

高速液体クロマトグラフィーによる食品中に混入されたアジ化ナトリウムの迅速分析

生活衛生部門

Rapid Determination of Sodium Azide Mixed in Food by High Performance Liquid Chromatography

Division of Food and Environmental Hygiene

Abstract

A rapid and easy method for the determination of sodium azide contained in food by high performance liquid chromatography has been developed.

In this method, sodium azide contained in food was converted into 3,5-dinitrobenzoyl azide by reaction with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. It was necessary that sample including a lot of fat or protein should be diluted with water ten times and centrifuged. Adding a mixture of acetonitrile-0.05mol/l citrate buffer solution of pH 3.6(1:1) made it detectable, regardless of pH of food.

The recoveries of sodium azide added were 79.4~103.0% at 50 µg/ml(6.1CV%), 85.7~116.0% at 5 µg/ml(5.3CV%). The total analysis time was 25~40 minutes per a sample.

Key Words

rapid determination 迅速分析, sodium azide アジ化ナトリウム,
high performance liquid chromatography(HPLC) 高速液体クロマトグラフィー,
centrifuge 遠心分離機で分離する, citrate クエン酸塩

1 はじめに

アジ化ナトリウム(以下 NaN_3 と略す)は従来,防腐剤,薬品の原料及び自動車のエアバッグや航空機の緊急脱出シートの起爆剤として使用されてきた。

しかし,1998年に新潟でポットへ NaN_3 が混入される事件が起こり,三重,愛知,京都でも同様の事件が相次いだ。これを受けて厚生労働省は1999年に毒物及び劇物取締法において NaN_3 を毒物に指定した。その後も,埼玉,岡岡で同様の事件が起きており,問題となっている。表1に NaN_3 の物性を示す。

このような混入による健康危害事例が発生した場合,迅速かつ簡易な分析法により,すばやく原因物質を特定することが重要である。

そこで,都田らの報告した方法¹⁾を基に, NaN_3 をUVラベリ化剤である3,5-ジニトロ塩化ベンゾイル(以下DNBCと略す)で誘導体化して,UV検出器付の高速液体クロマトグラフィー(以下HPLCと略す)で測定する方法を検討したので報告する。

表1 アジ化ナトリウムの物性²⁾

性状	無色～白色,無臭の結晶。不安定で,衝撃や重金属との反応によって爆発しやすい。水によく溶解する。
中毒量,致死量	ヒト経口中毒量:5~10mg ヒト経口最小致死量:700mg(13mg/kg) ラット経口LD ₅₀ :27mg/kg
中毒症状(経口)	悪心,嘔吐,下痢,頭痛,めまい,ふらつき,複視,しびれ,発汗,眼前暗黒感,神経障害,過呼吸,胸部不快感,胸痛,息切れ,肺水腫,頻脈,失神,痙攣,昏睡,ショック,肝障害,血圧低下(ときに血圧上昇が先にみられることがある)など
体内動態	経口,経気道,経皮により速やかに吸収される。 経口の場合には,胃酸と反応してアジ化水素を発生する。
毒性機序	ミトコンドリア内のチトクロム酸化酵素のFe ³⁺ と結合して,酵素の働きを阻害し,細胞呼吸を傷害する。

2 実験方法

(1) 試料

水,コーヒー,緑茶,紅茶,栄養ドリンク,野菜ジュース,日本酒,牛乳,ごはん,パン,ヨーグルト,レトルトカレー(以下カレーと略す)の市販品を小売店にて購入し,添加回収用試料として用いた。

(2) 試薬

ア 標準溶液

NaN_3 (和光純薬(株)製,化学用)を100mg量り採り,水に溶解して100mlとしたものを標準原液とし,適宜水で希釈して使用した。

イ 1%DNBC溶液

DNBC(ナカライテスク(株)製,HPLC用ラベリ化剤)2gをアセトニトリルに溶解し200mlとした。

ウ クエン酸緩衝液

0.05mol/lクエン酸溶液,0.05mol/lクエン酸ナトリウム溶液を作製し(共に和光純薬(株)製,特級),混和してpHを3.6に調整した。

エ アセトニトリル

ナカライテスク(株)製HPLC用を用いた。

オ 水

超純水を用いた。

(3) 装置

ア HPLC

島津製作所(株)製のポンプ:LC-10AT,カラムオープン:CTO-10A,オートサンプラー:SIL-10A_{XL},UV検出器:

SPD-M10AVP

イ pH計

堀場製作所(株)製のpH METER F-14

ウ 遠心機

(株)コクサン製の型番:H-9R

(4) 試験溶液の調製

ア 液体試料(水, コーヒー, 緑茶, 紅茶, 栄養ドリンク, 野菜ジュース)

試料2mlにクエン酸緩衝液・アセトニトリル(1:1)混液6ml, 1%DNBC溶液2mlを加えて1分間強振し, 3分間放置後, クエン酸緩衝液・アセトニトリル(1:1)混液で10mlとしたものを, 0.45µmのメンブランフィルターでろ過し, HPLC用試験溶液とした。

イ 妨害の多い試料(アルコール飲料: 日本酒, 脂肪やタンパク質の多い液体試料)

水で10倍希釈した試料を2ml採り, クエン酸緩衝液・アセトニトリル(1:1)混液6ml, 1%DNBC溶液2mlを加えて1分間強振し, 3分間放置後, クエン酸緩衝液・アセトニトリル(1:1)混液で10mlとしたものを, 0.45µmのメンブランフィルターでろ過し, HPLC用試験溶液とした。

ウ 固形・半固形試料など(ごはん, パン, ヨーグルト, カレー, 牛乳)

試料をフードプロセッサーなどで均質化した後, その2gを採り 水を加えて20mlとしてよく攪拌して均質化する。これを高速冷却遠心機(-5℃, 10000rpm)で10分間遠心分離する。その上澄み2mlを採り, クエン酸緩衝液・アセトニトリル(1:1)混液6ml, 1%DNBC溶液2mlを加えて1分間強振し, 3分間放置後, クエン酸緩衝液・アセトニトリル(1:1)混液で10mlとしたものを, 0.45µm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) 測定条件

表2に示すとおりである。

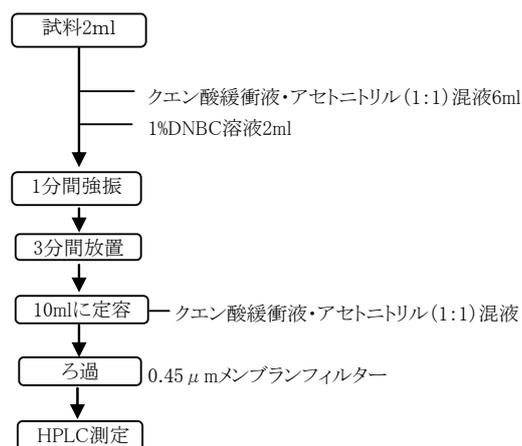
表2 測定条件

カラム	C18カラム(4.6 mm i.d. × 250mm) MACHEREY-NAGEL GmbH&Co.KG製
移動相	アセトニトリル・水(1:1)混液
検出波長	254nm
カラム温度	40℃
流速	1.0ml/min
注入量	10 µl

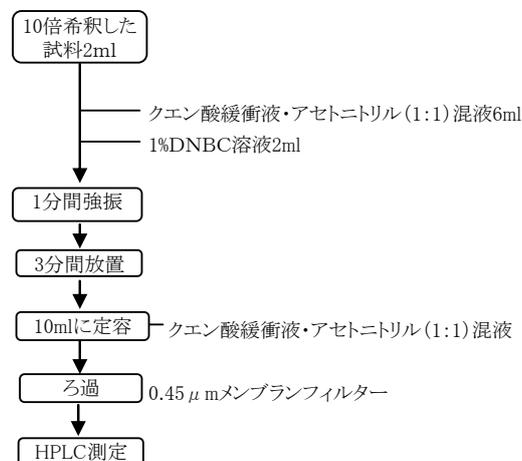
(6) 検量線

0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml に調製したNa₃標準溶液を各々2ml採り, クエン酸緩衝液・アセトニトリル(1:1)混液6ml, 1%DNBC溶液2mlを加えて1分間

