

食品中に混入されたアジ化ナトリウムの迅速分析

都 田 路 子*, 天 川 映 子*, 永 山 敏 廣

Rapid Determination of Sodium Azide Mixed in Food

Michiko MIYAKODA*, Eiko AMAKAWA* and Toshihiro NAGAYAMA*

Keywords : アジ化ナトリウム sodium azide, 高速冷却遠心 high speed refrigerated centrifuge, 食品 food, 迅速分析 rapid determination, 健康危害 health harm, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

はじめに

意図的あるいは非意図的に食品に混入された化学物質による健康危害の事例として、平成10年に起きた新潟のアジ化ナトリウム（以下 NaN_3 と略す）のポットへの混入事件が挙げられる。その後、同様の事例が繰り返されたことから、平成11年に NaN_3 は毒物に指定された。しかし、当所においては健康危害発生時を想定した NaN_3 の迅速で簡易な分析法は確立されていない。そこで、危害発生時にすばやく対応できる分析法を作成することとした。

NaN_3 の分析法としては、塩化第二鉄による呈色試験法¹⁾、吸光度法²⁾、通気-イオンクロマトグラフィー（以下 IC と略す）³⁾、水蒸気-IC⁴⁾、誘導体化によるガスクロマトグラフィー質量分析法¹⁾等の報告がなされている。しかしこれらの分析法は煩雑な手順を要し、結果を得るまでに長時間が必要とされる。

そこで、中里ら⁵⁾が報告したUVラベル化剤である3,5-ジニトロ塩化ベンゾイル（以下 DNBC と略す）を NaN_3 と反応させ3,5-ジニトロベンゾイルアザイド（以下 DNBA と略す）としHPLCで分析する方法を応用し、食品の前処理を工夫して簡易な分析法の構築を試みた。

実験方法

1. 試料

NaN_3 が混入される可能性が考えられる茶、ジュース、コーラ飲料、日本酒、コーヒー、牛乳、レトルト・カレー（以下カレーと略す）の市販品を小売店より購入し、添加回収試験用試料とした。

2. 試薬及び試液

1) **標準溶液** NaN_3 （和光純薬工業（株）製、化学用）をシリカゲルデシケータで乾燥した後、その100 mg を水に溶解して100 mLとしたものを標準原液とし、適宜水で希釈して使用した。

2) **1% DNBC 溶液** DNBC（ナカライテスク（株）製 HPLC

用ラベル化剤）1 g をアセトニトリルに溶解し100 mLとした。

3) **クエン酸緩衝液** 0.05 mol/L クエン酸溶液及び0.05 mol/L クエン酸ナトリウム溶液を混和してpHを3.6に調整した。

4) **アセトニトリル** 和光純薬工業（株）製 HPLC 用を用いた。

5) **その他の試薬** 市販特級品を用いた。

3. 装置

HPLC 装置：日本分光（株）製の880-PU型ポンプ、カラムオープン、オートサンプラー、UV 検出器で構成、データ処理装置：島津製作所（株）製クロマトパック C-R6A、冷却遠心機：佐久間製作所製 M-160-IV型

4. 試験溶液の調製

1) **液体試料の茶、ジュース、コーラ飲料** 試料2 mL にクエン酸緩衝液・アセトニトリル（1:1）混液6 mL、1% DNBC 溶液2 mLを加えて1分間強振し、3分間放置した後、クエン酸緩衝液・アセトニトリル（1:1）混液で10 mLとしたものを0.22 μm のメンブランフィルターでろ過し、HPLC 用試験溶液とした。

2) **アルコール飲料の日本酒、脂肪、タンパク質の多い牛乳、コーヒー飲料** 試料を水で10倍希釈した後、2 mLを採り、クエン酸緩衝液・アセトニトリル（1:1）混液6 mL、1% DNBC 溶液2 mLを加えて1分間強振し、3分間放置した後、クエン酸緩衝液・アセトニトリル（1:1）混液で10 mLとしたものを0.22 μm のメンブランフィルターでろ過し、HPLC 用試験溶液とした。

3) **半固形試料のカレー** 試料をフードカッターで均質化した後その2 gを採り、水を加えて20 mLとし、よく攪拌して均質化した後、高速冷却遠心機（ -5°C 、10,000 rpm）で10分間遠心分離した。上澄み2 mLを採り、クエン酸緩衝液・アセトニトリル（1:1）混液6 mL、1% DNBC 溶液

