

# 高速液体クロマトグラフィー法による硝酸根及び亜硝酸根の測定とカドミウム還元・ジアゾ化による比色法との測定値の比較

小嶋慎太郎・内山亜喜子

福岡市保健環境研究所保健科学部門

## Measurement of Nitrate and Nitrite by High Performance Liquid Chromatography Method and Comparison of the Measurement with Colorimetric Method by Cadmium Reduction-Diazotization

Shintaro KOJIMA and Akiko UCHIYAMA

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

### 要約

カドミウム還元・ジアゾ化法による硝酸根の測定を見直すため、高速液体クロマトグラフィー法により辛子明太子、食肉製品中の硝酸根を測定した。辛子明太子 29 検体及び食肉製品 31 検体について測定し、その値をカドミウム還元・ジアゾ化法で測定した値と比較したところ、辛子明太子は 0.002~0.030g/kg の範囲でその相関係数は 0.981、食肉製品については 0.004~0.383g/kg の範囲でその相関係数は 0.999 と高い相関を示した。また亜硝酸根も同時に測定し同様に比較を行ったところ、食肉製品については 0.001~0.062g/kg の範囲でその相関係数は 0.989 であり、高い相関を示した。

**Key Words** : 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, 硝酸根 nitrate, 亜硝酸根 nitrite, カドミウム還元 cadmium reduction, ジアゾ化 diazotization, 比色法 colorimetric method

## 1 はじめに

いくら、たらこや食肉製品などの見た目をよくするための発色剤として添加される食品添加物に亜硝酸ナトリウムや硝酸カリウムなどがある。これらには食品衛生法により使用基準が定められており、亜硝酸根としてたらこには 0.0050g/kg、食肉製品には 0.070g/kg を超える量残存してはならないとなっている<sup>1)</sup>。

現在当所では、硝酸根の分析を食品衛生検査指針食品中の食品添加物分析法1989に基づき行っている。すなわち、銅処理カドミウムカラムを用い硝酸イオンを亜硝酸イオンへ還元し、その後比色法で測定をする方法を用いている。

この方法は銅処理カドミウムカラムを用いるため、その廃液はカドミウムや銅などの重金属イオンを含む重金属廃液となる。そこで環境への負荷を減らす為には銅処理カドミウムカラムを使用せずに硝酸根を測定する必要がある。

現在第2版食品中の食品添加物分析法ではイオンクロマトグラフを用いた分析法が採用され<sup>2)</sup>、また衛生試験法・注解2005では高速液体クロマトグラフを用いた分析法が掲載されている<sup>3)</sup>。そこで今回当所が保有する高速液体クロマトグラフ（以下HPLC）を用いて硝酸根の測定を行い、その結果について現行の分析法との比較を行ったのでその結果を報告する。

また亜硝酸根については、銅処理カドミウムカラムは使用しないが、硝酸根と同じ分析条件での測定が可能であったため同時に測定を行ったのでその結果も報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

辛子明太子29検体、食肉製品31検体

## 2.2 試薬等

亜硝酸ナトリウム：和光純薬製，特級

硝酸カリウム：和光純薬製，特級

標準原液（オートアナライザー）：硝酸カリウム361mg  
または亜硝酸ナトリウム246mgに蒸留水を加え50mLとした。  
(Nとしてそれぞれ1,000 $\mu$ g/mL)

標準原液（HPLC）：硝酸カリウム163mgまたは亜硝酸ナ  
トリウム150mgに蒸留水を加え100mLとした( $\text{NO}_3$ またはN  
 $\text{O}_2$ としてそれぞれ1,000 $\mu$ g/mL)

標準液：各標準原液を蒸留水で適宜希釈した。

スルファニルアミド：キシダ化学製，特級

N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩：片山化学工業製，  
特級

50%Triton-X：Triton-X(シグマ製)をエタノールで2倍希釈  
した

比色用発色試薬：りん酸100mLに水800mLを加え，スル  
ファニルアミド1g，N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩0.  
5gを加え溶解させた後蒸留水を加えて1Lとし，50%Triton-X  
を2mL加えた。

銅処理カドミウムカラム：和光純薬製カドミウム(銅コー  
ティング済)水中浸漬品0.5~2mm，硝酸塩分析用を内径2m  
m $\times$ 15cmのガラス管に十分量詰め，その両端をガラスウール  
で軽く栓をした。

