

REHSE「高校生による環境安全とリスクに関する自主研究活動支援事業」

2019年度 研究活動報告書

テーマ：「食品中の硝酸塩が亜硝酸塩に変化するリスクについての研究」

研究者：鳥取県立倉吉東高等学校化学ゼミ 足立優子 杉山奈々子

1. 背景（研究の動機）

亜硝酸ナトリウムは、亜硝酸イオンとしての残存量が 0.070g/kg 以下（食肉製品）と定められている食品添加物である⁽¹⁾。亜硝酸塩が第二級アミンと反応すると、発がんの可能性のあるニトロソアミンを生成することが知られている⁽²⁾。また硝酸塩、亜硝酸塩によって乳児にメトヘモグロビン血症が発生した事例も報告されている⁽³⁾⁽⁴⁾。

学校の家庭科の授業においても、亜硝酸塩の一種である亜硝酸ナトリウムは安全性について盛んに議論されている食品添加物の一つとして挙げられていた。調べてみると、亜硝酸塩は硝酸塩が還元されて生じる物質であること、野菜など硝酸塩が多く含まれている食品があることを知った。硝酸塩は野菜類、特に小松菜（茎 2167ppm 、葉 781ppm ）、白菜（ 1433ppm ）、チンゲンサイ（ 3310ppm ）などの葉物野菜に多く含まれる物質である⁽⁵⁾。そこで、食品に含まれる硝酸塩が亜硝酸塩に変化することはあるのか、あるとしたらどのような条件で起こるのか調査が必要だと感じた。

2. 目的

食品に含まれる硝酸塩が亜硝酸に変化することがあるのか、あるとすればどのような条件下で起こるのかを検討する。

3. 活動の内容

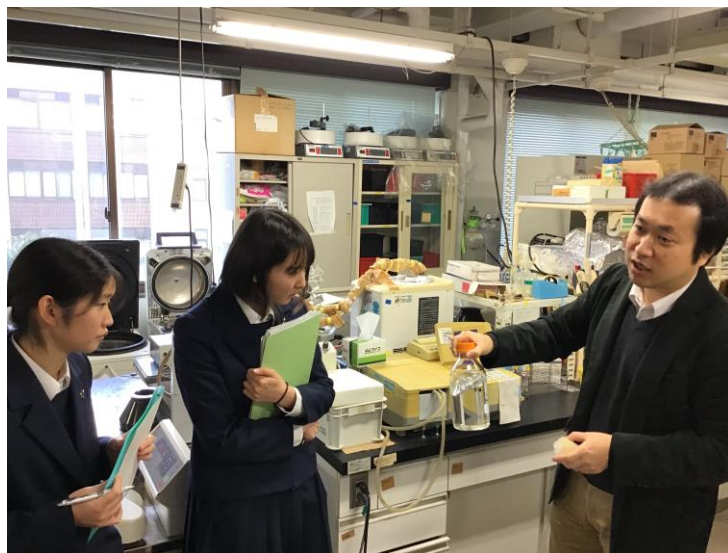
3. 1. 講義・施設見学

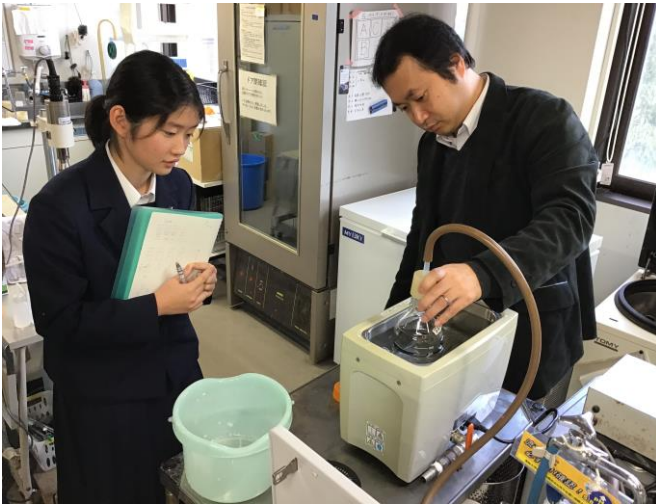
日時：令和元年 12 月 24 日（火）10：30～12：00

場所：鳥取大学工学部校舎内

講義題目：「硝酸塩が亜硝酸塩に変化する可能性について」

講師：八木寿梓（鳥取大学工学部准教授）





講義から学んだこと：

L-アスコルビン酸は不安定な物質であり、それが影響して硝酸イオンがうまく還元されていないという可能性が浮上した。また、発生すると考えられる亜硝酸イオン自身も不安定な物質であり、不安定な物質で不安定な物質を発生させようとしているために、反応のしにくさや再現性の低さが実験結果に表れているのではないかと指摘された。

また、反応しやすいと考えられる条件についていくつか例を説明していただいた。

- ① 低温下で反応させる
- ② 時間をかけゆっくりと反応させる
- ③ 使用している水に酸素や窒素が溶け、その酸素が反応して生じた亜硝酸イオンを酸化している可能性があるため、水に溶けている酸素を抜く（脱気する）

4. 研究成果

4. 1. 試験紙を用いた予備実験

亜硝酸塩は硝酸塩が還元されることによって生じる。このことから、硝酸塩と還元剤を反応させると亜硝酸塩が発生するのではないかと仮定した。予備実験として、市販の試験紙（テトラ テスト 6 in 1 試験紙、図 1）を用いて硝酸塩、亜硝酸塩の濃度を測定した。

