

急性食中毒発生時の迅速分析法の検討 (1) —アジ化ナトリウム—

藤田 久雄・毛利 孝明・西岡 千鶴・吉田 明美・砂古口博文・黒田 弘之

The examination of the quick analysis method in case of the acute food poisoning occurrence (1)

—Sodium Aside—

Hisao FUJITA, Takaaki MOURI, Chizuru NISIOKA, Akemi YOSIDA, Hirofumi SAKOGUCHI,
and Hiroyuki KURODA

I はじめに

1998年7月に和歌山の亜硝酸、8月に新潟アジ化ナトリウム、さらに長野の青酸化合物によるいわゆる毒物混入中毒事件が発生し、急性中毒発生時の即応検査対応が必務となっている。アジ化ナトリウムの分析法は、伊藤等のワイン中の水蒸気蒸留して塩化第二鉄と反応させて形成した錯イオン $\text{Fe}(\text{N}_3)^{2+}$ を比色する方法¹⁾、ワイン並びに中毒生体試料中の3, 5-ジニトロベンゾイルクロリドによるプレカラム誘導化の後、高速液体クロマトグラフィーによる分析法^{2), 3)}、液体試料中の通気分離イオンクロマトグラフィーによる分析法⁴⁾、相間移動ベンタフルオロベンジル化によるGC/MS分析法⁵⁾等が報告されている。しかし、アジ化ナトリウムは薬毒物化学試験法に整備されておらず、適用食品、簡便性、迅速性等で検討が必要であると思われる。そこで、伊藤らの水蒸気蒸留法を基に、水蒸気蒸留イオンクロマトグラフィーによるアジ化ナトリウムの迅速分析法³⁾を検討した。この分析方法を急性食中毒発生時の嘔吐物等への適応と検出した場合の確認方法について検討したので報告する。

II 実験方法

1. 試料

苦情並びに食中毒発生時の嘔吐物、お茶、フライドチキン、フライドポテト、チキンフライ、オムレツ、巻き寿司、チキンカツサンド、ウニ並びに市販のりんごジュース及びワイン。

2. 試薬

(1) アジ化イオン標準溶液：和光純薬(株)製化学用アジ化ナトリウムをシリカゲルデシケータで十分乾燥した後、その154.7mgを水に溶かして100mLにする。この溶液1mLはアジ化イオン(N_3^-)1000 μg を含む。この溶液を移動相(2.7mM Na_2CO_3 /0.3mM

NaHCO_3)で希釈して各濃度の標準溶液を作成する。

(2) 移動相(2.7mM Na_2CO_3 /0.3mM NaHCO_3)：和光純薬(株)製試薬特級炭酸ナトリウム(無水)0.2862g及び炭酸水素ナトリウム0.0252gを精製水に溶かして1000mLとする。

(3) 4倍濃度移動相(10.8mM Na_2CO_3 /1.2mM NaHCO_3)：和光純薬(株)製試薬特級炭酸ナトリウム(無水)0.2862g及び炭酸水素ナトリウム0.0252gを精製水に溶かして250mLとする。

(4) 50mM炭酸ナトリウム溶液：和光純薬(株)製試薬特級炭酸ナトリウム(無水)5.300gを精製水に溶かして1000mLとする。

(5) 硫酸、水酸化ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムは和光純薬(株)製試薬特級を用いた。アセトニトリルは和光純薬(株)製HPLC用、3, 5-ジニトロベンゾイルクロリドは東京化成(株)製を用いた。

3. 装置

(1) イオンクロマトグラフ：日本ダイオネクス(株)製のDX-AQであり、電気伝導度検出器はCDM-2、カラムはIonPacAS12A(4×200mm)/AG12A(4×50mm)、データ処理機は島津製作所製クロマトパックC-R7Aを使用した。

(2) ロータリーエバポレーター：SIBATA RE121, Vacuum System B-179

(3) 水蒸気蒸留装置：ガラス製

(4) ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)：島津製作所製QP-1000XE

(5) 高速液体クロマトグラフ：島津製作所製LC-10Aシステム(LC-10AD, SPD-10AV, CTO-10A, SPD-M10AV, CLASS10-LC)