その他試薬：市販の特級品を用いた。

## 2.3 装置および測定条件

### 2.3.1 オートアナライザー

ブラン・ルーベ製オートアナライザーII

測定波長：550nm

### 2.3.2 高速液体クロマトグラフ

アジレント社製1100シリーズ

移動相：りん酸水素二ナトリウム十二水和物1.79g，りん  
酸二水素ナトリウム二水和物0.78g，過塩素酸ナトリウム一  
水和物14.04gに蒸留水を加え1Lとした。

カラム：Asahipak NH2P-50 4E 4.6 $\times$ 250mm，粒径5 $\mu$ m

測定波長：210nm

注入量：20 $\mu$ L

カラム温度：25 $^{\circ}$ C

## 2.4 試験溶液の調製方法

試料10gに熱水50mL及び10%炭酸ナトリウム溶液4mLを加  
えホモジナイズし，それを200mL容比色管に移した。容器は  
熱水10mLずつで数回洗浄し洗液は比色管に加え，液量が12  
0mLを超えたところで80 $^{\circ}$ Cの水浴に入れ20分間加熱した。冷  
水中で室温まで冷却した後15%フェロシアン化カリウム溶  
液5mL及び30%硫酸亜鉛溶液5mLを加えよく振り混ぜ，水を

加えて全量を200mLとした。4 $^{\circ}$ Cで一晩放置し，内容をよく  
混和し乾燥した東洋ろ紙No.5Aを用いて別の共栓付比色管  
へろ過した。その際最初のろ液約40mLを捨て，その残りを試  
料溶液とした。

## 2.5 比色法の試験方法

試料溶液10mLを試験管にとり，オートアナライザーを  
用いて測定を行った。試料溶液は必要に応じて水で希釈  
したものを使用した。オートアナライザーの2つのライン  
のうち片方のみ銅処理カドミウムカラムをセットし，  
 $\text{NO}_3$ を還元した $\text{NO}_2$ 及び試料溶液由来の $\text{NO}_2$ の総量を測  
定した。またもう一方のラインで試料溶液由来の $\text{NO}_2$ を  
測定し，その後試料溶液由来の $\text{NO}_2$ との差から $\text{NO}_3$ を求  
めた。

## 2.6 HPLC法の試験方法

試料溶液及び標準液を0.2 $\mu$ mのメンブレンフィルター  
でろ過した後，HPLCに供した。標準液の濃度は0.05~10  
 $\mu$ g/mLとした。

HPLC法での定量下限は，標準液を測定した際S/N比が10  
を超えた0.05 $\mu$ g/mLを定量下限とした。すなわち検体換算と  
して0.001g/kgを定量下限とした。

## 3 実験結果及び考察

### 3.1 硝酸根の測定結果

オートアナライザーによる比色法及びHPLC法により測  
定した硝酸根の値を表1に示した。食肉製品については3回測  
定を行いその平均値とした。

辛子明太子は比色法で0.003~0.030g/kg，HPLC法で0.002  
~0.029g/kgであった。食肉製品は比色法で0.006~0.383g/kg，  
HPLC法で0.006~0.380g/kgであった。

比色法の測定値を横軸，HPLC法の測定値を縦軸にプロッ  
トした(図1及び2)。相関係数は辛子明太子で0.981，食肉  
製品で0.999といずれも高い相関を示した。

上記の結果から，HPLCによる分析を行うことで，銅処理  
カドミウムカラムを使うことなく同様の結果を得ることが  
できることが判明した。

### 3.2 亜硝酸根の測定結果

食肉製品全31検体について両法による亜硝酸根の測定結  
果を表2に示した。定量下限は3.1と同様0.001g/kgとした。

3検体は両法において定量下限未満であった。それ以外に  
ついては比色法では0.002~0.062g/kg，HPLC法では0.001~0.  
061g/kgであった。3.1と同様相関係数を求めたところ，0.989  
と高い相関を示した(図3)。

硝酸根と同じ分析条件で測定が可能のため、食肉製品についてはHPLCによる同時分析を行うことが可能であることが判明した。

辛子明太子については、HPLC法での測定を試みたが定量はできなかった。これは今回の前処理法では妨害を完全に除去できず妨害ピークと目的のピークが十分に分離できなかった事と、辛子明太子の原料であるたらこに対する基準が0.0050g/kgと低く、硝酸根の分析に比べ低濃度の領域を分析しなければならぬため、測定感度が十分でないことが考えられた。

