

高速液体クロマトグラフィーによる 農産物及びその加工品中の臭素分析法

貞 升 友 紀*, 井 部 明 広*, 田 端 節 子*,
宮 川 弘 之*, 安 井 明 子*, 安 田 和 男*

Analytical Procedure for Bromide in Agricultural Products and Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography

YUKI SADAMASU*, AKIHIRO IBE*, SETSUKO TABATA*,
HIROYUKI MIYAKAWA*, AKIKO YASUI* and KAZUO YASUDA*

A simple and rapid method using HPLC was developed in order to determine bromide residues in agricultural products and foodstuffs.

A 10g sample with 4 %NaOH in ethanol solution was ashed at 500°C. The ashed residue was dissolved in water and cleaned up by a Bond Elut SAX and a Mega Bond Elut PRS. Bromide in the eluent was determined by HPLC-UV using an anion exchange resin column, Ion Pac AS12A. Recoveries of bromide ion spiked at 2 ppm and regulation limits of respective agricultural products were more than 80.0%, and the detection limit was 0.5ppm in agricultural products. The method was applied to 87 samples of 12 kinds of agricultural products and foodstuffs, so that considerable bromide was detected from corns, kiwifruits, strawberries and chinese chestnuts as compared with that from other agricultural products. Particularly, 43.2 ppm bromide was detected in chinese chestnut. Moreover, some of the foodstuffs were found to have considerable bromide but this finding was probably caused by other ingredients such as salt. None of the samples exceeded the regulation limits in Japan.

Keywords : 臭素 bromine, 臭化物 bromide, 農産物 agricultural products, 高速液体クロマトグラフ HPLC, 陰イオン交換樹脂カラム anion exchange resin column

緒 言

臭化メチルは殺虫、殺菌を目的とした含臭素農薬で、我が国の使用量は年々減少しているものの、農産物や土壌の薰蒸剤として約8,000 tの使用があり¹⁾、44種の農産物に臭素として残留基準が設けられている。1992年臭化メチルはオゾン層破壊物質に指定され、2015年までに全廃することが決められたが、全廃後も代替技術の不十分な場合や緊急用途は条件付きで使用が許可されることになっている¹⁾。これらのことから、農産物における残留臭素の含量を継続的に調査することが重要である。現在、臭素試験法の公定法にはガスクロマトグラフ(GC)法が定められているが²⁾、誘導体化や空補正など操作が煩雑で

ある。その他にも検知管法³⁾やイオンクロマトグラフ法⁴⁾が報告されているが、これらの方法を比較検討したところ操作性や精度の点で難点がみられた。さらに、米を対象とした蛍光X線法⁵⁾や高速液体クロマトグラフ法⁶⁾の報告があるが、他の農産物及び加工品に適用した例はない。

そこで、今回イオン交換樹脂カラムを用いた高速液体クロマトグラフ法を検討し、各種農産物及びその加工品に適用したところ良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

1999年4月～2000年1月に東京都内で市販されていた

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

農産物及びその加工品を試料とした。

2. 試薬

(1)臭化物標準溶液：和光純薬工業(株)製イオンクロマトグラフ用臭化物イオン標準溶液 (1000 ppm) を適宜水で希釈して用いた。

(2)前処理用カートリッジカラム：いずれもVARIAN社製のBond Elut SAX及びMega Bond Elut PRSを用いた。Bond Elut SAXはあらかじめメタノール及び水各2 mlを流した後、0.1 mol/L硫酸溶液6 ml、次いで水8 mlで洗浄したものを用いた。また、Mega Bond Elut PRSはあらかじめメタノール及び水各5 mlで洗浄したものを用いた。

(3)その他の試薬：市販の特級試薬を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ(HPLC)：ポンプLC-10AT型、紫外可視分光検出器SPD-10AV型、カラムオープンCTO-10AC型 (いずれも(株)島津製作所製)

4. HPLC測定条件

ガードカラム及び分析カラム：DIONEX社製Ion Pac AG12A(4 mm i.d.×50mm)及びIon Pac AS12A(4 mm i.d.×250mm)、移動相：1.35mmol/L炭酸ナトリウム・0.15 mmol/L炭酸水素ナトリウム溶液、流速：0.8ml/min、カラム温度：40℃、検出波長：200nm、注入量：20 μ l