* 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

* Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

2 mL を加えて 1 分間強振し、3 分間放置した後、クエン酸緩衝液・アセトニトリル (1 : 1) 混液で 10 mL とした。これを 0.22 μm のメンブランフィルターでろ過し、HPLC 用試験溶液とした。

5. HPLC 条件

カラム : Lichrosorb RP18-5 (4.6mm i.d.×250 mm) GL sciences Inc. 製, 移動相 : アセトニトリル・水 (1 : 1) 混液, 検出波長 : 254 nm, カラム温度 : 40°C, 流速 : 1.0 mL/min, 注入量 : 10 μL 。

6. 検量線

0.25~100 $\mu\text{g/mL}$ に調製した数段階の NaN_3 標準溶液の各々 2 mL を採り、これにクエン酸緩衝液・アセトニトリル (1 : 1) 混液 6 mL, 1% DNBC 溶液 2 mL を加えて 1 分間強振し、3 分間放置した後、クエン酸緩衝液・アセトニトリル (1 : 1) 混液で 10 mL としたものを HPLC に注入し、得られたピーク面積から検量線を作成した。

結果及び考察

1. 誘導体化における pH 及び DNBA の安定性の検討

DNBA の生成は一定で pH の違いによる差は認められず、また、DNBA の安定性については、10 時間放置後の減衰率が、pH2.0 で 5%, pH3.0~5.0 では 3%以内、pH7.0 では 65% であると報告されている⁵⁾。試料中の茶の pH は 6.2 であったことから DNBA が速やかに減衰することが危惧された。そこで、この茶について生成した DNBA の減衰率を検討したところ、1 時間放置後で 10%、10 時間で 66%であった。これらのことから、DNBA の安定化を図るため、食品の pH に関わりなく、検量線作成時と同様にクエン酸緩衝液・アセトニトリル (1 : 1) 混液を加えて試料溶液の pH を 3.6 付近の一定に保つこととした。

2. 前処理の検討

食品の特性に合わせ三種類の精製方法を検討した。

1) 固相抽出用カートリッジカラムによる精製 中里ら⁵⁾ はワインに DNBC を加えて強振した後、夾雑物による障害を取り除くため、固相抽出カートリッジカラムのフロリジルを用いて良好な結果を得ている。そこで、茶について固相抽出カートリッジカラムの Sep-Pak C₁₈ 及びフロリジルの各カラムを用いて精製効果を比較した。表 1, 図 1 に示すように、未処理の茶の回収率が 84.6%, CV0.4% とカートリッジカラムを通したものとほとんど違いのない結果を得、特に大きな妨害も認められなかったので、カートリッジカラムによる精製は省略することとした。

表 1. カートリッジカラムによる茶抽出物の精製

種類	回収率 (%)	CV (%)
未処理	84.6	0.4
C ₁₈	84.5	0.8
フロリジル	79.7	1.0

添加量 : 50 $\mu\text{g/mL}$ (n = 3)

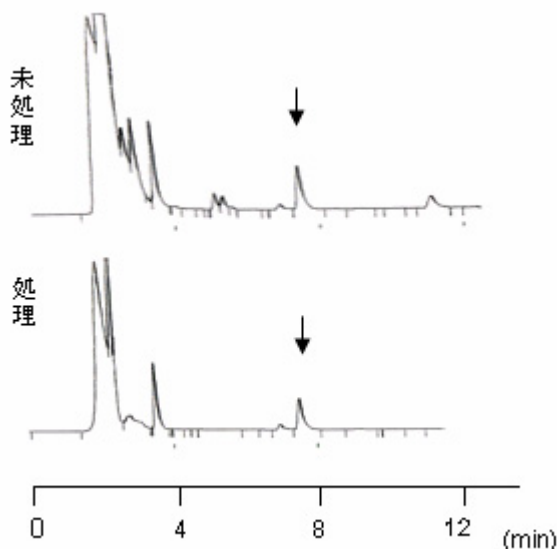


図 1. フロリジルカラムによる精製効果の比較

NaN_3 : 添加量 : 50 $\mu\text{g/mL}$

2) 希釈による精製 表 2 に示すように、脂肪、タンパク質の多いコーヒー及び牛乳、アルコール飲料の日本酒などは、試料を DNBC と反応させた後、メンブランフィルターでろ過することが不可能であったり、回収率の低下が見られた。