身近な食品中に含まれ、還元剤としての働きを示す物質として、L-アスコルビン酸、グルコースなどが考えられる。そこで、L-アスコルビン酸水溶液による還元について検討した。

4. 1. 1. 手順

1. 試験管に表 1 に示した溶液を準備する
2. 付属する取り扱い説明書に従って、試験紙を約 1 秒間各溶液に浸したのち、取り出して 1 分間待つ
3. 試験紙の色の変化を付属の色見本と比較し、溶液中の硝酸塩と亜硝酸塩の濃度を概算する（表 1）

硝酸ナトリウム水溶液の濃度（250ppm）、亜硝酸ナトリウム水溶液（10ppm）の濃度は、試験紙の計測可能範囲に収まるように設定し、L-アスコルビン酸の濃度はおよそレモンに含まれるビタミン C の濃度（300ppm）に合わせた。

4. 1. 2. 結果と考察

これらの実験から、L-アスコルビン酸を含む溶液では、硝酸イオンから亜硝酸イオンへの変化は

観察されなかった (⑥)。今回は室温で実験を行ったため、温度や pH などの条件を変えて実験し、硝酸イオンから亜硝酸イオンへの変化の有無を検討する必要があると考えた。

また、⑥の試験紙において、L-アスコルビン酸が、亜硝酸塩が反応するのを妨げた可能性を考え、L-アスコルビン酸と亜硝酸ナトリウム水溶液を混合した場合の実験も行った (⑧)。しかし、以下の表のように、⑧の試験紙の硝酸塩の部分に反応した。これが実験ミスなのかあるいは亜硝酸塩が硝酸塩に酸化されたためなのか、疑問が残る点だった。



図1 テトラ テスト 6 in 1 試験紙

表1 準備した試料と測定結果
反応温度 26°C (室温) 反応時間 10 分

試料	亜硝酸塩濃度 (ppm)	硝酸塩濃度 (ppm)
① 倉吉東高校で精製された水 (2mL)	N.D.	N.D.
② 日本の水道水 (2mL)	N.D.	N.D.
③ 市販の精製水 (2mL)	N.D.	N.D.
④ 10ppm NaNO ₂ aq (1mL) + 精製水 (1mL)	5	25
⑤ 300ppm L-アスコルビン酸 aq (1mL) + 精製水 (1mL)	N.D.	10
⑥ 300ppm L-アスコルビン酸 aq (1mL) + 250ppm NaNO ₃ aq (1mL)	N.D.	250
⑦ 250ppm NaNO ₃ aq (1ml) + 精製水 (1ml)	N.D.	100
⑧ 300ppm L-アスコルビン酸 aq (1mL) + 10ppm NaNO ₂ aq (1mL)	10	100
⑨ シンガポールの水道水 (2mL)	N.D.	N.D.
⑩ セントジョセフ高校*のウォータークーラーの水 (2mL)	N.D.	N.D.
⑪ セントジョセフ高校のトイレの水 (2mL)	N.D.	N.D.
⑫ 台湾の水道水	N.D.	N.D.

*本研究の一部は、学校の探究活動の一環として、セントジョセフ高校（シンガポール）の生徒との共同研究で行われている。この試験紙を用いた予備実験はセントジョセフ高校の協力を得て行った実験である。それに際して、シンガポールと日本における水道水中の亜硝酸態窒素の基準値を調べたところ、基準値が低い日本に対して、シンガポールは比較的基準値が高いことが分かった（図2）。