5. 試験溶液の調製

粉碎あるいは細切した試料10.0gを採取し、4%水酸化ナトリウム・エタノール溶液25mlを加えて一夜放置後、500℃で灰化した。この灰化物に水10mlを加え、超音波で抽出後ろ紙でろ過し、残渣を水で洗い、ろ液とあわせて20.0mlにしたものを灰化溶液とした。次に、Bond Elut SAXの下にMega Bond Elut PRSを接続した前処理用連結カートリッジカラムに灰化溶液1 mlを負荷し、水2.5mlを流した後Bond Elut SAXを取り外し、Mega Bond Elut PRSのみに水2.0mlを流した。流出液を全てあわせ、沸騰水浴上で加熱濃縮し、放冷後、水で5.0mlにしたものをHPLC用試験溶液とした。

6. HPLCによる測定

試験溶液20 μ lをHPLCに注入し、得られたクロマトグラムからピーク面積を求め、別に作成した検量線より試料中の臭素含量を算出した。なお、検量線は臭化物標準溶液0.1~5.0ppmの範囲で作成した。

結果及び考察

1. 灰化及びカラム精製時における水酸化ナトリウム量の検討

これまで報告されている臭素試験法^{2-4), 6)}と同様に本法でも試料を灰化し有機物の除去を行うことにしたが、灰化の際に添加する水酸化ナトリウム量が回収率に影響するとの報告がある⁷⁾ことから検討を行った。あらかじめGC法²⁾で臭素含量を確認したオレンジを用いて、水酸化ナトリウム量を試料1 gあたり0.05 g~0.4 gと変化させたときの臭素含量を測定した。Fig. 1に示したとおり水酸化ナトリウム量が0.1 g以上で安定した値が得られることがわかった。

また、Fig. 2に示したとおり、前処理用カートリッジカラムに負荷する際、灰化溶液の水酸化ナトリウム濃度が4%以上のとき回収率が良く、安定することがわかった。

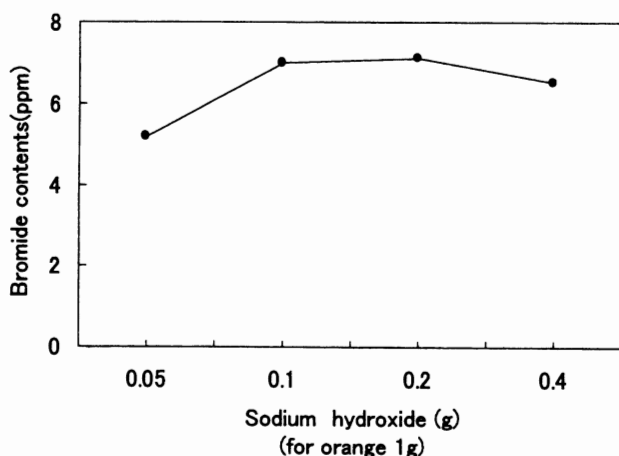


Fig. 1. Effect of Sodium Hydroxide on Bromide Contents
Bromide:6.5 ppm(by GC method)

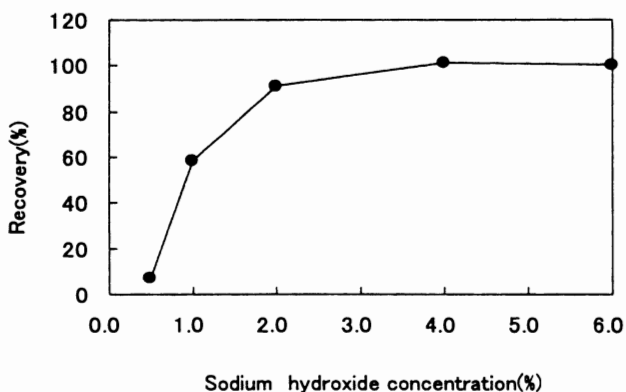


Fig. 2. Effect of Sodium Hydroxide Concentration on the Recoveries of Bromide Ion from Connecting Cartridge
Br⁻ added:50ppm, Elution volume:5ml

