

発蛍光試薬 1,2-ジアミノ-4,5-ジメトキシベンゼンを用いる食肉製品および魚肉ハム・ソーセージ中の亜硝酸塩の簡便・迅速なフローインジェクション分析

和田光弘, 黒瀬 恵, 中村章子, 黒田直敬,
谷川美保子, 中島憲一郎

(長崎大学薬学部)

原稿受付平成 11 年 5 月 21 日; 原稿受理平成 11 年 11 月 4 日

Simple and Rapid Flow Injection Analysis for Determination of the Nitrite Ion in Meat and Fish Products with 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzene as the Fluorogenic Reagent

Mitsuhiro WADA, Megumi KUROSE, Akiko NAKAMURA, Naotaka KURODA,
Mihoko TANIGAWA and Kenichiro NAKASHIMA

School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521

A simple and rapid flow injection analysis (FIA) with fluorescence detection was developed for the determination of nitrite in meat and fish products (*e.g.*, ham and sausages). 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzene (DDB) was used as the fluorogenic reagent, and the carrier solution was 0.05 mM DDB in 0.5 M sulfuric acid which retained its availability for at least 48 h after preparation. The DDB derivative was monitored at 402 nm (*ex.* at 311 nm). The calibration curve for standard nitrite ranging from 0.23 to 4.60 $\mu\text{g/ml}$ showed good linearity ($r=0.998$) between the concentration of nitrite and the fluorescence intensity. The limit for the detection of nitrite was 51 ng/ml at a signal-to-noise ratio of 3. The amount of nitrite in meat and fish products ranged from 7.8 to 24.1 $\mu\text{g/g}$. Good correlation ($r=0.991$) was obtained between the proposed method and spectrophotometry by using a fish product spiked with a known concentration of standard nitrite.

(Received May 21, 1999; Accepted in revised form November 4, 1999)

Keywords: flow injection analysis (FIA) フローインジェクション分析, nitrite 亜硝酸イオン, fluorescence detection 蛍光検出, 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene 1,2-ジアミノ-4,5-ジメトキシベンゼン, food additive 食品添加物.

1. 緒 言

亜硝酸塩は、食肉製品および魚肉ハム・ソーセージに発色剤として添加される。食物とともに人体に摂取された亜硝酸塩は、生体中の主に第二級アミンと反応し、発癌性を有するニトロソアミンを生成する。このニトロソアミンは胎盤を通過し、胎児に催奇形性を示すことが知られている。また亜硝酸塩はオキシヘモグロビンに作用してメトヘモグロビンを生成したり、あるいは還元酵素の作用により、一酸化窒素に変換されると、その強い親和性によりヘモグロビンをニトロソヘモグロビンへと変換することが知られている。この

ような背景から食品中の亜硝酸塩を精度よく簡便かつ迅速に定量する方法を開発することは大変重要であると考えられる。

現在までに亜硝酸塩の測定法として吸光光度法 (Green *et al.* 1982), 蛍光法 (Wheeler and Lott 1974) および化学発光法 (Cox 1980) が報告されている。スルファミドと亜硝酸の反応によるジアゾ化反応およびそれに続くジエチルアミノナフタレンとのカップリング反応を利用して、生成物の吸光度を測定する吸光光度法 (グリース法) は、最もよく用いられる方法である。しかしながら、吸光光度法は亜硝酸塩に対する

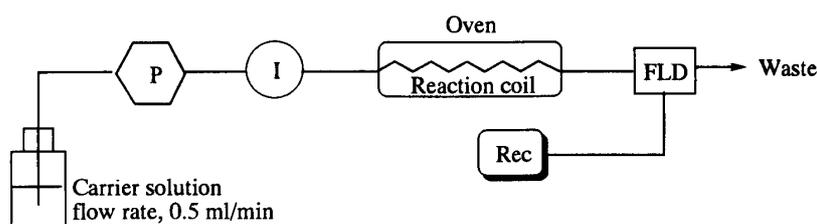


Fig. 1. FIA system for the measurement of nitrite

P, pump; I, injector; FLD, fluorescence detector; Rec, recorder.

