ヒドララジンを用いた食品中亜硝酸イオンの ガスクロマトグラフィーによる定量法

(昭和 55 年 6 月 3 日受理)

田中章男* 能勢憲英* 渡辺昭宣*

Gas Chromatographic Determination of Nitrite in Foods by Using Hydralazine

Akio TANAKA, Norihide NOSE
and Akinobu WATANABE

(Saitama Institute of Public Health: 639-1, Kamiökubo-higashi, Urawa-shi, Saitama)

A simple and practical method for the determination of nitrite in foods is described. It is based on the reaction of nitrite with hydralazine in acidic solution (pH 1.0~3.0) at 70°C for 10 min to form tetrazole [5,1- α] phthalazine, a stable compound which can be extracted with toluene and determined quantitatively by means of gas-liquid chromatography with a flame-ionization detector and a column of 3% OV-225 on Chromosorb W HP; the minimum determinable amount of nitrite-nitrogen was 0.02 μ g/ml.

A sample was finely chopped and ground in a porcelain pestle and mortar, then 5~10 g of the mixture was transferred into a 100 ml volumetric flask by means of 70 ml of hot water (ca. 80°C), and 2.5 ml of 1 N sodium hydroxide solution and 5 ml of 12% zinc sulfate solution were added. The whole was shaken occasionally in a water-bath at 80°C for 20 min, then cooled to room temperature, and filtered. (Vegetables and vegetable products were extracted at 80°C with occasional shaking for 60 min without the addition of 1 N sodium hydroxide solution or 12% zinc sulfate solution.)

A 20 ml volume of the filtrate was reacted with hydralazine, extracted twice with 5 ml of toluene and then concentrated to 5 ml by blowing dry nitrogen gas at 50°C. The concentrated solution was passed through an alumina column to remove interfering substances from foods. Twenty ml of hexane and 15 ml of acetone were added successively to the column at a rate of 3 ml/min. The acetone eluate was concentrated to 2 ml by blowing dry nitrogen gas at 50°C. The final solution was injected into the gas chromatograph.

The recovery of nitrite added to various foods ranged from 94.5 to 98.1% and, the standard deviation for the whole procedure was 1.1% for 28 determinations. The results of nitrite determination by proposed method were in good agreement with those of the colorimetric method.

(Received June 3, 1980)

Key words: ヒドララジン hydralazine; 亜硝酸イオン nitrite ion; ガスクロマトグラフィー gas-liquid chromatography; テトラゾロフタラジン tetrazolophthalazine

緒 言

亜硝酸塩は食肉および鯨肉製品、魚肉ソーセージ、ハム等の発色剤として広く利用され、その使用基準が食品衛生法で定められている。食品中の亜硝酸の定量法としては、亜硝酸を加温抽出し、除タンパクし、そのろ液についてジアゾ化反応により比色する方法^{1)~3)}がある。しかし、この方法は抽出操作で得られる試験溶液が食品の

種類によっては混濁または着色し、場合によっては定量が困難となることがある。このことから、亜硝酸をガスクロマトグラフィーにより定量する方法を検討した。ガスクロマトグラフィーによる方法は、亜硝酸を酸化して、硝酸としベンゼン⁴⁾や、2,4-キシレノール⁵⁾をニトロ化する方法、亜硝酸とオルトフェニレンジアミンと反応させて 1 H-ベンゾトリアゾールを生成する方法^{6),7)}等が報告されている。しかし、ニトロ化法は感度は良いが、高濃

* 埼玉県衛生研究所：浦和市上大久保東 639-1

度の硫酸を使用すること、また、オルトフェニレンジアミン法は反応および生成物抽出時でそれぞれの溶液のpHが異なるため、その都度調製しなければならないなどの問題がある。著者らは、ヒドララジンが亜硝酸と反応⁸⁾し定量的に、テトラゾロフタラジンを生成することより、これを用いてガスクロマトグラフィーにより食品中の亜硝酸を定量する方法を検討したところ良好な結果が得られたので報告する。

1. 実験方法

1.1 試料

魚肉ソーセージ、食肉ハム、サラミソーセージ、たらこ、コーンビーフ(かん詰)、ハウレンソウおよびトマトはいずれも市販品を用いた。

1.2 試薬および装置

亜硝酸標準溶液：乾燥した亜硝酸ナトリウム(試薬特級) 0.493 gを精密にとり蒸留水に溶かして1000 mlとし、原液とした。次に原液 10 ml をとり、水を加えて100 ml としたものよりその2 ml をとり、水を加えて全量を100 ml とし標準溶液とする。(用時調製)。亜硝酸

Scheme 1. Formation of tetrazolophthalazine

性窒素標準溶液 1 ml=0.2 μ g $\text{NO}_2\text{-N}$.