そこで、これらの食品について水による希釈を試みたところ、5 倍から 10 倍の希釈を行うことにより 75.3%~98.0% の回収率が得られた。

表 2. 希釈した場合の回収率 (%)

試料	希釈倍率		
	1	5	10
茶	84.6	84.9	84.7
ジュース	85.4	84.0	83.9
コーラ飲料	82.4	79.1	79.5
日本酒	74.3	75.3	78.9
コーヒー	67.3	98.0	94.4
牛乳	*	76.6	79.7
レトルト・カレー	*	*	*

添加量 : 50 $\mu\text{g/mL}$ (n = 3)

レトルト・カレー 50 $\mu\text{g/g}$

* メンブランフィルターによるろ過不能

表3. 添加回収試験結果

試料	添加量 5.0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		添加量 50.0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	回収率 (%)	CV (%)	回収率 (%)	CV (%)
茶	84.6	0.4	91.4	0.9
ジュース	85.4	0.8	88.9	1.9
コーラ飲料	82.4	0.4	97.5	1.7
日本酒	78.9	0.8	75.3	0.4
コーヒー	94.4	0.2	81.7	0.6
牛乳	79.7	0.9	76.6	2.7
レトルト・カレー*	97.2	2.1	99.6	5.5

* 添加量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)

(n = 3)

3) 高速冷却遠心による精製

澤田ら⁶⁾は、カレーの前処理に遠心分離後、加圧ゲルろ過による精製を行っているが、この方法では処理時間に1~2時間を要し、ICによる測定が困難であるとの報告をしている。そこで希釈と高速冷却遠心を組み合わせたHPLCによる短時間で効率的な分析を試みた。その結果、カレー中の脂質等は高速冷却遠心により除去され、特に妨害なく分析できることがわかった。図2にクロマトグラムを示した。

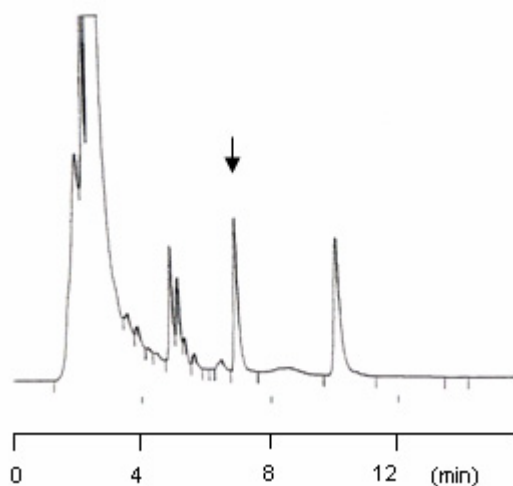


図2. レトルト・カレー抽出物の

HPLCクロマトグラム

NaN₃: 添加量 50 $\mu\text{g}/\text{g}$

3. 検量線

NaN₃標準溶液の0.25~2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (低濃度用), 2.5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (高濃度用)の範囲で良好な直線性 ($r = 0.999$)を示した。

4. 添加回収試験

NaN₃が混入される可能性のある、茶、カレーなど7種類の市販食品を用いて添加回収試験を行った。

添加量はNaN₃の経口最小中毒量 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (試料 100 mL

を経口摂取した場合)を参考にし、試料 1 mL 当り 50 μg とその 1/10 量である 5 μg とした。

表3に示したように、回収率は75.3%~99.6%と良好な結果であった。定量限界は、茶などの清涼飲料水は試料中濃度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 清涼飲料水以外の試料では 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 又は 2.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ である。

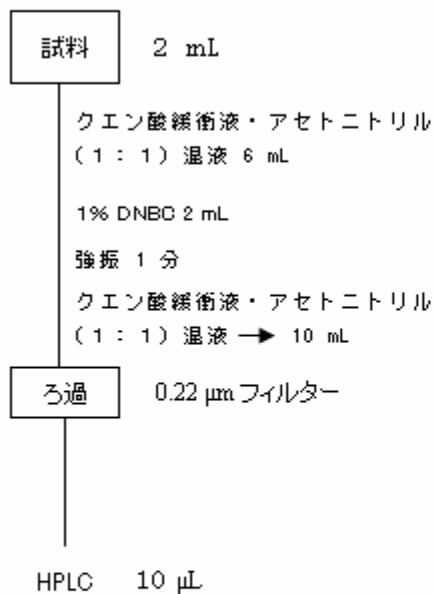
以上のように本法では、誘導体化を妨害する可能性のある試料中のタンパク質や脂肪を、希釈又は高速冷却遠心分離 (-5°C, 10,000 rpm) とミリポアフィルターによる簡便な操作で除去してその影響を防止し、また、クエン酸緩衝液・アセトニトリル (1:1) の添加で食品の pH に左右されない安定した分析を可能とした。HPLCによるNaN₃の分析法の概要を図3に示した。