選択性および感度が低いため、試料の煩雑な前処理や濃縮が必要である。

亜硝酸塩の蛍光検出法は、吸光光度法に比べて感度も高く、近年よく用いられるようになってきた方法である。蛍光誘導体化試薬として知られる2,3-ジアミノナフタレン (DAN) は、酸性条件下で亜硝酸塩と反応し、トリアゾール環を持つ蛍光物質を生じる。また DAN は亜硝酸塩の他に、一酸化窒素とも反応することが知られている。特に中性条件において一酸化窒素と選択的に反応すること (櫻井等 1996) から、これを利用して、著者等は DAN を用いる一酸化窒素の HPLC-蛍光定量法を開発している (Wada *et al.* 1998)。一方、ルミノールを用いる化学発光定量法は、非常に高感度な方法であるが、同じく亜硝酸塩と一酸化窒素の両者が反応して、発光することから、選択性が問題となる。

1,2-ジアミノ-4,5-ジメトキシベンゼン (DDB) は、酸性条件下、芳香族アルデヒドと反応し、蛍光性の化合物を生じることが、Nakamura (1982) によって報告されている。著者等はこの DDB が亜硝酸塩とも反応し、蛍光物質を生成することを見出した。そこで、この蛍光物質のフローインジェクション (FIA)-蛍光検出法を検討し、迅速・簡便な亜硝酸塩の定量法を開発した。さらに本法を加工食肉製品中の亜硝酸塩の定量に適用し、その実用性を検討した。

2. 実験方法

(1) 試薬

亜硝酸ナトリウム、硫酸、N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩は和光純薬製を用いた。DDB は同仁化学研究所製を、スルファニルアミドはキシダ化学製をそれぞれ用いた。メンブレンフィルターには Millex-HA (0.45 μ m, ミリポア) を用いた。水はピュアライン WL 21 P (ヤマト科学) で処理したものを、その他の試薬はいずれも特級品を用いた。亜

硝酸塩標準溶液は、一定濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液を用時調製し、水で適宜希釈して用いた。

(2) 装置

亜硝酸塩の測定に用いた FIA システムは島津製作所製 LC-6 A 型ポンプ、レオダイン製 7125 型インジェクター、CTO-6 A 型カラムオープン (島津)、日立製作所製 F 1000 蛍光検出器および東ソー製 FBR-1 型記録計からなる。システムの概略図を Fig. 1 に示す。反応コイルにはテフロン製コイル (500 \times 0.5 mm, i.d., ジェルサイエンス) を用いた。キャリア溶液には 0.05 mM DDB の 0.5 M 硫酸溶液を用い、これを 0.5 ml/min で送液した。試料注入量は 10 μ l とした。吸光光度法による亜硝酸塩の測定には、UV-265 FS 型吸光光度計 (島津) を用いた。

(3) 試料溶液の調製

試料の前処理は、食品添加物試験法 (日本薬学会 1995) に、若干の改良を加えて行った。すなわち細切りした試料 10 g をとり、約 80 $^{\circ}$ C の温湯を適量加えてホモジナイズする。これに 0.5 M 水酸化ナトリウム溶液を 10 ml 加えてよく振り混ぜ、さらに 12% 硫酸亜鉛溶液 10 ml を加えて振とう後、80 $^{\circ}$ C で 20 分間加熱する。冷水で冷却後、水を加え 100 ml にする。これを 1 ml とり、水あるいは既知濃度の亜硝酸塩標準液を 0.2 ml 加える。FIA-蛍光検出法に用いる試料には 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) を、吸光光度法には 1.3 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) 0.2 ml をそれぞれ加え、遠心後、上清をろ過する。ろ液を 0.7 ml とり、水を加えて 1 ml とした後、FIA-蛍光検出法あるいは吸光光度法に供する。

(4) 吸光光度法

食品中の亜硝酸塩の測定は、衛生試験法中の食品添加物試験法 (日本薬学会 1995) に準じて行った。

DDB を用いる食肉製品および魚肉ハム・ソーセージ中の亜硝酸塩のフローインジェクション分析

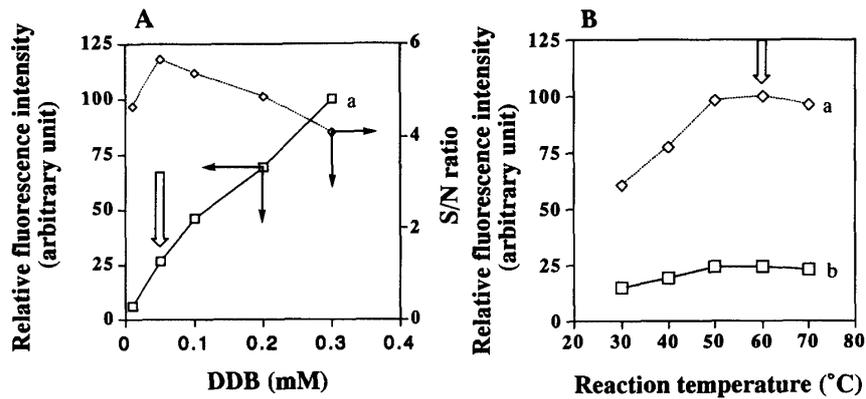


Fig. 2. Effects of DDB concentration (A) and reaction temperature (B) on the relative fluorescence intensity

Curve a, $4.60 \mu\text{g/ml}$ of NO_2^- ; curve b, $1.15 \mu\text{g/ml}$ of NO_2^- ; the FIA conditions are shown in the text.

