調を比色標準溶液の色調と比較して検液中の硝酸塩濃度を判定する。（この反応は非常に鋭敏であるが短時間内に退色するので 2~5 分以内に色調を判定する。）

2. 検定結果および考察

DPB 法と N.C.A. で採用されている DPA 法による呈色の比較を比色標準溶液について行なった結果、DPB 法では 0.5 ppm から 10 ppm の硝酸性窒素まで判定できるが、10 ppm 以上になると呈色が濃くなって差異の判定はつげがたい。DPA 法では硝酸性窒素 6 ppm 程度が検出限界であった。実際試料としてトマトジュースの遠沈上清（硝酸塩を検出しないもの）に硝酸性窒素として 0, 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 10.0 ppm になるように硝

* 財団法人東洋食品研究所（兵庫県川西市寺畑）
Toyo Institute of Food Technology, Kawanishi, Hyogo.

酸カリウムを添加した溶液を調製し、DPB 法と DPA 法による呈色の比較を行なった。天然物について実施した場合には、試薬溶液が濃硫酸であるため褐色化現象が認められるが、DPB 法では 1 ppm 程度まで判定できる。しかし、DPA 法では 6 ppm 以上の硝酸性窒素でないと判定できない。すなわち、DPB 法は DPA 法よりも 6~7 倍鋭敏であることが判明した。

検液の糖濃度が高い場合とか、パルプ質が多い場合には褐色化現象を起こしやすく、また一度に多量の試薬溶液を滴加したときにもこのような現象が現われるが、攪拌しながら試薬溶液を滴加すると比較的良好な結果がえられた。この褐色化現象防止についてはさらに検討を加えたい。

第 1 表 DPB 法と *m*-xylenol 法, Cd カラム法によるトマト果実中の硝酸塩測定値の比較 (単位: 硝酸性窒素の ppm)

試料番号	DPB 法	<i>m</i> -xylenol 法	Cd カラム法
1	1	1.3	1.5
2	6	6.5	5.7
3	6	4.9	5.4
4	6	8.6	7.5
5	3~6	4.9	4.3
6	10	10.4	11.3
7	10 以上	17.5	
8	6~10	9.6	
9	3	5.7	
10	6~10	10.7	
11	10	14.2	
12	3~6	8.5	
13	1~3	2.2	
14	1	1.8	
15	3	3.5	
16	3	2.9	
17	10	13.5	
18	6~10	9.1	
19	6	3.8	
20	1 以下	Tr	

トマト果実について DPB 試薬による簡易検定結果と *m*-xylenol 法, Cd カラム法による測定結果の比較を行なった。この結果を第 1 表に示した。この結果から、褐色化現象が認められるにもかかわらず DPB 法は硝酸性窒素 1~10 ppm 程度の範囲内で *m*-xylenol 法, Cd カラム法と比較し近似的な値がえられた。

3. 要約

本報で提唱した DPB 法を DPA 法ならびに *m*-xylenol 法, Cd カラム法と比較検討した結果、次の事柄が明らかとなった。

(1) DPB 法は DPA 法よりも 6~7 倍鋭敏であって、硝酸性窒素標準溶液では 0.5 ppm から 10 ppm まで判定できるが、10 ppm 以上になると呈色が濃くなるので差異の判定はつげがたい。またトマトジュースでは、有機物の存在のため褐色化現象が認められるにもかかわらず、1 ppm まで判定できる。

(2) トマト果実について、DPB 法による判定値と *m*-xylenol 法や Cd カラム法で測定した値は、ほぼ同じ結果がえられた。

(3) DPB 法は操作が非常に簡便であって、園場やかん詰工場内でかん詰原料中の硝酸塩簡易検定のための現場向の測定法として十分使用できる。

おわりに、本研究を行なうにあたり終始有益な御教示を賜わった、東洋製罐株式会社技術本部・研究部に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 東京大学農学部農芸化学教室: 実験農芸化学, 別巻, (朝倉書店), p. 76 (1964).
- 2) Method of Analysis of A.O.A.C., 9th. ed., 23-013 p. 298 (1960).
- 3) KAMM, L., McKEOWN, G.G. and SMITH, D.M.: J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 48, 892 (1965).
- 4) 杉山直儀・高橋和彦: 園芸, 27, 161 (1958).
- 5) FEIGL, F.: Spot Tests in Organic Analysis, 6th. ed., (Elsevier), p. 178 (1960).

(1967 年 11 月 30 日受理)