共同研究のビデオ通話の様子

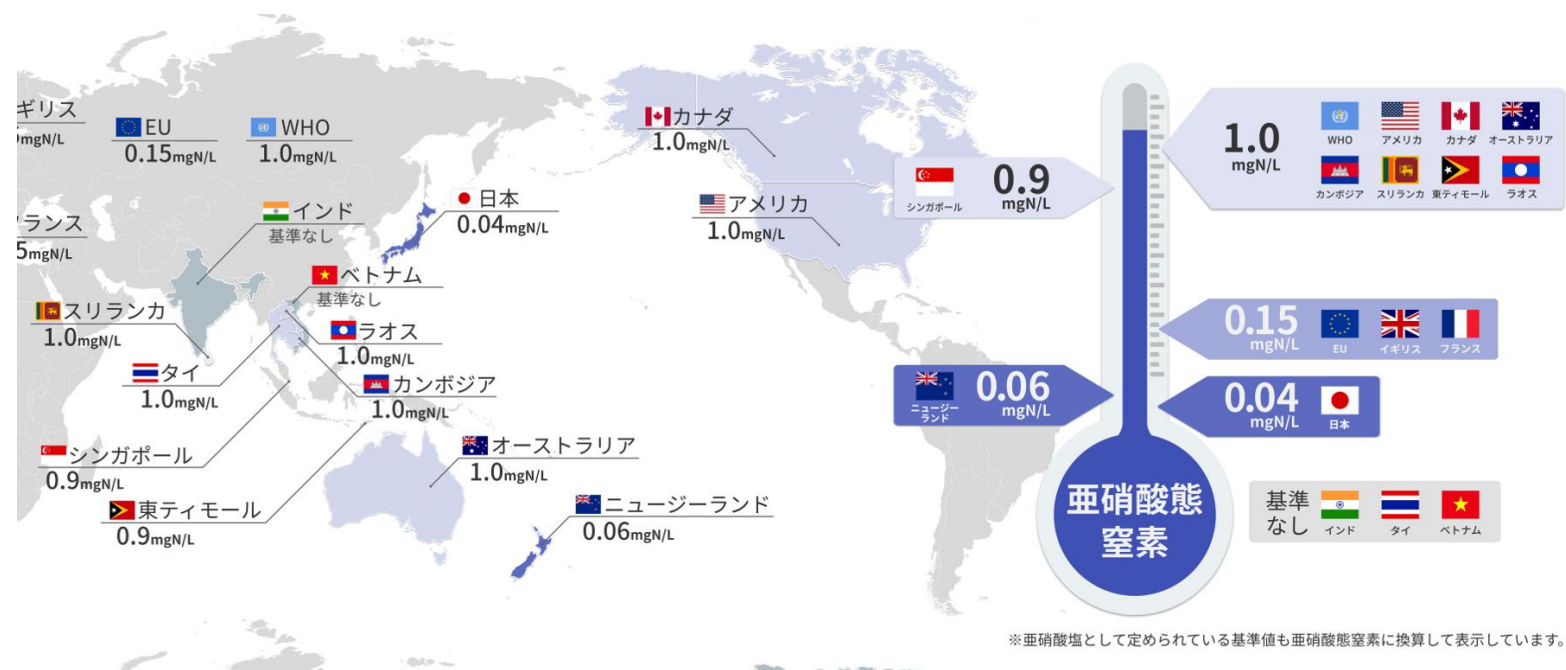


図2 世界の水道水中の亜硝酸態窒素の基準値⁽⁶⁾

4. 2. ザルツマン試薬と吸光光度計を用いた検量線の作成

溶液中の亜硝酸イオンを測定し、硝酸塩から亜硝酸塩への変換の有無を判断するために、分光光度計 (METASH 分光光度計 V-5000) とザルツマン試薬を用いた吸光光度法により検量線を作成することとした。

4. 2. 1. ザルツマン試薬の調製

1. スルファニル酸 2.5g を精製水 350mL に溶かす

2. N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 0.025g とリン酸 15mL を加える
 3. メスフラスコを使用し純水で 500 mL に希釈する
4. 2. 2. ザルツマン試薬を用いた検量線の作成
1. 0、0.5、1、1.5、2ppm 亜硝酸イオン各溶液 (1.5mL) をディスポセルに入れる
 2. ザルツマン試薬 (1.5mL) を各溶液と混合する
 3. 20分間反応させる (図3)
 4. 吸光度計を使用し、各溶液の吸光度を測定する (図4)
 5. 作成したザルツマン試薬は3ヶ月おきに作り替える。

4. 2. 3. 結果

作成した検量線は良好な直線性を示した。したがって、今後はザルツマン試薬と分光光度計を用いて水溶液中の亜硝酸イオンの定量を行うこととした。

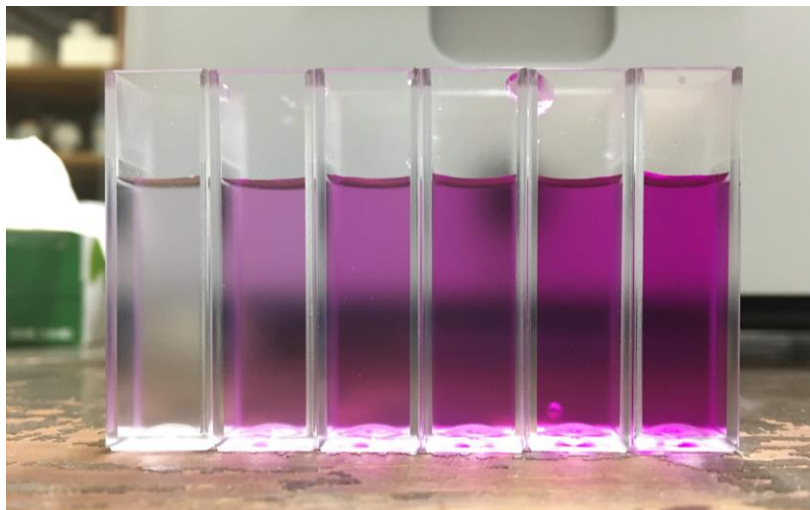
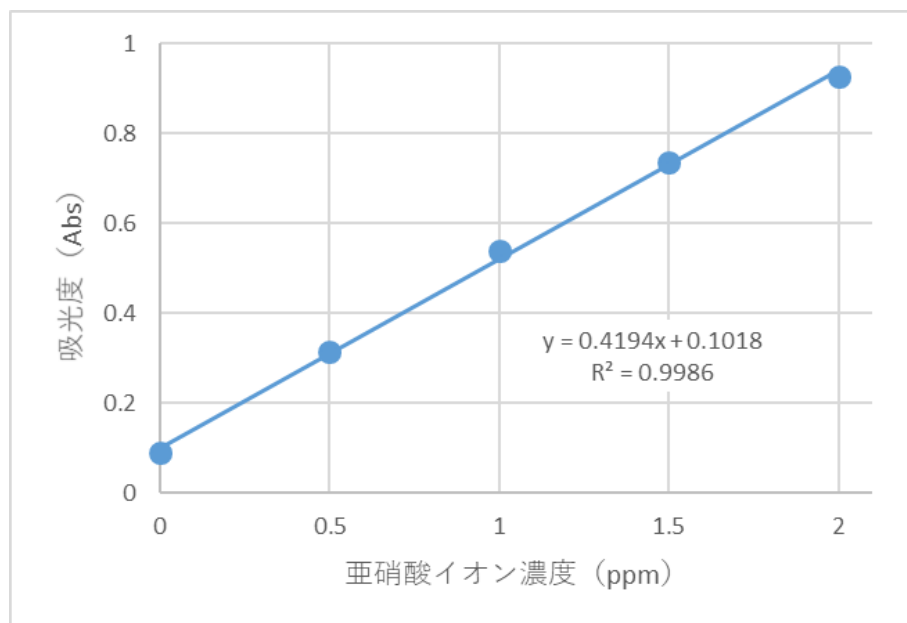


