各種食品添加物と共存する亜硝酸塩の 比色定量法について

(昭和 42 年 9 月 29 日受理)

永 田 致 治* 安 藤 則 秀*

A Colorimetric Method for the Determination of Nitrite Coexisting with Various Food Additives

Yukiharu NAGATA and Norihide ANDO

(Faculty of Agriculture, Kyushu University:
Hakozaki, Fukuoka)

For the purpose of devising a colorimetric method for estimating the accurate amount of nitrite coexisting with various food additives, studies on a modified colorimetric method of Follett and Ratcliff have been made, and the following successful method has been developed in the present work.

Since it has been found that reducing substances and hexametaphosphate interfere with the modified method of Follett and Ratcliff, potassium ferricyanide was added first to a model system containing nitrite and various food additives in order to oxidize the reducing substances.

Potassium ferrocyanide formed by the reaction of potassium ferricyanide with reducing substances interfered with the modified method too, lead acetate, therefore, was added to precipitate it, whereupon hexametaphosphate was also precipitated by lead acetate simultaneously.

By filtering off these precipitates, the filtrate came to be absolutely free from interfering substances, and accordingly the accurate amount of nitrite coexisting with various food additives could be estimated by determining the nitrite in the filtrate following the modified method of Follett and Ratcliff.

(Received September 29, 1967)

肉製品中の亜硝酸塩の量を正確に定量することは、最近各種食品添加物の使用により複雑となってきた肉製品の発色機構を追究してゆくためにも、また食品衛生上の立場からもきわめて重要である。

われわれはさきに、亜硝酸塩と還元型 ascorbate (以下 R-As と略記) が共存する場合には、従来用いられている比色法または滴定法では、両成分の正しい定量値が得られないことを明らかにし、水溶液 model system 中に共存する亜硝酸塩と R-As の両成分を、同時にしかも正確に定量しうるポーログラフ法を考案し、さらにこの定量法を用いて、共存するこの両成分が、保存や加熱処理の際にどのような挙動を示すかについて追究した結果を報告した¹⁾²⁾。

しかしこのポーログラフによる亜硝酸塩定量法は、肉加工の際使用される多くの食品添加物によって阻害作

用を受けるため、これらの食品添加物が共存する場合の亜硝酸塩の挙動は、この方法では正しく追究できないことが明らかとなった²⁾。

そこで今回、亜硝酸塩の比色定量法について種々検討を行ない、各種食品添加物と共存する亜硝酸塩の量を正確に定量できる比色定量法を考案することができたので、その結果について報告する。

実験と考察

1. 各種比色定量法による亜硝酸塩定量値の比較

亜硝酸塩の比色定量法は現在までに数多く報告されているが、これらのうち通常ひろく使用されている A.O. A.C. 法³⁾、Griess-Irosbay 法⁶⁾⁷⁾、Shinn 法⁸⁾ および Follett and Ratcliff 法⁹⁾ について検討を行なった。

試料溶液は、前報²⁾³⁾の方法に準じ、pH 5.5 ペロナル緩衝液に亜硝酸ナトリウムのみ 0.01% 含むものと、これにアスコルビン酸ナトリウムを 0.1% 共存させたもの

* 九州大学農学部：福岡市箱崎

Table 1. Effect of Coexisting Reduced Form Ascorbate on the Findings for Sodium Nitrite Determined by Various Colorimetric Methods

[Each sample solution was prepared just before determination by dissolving 0.01% sodium nitrite and 0.1% sodium ascorbate in a veronal buffer of pH 5.5 at 0°C, respectively]

Concentration in sample solution		NaNO ₂ 0.01%		{NaNO ₂ 0.01% Na-ascorbate 0.1%				
Experiment No.		I	II	I	II	III	IV	V
NaNO ₂ found (ppm)	A.O.A.C. method ⁵⁾	100	100	26	26	34	35	29
	Griess-Irosvay method ^{6) 7)}	100	100	92	97	98	98	97
	Shinn method ⁸⁾	100	100	39	41	33	43	42
	Follett and Ratcliff method ⁹⁾	100	100	31	31	33	33	34

を、それぞれ 0° で調製した。

調製直後における各試料溶液中の亜硝酸塩を、上述の各種比色法で定量した結果は Table 1 のとおりである。

すなわち、R-As を含まない試料溶液では、いずれの方法によっても亜硝酸塩は正確に定量できたが、R-As が共存する場合には、いずれの方法においてもかなりの阻害を受けて、亜硝酸塩の定量値は低くなった。またこの場合、R-As による阻害の程度は定量法によって著しい差異のあることが認められた。

