

短 報

# 亜硝酸イオン共存下の乳酸の Barker-Summerson 法による 吸光光度定量

宮尾 茂 錐 ・ 青木 陸 夫

## Spectrophotometric Determination of Lactic Acid by Barker-Summerson Method in the presence of Nitrite Ion

Shigeo MIYAO and Mutsuo AOKI

### Summary

The author has perceived that nitrite ion prevents the color development of lactic acid by Barker-Summerson method. Therefore, the method of excluding the prevention of nitrite ion was investigated. Consequently it was found that nitrite ion was decomposed by the addition of sulfamic acid.

### I 緒 言

乳酸を濃硫酸の存在下で加熱すると定量的にアセトアルデヒドに変化し、それをp-ヒドロキシジフェニルで青紫色に発色させ、分光光度計にて、560nmで測定する方法は、Barker, Summerson<sup>1)</sup>によって開発されたが、微量の乳酸を測定できることから、酵素法とともに広く利用されている。発酵漬物は乳酸菌の発酵作用によって、主に乳酸と微量の香気成分が付与され、独特の風味を有する食品であるが、その品質を判断する上で、乳酸量を測定することは意義のあることである。また、発酵漬物を製造する際、その発酵初期においては、主にグラム陰性菌の*Pseudomonas*や*Enterobacter*により、原料野菜に含まれている硝酸塩が、細菌の硝酸還元酵素により還元され、亜硝酸が生成されることはよく知られている。この発酵初期の段階で乳酸量を、Barker-Summerson法で測定しようとしたところ、亜硝酸イオンが存在している場合には亜硝酸イオンにより、著しい妨害を受けることを知った。そこで、妨害を除去する方法について検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

### II 方 法

#### 1 試 薬

亜硝酸窒素の標準液は、デンケーター中で24時間乾燥させた特級の亜硝酸ナトリウムを用い、また、乳酸の標準液は、特級の乳酸リチウムを用い、それぞれ調製した。濃硫酸は精密分析用、水酸化カルシウムは化学用のものを用い、p-ヒドロキシジフェニル、スルファミン酸、硫酸銅は特級試薬を使用した。

#### 2 定量法

乳酸の定量法は、Barker-Summerson法に準拠して行った。すなわち、除蛋白した試料液を遠沈管にとり、20% CuSO<sub>4</sub> 0.5 ml を加え、蒸留水にて全容を5 ml とした後、少量のCa(OH)<sub>2</sub>粉末を加え、時々、攪拌しつつ、30分間以上放置し、その後、遠沈し、上澄液を得た。つぎに、上澄液より一定量(1 ml以下で乳酸として8 μg以下の量)を中試験管にとり、蒸留水にて1.0 ml とした後、4% CuSO<sub>4</sub>液を0.05 ml 加え、氷水中で試験管を冷却しつつ濃硫酸6.0 mlを徐々に注加し、反応させた。内容物をよく混合した後、沸騰水浴中に、5分間つけて、ただちに流水中にて、20°C以下に冷却し、そ

の後、p-ヒドロキシフェニルの1.5%溶液を0.1 ml 加え、よく振とうさせてから、30°Cの水浴中に、30分間 放置させた。つぎに、再び沸騰水浴中に正確に90秒間 つけ、流水中に冷却した。そして、分光光度計にて、 560nmの波長における吸光度を測定した。なお、対照 は、蒸留水を用い、同様の操作を行ったものを使用した。

つぎに、亜硝酸イオンによる妨害の程度を知る際は、 試料液または上澄液に、既知濃度の亜硝酸ナトリウム溶 液を添加し、上記と同様の操作を行い測定した。

### 3 亜硝酸イオンの分解

亜硝酸イオンを分解する場合は、0.5%スルファミン 酸/INH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液を検液1.0 mlに対し0.1 mlを添加 し、30°C、30分間放置した。

## III 結果および考察

Barker-Summerson法による乳酸の定量を行う場

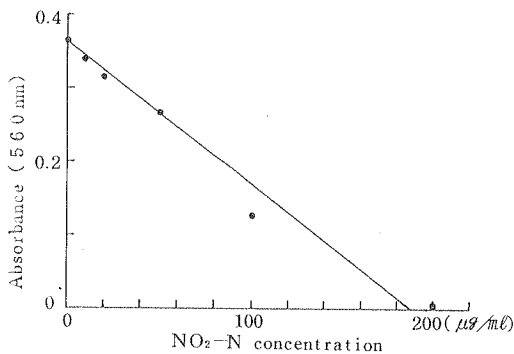


Fig.1 Effect of NO<sub>2</sub>-N on color development of Lactic acid by Barker-Summerson method. (Lactic acid : 100 μg/ml)

合に、亜硝酸イオンの妨害がどの程度であるかを検討す るために、100 μg/mlの乳酸を含有する水溶液に、亜 硝酸ナトリウム溶液を添加し、亜硝酸窒素量が0.10, 20, 50, 100, 200 μg/mlとなるよう検液を調製し、従来の 方法で定量を行い、測定したものがFig.1である。