0.5% ヒドララジン溶液：ヒドララジン塩酸塩(試薬特級) 0.5 g を蒸留水に溶解し 100 ml とした。

活性アルミナ：市販品(酸性, Merck 社製)をそのまま使用した。

ガスクロマトグラフ用充てん剤：3% OV-225 (クロモソルブ W, HP, 80~100 mesh, 日本クロマト工業(株)製)を用いた。

ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製 GC-7AG 型(FID 検出器付)。

1.3 試験溶液の調製

細切試料 5~10 g をビーカーに精秤し、これに約 80°の温湯を適量加え 100 ml のメスフラスコに移し、容器を温湯で数回洗ってフラスコに加える。このときフラスコの液量は約 70 ml とする。これに 1 N 水酸化ナトリ

Table 1. Analytical Conditions of Gas-liquid Chromatography

Instrument	Shimadzu GC-7 AG type
Column	Glass column 1 m $\times$ 3 mm
Liquid phase	OV-225, 3%
Detector	Flame-ionization type
Detector temperature	300°C
Column temperature	230°C
Carrier gas	N_2 , 2.0 kg/cm ²

Fig. 1. Effect of amount of hydralazine on the formation of tetrazolophthalazine

Fig. 2. Effect of pH on the reaction with nitrite and hydralazine

ウム 2.5 ml を加えてよく振り混ぜた後、12% 硫酸亜鉛溶液 5 ml を加え、時々振り混ぜながら 80° の水浴中で 20 分間加熱する。(野菜およびその加工品については蒸留水 70 ml を加えて 80° で 60 分間加温抽出した)。ついで冷水中で室温となるまで冷却した後、蒸留水を加えて全量 100 ml とする。内容をよく混和した後、ろ過し、最初のろ液 10 ml を捨て以後の透明な液を試験溶液とする。

1.4 テトラゾロフタラジンの生成

ろ液 20 ml を正確に 50 ml の遠沈管に取り、これに 0.5% ヒドララジン溶液 1 ml を加えてよく振り混ぜ、次に 2 N 塩酸 2 ml を加えてよく振り混ぜた後、直ちに 70° の水浴上で 10 分間加熱して反応させる (Scheme 1)。

冷却後、塩化ナトリウム 5 g を加えてよく混和し、次にトルエン 5 ml を加えて 2 分間激しく振とう後、これを 5 分間 3000 回転で遠心分離した後、トルエン層を 25 ml の共栓試験管に分取し、更に先の遠沈管にトルエン 5 ml を加えて再び同様に操作する。ここに得られた前後の抽出液を合し、これに窒素ガスを通じ、50° の水浴上で 5 ml に濃縮する。濃縮液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、あらかじめトルエンで湿潤させたアルミナカラム (内径 1 cm × 長さ 30 cm, 下端にガラスウールを軽く詰めて、5 cm の層を作ったもの) に注ぎ、3 ml/min の速度でカラム内を流通させる。ついで *n*-ヘキサン 20 ml を注加し、ヘキサンの流出が終わったならばさらにアセトン 15 ml を加えてテトラゾロフタラジンを溶出さ

せる。この液を 50° の水浴上で窒素ガスを通じながら 2 ml に濃縮し、これを試験溶液とする。

1.5 定量操作

Table 1 に示した測定条件で、試験溶液 2~5 μ l をガスクロマトグラフィーに供し、定量を行った。

別に亜硝酸性窒素標準溶液 2~20 ml を数個の遠沈管に取り、水を加えて全量を 20 ml とした後、試験溶液の場合と同様に操作して検量線を作成する。試験溶液より得た値を検量線と対比して亜硝酸イオンの量を算出する。