Ⅲ 分析操作

1. 試験溶液の調製

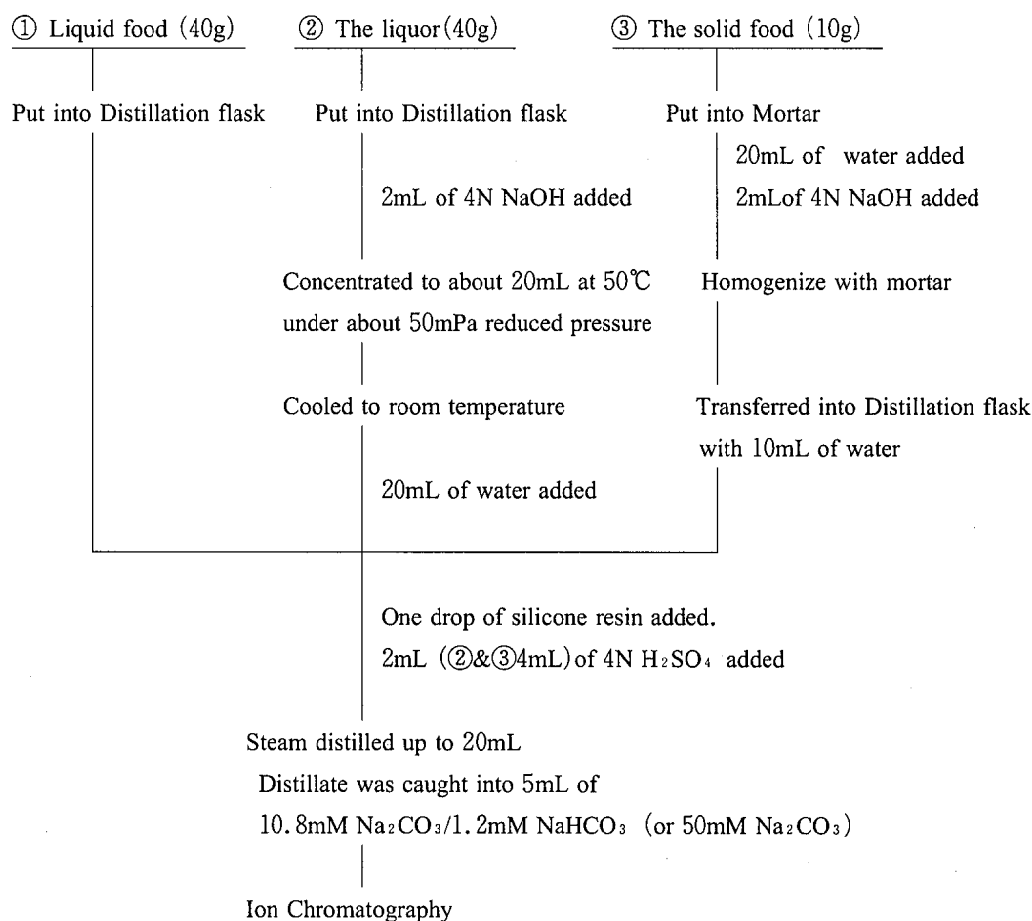
- (1) アルコールを含まない液体試料は、試料40gを100 mLの蒸留フラスコに採り、シリコン樹脂を1滴、4 N硫酸水溶液を2 mL加えて、直ちに、受器（20 mL目盛付試験管）に4倍濃度移動相（10.8mM Na_2CO_3 /1.2mM NaHCO_3 ）5 mLを入れた水蒸気蒸留装置に接続して、流出率約6～8 mL/minで水蒸気蒸留を行い、留液約15mLを採り、20mL定容にして試験溶液とする。その試験溶液50 μL をイオンクロマトグラフに注入して定量する。
- (2) アルコールを含む液体試料は、試料40gを100mLの蒸留フラスコに採り、4 N水酸化ナトリウム水溶液2 mL加えて、50℃の水浴中でロタリーエバポ