しかし食肉製品については0.001g/kgの分析が可能であったことから、前処理法を変えることで分析は可能になると考える。また、カラムサイズを変更するなどしてより高感度な分析をすれば低濃度領域についても分析が可能

になるものと考えられる。今後はこの結果をふまえ、辛子明太子への適用やより低濃度領域を高感度に分析する方法について検討していくこととしている。

## 文献

- 1) 厚生省告示第370号：食品、添加物等の規格基準，昭和34年12月28日
- 2) 厚生省生活衛生局食品化学課：第2版食品中の食品添加物分析法，102～104，2000
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2005，329，金原出版(株)，2005

表1 硝酸根の比色法及びHPLC法による測定結果

| 検体名   | No. | 比色法   | HPLC法 | 検体名  | No.   | 比色法   | HPLC法 | 硝酸Kの表示 |
|-------|-----|-------|-------|------|-------|-------|-------|--------|
| 辛子明太子 | 1   | 0.011 | 0.009 | 食肉製品 | 1     | 0.012 | 0.010 | なし     |
|       | 2   | 0.004 | 0.002 |      | 2     | 0.131 | 0.131 | なし     |
|       | 3   | 0.008 | 0.006 |      | 3     | 0.027 | 0.027 | なし     |
|       | 4   | 0.030 | 0.029 |      | 4     | 0.170 | 0.173 | あり     |
|       | 5   | 0.009 | 0.009 |      | 5     | 0.017 | 0.020 | なし     |
|       | 6   | 0.008 | 0.008 |      | 6     | 0.006 | 0.012 | なし     |
|       | 7   | 0.003 | 0.003 |      | 7     | 0.019 | 0.018 | なし     |
|       | 8   | 0.007 | 0.006 |      | 8     | 0.056 | 0.054 | なし     |
|       | 9   | 0.008 | 0.008 |      | 9     | 0.073 | 0.071 | なし     |
|       | 10  | 0.007 | 0.004 |      | 10    | 0.006 | 0.004 | なし     |
|       | 11  | 0.010 | 0.009 |      | 11    | 0.012 | 0.012 | なし     |
|       | 12  | 0.006 | 0.006 |      | 12    | 0.021 | 0.023 | なし     |
|       | 13  | 0.006 | 0.005 |      | 13    | 0.383 | 0.380 | あり     |
|       | 14  | 0.025 | 0.024 |      | 14    | 0.228 | 0.226 | あり     |
|       | 15  | 0.007 | 0.008 |      | 15    | 0.031 | 0.029 | あり     |
|       | 16  | 0.011 | 0.011 |      | 16    | 0.021 | 0.019 | なし     |
|       | 17  | 0.003 | 0.004 |      | 17    | 0.011 | 0.012 | なし     |
|       | 18  | 0.010 | 0.009 |      | 18    | 0.040 | 0.041 | なし     |
|       | 19  | 0.017 | 0.019 |      | 19    | 0.019 | 0.011 | なし     |
|       | 20  | 0.008 | 0.008 |      | 20    | 0.029 | 0.018 | なし     |
|       | 21  | 0.009 | 0.010 |      | 21    | 0.034 | 0.031 | なし     |
|       | 22  | 0.004 | 0.003 |      | 22    | 0.020 | 0.018 | なし     |
|       | 23  | 0.012 | 0.013 |      | 23    | 0.027 | 0.026 | なし     |
|       | 24  | 0.006 | 0.007 |      | 24    | 0.036 | 0.033 | なし     |
|       | 25  | 0.008 | 0.010 |      | 25    | 0.012 | 0.009 | なし     |
|       | 26  | 0.007 | 0.006 |      | 26    | 0.007 | 0.006 | なし     |
|       | 27  | 0.009 | 0.008 |      | 27    | 0.033 | 0.023 | あり     |
|       | 28  | 0.010 | 0.009 |      | 28    | 0.063 | 0.062 | あり     |
|       | 29  | 0.008 | 0.009 |      | 29    | 0.020 | 0.018 | なし     |
|       |     |       | 30    |      | 0.006 | 0.007 | なし    |        |
|       |     |       | 31    |      | 0.062 | 0.064 | あり    |        |