なお、Follett and Ratcliff 法を用いて調査した Fig. 1 の結果から明らかなように、共存する R-As の濃度を増すと阻害作用は大となり、亜硝酸塩の定量値はしだいに低くなる傾向を示した。

亜硝酸塩を比色定量する際に、共存する R-As が阻害作用を示す理由は、Table 2 に示すように、いずれの比色法においても、反応液に酢酸や塩酸などを添加し、酸性域でジアゾ化およびカップリングの反応を行なわせて発色させるために、R-As が共存すると反応液の pH や反応時間などによって著しい影響を受け、ジアゾ化およびカップリングの反応が進行する際に、R-As による亜硝酸塩の分解反応も進行するものと考えられる。

以上の結果、R-As のような還元性物質が共存する場合には、従来の比色法をそのまま適用すると、亜硝酸塩の正しい定量値は得られないことが明らかとなった。

Fig. 1. Effect of coexisting reduced form ascorbate on the findings for sodium nitrite (Modified method of Follett and Ratcliff)

[Each sample solution was prepared just before determination by adding desired amount of sodium ascorbate to a veronal buffer of pH 7.0 containing 0.01% sodium nitrite at 0°C]

Table 2. Colorimetric Methods for the Determination of Nitrite

Method	Color-developing reagent	Acidifying reagent	Conditions employed for color development		
			pH	Temperature (°C)	Time (min)
A.O.A.C. method ⁵⁾	Sulfanilic acid α -Naphthylamine	Acetic acid	3.1	Room temperature	60
Griess-Irosvay method ^{6) 7)}	Sulfanilic acid α -Naphthylamine	Na-acetate Acetic acid	2.7	Room temperature	10
Shinn method ⁸⁾	Sulfanilamide N-(1-Naphthyl)-ethylene-diamine dihydrochloride	Hydrochloric acid	0.8	Room temperature	5
Follett and Ratcliff method ⁹⁾	Sulfanilic acid α -Naphthol	Acetic acid Ammonia	4.0	25~30	30

2. 実験条件の検討

(1) R-As による阻害を除去する方法

上述のように、比色法で亜硝酸塩を定量する際、いずれの方法を用いても R-As が共存すると著しく阻害作用を示すことが明らかとなったので、亜硝酸塩の比色定量法のうち最近発表された Follett and Ratcliff 法を選び、これを改良し正確な亜硝酸塩定量法を確立する目的で、まず R-As による阻害を除去する方法について検討を行なった。

(i) Follett and Ratcliff 変法による亜硝酸塩の定量：肉製品中の硝酸塩および亜硝酸塩を定量する目的で、Follett and Ratcliff⁹⁾により新しく考案された亜硝酸塩の比色定量法を、われわれの実験目的に適するように一部改変したつぎに示す変法を用いて以下の検討を行なった。

亜硝酸塩を含む試料溶液 2 ml を 200 ml 容メスフラスコにとり、蒸留水で画線まで満たしたのち、その 5 ml を試験管にとり、これに Orange I 試薬 5 ml を加えて 30° の恒温水槽中で 30 分間反応発色させ、流水で 10 分間冷却後、得られた発色液について波長 479 m μ における吸光度を測定する。

この場合使用する Orange I 試薬は、原法⁹⁾に準じ、つぎのように調製した。すなわち、蒸留水 360 ml と氷酢酸 50 ml を 600 ml 容かっ色試薬ビンにとり、50° に加温したのち、スルファニル酸の粉末 0.25 g を加え、溶けたならばさらに α -ナフトール 0.2 g を加えて溶解する。流水で室温まで冷却後、ガラス電極 pH メーターを用いて、10%アンモニア水で pH 4.0 $\pm$ 0.05 に調整したのち、蒸留水を加えて全容を 500 ml とする。

なお原法では pH 9.6~9.7 の HCl-NH₄OH 緩衝液を添加しているが、変法ではこれを添加せず、また原法では発色の際の温度を 25~30° としているが、変法では発色条件を一定にするために 30° とし、測定波長も原法では 474 m μ を用いているが、島津製光電分光光度計を使用して検討した結果、最大吸収波長は 479 m μ であったので、変法ではこの波長で比色定量することとした。

