

ジフェニルベンチジン試薬による食品中の硝酸塩の簡易検定法

岩 本 喜 伴 宮 崎 正 則
国 里 進 三 前 田 瑠 子

APPROXIMATE DETERMINATION OF NITRATE IN FOODS WITH DIPHENYLBENZIDINE REAGENT

Yoshitomo Iwamoto, Masanori Miyazaki,
Shinzo Kunisato and Yuuko Maeda

Summary

Nitrate was found to cause fast detinning of the internal surface of the can when contained in large amounts in canned foods, and its occurrence in agricultural products is known to be rather often. Since any methods for preventing the nitrate-induced detinning, on which enormous efforts are directed by workers, are not available for the time being, a method for rapid and approximate estimation of nitrate became necessary for the inspection of foods prior to canning as for the nitrate contents.

The authors describe in this note that a spot-test estimation of nitrate in food in which the reaction of diphenylbenzidine with nitrate in concentrated sulfuric acid to yield a blue coloration is conveniently employed.

The color development by the reaction of nitrate with diphenylbenzidine and with diphenylamine (0.05g reagents in 50 ml. concentrated sulfuric acid) were compared and it was shown to be more intensive with the former than with the latter (Fig. 1-a).

When the spot test with these reagents were applied to the tomato juice containing varying amounts of potassium nitrate, 1 ppm of nitrate-nitrogen was found to be detected with diphenylbenzidine despite that the browning reaction took place due to organic materials in the juice, whereas 6 ppm nitrate-nitrogen was the lower limit for the test with diphenylamine (Fig. 1-b).

The accuracy of the spot test with diphenylbenzidine was found to well compare, for the rapid estimation of nitrate in foods, to the A.O.A.C.'s *m*-xylenol method, as well as the Kamm's cadmium column method (Table I).

1. 緒 言

近年、100%果汁であるトマト、パインオリチナルジュースかん詰、プリンスメロン、アスパラガス、ほうれん草等のかん詰で製造初期にきわめて急速なスズ異常溶出をもたらす原因不明の事故が散発的に発生した。この原因について著者¹⁾らは、天然物中に含まれている硝酸塩がスズ異常溶出の主要原因であることを明らかにした。

かん詰使用水中に含まれている硝酸塩除去については脱イオン水の使用で目的は達成されるが、かん詰原料中に含まれている硝酸塩の除去は困難である。この問題に関し植物生理、かん詰製造工程中の処理ならびに容器について検討を加えているが完全な対策をたてるまでには時日を要するものと考えられる。

かん詰使用水中の硝酸塩含量はG, R, 硝酸試薬²⁾等で簡単に1 ppm以下まで測定出来るが、食品中に含まれている硝酸塩の定量法としては現在 *m*-Xylenol 法³⁾, Cd カラム法⁴⁾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⁵⁾ (以下DPA法と略す), Phenyl disulphonic acid,法⁵⁾ Bray's法⁵⁾等があり, カリフォルニア大学ではDPA試薬によるスポットテスト法をトマト果実中の硝酸塩簡易測定法として使用している. またN.C.A.(米国かん詰協会) Washington D.C. 研究所でもこの方法を採用し, トマト果実中の硝酸塩を測定している. しかし, これらの方法はいずれも5ppm以下の硝酸性窒素の測定には感度的に不足しておりDPAの検出限界は6ppm程度であった.

著者らは, かん詰原料となる農産物, パック前の内容物に含まれている硝酸塩をチェックし, かん詰となった場合のスズ異常溶出事故を未然に防止するため Diphenylbenzidine (以下DPBと略す) 試薬⁶⁾による硝酸塩簡易検定法を採用し, DPA法と比較検討した結果, このDPB法はDPA法よりも6~7倍程度鋭敏で硝酸性窒素標準溶液では1ppm以下まで検出出来, 測定操作も非常に簡便で圃場, かん詰工場内でも常用法として使用出来ることが明らかとなった.

このDPB法の採用で, かん詰原料中の硝酸塩によるスズ異常溶出事故防止対策の一助になれば幸いと考えたので以下に検定方法を報告する.