単位はg/kg, (－) : <0.001

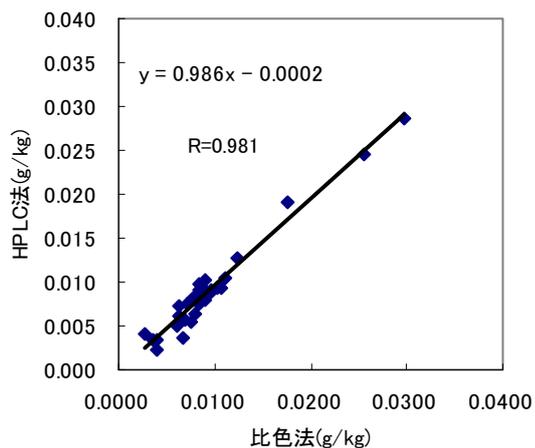


図1 辛子明太子における硝酸根の相関

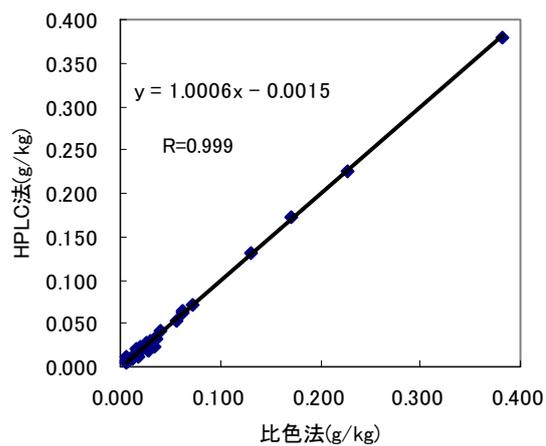


図2 食肉製品における硝酸根の相関

表2 亜硝酸根の比色法及びHPLC法による測定結果

| 検体名  | No. | 比色法   | HPLC法 |
|------|-----|-------|-------|
| 食肉製品 | 1   | 0.007 | 0.007 |
|      | 2   | 0.030 | 0.029 |
|      | 3   | 0.026 | 0.026 |
|      | 4   | 0.013 | 0.012 |
|      | 5   | 0.012 | 0.012 |
|      | 6   | 0.005 | 0.005 |
|      | 7   | 0.007 | 0.006 |
|      | 8   | 0.002 | 0.001 |
|      | 9   | 0.017 | 0.016 |
|      | 10  | 0.004 | 0.004 |
|      | 11  | (-)   | (-)   |
|      | 12  | 0.008 | 0.008 |
|      | 13  | 0.014 | 0.014 |
|      | 14  | 0.014 | 0.014 |
|      | 15  | 0.010 | 0.009 |
|      | 16  | 0.011 | 0.011 |
|      | 17  | (-)   | (-)   |
|      | 18  | 0.009 | 0.009 |
|      | 19  | 0.062 | 0.061 |
|      | 20  | 0.037 | 0.026 |
|      | 21  | 0.026 | 0.025 |
|      | 22  | 0.025 | 0.024 |
|      | 23  | 0.018 | 0.017 |
|      | 24  | 0.028 | 0.027 |
|      | 25  | 0.003 | 0.002 |
|      | 26  | (-)   | (-)   |
|      | 27  | 0.005 | 0.004 |
|      | 28  | 0.016 | 0.015 |
|      | 29  | 0.013 | 0.013 |
|      | 30  | 0.017 | 0.016 |
|      | 31  | 0.005 | 0.005 |

単位はg/kg, (-) : <0.001

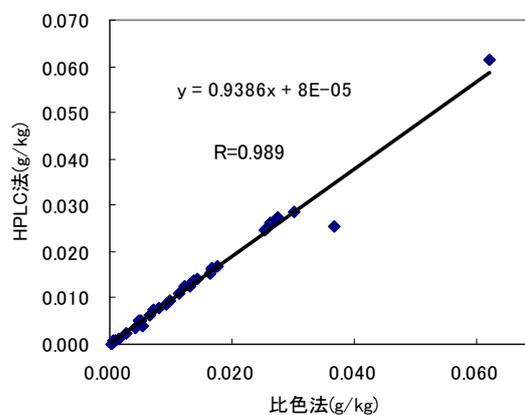


図3 食肉製品における亜硝酸根の相関