レーターを用いて50ミリパスカル減圧下で約20mLまで減圧濃縮する。冷却後、蒸留20mLと、シリコンを1滴、4 N硫酸水溶液を4 mL加えて直ちに、以下(1)と同様に水蒸気蒸留を行な20mL定容にして試験溶液とする。

- (3) 固体試料は、試料10gを乳鉢に採り、蒸留水20mL、4 N水酸化ナトリウム水溶液2 mL加えて磨り潰した後、蒸留水で10mLで蒸留フラスコに移し入れる。次に、シリコンを1滴、4 N硫酸水溶液を4 mL加えた後、直ちに、以下(1)と同様に水蒸気蒸留を行ない、20mL定容にして試験溶液とする。

なお、ワイン等亜硫酸が含有する食品は、捕集蒸留液が酸性になるので、捕集液は50mM炭酸ナトリウム溶液を使用する。

以上の方法はScheme 1 に示した。



Scheme 1 Schematic diagram for determination of sodium azide in foods

2. イオンクロマトグラフィーの条件

Table 1 にイオンクロマトグラフィーの条件を示す。

Table 1 Ion Chromatographic conditions

Sample Loop Volume	: 50 μ L
Column	: IonPacAS12A + IonPacAG12A
Eluent	: 2.7mM Na ₂ CO ₃ /0.3mM NaHCO ₃
Eluent Flow Rate	: 1.5mL/min
Suppressor	: Anion Self-Regenerating Suppressor-I
Detector	: Electric conductivity

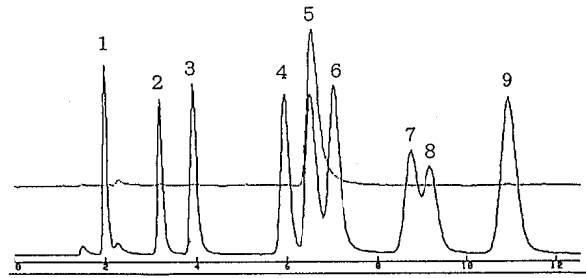


Fig. 1 Ion chromatograms of 9 Anion standard ;
Peak1 : Fluoride, 2 : Chloride, 3 : Nitrite, 4 :
Bromide, 5 : Azide, 6 : Nitrate, 7 : Sulfite, 8 :
Phosphate, 9 : Sulfate ; level, 0.6,1,2,4,8,4,4,
6.4 μ g/mL.

IV 実験結果並びに考察

1. イオンクロマトグラフィーの検討

イオンクロマトグラフィーの条件は緊急性、迅速性を考慮し、Table 1 に示すとおり、通常、塩素等陰イオンの分析に使用している条件とした。陰イオンのクロマトグラムをFig. 1 に示す。アジ化イオンと硝酸イオンは分離度が十分ではないが、硝酸イオンは水蒸気蒸留で除去できる。亜硫酸イオンは水蒸気蒸留で除去されないが、アジ化イオンと完全に分離する。

Fig. 2 に嘔吐物、お茶及びフライドポテトを本法で分析したクロマトグラムを示す。検討した食品10種及び嘔吐物8種には、アジ化イオンの定量に妨害になるピークはなかった。