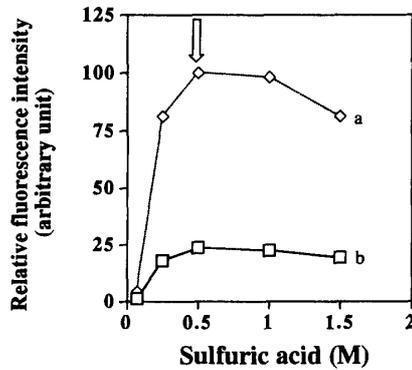


Fig. 3. Effect of sulfuric acid concentration on the relative fluorescence intensity

Curve a, $4.60 \mu\text{g/ml}$ of NO_2^- ; curve b, $1.15 \mu\text{g/ml}$ of NO_2^- ; the FIA conditions are shown in the text.

3. 結果および考察

(1) FIA 条件の最適化

FIA 条件の最適化を行った。検討には 1.15 および $4.60 \mu\text{g/ml}$ の亜硝酸塩標準溶液を用い、それぞれを 3 回注入したときの平均相対蛍光強度 (RFI) を求めた。まずキャリアー溶液に含まれる DDB 濃度の検討を行った (Fig. 2-A)。DDB 濃度の増加に伴い、RFI も増加した。しかし同時にバックグラウンドのノイズレベルも増加したため、ここでは最大のシグナル/ノイズ比 (S/N) を与えた 0.05 mM を用いることにした。反応温度について $30 \sim 70^\circ\text{C}$ の範囲で検討を行ったところ、 50°C 以上で最大かつ一定の RFI が得られた (Fig. 2-B)。そこで以後の検討には 60°C を用いることにした。次にキャリアー溶液の流速および反応コイルの長さの RFI に対する影響を検討した。より低流速

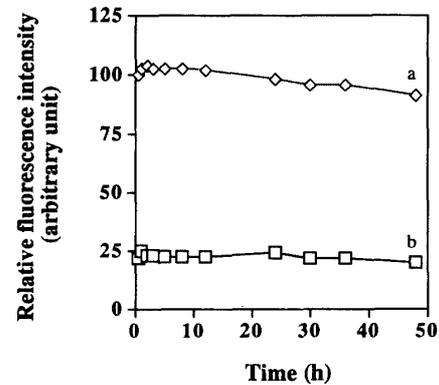


Fig. 4. Time-course plots for the relative fluorescence intensity

Curve a, $4.60 \mu\text{g/ml}$ of NO_2^- ; curve b, $1.15 \mu\text{g/ml}$ of NO_2^- ; the FIA conditions are shown in the text.

でキャリアー溶液を送液した場合に、RFI は増加したが、それに伴い 1 検体の測定に要する時間も増加し、FIA の特長である迅速性が損なわれた。ここでは 0.5 ml/min を選択した。反応コイルの長さについて $50 \sim 200 \text{ cm}$ の範囲で検討を行ったが、コイルの長さの延長に伴う RFI の増加は見られなかったことから、以後の検討では 50 cm を用いることにした。最後にキャリアー溶液の硫酸濃度を検討したところ、 0.5 M 硫酸溶液を用いた場合に最大の RFI が得られたので、これを用いることにした (Fig. 3)。

今回用いたキャリアー溶液を、調製後の時間経過に対する試薬の有効性を検討するために亜硝酸塩の RFI を経時的に測定した (Fig. 4)。有効性は、調製した直後のキャリアー溶液で得られた $4.6 \mu\text{g/ml}$ 亜硝酸塩溶液の RFI を 100 として評価した。その結果、亜

Table 1. Effect of coexisting ions on the relative fluorescence intensity

Ion	Added amount (μg) *	RFI***
Cu ²⁺	100	108
Zn ²⁺	100	104
Fe ³⁺	100	101
	10	102
NH ₄ ⁺	100	104
F ⁻	100	98
Cl	100	105
I ⁻	150	205
	100	179
	15	135
NO ₃ ⁻	100	101
S ₂ O ₃ ²⁻	100	N.D.**
	10	N.D.
CH ₃ COO	100	100
	10	101
Ascorbic acid	100	N.D.
	10	69
	1.0	96

* Amount added to 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of NO₂⁻. ** Not detected. *** Relative fluorescence intensity (RFI) obtained with 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of nitrite is taken as 100.