まとめ

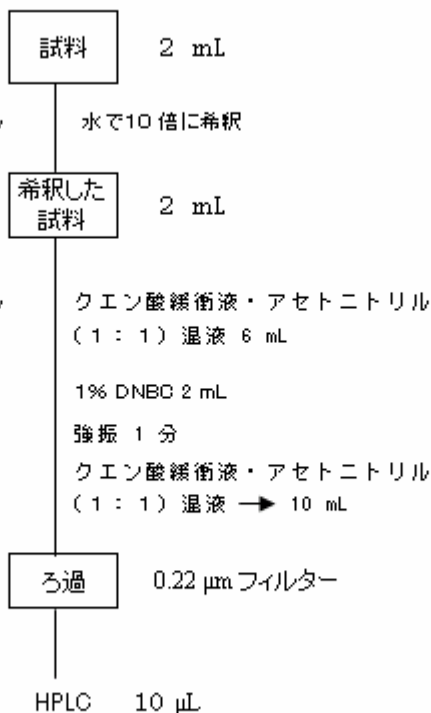
健康危害発生時の迅速な原因把握を目的として、HPLCによる食品中のNaN₃の迅速分析法について検討した。

- クエン酸緩衝液の添加により食品の pH に左右されずNaN₃を誘導体化し、生成したDNBAを安定した状態で測定することができた。
- 高タンパク、高脂肪の食品について、希釈又は高速冷却遠心の簡便な前処理により除タンパクや脱脂分離を行うことができ、試験溶液の調製に要する時間を大幅に短縮することができた。本法の分析時間は1試料当り30~40分である。
- 茶、牛乳、カレーなど7種の市販食品での添加回収率は、1 mL 又は 1 g 当り 50 μg 添加で75.3~99.6%, 5 μg 添加で78.9%~97.2%と良好であった

茶などの清涼飲料水



液体試料(脂肪・タンパク質の多い試料)



レトルト・カレー

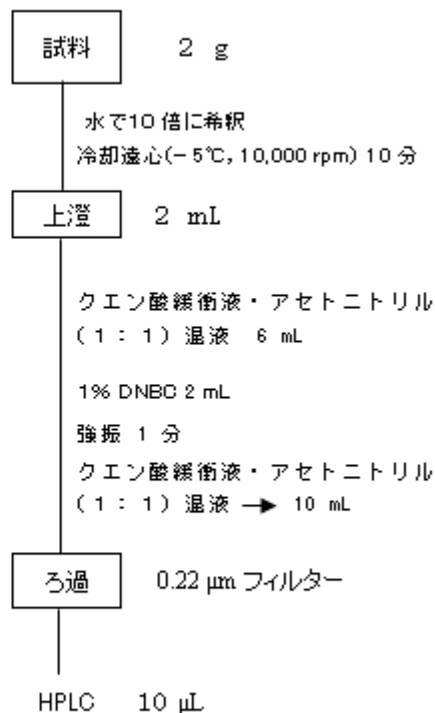


図3. HPLCによるアジ化ナトリウム分析法の概要

文 献

- 1) 日本薬学会衛生薬学委員会：日本薬学会第120年会公衆衛生協議会資料，14-17，2000.
- 2) 金並和重，局信男，後藤成一，他：大分県衛生環境研究センター年報，26，60-62，1998.
- 3) 大島晴美，上野英二，斉藤薫，他：日本食品衛生学会第77回学術講演要旨集，p28，1999.

- 4) 藤田久雄，毛利孝明，西岡千鶴，他：第36回全国衛生化学技術協議会年会講演集，p82，1999.
- 5) 中里光男，斉藤和男，菊池洋子，他：食衛誌，27，507-511，1986.
- 6) 澤田道和，大西道代，中村能則，他：第37回全国衛生化学技術協議会年会講演集，82-87，2000.