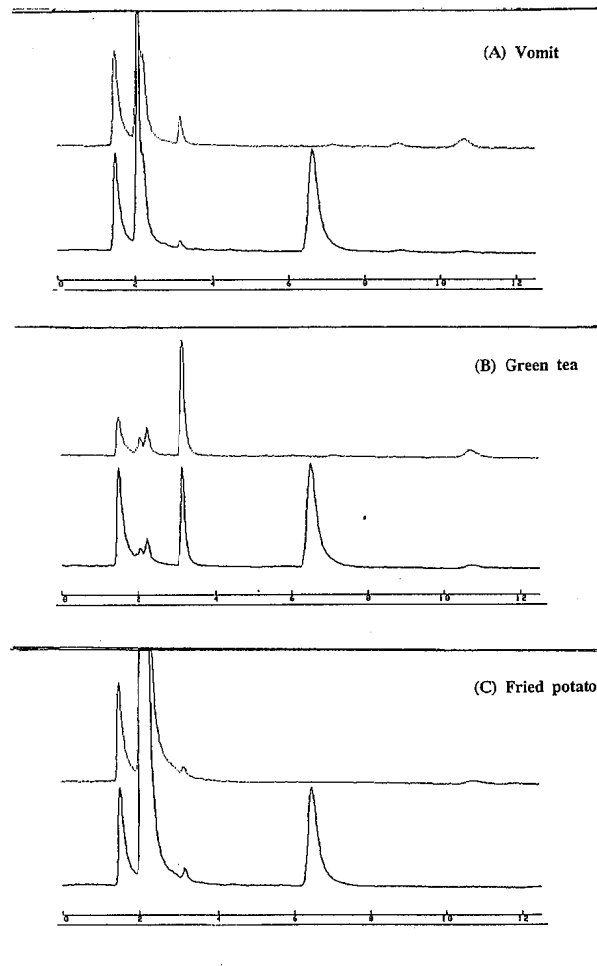


Fig. 2 Ion chromatograms of (A) Vomit ; (B) Green tea ; (C) Fried potato ; the upper side : control sample, the under side : azide standard added to sample ; level, Green tea : 2.5 μ g/g : Vomit and Fried potato, 10 μ g/g.

Table 2 Recovery of azide ion from Vomits and Foods

Sample	Sample Size	Added	n	Recovery(%)
Vomit A	10g	200 μ g	3	92.7
Vomit B	10g	200 μ g	1	98.7
Vomit C	10g	200 μ g	1	98.9
Vomit D	10g	200 μ g	1	96.4
Vomit E	10g	200 μ g	1	95.0
Vomit F	10g	100 μ g	1	101.8
Vomit G	10g	100 μ g	1	104.0
Vomit H	10g	100 μ g	1	93.8
Green tea	40g	100 μ g	1	100.1
Blend tea	40g	100 μ g	1	97.9
Volume sushi	10g	100 μ g	1	93.2
Cutlet sand	10g	100 μ g	1	95.8
Fried potato	10g	100 μ g	1	93.5
Chicken fly	10g	100 μ g	1	91.4
Omelet	10g	100 μ g	1	99.3
Kisu (Sillago shiama)	10g	100 μ g	1	95.1
Sea urchin	2g	100 μ g	1	94.3
Wine	40g	200 μ g	3	97.2

2. 実試料への適用と添加回収実験

本分析法を苦情並びに中毒発生時の嘔吐物 8 種並びに緑茶、ブレンド茶、巻き寿司、チキンカツサンド、フライドポテト、フライドチキン、オムレツ、キス、ウニ、ワインに適用した結果、アジ化イオンはいずれも検出限界以下であった。検出限界は嘔吐物及び固体食品が0.4 μ g/g、液体食品が0.1 μ g/gである。

また、これらの嘔吐物及び食品にアジ化イオンを添加して、本分析法に従って操作し、回収率をTable 2に示す。アジ化イオンの回収率は91.4~104.0%であった。