図3 各濃度の亜硝酸ナトリウム水溶液とザルツマン試薬を混合した実験の結果



反応溶液の体積 2mL 反応温度 25℃ 反応時間 20分

波長 540nm

図 4 亜硝酸イオンの検量線

4. 3. L-アスコルビン酸を用いた反応条件の検討

人体の中で起こりうる以下の条件において、L-アスコルビン酸を加えた硝酸が亜硝酸に変化することがあるのかを調べることにした。

- ①36°Cで 30 分間反応させる（おおよそ人の体温）
- ②pH1~1.5 で反応させる（おおよそ人の胃液の pH）

4. 3. 1 実験手順

①36°Cで 30 分間反応させる

1. 3本の試験管に 2000ppm 硝酸イオン水溶液 2mL と 500ppm の L-アスコルビン酸水溶液（濃度はおよそレモンに含まれるビタミン C の濃度⁽⁷⁾）2mL をそれぞれはかり取り、36°C で 30 分間温める（反応後この溶液の pH を測定すると、pH=3.57 であった）
2. 1 の溶液 1.5mL をディスポセルに入れ、ザルツマン試薬 1.5mL を加えて 20 分間反応させる
3. 分光光度計を用いて、波長 540nm で吸光度を測定する

②pH1~1.5 で反応させる

1. L-アスコルビン酸水溶液 500ppm と 0.20mol/L 塩酸を体積比 1 : 1 で混合し、L-アスコルビン酸・塩酸水溶液とする
2. 3本の試験管に 2000ppm 硝酸イオン水溶液 2mL と 1 の水溶液 2mL をそれぞれはかり取り、室温（約 20°C）で反応させる（反応後この溶液の pH を測定すると、3本の試験管すべてが pH1.3~1.5 のなかに収まっていた。）
3. 2 の溶液 1.5mL をディスポセルに入れ、ザルツマン試薬 1.5mL を加えて 20 分間反応させる
4. 分光光度計を用いて、波長 540nm で吸光度を測定する

4. 3. 2. 結果と考察

①②ともに亜硝酸イオンは検出できなかった。この理由としては、そもそも硝酸イオンと L-アスコルビン酸では亜硝酸イオンが発生しない場合と、亜硝酸イオンと L-アスコルビン酸が不安定な物質であり、L-アスコルビン酸または発生した亜硝酸イオンが溶存酸素と反応した場合などが考えられる。

また、検量線と対照実験を比較した結果、L-アスコルビン酸は、亜硝酸がザルツマン試薬と反応し呈色するのを阻害するということがわかった。これは、L-アスコルビン酸が亜硝酸とザルツマン試薬が反応するのを妨げている可能性と、L-アスコルビン酸が亜硝酸をさらに還元している可能性が考えられる。

そこで、亜硝酸イオンの定量における、L-アスコルビン酸の影響を調べることにした。

4. 4. 亜硝酸イオンの定量における L-アスコルビン酸の影響

4. 4. 1. 手順

① 反応時間の検討

1. 5本の試験管に 4ppm 亜硝酸イオン水溶液 1mL と 1000ppm の L-アスコルビン酸 1mL をそれぞれはかり取り、25°Cで 0、10、20、30、60 分間反応させる