2. 実験結果

2.1 ヒドララジンの添加量

ヒドララジンの添加量を定めるために、亜硝酸性窒素標準溶液 20 ml ずつを遠沈管に取り、2 N 塩酸 2 ml を加え次にヒドララジンを蒸留水で 0.5~15 mg/ml にした溶液をそれぞれ 1 ml ずつ加え 1.4 項の方法に従ってテトラゾロフタラジンを生成させた。Fig. 1 のようにヒドララジン 1 mg 以上で一定量のテトラゾロフタラジン生成がみられたが、実際に食品を分析するにはこの場合過剰と思える 5 mg を適当な添加量とした。したがって 0.5% ヒドララジン溶液を 1 ml 添加した。

2.2 テトラゾロフタラジンの生成条件

ヒドララジンと亜硝酸を反応させ、テトラゾロフタラジンを生成させる際に塩酸酸性下で行うが、この際反応液の pH によっては生成量に変動を生ずることが考えられるため、生成量がより多く、一定の値が得られる反応至適 pH について検討した。亜硝酸性窒素標準溶液

Fig. 3. Time course of formation of tetrazolophthalazine

Fig. 4. Effect of temperature on the formation of tetrazolophthalazine

20 ml をとり 1 N 塩酸を用い、それぞれ pH を 0.5~8 の範囲に調製し、0.5% ヒドララジン溶液 1 ml を加え、70° の水浴上で時々かき混ぜながら 10 分間加熱して反応を行い、3.4 項に従って生成したテトラゾロフタラジンを定量した。この結果を Fig. 2 に示したが、pH 1.0~

3.0 の範囲ではほぼ一定の生成量を示した。

pH 3 以上では反応は急激に低下した。2 N 塩酸 2 ml を加えることにより実際の食品の分析の際、pH が 1.0~3.0 の間に達するのでこの量の塩酸を加えることにした。

Fig. 5. Effect of pH on the extraction of tetrazolophthalazine

2.3 反応時間および温度

亜硝酸とヒドララジンの反応至適条件を見出すためまず反応時間の検討を行った。亜硝酸性窒素標準溶液 20 ml と 0.5% ヒドララジン溶液 1 ml を加え 70° で 2～10 分間でそれぞれ反応を行った。この結果を Fig. 3 に示した。

また、反応温度の検討は同様の条件で温度を 10～80° までとし、10 分間反応を行った。この結果を Fig. 4 に示した。

Fig. 3, Fig. 4 より反応は短時間で終了し、また温度も比較的低温でも反応することがわかったが、食品の分析の場合、抽出液が混濁した場合反応が進みにくいことを考慮し反応条件は 70° で 10 分間加熱とした。

2.4 抽出至適 pH

2.2 項によって生成したテトラゾロフタラジンのトルエン抽出時の至適 pH とテトラゾロフタラジンの抽出率を求めるため、亜硝酸性窒素標準溶液 20 ml を数個の遠沈管にとり 2.3 項に準じて反応を行った。反応後、1 N 塩酸および 2% 水酸化ナトリウム溶液で反応液を pH 0.5～8 の範囲に調製し、塩化ナトリウム 5 g を加えたものにつき、トルエン 5 ml で 2 回抽出した。Fig. 5 によりテトラゾロフタラジンは pH に関係なく抽出された。また 2.2 項で述べたテトラゾロフタラジンは生成時と抽出時の pH 域が重なっているため、反応後、pH の再調製をする必要はなく、直接抽出することができた。

3.5 抽出溶媒とクリーンアップ

ヒドララジンと亜硝酸により生成したテトラゾロフタ

Table 2. Recovery Tests of Tetrazolophthalazine from Alumina Column Chromatography

Volume of acetone (ml)	Recovery (%)				Average (%)
5	90.4	90.8	91.3	92.1	91.2
10	98.0	98.4	98.7	99.0	98.5
15	99.2	99.7	99.8	100.0	99.7

ラジンの抽出溶媒としては酢酸エチル、酢酸ブチル、ベンゼン、トルエン、キシレン、*n*-ヘキサン、シクロヘキサンについて検討を行ったが、*n*-ヘキサン、シクロヘキサン以外はほぼ 100% の抽出率であった。本実験では溶媒の揮散、実験操作上の観点等からトルエンを抽出溶媒とした。