2. 試薬

2.1. DPB 試薬 : DPB 0.05g を窒素分析用濃硫酸50mlに溶解し, かつ色の滴びんに入れて用いる. 試薬溶液の色が濃くなれば新しく調製する.

2.2. 標準硝酸性窒素原液 : 純硝酸カリウム (KNO_3) 0.7218gをメスフラスコにとり蒸留水または脱イオン水に溶解し, 全量を1000mlとなし, これを原液とする. 本溶液は100ppmの硝酸性窒素溶液となる.

2.3. 比色標準溶液 : 標準硝酸性窒素原液を0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 10.0ml宛各々100ml容のメスフラスコにとり, 蒸留水または脱イオン水で標線まで満たす. この時の硝酸性窒素は0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 10.0ppmとなる. 本溶液は毎週調製して使用する.

2.4. 窒素分析用濃硫酸 : 試薬特級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, 冷却後使用する.

3. 器具

spot plate

小型ペンチ

4. 測定方法

比色標準溶液を spot plate 上に1滴ずつ滴下する. 別に検体を小型ペンチまたは手で圧搾して液汁を1滴 spot plate 上にとる. DPB試薬をこれらの上に1滴宛滴加し, spot plate を動かして, かくはんしながらDPB試薬を更に3~4滴滴加する. 硝酸塩が存在すれば青らん色を呈する. この時検液の色調を比色標準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.)

5. 測定結果

DPBとDPA試薬による呈色の比較を比色標準溶液について行なった. この結果をFig.1-aに示す. この結果からDPB試薬では1ppm以下から10ppmの硝酸性窒素まで判定出来る

が、10ppm 以上になると色調が濃くなって差異の判定はつけ難い。D P A 試薬では 6 ppm 程度が検出限界であった。また、トマトジュースの遠沈上清（硝酸塩不検出）に硝酸性窒素として 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 10.0 ppm になるように硝酸カリウムを添加した溶液を調製し、D P B と D P A 試薬による呈色の比較を行なった。この結果を Fig. 1—b に示した。この結果から D P B 試薬では 1 ppm 程度まで判定出来るが、D P A 試薬では 6 ppm 以上でない判定出来ない。

Diphenylbenzidine (Upper 6 spots of the right plate)		
NO ₃ '—N 0 ppm	NO ₃ '—N 0.5 ppm	NO ₃ '—N 1 ppm
NO ₃ '—N 3 ppm	NO ₃ '—N 6 ppm	NO ₃ '—N 10 ppm

Diphenylamine (Lower 6 spots of the right plate)		
NO ₃ '—N 0 ppm	NO ₃ '—N 0.5 ppm	NO ₃ '—N 1 ppm
NO ₃ '—N 3 ppm	NO ₃ '—N 6 ppm	NO ₃ '—N 10 ppm

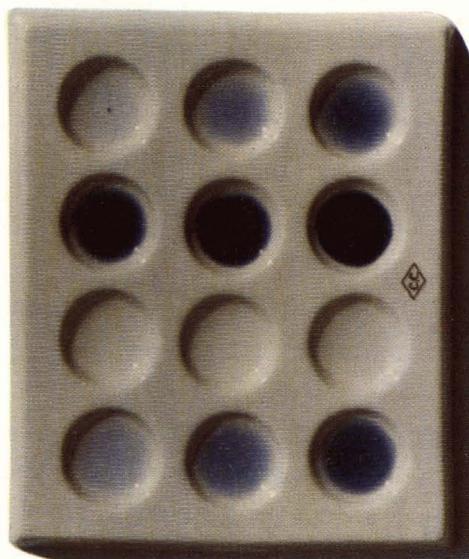


Fig. 1-a. Color development of potassium nitrate solutions with diphenylbenzidine and diphenylamine.