亜硝酸イオンを含有しない場合の560nmにおける吸 光度は、0.365であったが、亜硝酸イオン濃度が上昇す るにしたがい、吸光度は、ほぼ直線的に減少し、亜硝酸 イオンが200 μg/mlでは、0.03にまで低下し、明ら かに亜硝酸イオンが乳酸の定量を妨害していることが判 明した。そこで、つぎに、亜硝酸イオンがBarker- Summerson法の操作によってある物質が生成され、 その吸収が、乳酸の場合の吸収を妨害しているかどうか をみるために、乳酸、亜硝酸イオンをそれぞれ、Barker- Summerson法によって操作を行い、呈色液の吸収極 大を求めたところ、Fig.2の結果を得た。

その結果、乳酸の場合の吸収極大は、560~570nmで あるが、その付近での亜硝酸イオンの吸収は、逆に低い 値を示しており、亜硝酸イオンそのものの呈色による妨 害は、ないことが明らかとなった。したがって、亜硝酸 イオンの妨害は、何らかの形で、乳酸あるいはアセトア ルデヒドなどの化合物と反応することによって生ずる妨 害であると考えられる。

つぎに、前処理を終了し、呈色反応直前の段階で、ど の程度の亜硝酸イオンの存在で、妨害が生じるかを調べ たものがFig.3である。

亜硝酸イオンが存在しない場合は、乳酸量が8 μg/mlで、吸光度は0.60であったが、亜硝酸イオンが2.5

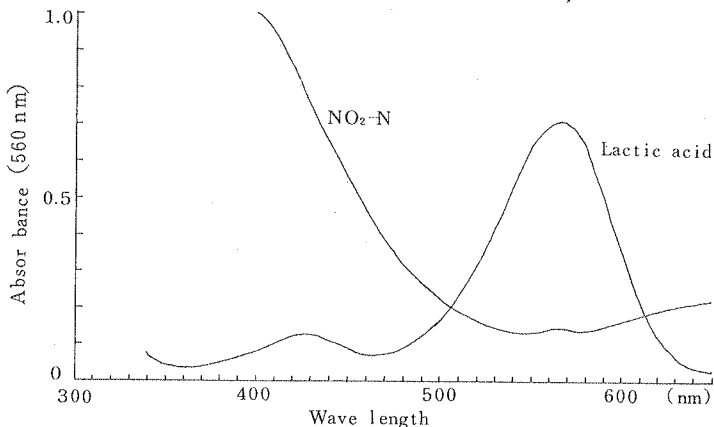


Fig.2 Absorption spectra of Lactic acid and NO<sub>2</sub>-N by Barker-Summerson method.

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在すると、0.225に減少し、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ では、0.02にまで減少した。したがって、呈色反応直前の段階において、亜硝酸イオンが $2.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の微量が存在しても妨害を起し、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ になると、乳酸に基く吸光はほとんど消失することが明らかとなった。そこで亜硝酸イオンは冷時においてもスルファミン酸とたやすく定量的に反応し、窒素ガスを発生して分解することから、亜硝酸イオンの妨害を除去する目的で、スルファミン酸の利用について検討を加えた。

すなわち、Barker-Summerson法の操作中で、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 粉末処理後の上澄液 $1.0\ \text{ml}$ に、0.5%スルファミン酸/ $1\ \text{NH}_2\ \text{SO}_4$ 溶液を $0.1\ \text{ml}$ 添加し、 $30^\circ\text{C}$ 30分間放置した後、従来の方方法にしたがい、呈色反応を行わせたところ、Table 1. に示すように、亜硝酸イオンの存在の有無にかかわらず、 $560\ \text{nm}$ における吸光度は、 $0.314\sim 0.322$ で、多少のばらつきはあるものの、亜硝酸の妨害を除去することが可能であると思われる結果を得た。したがって、発酵漬物のように乳酸と亜硝酸が混在する系において、Barker-Summerson法によって、乳酸を比色定量する場合には、応用可能であると思われる。

### 引用文献

- 1) BARKER, S.B. and SUMMERSON, W.H., J. Biol. Chem., **138**, 535 (1941)

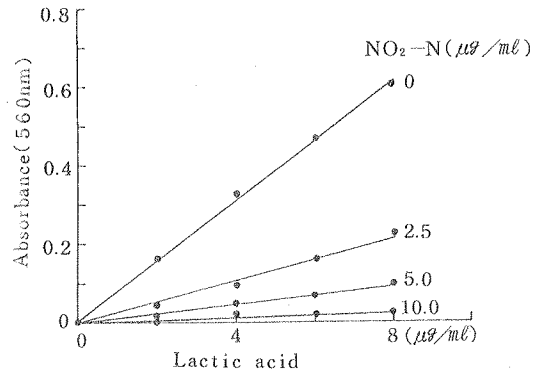


Fig.3 Effect of  $\text{NO}_2\text{-N}$  on the absorbance of Lactic acid by Barker-Summerson method.

Table 1 Effect of Sulfamic acid on the decomposition of nitrite ion.

Solution ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		Absorbance
Lactic acid	$\text{NO}_2\text{-N}$	
100	0	0.319
100	10	0.319
100	20	0.320
100	50	0.322
100	100	0.314
100	200	0.319