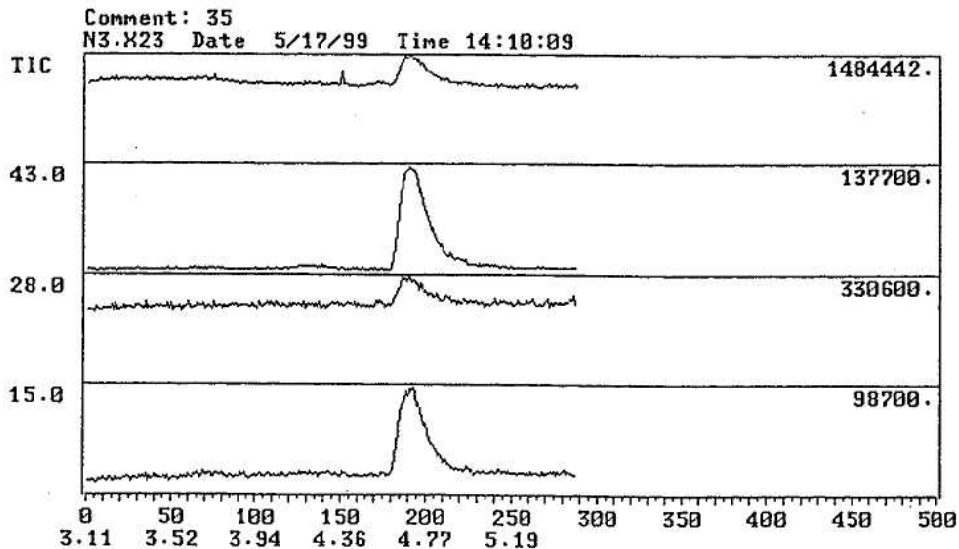
3. 確認方法

(1) ヘッドスペースーガスクロマトグラフ質量分析法による確認

イオンクロマトグラフィーで検出したアジ化イオ

ンをガスクロマトグラフ質量分析法で確認する方法を検討した。水蒸気蒸留した試験溶液15mLを25mLバイアル瓶に採り、4 N硫酸溶液 1 mLを加えて、直ぐにテフロン張りセプタムで密栓する。ヘッドスペース1000 μ LをGC/MSに導入する。Fig. 3に茶にアジ化イオンを50 μ g/g添加したときのクロマトグラム及びマススペクトルを示す。

ピークがブロード且つ、低質量でバックグラウンドが高いため、50 μ g/mL以下では同定できなかったが、50 μ g/g添加のお茶はライブラリー検索でアジ化水素が確認できた。また、50 μ g/g以上であっても、ワイン等は教雑ピークが多く高濃度でないと、同定が困難であった。



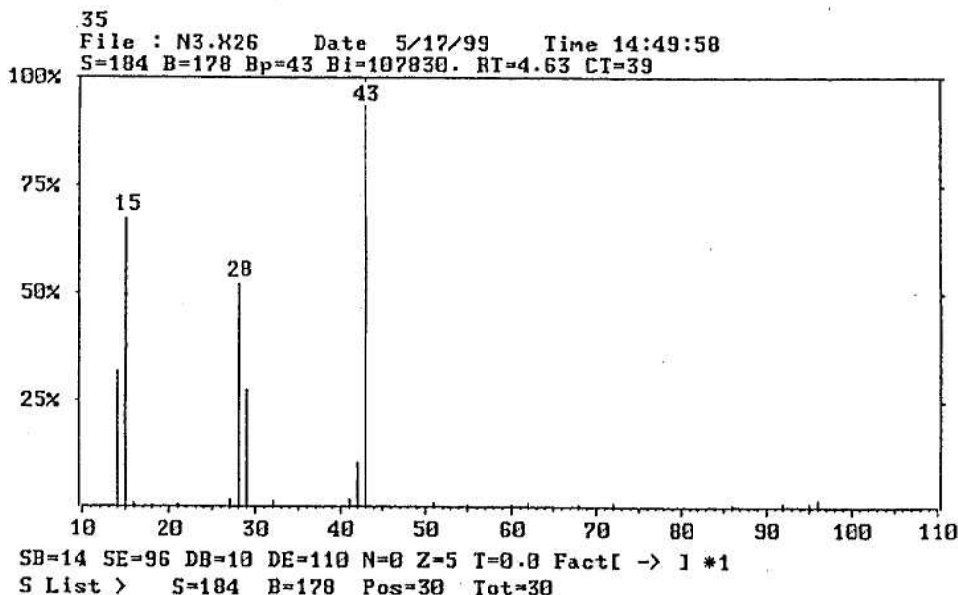


Fig. 3 Mass spectrum and chromatogram of azide ion added to tea by GC/MS ; level, 50 μ g/mL.