Diphenylbenzidine (Upper 6 spots of the right plate)		
NO ₃ '—N 0 ppm	NO ₃ '—N 0.5 ppm	NO ₃ '—N 1 ppm
NO ₃ '—N 3 ppm	NO ₃ '—N 6 ppm	NO ₃ '—N 10 ppm

Diphenylamine (Lower 6 spots of the right plate)		
NO ₃ '—N 0 ppm	NO ₃ '—N 0,5 ppm	NO ₃ '—N 1 ppm
NO ₃ '—N 3 ppm	NO ₃ '—N 6 ppm	NO ₃ '—N 10 ppm

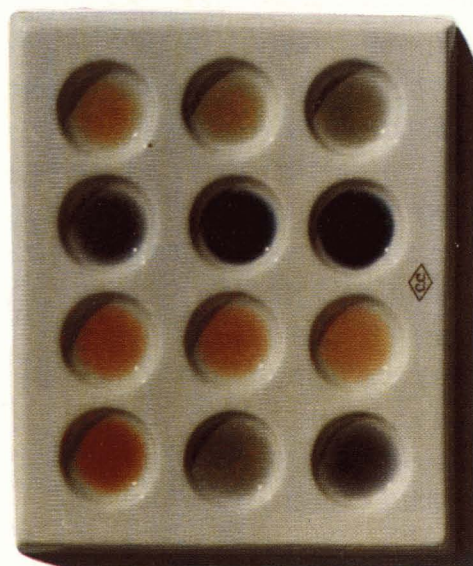


Fig. 1-b. Color development of nitrate contained in tomato juice with diphenylbenzidine and diphenylamine.

次に実際試料としてトマト果実 6 点について D P B 試薬による簡易検定結果と、*m*-Xylenol 法、Cd カラム法による定量分析結果との比較を Table I. に示した。この結果から Browning 現

象が認められるにもかかわらずD P B法は1~10ppm程度の硝酸性窒素の範囲内では *m*-Xylenol, Cd カラム法と比較的近似的な値がえられた。

Table I. Comparison of the diphenylbenzidine spot test with the *m*-xylenol and cadmium column methods for the estimation of nitrate in tomato juice.

Sample number	Nitrate-nitrogen detected with (ppm)		
	Diphenylbenzidine	<i>m</i> -Xylenol	Cadmium column
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

6. 結 語

かん詰原料中の硝酸塩によるスズ異常溶出問題に関し完全な防止対策をたてるには、なお時日を要するものと考えられるので現段階では原料中の硝酸塩をすみやかに測定する方法が必要となってきた。

D P B法を、従来から使用されていたD P A法と比較検討の結果、Fig. 1—a, 1—bに示したごとくD P B法はD P A法よりも6~7倍検出感度が高く、硝酸性窒素として1 ppm以下まで判定出来る。しかし、試薬の溶解に濃硫酸を使用するため検液の糖濃度が高い場合とか、パルプ質が多い場合には **Browning** 現象が起り判定に誤差を生じやすい。また一度に多量の試薬を滴加した場合にもこのような現象は顕著にあらわれるが、かくはんしながら滴加すると比較的良好な結果がえられた。**Browning** 現象防止については更に検討を加えたい。

7. 要 約

現在N. C. A. でトマト果実中の硝酸塩簡易検定に使用されているD P A法と本報で提唱したD P B法を比較検討した結果、

1) D P B法はD P A法よりも6~7倍鋭敏で硝酸性窒素標準溶液では1 ppm以下から10ppmまで判定出来るが10ppm以上になると色調が濃くなって差異の判定はつけ難い。またトマトジュースでは有機物の存在のため **Browning** 現象が認められるにもかかわらず1 ppmまで判定出来る。

2) トマト果実について、この方法による判定値と、*m*-Xylenol 法, Cd カラム法で定量した測定値とはほぼ同じ結果がえられた。

3) この方法は操作が非常に簡便で圃場、かん詰工場内でかん詰原料中の硝酸塩簡易検定の常用法として充分使用出来る。

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った東洋製罐株式会社技術本部研究部に深く感謝致します。

文 献

- 1) 岩本喜伴、宮崎正則、国里進三、前田瑠子、堀尾嘉友、小村祥子：本誌投稿中。
- 2) 東京大学農学部農芸化学教室：実験農芸化学別巻 P. 76 (1964) 朝倉書店
- 3) Method of Analysis of the A.O.A.C. 9th. ed., 23 • 013 (1950)
- 4) L. Kamm, G. G. Mckeown, D. M. Smith ; J. of the A.O.A.C. 48 892 (1965)
- 5) 杉山直儀、高橋和彦：園芸学誌 27 161 (1958)
- 6) Fritz Feigl : Spot tests in organic analysis 6th. ed., P. 178 (1960)