1 液体試料



2 妨害の多い液体試料



3 固形・半固形試料

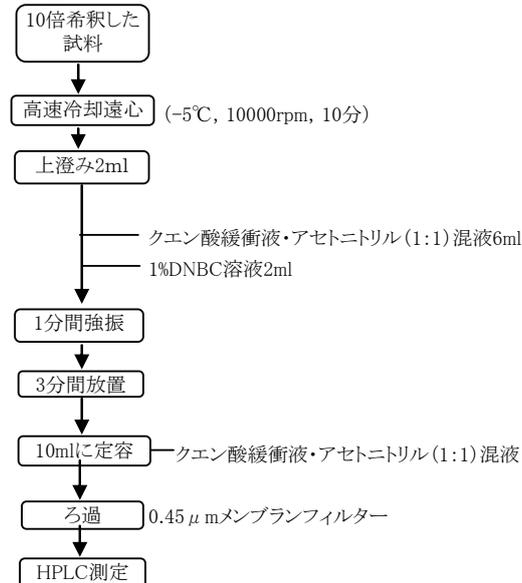


図1 試験溶液の調製の概要

強振し, 3分間放置後, クエン酸緩衝液・アセトニトリル(1:1)混液で10mlとしたものを, 0.45µmのメンブランフィルターでろ過し, HPLCに注入して得られたピーク面積(図2参照)を用いて,

絶対検量線法により検量線とした。

(7) 添加回収

水, コーヒー, 緑茶, 紅茶, 栄養ドリンク, 野菜ジュース, 日本酒, 牛乳, ごはん, パン, ヨーグルト, カレーを用いて添加回収試験 (n=3) を行った。

添加量はヒト経口最小中毒量 5mg (50 µg/ml の試料を 100ml 経口摂取したことに相当) を参考に, 試料 1ml 又は 1g 当り 50 µg とその 1/10 の量である 5 µg とした。

3 結果及び考察

(1) 試験溶液の調製

牛乳は, 10 倍希釈する方法ではメンブランフィルターでろ過することができなかった。そのため, 10 倍希釈した後, 遠心分離を行い, その上澄みを用いた。

また, コーヒーは 10 倍希釈を行わなくても測定が可能であった。

(2) 検量線

NaN₃ 標準溶液の 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 µg/ml (低濃度用), 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml (高濃度用) の範囲で良好な直線性 (r=0.996~0.999) を示した。

(3) ブランク試験

水 2ml を用いて, 同様に調製したものを試薬ブランクとして HPLC に注入した。その結果, NaN₃ のピークは検出されなかった。

(4) 添加回収試験

12 種類の添加回収用試料のブランクには, 全て NaN₃ のピークが検出されなかった。

表 3 で示すように添加回収率は, 高濃度添加 (50 µg/ml) した場合は 79.4~103.0%, 低濃度添加 (5 µg/ml) した場合は 85.7~116.0% であった。ばらつきもそれほど小さくなく (高濃度添加した場合は 0.6~6.1CV%, 低濃度添加した場合は 1.4~5.3CV%), 良好な結果であった。

(5) 検出限界及び定量限界

定量限界値付近と思われる標準溶液 (0.1 µg/ml) を 5 回測定し, その測定データの標準偏差を求め, 3σ を検出限界, 10σ を定量限界とした。

表 4 に示すように, 定量限界が 0.118 µg/ml であるため, 検量線の濃度範囲内であれば十分定量可能であると思われる。

(6) 試験溶液の安定性

NaN₃ と DNBC を反応させることで生じる 3,5-ジニトロベンゾイルアザイド (以下 DNBA と略す) は, 中性条件では不安定であり, 酸性条件では比較的安定であることが知られている^{(1),(2)}。そこで 50 µg/ml の標準溶液 (pH はおよそ 4) を約 90 分ごとに測定し, その減衰率を確認した。

表 5 に示すように, 90 分ごとに 1~2% ずつ減衰しているが, 10 時間程度の測定時間であれば, 定量には支障がないと思われる。

4 結論

(1) 高タンパク, 高脂肪など妨害の多い食品は, 希釈や高速冷却遠心を用いることで測定が可能となった。本法の前処理時間は, 1 試料当り 10~25 分, 測定時間は 12 分程度であり, 迅速に検査が可能である。

(2) 12 種類の食品を用いた添加回収率は, 高濃度添加 (50 µg/ml) した場合は 79.4~103.0%, 低濃度添加 (5 µg/ml) した場合は 85.7~116.0% と良好であった。

5 参考文献

- (1) 都田路子, 天川映子他: 食品中に混入されたアジ化ナトリウムの迅速分析, 東京保安研七報, 57, 215-218, 2006
- (2) 森博美, 山崎太編著: 急性中毒ファイル第 4 版, 廣川書店, 324
- (3) 中里光男他: 高速液体クロマトグラフィーによるワイン中のアジ化ナトリウムの分析法, 食衛誌, 27, 507-511, 1986

表 3 添加回収結果 (n=3)