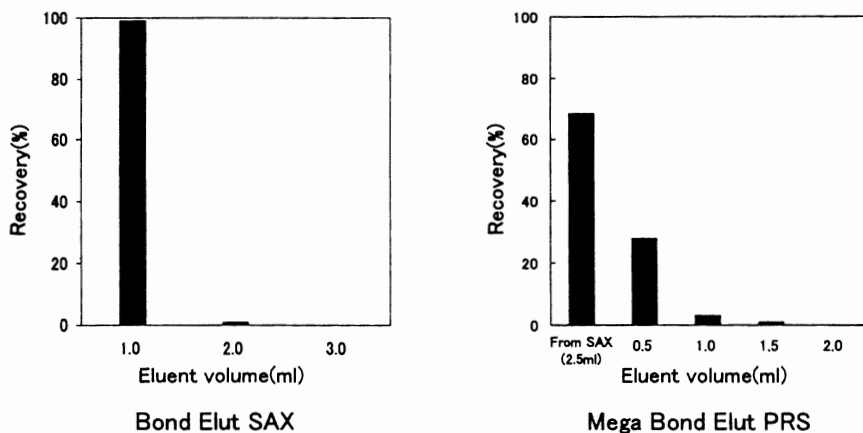


Fig. 3. Effect of Eluent Volume on the Recoveries of Bromide Ion from Bond Elut SAX and Mega Bond Elut PRS Cartridge
Br⁻ added: 50ppm, Eluent: watar

以上の結果から、灰化時の水酸化ナトリウム添加量は試料 1g あたり 0.1g とし、前処理用カートリッジカラムに負荷する際の水酸化ナトリウム濃度が 5% となるよう灰化溶液を 20.0ml に調製することにした。

2. 前処理用カートリッジカラムによる精製法の検討

灰化溶液中の水酸化ナトリウムに由来する Na⁺ 及び OH⁻ が妨害ピークとして分析に影響するため、前処理用カートリッジカラムによる除去を試みた。

1) 前処理用カートリッジカラムの検討

OH⁻ を除去するために各種陰イオン交換前処理用カートリッジカラムを検討したところ、Bond Elut SAX が有効であったが、Bond Elut SAX は Cl⁻ 型のため、OH⁻ を除去する代わりに溶出してくる Cl⁻ 由来の妨害ピークが分析に影響することがわかった。そこで、Bond Elut SAX の Cl⁻ を他のイオンに置き換えることを検討したところ、SO₄²⁻ がクロマトグラム上妨害にならないことがわかった。以上の結果から、Bond Elut SAX のコンディショニングには通常のメタノール及び水に加え、0.1mol/L 硫酸溶液を用いて Cl⁻ を SO₄²⁻ に置換し、水洗いを行うことにした。さらに、Na⁺ を除去するために陽イオン交換前処理用カートリッジカラムを用いることとし、負荷溶液が水系であることなどから Mega Bond Elut PRS を選んだ。

2) 前処理用カートリッジカラムからの流出率

前処理用カートリッジカラムから完全に Br⁻ を流出させる水量について検討し、Fig. 3 に示した。50ppm の臭化物標準溶液を 1 ml 負荷した Bond Elut SAX に水を 1 ml ずつ流し回収率を測定したところ、Fig. 3 左図に示したように、2 ml 流すことで Bond Elut SAX から完全に Br⁻ が流出した。また、Bond Elut SAX をはずした後、Fig.

3 右図に示したように、Mega Bond Elut PRS に水 1.5 ml を流すことで完全に Br⁻ が流出した。そこで、前処理用連結カートリッジカラムには水 2.5 ml を流し、さらに Mega Bond Elut PRS のみに水 2.0 ml を流すことにした。

3. HPLC 条件の検討

分析カラムにはピーク形状等を検討し、陰イオン交換樹脂カラムである Ion Pac AS12A を用いることにした。移動相は分析カラムの推奨条件から 2.7mmol/L 炭酸ナトリウム・0.3mmol/L 炭酸水素ナトリウム溶液を選び、分析を行ったところ妨害ピークとの分離が良くなかった。そこで移動相の濃度を検討したところ、1.35mmol/L 炭酸ナトリウム・0.15mmol/L 炭酸水素ナトリウム溶液を