(ii) 酸化剤による R-As の阻害除去試験：亜硝酸塩を比色定量する際に、共存する R-As が阻害作用を示すのは、酸性域において R-As が亜硝酸塩を還元して分解するために起こるのであるから、R-As を酸化して反応系から除去すれば、その阻害を防止できると考えられる。

まず、強力な酸化剤として、過マンガン酸カリウムと臭素について検討を行なったが、これらはいずれも亜硝酸塩そのものをも分解する作用のあることが認められたので、この実験目的には使用できなかった。

(iii) 亜硝酸塩の比色定量値に及ぼす赤血塩の影響：つぎに、温和な酸化剤であり、タンパク質の SH 基の定量¹⁰⁾¹¹⁾などの試薬に应用されている赤血塩について検討

Fig. 2. Effect of potassium ferricyanide on the findings for sodium nitrite

(Modified method of Follett and Ratcliff)

[Each sample solution was prepared just before determination by adding desired amount of potassium ferricyanide to a veronal buffer of pH 7.0 containing 0.01% sodium nitrite at 0°C]

を行なった。すなわち、亜硝酸ナトリウム 0.01% と種々の濃度の赤血塩を含む pH 7.0 ベロナール緩衝液を試料溶液とし、赤血塩が亜硝酸塩の定量値に及ぼす影響を調査した。

その結果は Fig. 2 のとおりで、赤血塩が一定量以上共存すると、しだいに吸光度が増加する傾向を示したが、発色液の赤血塩濃度 0.08 mM 以下ではなんら影響はないことが認められた。

(iv) 赤血塩による R-As の阻害除去：上述の結果を参照し、赤血塩を用い、亜硝酸塩と共存する R-As を酸化することによって、R-As による阻害を除去できるかどうかを検討した。すなわち、亜硝酸塩 0.01% とともに、アスコルビン酸ナトリウムを 0~0.2% 含む pH 7.0 ベロナール緩衝液に、赤血塩を濃度 20 mM になるように添加し、0° で 30 分間保持して R-As を酸化し、つぎに比色定量の際の発色液の赤血塩の終濃度が 0.08 mM 以下になるように蒸留水で希釈してから、各試料溶液について亜硝酸塩を定量した。

このような定量条件を採用したのは、つぎの理由による。すなわち前報²⁾で、pH 7.0, 0° の条件下では、72 時間後においても、共存する亜硝酸塩と R-As の両成分は全く反応せず安定であることが明らかにされており、また今回、赤血塩による R-As の酸化反応は、pH 7.0, 0° の条件下で数分間以内に完結することが確かめられたので、赤血塩による R-As 酸化の反応条件は pH 7.0, 0°, 30 分間と定めた。また、発色液の赤血塩濃度を 0.08 mM 以下になるように希釈した理由は、(iii) に示したとおりである。

結果は Fig. 3 のとおりで、Fig. 1 に示した赤血塩未処理の場合ほど著しくはないが、R-As が共存すると、赤血塩処理を施しても、やはり定量操作中に亜硝酸塩の一部が分解し、そのため亜硝酸塩の正確な定量値の得ら

Sample No.	①	②	③	④
NaNO ₂ (%)	0.01	0.01	0.01	0.01
Na-ascorbate (%)	—	0.05	0.10	0.15
K ₃ Fe(CN) ₆ (mM)	—	20	20	20

Fig. 3. Effect of potassium ferricyanide on the findings for sodium nitrite coexisting with reduced form ascorbate

(Modified method of Follett and Ratcliff)

[Each sample solution was prepared just before determination by adding desired amount of sodium ascorbate to a veronal buffer of pH 7.0 containing sodium nitrite and potassium ferricyanide at a concentration of 0.01% and 20 mM respectively, and allowed to stand for 30 min at 0°C]

Fig. 4. Formation of potassium ferrocyanide by the reaction of potassium ferricyanide with reduced form ascorbate

[Each sample solution was prepared just before determination by adding desired amount of sodium ascorbate to a veronal buffer of pH 7.0 containing potassium ferricyanide at a concentration of 0.05 mM, and allowed to stand for 30 min at 0°C. Ferrocyanide was determined by the method of Anson and Mirsky⁹⁾]

れないことが明らかとなった。この結果から、R-As は赤血塩によって酸化されるが、それと同時に赤血塩は還元されて黄血塩となり、これが亜硝酸塩を分解するのではないかと考えられる。