硝酸塩のRFIは、調製後48時間経過しても最初の強度の90%以上が保たれており、今回用いたキャリヤー溶液が、この時間内で十分使用可能であることが分かった。

次に、共存イオンの影響を検討した結果をTable 1に示す。イオンの影響は、亜硝酸塩1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対してそれぞれのイオンを添加し、何も添加しない場合の1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の亜硝酸塩標準溶液のRFIを100としたときの相対値として表している。その結果、ヨウ素イオンを加えた場合に正の誤差を、アスコルビン酸およびチオ硫酸イオンの共存で負の誤差を与えた。この理由については、現在不明であるが、負の誤差については試料の亜硝酸が、一酸化窒素に還元されたことが原因の一つではないかと考えられる。

次にDDBと反応する可能性が考えられるカルボニル化合物のRFIに与える影響を検討した。(Table 2)。5種類のカルボニル化合物について検討を行ったところ、亜硝酸塩と同濃度ではベンズアルデヒドが正の誤差を与えたが、その他の化合物は蛍光性の化合物を生じなかった。

Table 2. Effect of carbonyl compounds on the relative fluorescence intensity

Compound (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	RFI
Nitrite	100.0*
Acetaldehyde	1.8
Acetylacetone	2.0
Malondialdehyde	4.0
Glutaraldehyde	1.1
Benzaldehyde	246.5

* Relative fluorescence intensity (RFI) obtained with 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of nitrite is taken as 100.

(2) 検量線・検出下限

条件検討によって得られた最適FIA条件を用いて亜硝酸塩の標準溶液の検量線を作成した。検量線は0.23~4.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲で良好な直線関係を示した ($r=0.998$)。S/N=3の場合の検出下限は51 ng/mlと高感度であった。本法のアッセイあたりの感度は吸光光度法と比較して20倍、2,3-ジアミノナフタレンをラベル化剤として用いる蛍光光度法と同程度であった。

(3) 日内および日間の測定精度

3種類の加工食肉製品に46 $\mu\text{g}/\text{g}$ となるように亜硝酸塩標準溶液を添加した試料を用いて、日内および日間の測定精度について検討した。結果をTable 3に示す。同一試料を1日に3回定量をして得られた日内の精度はR.S.D.で0.6~3.1%であった。また添加回収率は96.5~101.5%と良好であった。同一試料を1週間のうち5日について測定した場合の日間の精度はR.S.D.で1.6~5.5%であった。

(4) 食品中の亜硝酸塩の定量

市販の食肉製品および魚肉ハム・ソーセージ5種類について、その中に含まれる亜硝酸塩濃度を測定した (Table 4)。測定は標準添加法で行い、定量値は1検体につき3回の測定を行いその平均値を用いた。その結果、7.8~24.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ の亜硝酸塩が検出された。今回加工食肉製品から検出された濃度は、いずれも使用基準の範囲内であった。魚肉ハムを測定した際のレコーレスポンスをFig. 5に示す。

(5) 他法との比較

魚肉ソーセージに異なる濃度の亜硝酸塩を添加し、これを試料として本法と衛生試験法 (日本薬学会1995) に記載されている吸光光度法とで得られた定量値を比較した (Fig. 6)。その結果、 $y=1.09x+0.99$

DDBを用いる食肉製品および魚肉ハム・ソーセージ中の亜硝酸塩のフローインジェクション分析

Table 3. Within-day and between-day precision of the proposed method

Sample	Added amount ($\mu\text{g/g}$)	Within-day ($n=3$)			Between-day ($n=5$)	
		Mean \pm S.D. ($\mu\text{g/g}$)	Relative standard deviation (%)	Recovery (%)	Mean \pm S.D. ($\mu\text{g/g}$)	Relative standard deviation (%)
Fish product B	0	9.6 \pm 0.3	3.1	96.5	9.1 \pm 0.5	5.5
	46	54.0 \pm 0.3	0.6		53.5 \pm 1.1	2.0
Pork ham D	0	8.0 \pm 0.1	1.3	101.5	8.4 \pm 0.3	3.6
	46	54.7 \pm 1.2	2.2		56.7 \pm 2.2	3.9
Fish sausage E	0	7.8 \pm 0.2	2.6	97.4	7.0 \pm 0.2	2.9
	46	53.0 \pm 0.3	0.6		54.3 \pm 0.8	1.6

Table 4. Amount of nitrite in meat and fish products by the standard addition method

	Mean \pm S.D. ($\mu\text{g/g}$) *
Fish product A	11.6 \pm 0.4
Fish product B	9.6 \pm 0.3
Pork sausage C	24.1 \pm 0.1
Pork ham D	8.0 \pm 0.1
Fish sausage E	7.8 \pm 0.2

* Mean of triplicate measurements.