GC/MS conditions : Instrument, Shimadzu QP-1000EX ; Mass range, 20-100 ; Ionization mode, +EI ; Ionization voltage, 70eV ; Ionization current, 300mA ; Ion source temp., 250 $^{\circ}$ C ; Transfer line temp., 250 $^{\circ}$ C ; Column, DB-624 70m \times 0.53 mm, 3 μ m ; Column oven temp., 40 $^{\circ}$ C ; Injector temp., 80 $^{\circ}$ C ; Carrier gas, He 20mL/min ; Sample Volume, 1000 μ L.

(2) 3, 5-ジニトロベンゾイルクロリド-プレカラム誘導化-高速液体クロマトグラフィーによる確認法

ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析法ではアジ化イオンの低濃度が確認できなかった。そこで、他の分析方法による確認手段として、中里らの報告²⁾に準拠して、アジ化イオンをUVラベル化剤である3, 5-ジニトロベンゾイルクロリド(DNBC)と反応させ、3, 5-ジニトロベンゾイルアザイド(DNBA)とした後、高速液体クロマトグラフィーで確認する方法を検討した。

水蒸気蒸留した試験溶液 5 mLを10mLテフロンパッキン付き試験管にとり、ブロムクレゾールグリーン指示薬(黄pH3.8-5.4青)を一滴加え、青色から黄色に変化するまで0.2N塩酸を滴下する。次に、1%3, 5-ジニトロベンゾイルクロリドアセトニトリル溶液を2 mL加えて、1分間強振して、反応させた後、水を加えて10mLとしてHPLC用試験溶液とした。そして、ホトダイオードアレイ検出器(DAD)付き液体クロマトグラフに10 μ L導入して測定した。

Fig. 4に1 μ g/mLアジ化イオンを3, 5-ジニトロベンゾイルクロリドで誘導化した3, 5-ジニトロベンゾイルアザイドのHPLC-DADスペクトルを示す。

また、Fig. 5に、りんごジュースにアジ化イオン濃度が0.5 μ g/mLになるように添加した試料及びそのブランク試料を水蒸気蒸留し、3, 5-ジニトロベンゾイルクロリドで誘導化したHPLC-DADクロマトグラムを示す。

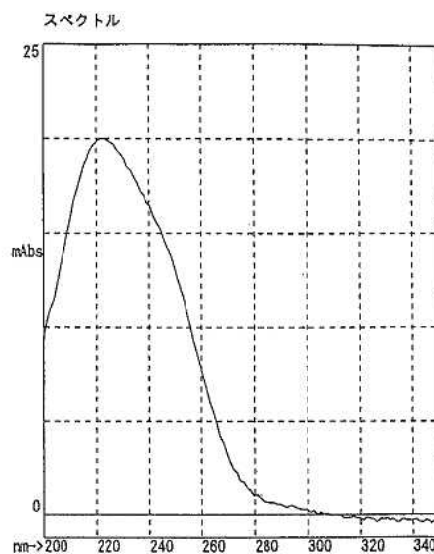


Fig. 4 HPLC-DAD spectrum of 3,5-dinitrobenzoyl azide ; level, azide ion 1.0 μ g/mL.

V まとめ

急性食中毒発生時の嘔吐物及び食品中のアジ化ナトリウムの迅速方法と確認方法を検討した。

1. 検体（液体40g, 固体10g）に4 N硫酸を加えて酸性下で水蒸気蒸留し、その蒸留物15mLを10.8mM Na_2CO_3 /1.2mM NaHCO_3 （又は50mM Na_2CO_3 ）5 mL中に捕集した。固体試料はアルカリ性下で粉碎した後、また、酒類はアルカリ性下で減圧濃縮してアルコールを除去した後、水蒸気蒸留を行った。その蒸留液50 μL をイオンクロマトグラフ（Column：IonPacAS12A+IonPacAG12A, Eluent：2.7mM Na_2CO_3 /0.3mM NaHCO_3 , Flow Rate：1.5mL/min）に注入することで嘔吐物等の迅速分析が可能であった。
2. 分析時間は1検体当たり液体食品が20分、嘔吐物及び固体食品25分、ワイン40分であった。
3. アジ化イオンは検討した試料からは、検出しなかった。
4. アジ化イオンの回収率は91.4~104.0%であった。
5. アジ化イオンの確認方法は濃度が50ppm以上の場合はヘッドスペースーガスクロマトグラフ質量分析法で確認できた。また、低濃度の場合は3, 5-ジニトロベンゾイルクロロドープレカラム誘導化-高速液体クロマトグラフィーで容易に確認できた。