(v) 赤血塩と R-As の反応による黄血塩の生成:

この推定のように、果して赤血塩による R-As の酸化に伴い黄血塩が生成されるかどうかを調べるために、赤血塩濃度 0.05 mM、アスコルビン酸ナトリウム濃度 0~0.001% の pH 7.0 ペロナル緩衝液を 0° で調製し、0° で 30 分間反応後における各試験液中の黄血塩生成量を Anson and Mirsky の方法¹⁰⁾ により定量した。

その結果は Fig. 4 のとおりで、赤血塩と R-As の反応は化学量論的に進行し、用いた実験条件下では、赤血塩 2 モルと R-As 1 モルから黄血塩 2 モルが生成されることが確かめられた。

(vi) 赤血塩溶液の添加量: 試料溶液の R-As 濃度が、通常肉加工に使用される程度の量、すなわちアスコルビン酸ナトリウムとして 0.1% (約 5 mM 溶液に相当) であると仮定すると、この試料溶液 2 ml 中の R-As を酸化するには、前項で述べた実験結果から、10 mM 赤血塩水溶液 2 ml を必要とするが、還元性物質含量の変動を考慮して幾分過剰に、しかも発色阻害を示さない量として、試料溶液 2 ml に対して 10 mM 赤血塩溶液を 3 ml 添加することとした。

しかしながら、試料溶液にかなり多量の還元性物質が含まれ、そのためにこの赤血塩添加量で不足する場合も考えられる。このような場合には、赤血塩溶液の示す黄色がただちに消失してほとんど無色となるが、これは肉眼的に容易に観察できるので、そのときはさらに 3 ml の 10 mM 赤血塩溶液を追加する必要がある。

試料溶液に含まれる還元性物質の量が、アスコルビン酸ナトリウムの 0.15% 相当量以下であれば、試料溶液 2 ml に対して 10 mM 赤血塩溶液 3 ml を添加すると反応液中に過剰に残存する赤血塩はそのまま発色液に移行するが、試料溶液の 200 倍希釈液に相当する発色液の赤血塩濃度は、共存する還元性物質の量に応じて 0.075 mM 以下となり、したがって、Fig. 2 に示した実験結果から明かなように、亜硝酸塩を Follett and Ratcliff 変法により比色定量する際に赤血塩が発色阻害を起こす心配はない。

(vii) 亜硝酸塩の比色定量値に及ぼす黄血塩の影響: 亜硝酸塩を Follett and Ratcliff 変法により比色定量する際に、共存する黄血塩が影響を及ぼすかどうかを調査するために、亜硝酸塩濃度 0.01%、黄血塩濃度 0~20 mM の pH 7.0 ペロナル緩衝液を 0° で調製し、これらの試料溶液について調製直後における亜硝酸塩を比色定量した。

その結果は Fig. 5 に示すとおりで、前述の亜硝酸塩と共存する R-As を赤血塩で酸化した場合の定量結果

Fig. 5. Effect of potassium ferrocyanide on the findings for sodium nitrite

(Modified method of Follett and Ratcliff)

[Each sample solution was prepared just before determination by adding desired amount of potassium ferrocyanide to a veronal buffer of pH 7.0 containing 0.01% sodium nitrite at 0°C]

(Fig. 3)と同様の傾向を示し、共存する黄血塩の量にほぼ比例して亜硝酸塩の一部が定量操作中に分解することが認められた。

以上のことから、亜硝酸塩を定量する際、共存する R-As によって生ずる妨害を除く目的で赤血塩処理を行なっても、R-As と赤血塩の反応の結果生じた黄血塩が亜硝酸塩を一部分解することが明らかになったので、つぎにこの黄血塩を反応系から除去する方法について検討を行なった。

(viii) 反応系よりの黄血塩除去法：黄血塩を反応系から沈殿除去する目的で、沈殿剤として、硫酸亜鉛および酢酸鉛を選び検討を行なったが、硫酸亜鉛を用いると、Follett and Ratcliff 変法による亜硝酸塩定量の際、微量の赤血塩の共存により発色を妨害し白濁を生ずるため、硫酸亜鉛はこの実験目的に使用できなかった。そこでつぎに酢酸鉛を用いて検討を行なった。