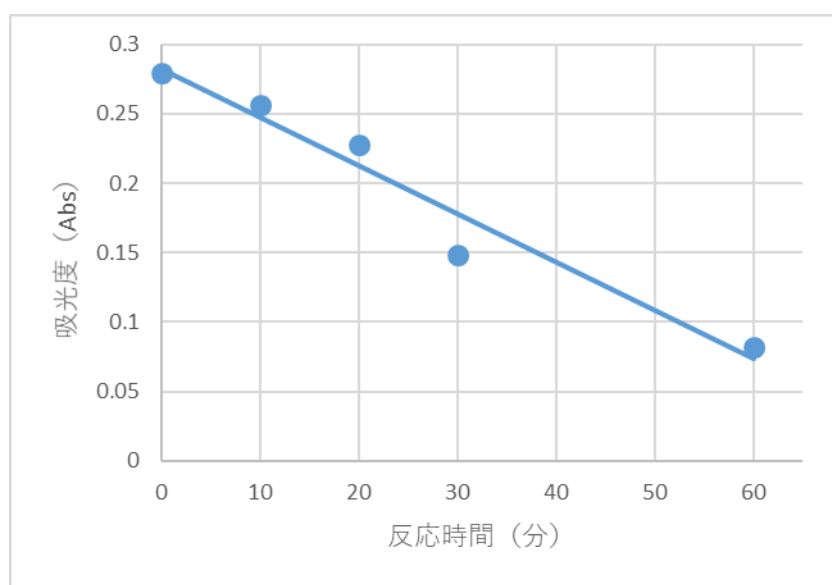
2. 反応後、ザルツマン試薬 2mL を入れ、20 分後に吸光度を測定する

② L-アスコルビン酸水溶液の濃度の検討

1. 5本の試験管に 4ppm 亜硝酸イオン水溶液 1mL と 0、250、500、750、1000ppm の L-アスコルビン酸 1mL をそれぞれはかり取り、25°C で 10 分間反応させる。
2. 反応後、ザルツマン 2mL を入れ、20 分後に吸光度を測定する

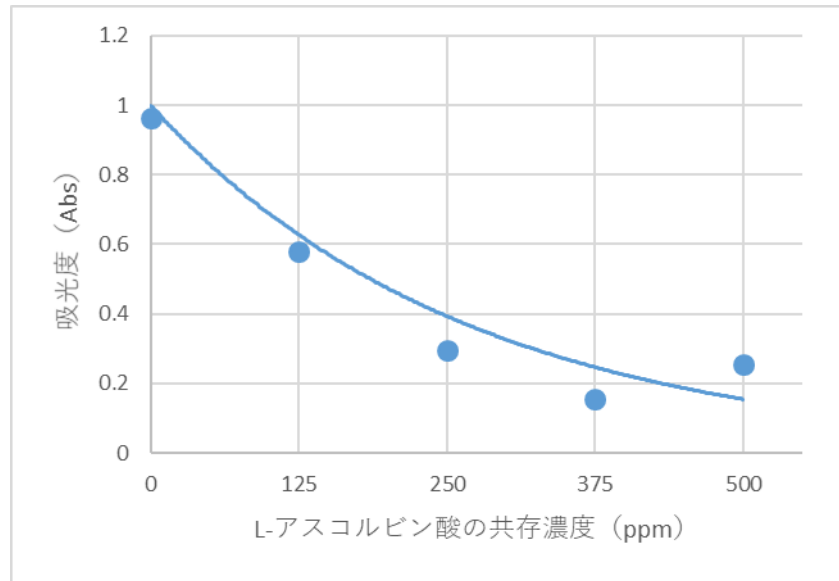
4. 4. 2. 結果と考察

①より、反応時間が長いほど、吸光度は低くなるということがわかった（図5）。また②より、L-アスコルビン酸の濃度が高いほど、吸光度が低くなるということがわかった（図6）。これは、亜硝酸イオンが L-アスコルビン酸により別の物質に還元されたためだと考えられる。



亜硝酸イオン 2ppm L-アスコルビン酸 500ppm
反応溶液の体積 2mL 反応温度 25°C
波長 540nm

図5 反応時間と吸光度の関係



亜硝酸イオン 2ppm

反応溶液の体積 2mL 反応温度 25℃ 反応時間 10分

波長 540nm

図6 L-アスコルビン酸の共存濃度と吸光度の関係

4. 5. 金属粉末と混合した場合の反応

以上の結果を踏まえ新たに論文調査を行ったところ、亜鉛の存在下で硝酸イオンが亜硝酸イオンに変化したという論文⁽⁸⁾を見いだすことができた。そこで、調理器具の材料として用いられる鉄や銅に着目し、それらの金属で硝酸イオンの還元が起こるか調べることにした。

4. 5. 1. 金属の前処理⁽⁸⁾

1. 10g の鉄粉（キンダ化学株式会社製）、銅粉（石津製薬株式会社製）にそれぞれ 0.1mol/L の塩酸 100mL を加え、ガラス棒で攪拌して洗浄し、上澄み液を捨てる
2. 純水 100mL を加え、ガラス棒で攪拌してすすぎ、上澄み液を捨てる。これを 5 回繰り返す
3. ドライヤーを使って乾かす

4. 5. 2. バッチ法による鉄粉・高濃度の L-アスコルビン酸を用いた条件の検討

手順

1. 100mL のビーカーに 2000ppm 硝酸イオン水溶液 5mL と 500ppm L-アスコルビン酸水溶液 5mL 加え、0.1g の鉄粉を入れる
2. 10 秒間振り混ぜ、これを 5 回繰り返す
3. 室温（約 20℃）で 10 分間放置する
4. ろ過する
5. ろ液 1.5mL をディスポセルに入れ、ザルツマン試薬 1.5mL を加えて 20 分間反応させる
6. 分光光度計を用いて、波長 540nm で吸光度を測定する

4. 5. 3. バッチ法による鉄粉または銅粉・低濃度の L-アスコルビン酸を用いた条件の検討

手順

1. 試験管に 2000ppm 硝酸イオン水溶液 5mL と 20、2、0ppm L-アスコルビン酸水溶液 5mL 加え、0.1g の鉄粉または銅粉を入れる

2. 10 秒間振り混ぜ、これを 5 回繰り返す
3. 25℃で 10 分間反応させる
4. ろ過する
5. ろ液 1.5mL をディスポセルに入れ、ザルツマン試薬 1.5mL を加えて 20 分間反応させる
6. 分光光度計を用いて、波長 540nm で吸光度を測定する