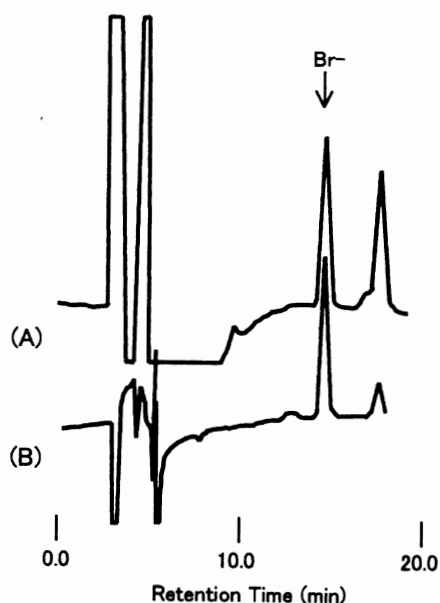


Fig. 4. HPLC Chromatograms
(A): Sample (Orange)
(B): Br⁻ Standard

Table 1. Recoveries of Bromide in Agricultural Products

| Sample | Regulation limit(ppm) | 2ppm added | | Regulation limit added | |
|------------|-----------------------|-------------|---------|------------------------|---------|
| | | Recovery(%) | C.V.(%) | Recovery(%) | C.V.(%) |
| Rice | 50 | 98.0 | 8.5 | 96.0 | 3.9 |
| Grapefruit | 30 | 98.7 | 3.2 | 93.6 | 2.1 |
| Orange | 30 | 98.3 | 7.8 | 83.0 | 7.0 |
| Lemon | 30 | 93.3 | 6.2 | 80.3 | 7.2 |
| Banana | 20 | 88.3 | 8.6 | 83.7 | 4.8 |
| Pineapple | 20 | 81.7 | 9.4 | 99.7 | 5.1 |
| Strawberry | 30 | 85.1 | 4.1 | 80.6 | 3.1 |
| Blueberry | 20 | 98.8 | 5.4 | 89.8 | 6.8 |
| Grape | 20 | 85.0 | 10.0 | 91.0 | 6.2 |

(n=3)

Table 2. Results of Bromide in Agricultural Products by HPLC and GC (ppm)

| Sample | Regulation limit | Contents | |
|--------------|------------------|----------|-----|
| | | HPLC | GC |
| Grapefruit | 30 | 1.1 | 1.5 |
| Orange | 30 | 6.6 | 6.5 |
| Papaya | 20 | 1.2 | 1.5 |
| Kiwifruit | 30 | 0.6 | 0.5 |
| Banana | 20 | 1.2 | 1.5 |
| Cherry | 20 | 4.4 | 4.3 |
| Strawberry 1 | 30 | 2.0 | 2.2 |
| Strawberry 2 | 30 | 3.6 | 3.6 |
| Blueberry 1 | 20 | 5.4 | 4.9 |
| Blueberry 2 | 20 | 2.1 | 2.3 |
| Wheat | — | 4.6 | 3.9 |

用いると良好な結果が得られることがわかった。また、検出器の測定波長は、測定感度及びベースラインの安定性から最も良好であった200 nmを選択した。本法をオレンジに適用したところ、Fig. 4に示したとおり良好なクロマトグラムが得られた。

4. 検量線及び検出限界

本法により検量線を作成したところ、 Br^- として0.05から50 ppmまで相関係数0.99と良好な直線性が得られた。検出限界は試料あたり0.5 ppmであった。

5. 添加回収試験

あらかじめ臭素が含有していないことを確認した市販の穀類、果実類等9試料に、 Br^- として2 ppm及び各試料の基準値と同じ濃度となるように標準品を添加して回収試験を行った。Table 1に示したとおり回収率80.3～99.7%，変動係数2.1～10.0%と良好な結果が得られた。

6. 公定法（GC法）との比較

市販品11試料に本法及び公定法（GC法）を適用し、

臭素含量を測定した結果をTable 2に示した。試料の種類にかかわらず両法とも極めて近似した結果が得られたことから、本法は実用上十分適用できることがわかった。

7. 市販品の分析結果

市販の農産物及びその加工品12種87試料の臭素含量を測定し、その結果をTable 3に示した。

農産物の試料で比較的臭素含量が多かったものは、とうもろこし、キウイフルーツ、いちご、くりであった。中でも基準値が設けられていないくりから今回の試料中で最も高い43.2 ppmの臭素が検出された。現在、代替消毒法のない作物にくりなどの殻果類果実やベリー類などが挙げられており¹⁾、今後も臭化メチルの使用が予想されることから調査の継続が重要であると考えられる。また、加工品にもピスタチオナッツ、コーングリッツ、ハト麦などで臭素含量の多いものがみられたが、その原因として加工工程で使用される食材料や添加物の影響が考えられた。特に食塩は臭素を多く含むことが知られており、また、これら臭素含量の多かった加工品には食塩が添加されていることから、今回加工品から検出された臭素は食塩に由来するものと推察された。なお、参考に市販の食卓塩1試料の臭素含量を測定したところ20.4 ppmが検出された。したがって、加工品の臭素含量は使用されている食材料や添加物の影響を考慮して評価する必要があることがわかった。今回調査した農産物ではいずれも基準値を超えるものはなかった。