クリーンアップはアルミナカラムの使用により食品中の色素はほとんど除去され、また魚肉、畜肉製品については、*n*-ヘキサン 20 ml を注加することにより肉製品由来と思われる油成分は除去された。この段階でのテトラゾロフタラジンはアルミナ層 5 cm では流出による損失はなかった。次にアセトン 15 ml によりテトラゾロフタラジンを完全に流出することができた。この結果は Table 2 に示す。

3.6 ガスクロマトグラフィーによる定量条件

ガスクロマトグラフィーの液相として OV-17, SE-30 QF-1, XE-60, OV-225 および PEG-20 M などを Table 1 の条件で検討した。この結果、OV-225, PEG-

Fig. 6. Calibration curve for nitrite-nitrogen

20 M 以外のものについては満足なピークは得られず、また OV-225 は PEG-20 M より感度が良好なため、OV-225 を液相として使用することにした。また、カラムの長さについても検討を行い、その結果 1 m とした。この条件を用い、実際に、Table 4 に示した試料について試験を行った。すなわち 1.3 項に準じて試料を調製し、反応抽出後、ガスクロマトグラフィーを行った結果、いずれもテトラゾロフタラジンの保持時間 (3.4 分) を妨害するピークはみられなかった。

また空試験として、ヒドララジンを添加しないものについても上記と同様に行ったが、テトラゾロフタラジンを妨害するピークは出現しなかった。

また、検量線は亜硝酸性窒素標準溶液を 2~20 ml とりすでに述べた方法により得られたピーク高を測定し、Fig. 6 に示した検量線を得た。

Fig. 6 より、原点を通り、直線性を示した。また、本法の定量限界は 20 ng/ml であった。

3.7 妨害物質の影響

試料中に共存すると思われるパラオキシ安息香酸ブチル、安息香酸、ソルビン酸、ブチルヒドロキシアニソール、ジブチルヒドロキソトルエンなどの添加物について検討した。亜硝酸性窒素標準溶液 20 ml を各添加物をそれぞれ 50 および 100 µg を加えて測定した結果、テトラゾロフタラジンの保持時間に相当する部分には各添加物のピークは出現せず、測定上影響がないことがわか

Table 3. Influence of Various Food Additives and Nitrate on the Determination of Nitrite by Gas-liquid Chromatography

Food additives	Added amount to 4 µg NO ₂ -N (µg)	Recovery of nitrite (%)
Sorbic acid	50	99.9
	100	99.8
Benzoic acid	50	100.1
	100	99.9
Butyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	50	99.7
	100	99.9
Butyl hydroxy anisole	50	99.0
	100	97.2
Dibutyl hydroxy toluene	50	99.4
	100	98.5
Potassium nitrate	50	100.0
	100	99.9

った。しかし、ブチルヒドロキシアニソール 100 µg の添加によりテトラゾロフタラジンの測定値が若干の低下を示した。また妨害物として、硝酸性窒素の影響を検討した。硝酸カリウムを用い、1 ml 中硝酸性窒素 50 および 100 µg を含む溶液を調製して、先と同量で同濃度の

Table 4. Recovery Tests of Nitrite Added to Various Foods

Sample	NO ₂ -N added (μ g)		Found (μ g)			Mean (μ g)	Recovery (%)
Fish sausage	0	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	
	20	19.3	19.6	19.8	19.8	19.6	98.1
Boneless pressed ham	0	1.9	2.0	2.2	2.2	2.1	
	20	21.0	21.3	21.6	21.8	21.4	96.6
Salami sausage	0	1.4	1.5	1.6	1.6	1.5	
	20	20.1	20.5	21.0	21.1	20.7	95.9
Pollack roe	0	1.9	2.1	2.3	2.4	2.2	
	20	20.4	20.8	21.6	21.6	21.1	94.5
Corned beef (Canned)	0	2.9	3.0	3.0	3.2	3.0	
	20	21.4	22.4	22.5	23.0	22.3	96.6
Spinach	0	3.1	3.1	3.1	3.2	3.1	
	20	21.5	21.9	22.7	22.9	22.3	95.8
Tomato	0	0.06	0.06	0.07	0.08	0.07	
	20	18.9	19.2	19.5	19.7	19.3	96.3
Mean value							96.3