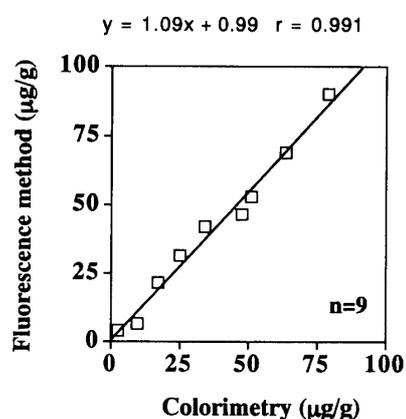


Fig. 6. Correlation between the results of the proposed method and the conventional colorimetric method

(x : 吸光度法, $\mu\text{g/g}$; y : FIA-蛍光検出法, $\mu\text{g/g}$)で表される回帰直線式が得られ, その相関係数は $r=0.991$ と極めて良好であった. 以上の結果から本法で得られた測定値は衛生試験法で得られた値と同等であることが確認された.

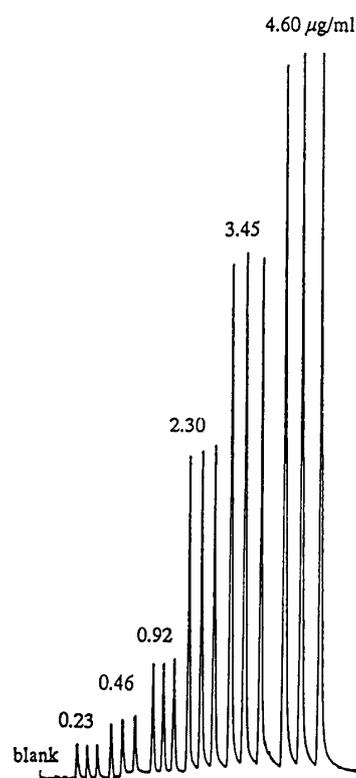


Fig. 5. Recorder response of a fish product spiked with standard nitrite

Numbers on signals show the final concentration of nitrite in spiked fish product. The FIA conditions are shown in the text.

4. 結 語

今回開発した方法は, 加工食肉製品中の亜硝酸塩を精度よく簡便かつ迅速に測定することが可能である. 衛生試験法に記載されている吸光度法は, 測定のために20分の反応時間を必要とするが, 本法はオンラインで反応を行うために約10検体/30minと非常に迅速な測定が可能である. よって多数の検体を測定す

る必要のある食品管理のための日常分析において大変有効であると考えられる。本法は原理的には環境水中の亜硝酸塩の測定などへの応用も可能であるが、この場合さらに検出感度を上げる必要がある。システムのダウンサイジングを試みるなどして、今後さらに感度の向上を目指していきたい。

引用文献

- Cox, R.D. (1980) Determination of Nitrate and Nitrite at the Parts per Billion Level by Chemiluminescence, *Anal. Chem.*, **52**, 332-335
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of Nitrite, and [¹⁵N]Nitrate in Biological Fluids, *Anal. Biochem.*, **126**, 131-138
- Nakamura, M. (1982) Fluorometric Determination of Aromatic Aldehydes with 4,5-Dimethoxy-1,2-diaminobenzene, *Anal. Chim. Acta*, **134**, 39-45
- 日本薬学会(編)(1995)『衛生試験法・注解』, 金原出版, 東京, 480
- 櫻井邦子, 小島宏建, 長野哲雄, 廣部雅昭(1996) 蛍光法を用いた新規一酸化窒素測定法の開発と応用 1, 日本薬学会第 116 年会講演要旨集, **4**, 124
- Wada, M., Ikehata, T., Yoshida, Y., Kuroda, N., and Nakashima, K. (1998) A Simple and Selective Monitoring Method for Nitric Oxide Capturing Ability by HPLC-Fluorescence Detection with 2,3-Diaminonaphthalene as a Fluorogenic Reagent, *Anal. Sci.*, **14**, 1177-1179
- Wheeler, G. L., and Lott, P. F. (1974) Rapid Determination of Trace Amounts of Selenium (IV), Nitrite, and Nitrate by High-Pressure Liquid Chromatography Using 2,3-Diaminonaphthalene, *Microchem. J.*, **19**, 390-405