文 献

- 1) 伊藤登志男, 豊田正武, 金森孝子, 慶田雅洋：ぶどう酒中のアジ化ナトリウムの定量法の検討, 食衛誌, 17(5), 386-391 (1976)
- 2) 中里光男, 斎藤和夫, 菊池洋子, 井部明弘, 藤沼賢司, 二島太一郎：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(5), 507-511 (1986)
- 3) LAMBERT W E., PIETTE M., VAN PETEGHEM C, DE LEENHEER A P, Application of High-Performance Liquid Chromatography to a Fatality Involving Azide, J Anal Toxicol (USA), 19(4), 261-264 (1995)
- 4) 三木昭宏, 西川真弓, 土橋 均：相間移動ペンタフルオロベンジル化によるシアン, チオシアン, 及びアジドイオンの一斉GC/MS分析法, 日本薬学会第119年会講演要旨集3, p141 (1999)
- 5) 大島晴美, 上野英二, 斎藤 勲, 加賀美忠明：イオンクロマトグラフィーによるアジ化ナトリウムの分析, 日本食品衛生学会第77回学術講演会講演要旨集, p28 (1999)
- 6) 投稿予定

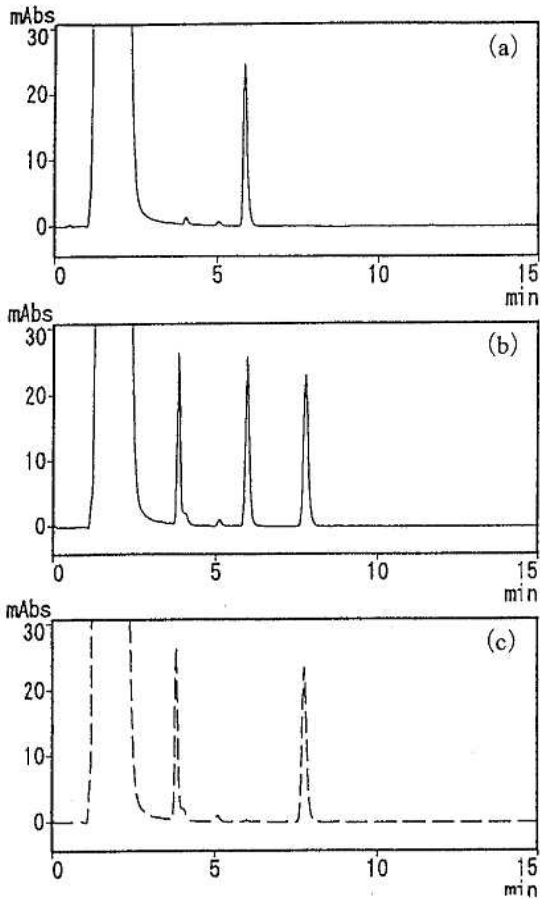


Fig. 5 HPLC-DAD chromatograms of azide ion in apple juice treated with 3,5-dinitrobenzoyl chloride.

- (a) 1.0 $\mu\text{g/mL}$ azide ion standard ;
- (b) standard added to sample ; level, 0.5 $\mu\text{g/g}$.
- (c) control sample

HPLC condition : column, Inertsil ODS-80A (4.6*150 mm) ; mobile phase, acetonitrile-water (1 : 1) ; flowrate, 1.0mL/min ; photodiode array detector, 8-nm band-pass, monitoring light 200 to 350nm, display wavelengths 240nm.