(ix) 亜硝酸塩定量値に及ぼす酢酸鉛の影響：使用する 0.1 M 酢酸鉛溶液は、つぎの方法で調製した。すなわち、炭酸ガスによる白濁を防ぐため、酢酸鉛を煮沸蒸留水に溶解し、10% 酢酸水溶液で pH 5.5 に調整し定容としたのち、東洋ロ紙 No. 6 でろ過する。

この 0.1 M 酢酸鉛溶液を 0~20 ml 添加し、全容を 200 ml とした亜硝酸塩 2 ppm を含む pH 7.0 ベロナール緩衝液を試料溶液とし、酢酸鉛が Follett and Ratcliff 変法による亜硝酸塩の比色定量値に及ぼす影響を調査したところ、この試料溶液 200 ml 中に 0.1 M 酢酸鉛溶液が 20 ml まで含まれても、亜硝酸塩の定量値になら阻害を示さないことが認められた。

(x) 酢酸鉛溶液の添加量の検討：亜硝酸塩と共存

する R-As を赤血塩を用いて酸化し、その結果生じた黄血塩を沈殿除去させるために、酢酸鉛溶液をどの程度添加すれば R-As による妨害を除去できるかについて検討を行なった。すなわち、あらかじめ 0° に氷冷した pH 7.0 ベロナール緩衝液 25 ml*, 10 mM 赤血塩水溶液 3 ml, 蒸留水 25 ml を 200 ml 容メスフラスコにとり、これに試料溶液として 0.01% 亜硝酸ナトリウム水溶液および 0.1% アスコルビン酸ナトリウム水溶液をそれぞれ 2 ml ずつ添加してよく攪拌混合後、30 分間氷水中で 0° に保った。つぎに 0.1 M 酢酸鉛溶液を最高 20 ml まで種々の量を加えて室温で 30 分間放置後、蒸留水で画線まで満たし、東洋ロ紙 No. 6 を用いてろ過したのち、ろ液中の亜硝酸塩を Follett and Ratcliff 変法で定量した。

その結果は Fig. 6 のとおりで、酢酸鉛の添加量を増すと R-As と赤血塩の反応の結果生じた黄血塩による妨害作用はしだいに減少し、この場合 0.1 M 酢酸鉛溶液 5 ml 以上の添加により亜硝酸塩は 100% 回収され、正確に比色定量できることが明らかとなった。この実験結果から、0.1 M 酢酸鉛溶液は 10 ml 添加することとした。

別途実験により、黄血塩と酢酸鉛はそれぞれ 2:3 のモル比で反応し、不溶性の錯塩を生成することが確かめられたが、Fig. 6 に示す実験結果から酢酸鉛はかなり

Fig. 6. Effect of lead acetate on the findings for sodium nitrite

(Modified method of Follett and Ratcliff)

[To 25 ml of veronal buffer of pH 7.0, 2 ml of 0.01% sodium nitrite solution, 2 ml of 0.1% sodium ascorbate solution, 3 ml of 10 mM K₃Fe(CN)₆ solution and 25 ml of distilled water were added, and the solution was allowed to stand for 30 min at 0°C. To which varying volumes of 0.1 M lead acetate solution were added, and the resulting mixture was allowed to stand for 10 min at a room temperature, then diluted to 200 ml and filtered. Nitrite in the filtrate was determined colorimetrically]

* pH 7.0 ベロナール緩衝液を 25 ml 添加することにより、赤血塩処理反応液を pH 7 に保持しうることが確かめた。

過剰に加える必要があり、0.1 M 酢酸鉛溶液を 10 ml 添加した場合は、理論量の約30倍も過剰に添加したことになる。

なお赤血塩と酢酸鉛は、この実験条件下では反応しないことが確かめられた。また上述の実験において、亜硝酸塩を比色定量する場合、Shinn 法⁹⁾を用いて同様の検討を行なってみたが、赤血塩や酢酸鉛の添加によりかなりの発色阻害を起こすことが認められた。したがって亜硝酸塩の比色定量法としては、Follett and Ratcliff 変法が最も適当であると考えられる。

(xi) 亜硝酸塩の濃度と吸光度との関係： 上述の検討により得られた方法を用い、R-As 0.1% と種々の濃度の亜硝酸塩を含む pH 7.0 ベロナール緩衝液を試料溶液として、亜硝酸塩濃度と発色液の吸光度との関係を調査した結果、亜硝酸ナトリウム0.04%以内で亜硝酸塩濃度と 479 m μ における吸光度との間に直線関係が得られ、Beer の法則に従うことが認められた。