4. 5. 4. バッチ法による鉄粉または銅粉・低濃度の L-アスコルビン酸を用いた条件の検討（低温での反応）

手順

1. 試験管に 2000ppm 硝酸イオン水溶液 5mL と 2、0ppm L-アスコルビン酸水溶液 5mL 加え、0.1g の鉄粉または銅粉を入れる
2. 10 秒間振り混ぜ、これを 5 回繰り返す
3. 0℃で 10 分間反応させる
4. ろ過する
5. ろ液 1.5mL をディスポセルに入れ、ザルツマン試薬 1.5mL を加えて 20 分間反応させる
6. 分光光度計を用いて、波長 540nm で吸光度を測定する

4. 5. 5. カラム法による鉄粉または銅粉を用いた条件の検討

手順

1. 1mL マイクロピペットチップに 3~4mm 程度に切ったろ紙を入れ、先に詰める
2. 鉄粉、銅粉、鉄粉と銅粉を 1 : 1 で混ぜたものを、0.5g 取ってそれぞれ 1. に入れる
3. 1000ppm 硝酸イオン水溶液を 20 秒毎に 0.10mL ずつ加え、これを 10 分間行う（図 5）
4. 流出した水溶液 2mL を試験管に加え、ザルツマン試薬 2mL を試験管に加えて 25℃で 20 分間反応させる
5. 4. の水溶液をディスポセルに入れ、分光光度計を用いて、波長 540nm で吸光度を測定する

4. 5. 6. 結果と考察

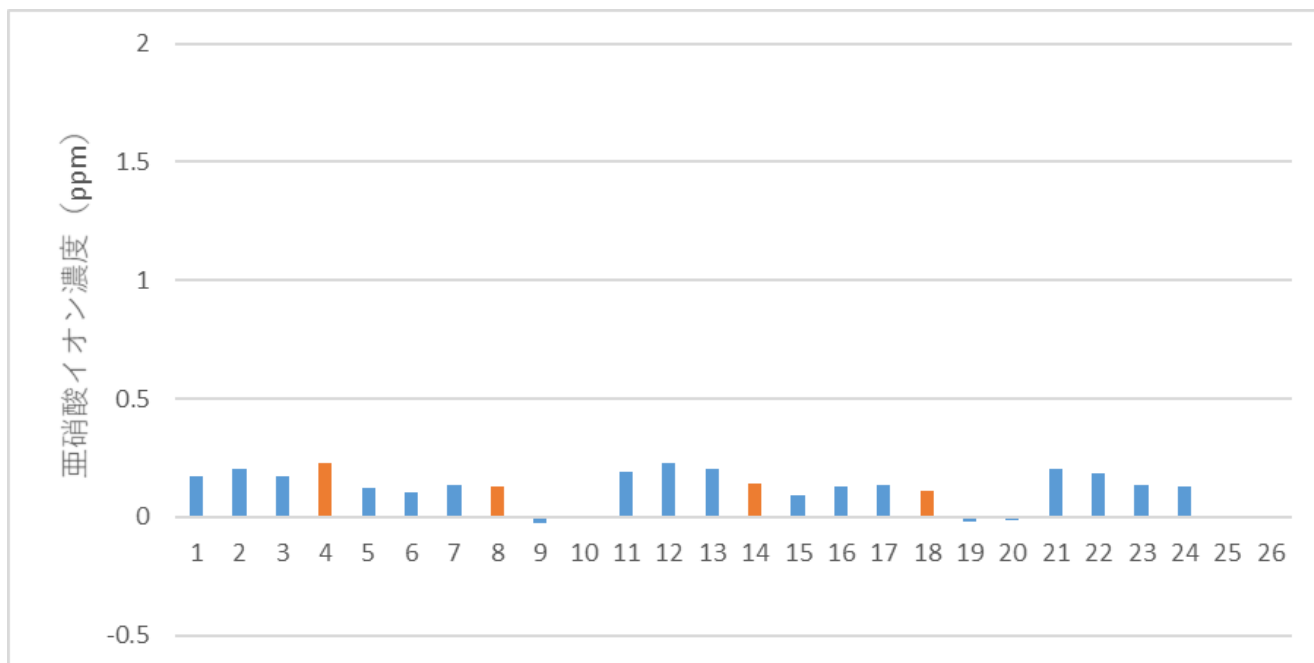
4. 5. 2. では亜硝酸イオンは検出できなかった。これは、4. 4. ②より、高濃度の L-アスコルビン酸は反応を妨げるためだと考えられる。

4. 5. 3. では亜硝酸イオンは検出できなかった。（図 7、表 2）これは、そもそも反応が起こっていない可能性と、試験管を振り混ぜる際に溶液と鉄粉がうまく接していなかった可能性が考えられる。同じ条件で別日に実験を行うと、いくつか吸光度が高くなるものがあった。しかし 4. 5. 3. で鉄・銅それぞれ 3 本ずつ実験を行っても目立った差は見られなかったため、再現性が低いと判断した。この再現性の低さは、上に述べたように、固体の金属と水溶液の反応であるため、攪拌の状況によって、接する面積と時間が変わることによって生じるのではないかと考えた。