Standard deviation: 1.1

Table 5. Comparison of Colorimetric Method and the Proposed Method for Determination of Nitrite-nitrogen

Sample	Colorimetric method NO ₂ -N found/ μ g	Proposed method NO ₂ -N found/ μ g
Boneless pressed ham	1 1.98	2.14
	2 3.76	3.79
Fish ham	1 4.10	4.18
	2 6.34	6.29
Pressed ham	1 15.0	14.4
	2 16.5	16.0
Fish sausage	1 0.08	0.08
	2 0.12	0.10
Salami sausage	1 1.59	1.53
	2 3.50	3.20
Pork sausage	1 8.40	8.93
	2 11.2	10.8

亜硝酸性窒素標準液をとり先に述べた方法で測定した。
以上の結果は Table 3 に示した。

また、除タンパク剤として 12% 硫酸亜鉛溶液を用いたが、テトラゾロプロフタラジン生成反応上の影響は全くなかった。

3.8 食品中亚硝酸の定量と測定精度

各種食品中の亜硝酸の定量と添加回収実験を 1.3~1.4 項に準じて行った結果は Table 4 に示す。

なお、測定値は 4 回の繰り返し定量を行った値である。この結果、平均回収率は 96.3% と良好な値が得られた。また、本法による測定値の標準偏差は $\pm 1.1\%$ であった。本法とジアゾ化⁷⁾による測定法を比較するため比較的着色の少なかった数種の市販加工肉製品をそのまま用い、1.3 項の方法に準じて得られた抽出液をジアゾ化して測定を行い、本法の測定結果と比較し、Table 5 に示す。

Table 5 のように、両法の測定値に大差なくほぼ等しい結果を得た。なお、ジアゾ化法では野菜および着色の著しい食品については直接比色定量ができなかったもので、本法と蒸留法を比較したが石崎⁷⁾の報告にみられるように、測定値が一定の値を示さず比較はできなかった。

4. 結 論

以上の結果から本法は、

(1) 亜硝酸をヒドララジンと塩酸酸性で 70°, 10 分間加熱後生成したテトラゾロプロフタラジンをトルエン抽出する。

その際、反応時と抽出時の pH が同じなのでそれぞれを調整する必要はなく、操作が簡単である。

(2) 着色料、天然色素などの夾雑物はアルミナカラムクロマトグラフィーで生成したテトラゾロプロフタラジンと分離することができる。

(3) ガスクロマトグラフィーにより、亜硝酸をテトラゾロプロフタラジンとして測定する際、ソルビン酸、安息香酸、パラオキシ安息香酸ブチル、ブチルヒドロキシアニソール、ジブチルヒドロキシトルエンは妨害ピークと

して出現せず、かつ再現性の良い測定値が得られた。また、硝酸塩、除タンパク剤の硫酸亜鉛はテトラゾロフタラジン生成に影響を与えなかった。

この結果、本法はジアゾ化比色法と比べてみても測定値はほぼ一致し食品中の亜硝酸イオンの日常試験法として十分実用に供し得る方法と考えられる。

本報告の要旨は、日本食品衛生学会第39回学術講演会(1980年5月、東京)において発表した。

終りに、本実験に際し、試料の提供をいただいた日本タバコ工業(株)に深謝致します。

文 献

- 1) 西村雅吉, 松永勝彦, 金沢秀郎: 分析化学, **18**, 1372~1376 (1969).
- 2) 菅野三郎, 和田 裕, 中岡正吉, 長谷川由紀子:

食衛誌, **7**, 72~75 (1966).

- 3) 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 311 (1980) 金原出版.
- 4) Wu, W. S., Peter, W. S.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **60**, 1137~1141 (1977).
- 5) Toyoda, M., Suzuki, H., Ito, Y., Iwaida, M.: *ibid.*, **61**, 508~512 (1978).
- 6) 秋庭正典, 桐榮恭二, 下石靖昭: 分析化学, **22**, 924~926 (1973).
- 7) 石崎陸雄, 小山田則孝, 上野清一, 片岡不士雄, 村山りつ子, 久保田かほる, 勝村 馨: 食衛誌, **17**, 428~433 (1976).
- 8) Darey, J., Ringier, B. H.: Helv. Chemica Acta., **34**, 195 (1951).