(xii) R-As と共存する 亜硝酸塩の回収率： われわれの考案した亜硝酸塩定量法によって、亜硝酸塩と共存する R-As の阻害作用が完全に除去できるかどうかをさらに確認するために、試料溶液として亜硝酸ナトリウム 0.01%ならびにアスコルビン酸ナトリウム 0.1%を含む pH 5.0, 6.0および 7.0 のベロナール緩衝液を 0° で調製し、ただちに亜硝酸塩を定量した。

その結果は Table 3 に示すように、R-As の阻害作用は、赤血塩および酢酸鉛処理を行なうこの改良法によって完全に除去され、前報²⁾のポーラログラフ法による定量値とほとんど一致して亜硝酸塩は 100% 回収され、この改良法により R-As が共存する場合にも正確な亜硝酸塩の定量値の得られることが明らかとなった。

(2) 各種食品添加物の影響

亜硝酸塩を定量する場合、上述のように R-As による阻害を除去する改良法を考案することができたが、肉加

工の際使用される R-As 以外のいろいろな食品添加物が共存する場合、この改良法に対して阻害作用を示すか否かを確かめるため、Follett and Ratcliff 変法そのものと、これに赤血塩および酢酸鉛処理を施した改良法を対比しながらさらに検討を行なった。使用した食品添加物の種類は Table 4 のとおりで、普通肉加工の際に使用される程度の量を用いて実験を行なった。なおこの場合の各供試液の pH は 6.0、亜硝酸ナトリウム濃度は 0.01%とし、使用した食品添加物のうち、システインの影響をみるために用いたシステイン塩酸塩、およびリン酸塩類、ソルビン酸とその塩類は、あらかじめ 1 N と 0.1 N の水酸化ナトリウムあるいは塩酸溶液で pH 6.0 に調整して使用した。

Table 4 は、亜硝酸塩の定量値に及ぼす各種食品添加物の影響を調査した結果を示すもので、Follett and Ratcliff 変法そのものでは、R-As と同様にイソアスコルビン酸ナトリウム、システインによる著しい阻害がみられ、またそのほかにヘキサメタリン酸塩がわずかではあるが阻害を示すことが認められた。しかし改良法では、供試した各種食品添加物はすべてなんら阻害を示さないことが認められた。このように改良法においては、イソアスコルビン酸ナトリウムとシステインによる阻害が認められなくなったのは、R-As の場合と同様に、いずれも赤血塩ならびに酢酸鉛による処理でこれらの成分が反応系から除去できたことを示している。またヘキサメタリン酸塩による阻害が除かれたのは、試薬として加えた酢酸鉛が、ヘキサメタリン酸塩と反応して沈殿除去されたためであることが、別途実験により明らかとなった。

3. 実験方法

上述のようにして実験条件を種々検討の結果、比色法により通常肉加工の際に使用される各種食品添加物が共存しても、亜硝酸塩を正確に定量できるつぎのような方

Table 3. Effect of Coexisting Reduced Form Ascorbate on the Findings for Sodium Nitrite Determined by the Modified and Modified and Improved Colorimetric Methods of Follett and Ratcliff, and the Modified Polarographic Method

[Each sample solution was prepared just before determination by dissolving 0.01% sodium nitrite and 0.1% sodium ascorbate in a veronal buffer of pH 5.0~7.0 at 0°C, respectively]

Method		NaNO ₂ found (ppm)		
		pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0
Colorimetric method of Follett and Ratcliff	Modified	36.6	36.6	35.9
	Modified and improved ^{a)}	99.6	99.8	99.8
Modified polarographic method ²⁾		99.7	100.0	100.0

a) Subjected to the preliminary treatments with K₃Fe(CN)₆ and Pb-acetate reagents

Table 4. Effects of Coexisting Food Additives on the Findings for Sodium Nitrite Determined by the Modified and Modified and Improved Methods of Follett and Ratcliff

[Each sample solution was prepared just before determination by adding desired amount of each food additive to a veronal buffer of pH 6.0 containing 0.01% sodium nitrite]