4. 5. 4. では亜硝酸イオンは検出できなかった。低温で反応させることで、反応速度を下げ、不安定な亜硝酸イオン・L-アスコルビン酸を安定化しようとしたが、亜硝酸イオンの生成は検出できなかった。

4. 5. 5. の結果を図 8 に示す。銅粉だけでは亜硝酸イオンは検出できなかった。鉄粉の場合も、ブランクと比較して吸光度にあまり大きな差は見られなかった。しかし、鉄と銅を混合した粉末の場合は、亜硝酸イオンが微量ではあるが検出できた。中村ら（9）は、銅とカドミウムを用いた硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元を報告している。したがって、鉄と銅の相乗効

果によって硝酸イオンが還元され亜硝酸イオンが生成した可能性がある。あるいは、粒子が大きくカラムに入れた溶液がすぐに流出する鉄に、粒子の小さい銅が加わったことによって、溶液が鉄のみの場合よりも長い時間カラム内に残り、より反応した可能性が考えられる。



硝酸イオン 1000ppm

0.1g の鉄粉または銅粉を入れ、10 秒間振り混ぜ、これを 5 回繰り返す

反応溶液の体積 10mL 反応温度 25℃ 反応時間 10 分

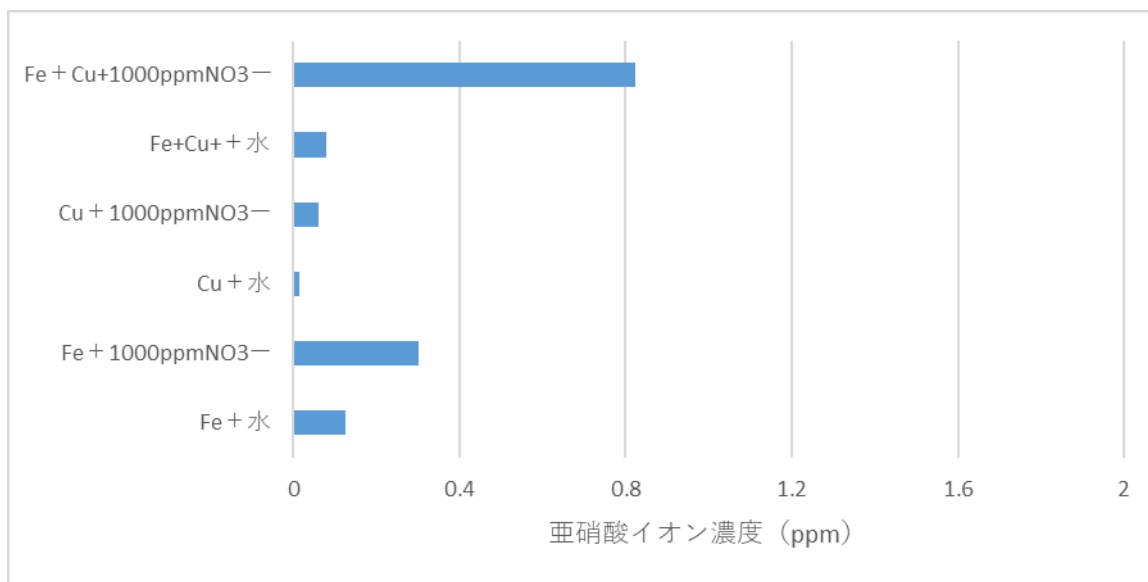
波長 540nm

図7 4. 5. 3. の結果

表2 図7の試料

	金属	硝酸イオン	L-アスコルビン酸 (ppm)
1~3	Fe	あり	20
4	Fe	なし	20
5~7	Cu	あり	20
8	Cu	なし	20
9	なし	あり	20
10	なし	なし	20
11~13	Fe	あり	2
14	Fe	なし	2
15~17	Cu	あり	2
18	Cu	なし	2
19	なし	あり	2
20	なし	なし	2
21	Fe	あり	0
22	Fe	なし	0
23	Cu	あり	0

24	Cu	なし	0
25	なし	あり	0
26	なし	なし	0



1000ppm 硝酸イオン

試料 0.5g をカラムに入れる

カラム長 Fe 2.1cm Cu 1.7cm Fe+Cu 1.8cm

0.10mL/20s 10 分間通水

反応温度 25℃ 反応時間 10 分

波長 540nm

図 8 4. 5. 5. の結果

5. 研究成果の発表

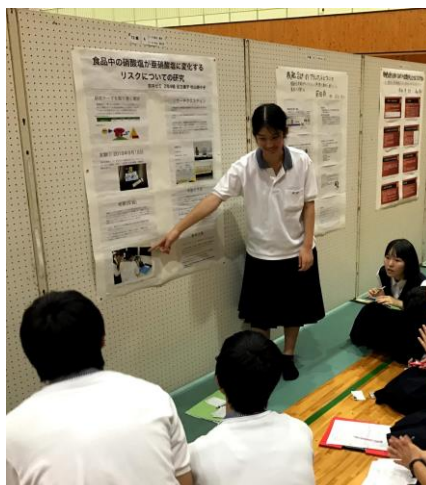
5. 1. 日時：令和元年 10 月 2 日（水）12 時 45 分～15 時 30 分