試料名	高濃度添加 (50 µg/ml)		低濃度添加 (5 µg/ml)	
	回収率平均 (%)	CV%	回収率平均 (%)	CV%
水	101.6	0.6	113.2	2.1
コーヒー	102.0	2.6	113.8	5.3
緑茶	102.4	1.8	114.8	2.8
紅茶	101.6	1.8	110.6	2.3
栄養ドリンク	99.7	1.6	107.8	1.5
野菜ジュース	103.0	2.0	111.8	1.7
日本酒	93.1	3.3	105.0	3.0
牛乳	101.4	1.4	91.5	1.4
ごはん	79.4	6.1	86.1	2.9
パン	96.8	2.7	85.7	5.0
ヨーグルト	84.9	5.4	88.0	1.6
カレー	96.6	1.7	116.0	3.0

表 4 検出限界及び定量限界

平均値	0.114
標準偏差 σ	0.012
変動係数 CV%	10.4
検出限界 3σ	0.035
定量限界 10σ	0.118

(単位: µg/ml)

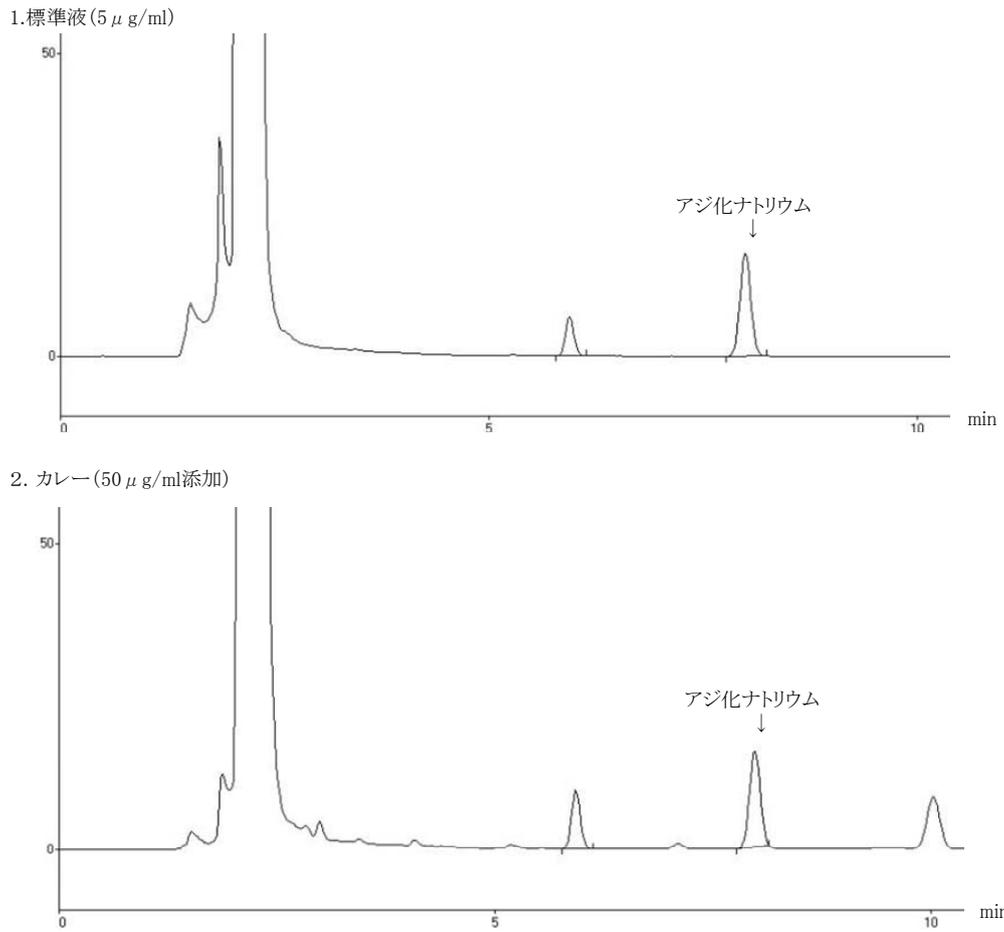


図2 アジ化ナトリウムのクロマトグラム

表5 試験溶液の安定性

	比率(%)
1.5時間後	97.1
3時間後	95.6
4.5時間後	93.1
6時間後	91.0
7.5時間後	89.7
9時間後	88.9
10.5時間後	88.4
12時間後	87.2