Additive	Concentration in sample solution (%)	NaNO ₂ found (ppm)	
		Modified method	Modified and improved method
NaCl	2.0	100	100
KNO ₃	0.1	100	100
Na-ascorbate	0.1	50	100
Na-isoascorbate	0.1	50	100
Cysteine	0.1	72	100
Nicotinamide	0.1	100	100
NaH ₂ PO ₄	0.5	100	100
Na ₂ HPO ₄	0.5	100	100
Na ₃ PO ₄	0.5	100	100
Na ₂ H ₂ P ₂ O ₇	0.5	100	100
Na ₄ P ₂ O ₇	0.5	100	100
Na ₅ P ₃ O ₁₀	0.5	100	100
Na ₆ P ₆ O ₁₈	0.5	97	100
Sorbic acid	0.1	100	100
K-sorbate	0.1	100	100
Na-sorbate	0.1	100	100
AF-2*	0.025	100	100

* A mixture of 1 part of AF-2 and 49 parts of soluble starch. Accordingly, the sample solution contains 5 ppm of AF-2

法を考案することができた。

実験方法：あらかじめ 0° に氷冷した pH 7.0 ペロナル緩衝液 25 ml, 10 mM 赤血塩水溶液 3 ml および蒸留水 25 ml を 200 ml 容メスフラスコにとり、これに 0.04 % 以下の亜硝酸ナトリウムと、通常肉加工の際使用される程度の濃度に各種食品添加物を含む試料溶液を 2 ml 添加し、30 分間氷水中で 0° に保持する。つぎに 0.1 M 酢酸鉛溶液 10 ml を添加して室温で 10 分間放置後、蒸留水で画線まで満たし、東洋口紙 No. 6 を用いてろ過する。ろ液 5 ml を試験管にとり、これに Orange I 試薬〔調製法 2・(1)・(i)] 5 ml を加えよく攪拌し、30° の恒温水槽中で 30 分間発色させたのち、流水で 10 分間冷却し、波長 479 mμ における吸光度を測定する。その際、試料溶液を入れないで同様に処理したものを盲検とする。この吸光度の値から、標準液で作成した検量曲線により亜硝酸塩量を算出する。

なお、この model system における亜硝酸塩定量法を、肉製品の場合に適用するため、種々検討を行なった結果、一応の成果が得られたので、これについては近く発表の予定である。

要 約

各種食品添加物と共存する亜硝酸塩を正確に定量できる比色法を見いだすため、model system を用い、Follett and Ratcliff 変法について種々検討を行なった結果、この目的にそうつぎのような方法を考案することができた。

Follett and Ratcliff 変法で亜硝酸塩を比色定量する場合、還元性物質とヘキサメタリン酸塩が阻害を示すことを認めたので、まず亜硝酸塩と各種食品添加物を含む model system に赤血塩を加えて還元性物質を酸化する。赤血塩と還元性物質の反応で生じた黄血塩もまた阻害を示すので、これを沈殿除去するため酢酸鉛を加えると、この際同時にヘキサメタリン酸塩が沈殿する。

これらの沈殿をろ過すると、すべての阻害物質が除去されるので、このろ液について Follett and Ratcliff 変法で亜硝酸塩を比色定量すると、各種食品添加物と共存する亜硝酸塩の量を正確に定量することができる。

終わりに本研究を行なうにあたり、実験にご協力下さった重富由紀子嬢と坂口恵子嬢に深く感謝の意を表しま

す。

本報の要旨は昭和 39 年度日本畜産学会大会 (昭和 39 年 4 月, 東京) において発表。

文 献

- 1) N. Ando, Y. Kako, Y. Nagata: Bull. Meat and Meat Products **2**, 7 (1963).
- 2) 永田致治, 安藤則秀: 栄養と食糧 **19**, 424 (1966-67).
- 3) 永田致治, 安藤則秀: 同上 **19**, 282 (1966).
- 4) 永田致治, 安藤則秀: 同上 **19**, 286 (1966).
- 5) Methods of Analysis, A.O.A.C. 389 (1955).
- 6) R. Novak, P. W. Wilson: J. Bacteriol. **55**, 517 (1948).
- 7) 山田敏郎, 江上不二夫ほか編: “標準生化学実験” p. 348 (1953) 文光堂, 東京.
- 8) M. B. Shinn: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. **13**, 33 (1941).
- 9) M. J. Follett, P. W. Ratcliff: J. Sci. Food Agr. **14**, 138 (1963).
- 10) M. L. Anson, A. E. Mirsky: J. Gen. Physiol. **24**, 679 (1941).
- 11) A. Kajita: J. Biochem. (Tokyo) **26**, 547 (1954).