発表の場：倉吉東高等学校 2 年次探究活動中間発表会

発表題目：「食品中の硝酸塩が亜硝酸塩に変化するリスクについての研究」

発表形態：ポスター発表

発表者名：足立 優子（2 年）、杉山 奈々子（2 年）



5. 2. 日時：令和2年2月9日（日）

発表の場：令和元年度鳥取県高校生理数課題研究等発表会（予定）

5. 3. 日時：令和2年2月21日（金）

発表の場：倉吉東高等学校2年次探究活動成果発表会（予定）

6. 「環境安全とリスク」に関する意見と感想

今回の実験活動を通して、自分たちで仮説を立て、実験を行うことの難しさを知りました。特に、専門的な道具を使い、正確に実験を行うことに慣れておらず、何度もやり直しを繰り返しました。しかし、段々とミスが減り、精度の向上を感じることができました。実験では期待した結果が得られないことも多かったですが、考察し、次回の実験でなにをするべきかを考えることが非常に重要であると学びました。メンターの名古屋大学環境安全衛生管理室 准教授 林瑠美子先生をはじめ、多くの先生方にご協力いただき、最後までやり遂げることができました。将来、大学での研究や、さらにその先にも繋がる、とてもよい経験ができたことを嬉しく思います。（足立）

家庭科の授業で教わった亜硝酸ナトリウムをはじめとする亜硝酸塩の危険性を具体的に知ることができたのはとても大きな収穫でした。この研究では、食品添加物として表示してある亜硝酸塩を摂取することのリスクだけでなく、そこからさらに踏み込んで、気づかないうちに亜硝酸塩を摂取していないかという点に着目でき、大変面白い研究となったと感じています。簡単に思いつくような条件だけではなかなか還元が起きず、悩むと同時に、今の私たちの生活の中に大きな危険は潜んでいないと知り安心もしましたが、まだ考え得る条件は無数に残っています。それらを実験することによって、私たちの食生活が安心である証明を少しでも多くするか、あるいは身近に潜むリスクを見つけ出し、それを避ける手段などを考えていくことができればよいと思っています。還元が起こる条件について様々に考える中で、林瑠美子先生、鳥取大学工学部 准教授 八木寿梓先生のご意見を大変参考にさせていただきました。また、このようなチャンスをくださった REHSE のスタッフの皆様にも大きな感謝をいたします。ありがとうございました。（杉山）

7. 今後の課題

バッチ法で再現性を高めるのが難しいと判断したため、主にカラム法を用いた実験を行う。また、L-アスコルビン酸はザルツマン試薬が呈色するのを妨げることがわかったため、まずは再現性が高いと考えられる金属と硝酸イオンの反応について考える。

- (1) カラムに入れた溶液が流出する速度をより遅くし、現在と同じ速度のデータと比較する
- (2) カラムに入れる鉄粉と銅粉の割合を変えて実験をする
- (3) (1) (2) の実験の再現性を検証する

8. まとめ

- (1) ほかに何か物質が共存しない場合、L-アスコルビン酸のみで硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元させることは難しく、日常生活の中では起こりにくいと考えられる。
- (2) 鉄によって、硝酸イオンが亜硝酸イオンに還元される可能性がある。
- (3) バッチ法では、試験管を振り混ぜる際、溶液と金属の接触する面積や時間にムラがあると考えられ、それが再現性の低さにつながっている。したがって、今後はカラム法を用いて実験を行い、様々な条件を検討する。

9. 参考文献

- (1) (日付不明).
(一財) 食品分析開発センターSUNATEC. (日付不明). (一財) 食品分析開発センターSUNATEC.
参照先: 主な食品添加物の用途と基準値: <http://www.mac.or.jp/technical/additive/index02.htm>

- (2) 谷村顕雄. (1971). 食品添加物と食品成分との反応—とくに亜硝酸塩について—. 公益社団法人日本食品衛生学会, 食品衛生学雑誌, 12 巻 4 号 p. 277-281

- (3) 農林水産省. (2015 年 12 月 2 日). 食品安全に関するリスクプロファイルシート (化学物質) .
参照日: 2019 年 6 月 23 日,
参照先: http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/pdf/151202_nitrate.pdf

- (4) ニューメディカ・テック株式会社. (日付不明). 亜硝酸性窒素の毒性.
参照日: 2019 年 8 月 4 日,
参照先: ニューメディカ・テック株式会社: https://nmt.or.jp/?page_id=336

- (5) 市場衛生検査所 大田出張所. (2007 年 2 月 1 日). 青果物中の亜硝酸根・硝酸根実態調査.
参照日: 2019 年 6 月 23 日,
参照先: <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/hyouka/files/3hyouka-shiryo10.pdf>

- (6) JWRC 水道技術研究センター.世界の水道水質基準マップ
参照日:2020 年 1 月 10 日
参照先: http://www.jwrc-net.or.jp/map/kijun_map.html

- (7) 一般社団法人 全国清涼飲料連合会. 「レモン果実 1 個当たりのビタミンC量」表示ガイドライン
参照日:2020 年 1 月 10 日
参照先:http://j-sda.or.jp/manufacturing/regulations_and_guidelines04.php

- (8) 西村 雅吉, 松永 勝彦 (1969) . 硝酸イオンの定量(亜硝酸への還元). 分析化学, 18 巻 2 号 p. 154-158

- (9) 中村公紀, 中村栄子 (2003) . 「金属カドミウムによる硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元」. 分析化学, Vol.52, No.5, 319-323