まとめ

各種農産物及びその加工品の臭素分析法として、アルカリ性下で灰化し、イオン交換前処理用カートリッジカラムで精製した後、陰イオン交換樹脂分析カラムを用いたHPLCで測定する簡便な方法を作成した。本法におけ

Table 3. Contents of Bromide in Agricultural products

| Classification | Sample | Regulation limit(ppm) | No. of Samples | Bromide (ppm) |
|-----------------|------------------|-----------------------|----------------|---------------|
| Cereal | Corn | 80 | 1 | 16.8 |
| | Buckwheat | 180 | 6 | 1.3~3.0 |
| | Malt | 50 | 5 | 1.6~3.5 |
| Citrus | Grapefruit | 30 | 3 | N.D.~4.9 |
| | Orange | 30 | 1 | 0.9 |
| | Lemon | 30 | 2 | N.D., 0.6 |
| | Sweety | 30 | 2 | 0.7, 2.0 |
| Tropical fruit | Avocado | 75 | 1 | N.D. |
| | Kiwi fruit | 30 | 2 | 11.8, 11.9 |
| | Banana | 20 | 4 | N.D. |
| | Pineapple | 20 | 3 | 0.5~1.9 |
| | Papaya | 20 | 5 | 0.3~1.0 |
| | Mango | 20 | 1 | N.D. |
| Berry | Strawberry | 30 | 3 | 0.6~7.8 |
| | Raspberry | 20 | 1 | N.D. |
| | Cranberry | 20 | 1 | N.D. |
| | Red currant | 20 | 1 | N.D. |
| Others | Grape | 20 | 3 | N.D.~0.8 |
| | Litchi | 60 | 1 | N.D. |
| | Melon | — | 1 | N.D. |
| | Pomegranate | 60 | 1 | 1.9 |
| Nut | Chinese chestnut | — | 1 | 43.2 |
| Hop | Hop | — | 5 | 2.1~4.5 |
| Cereals product | Job's tears | — | 2 | 1.0, 9.4 |
| | Wild rice | — | 1 | 2.0 |
| | Wheat | — | 4 | 1.2~4.0 |
| | Corn products | — | 2 | 10.3, 11.0 |
| Jam | Apricot jam | — | 1 | N.D. |
| | Strawberry jam | — | 3 | N.D.~0.7 |
| | Marmalade | — | 3 | N.D.~0.4 |
| | Blueberry jam | — | 1 | N.D. |
| Juice and Cream | Fruit juice | — | 3 | N.D. |
| | Maron cream | — | 1 | 0.6 |
| Dry fruit | Prune(dry) | — | 1 | N.D. |
| | Raisins | — | 2 | N.D. |
| | Mango(dry) | — | 1 | 0.4 |
| | Banana(dry) | — | 2 | 0.5, 4.4 |
| | Apricot(dry) | — | 1 | N.D. |
| | Pineapple(dry) | — | 1 | 0.2 |
| | Blueberry(dry) | — | 2 | N.D. |
| Nuts Product | Pistachio nuts | — | 2 | 9.4, 43.4 |

る添加回収率は80.0 %以上で、公定法（GC法）と比較しても実用上十分適用できることがわかった。また、本法はイオンクロマトグラフなどの特殊な機器を使用せず、有機溶媒もほとんど使用しないといった利点がある。本法を12種87試料の農産物及びその加工品に適用したところ、基準値の設けられている47試料ではとうもろこし、キウイフルーツ、いちごで比較的臭素含量が多かった。一方、基準値の設けられていないくりから43.2 ppmの臭素を検出した。さらに、加工品にも臭素含量の多いものがみられたが、使用される食塩などに含まれる臭素の影響が大きいと推測された。今回の調査では農産物中の臭素含量はいずれも基準値以下であった。

(本研究の概要は日本食品衛生学会第77回学術講演会1999年5月及び第78回学術講演会1999年10月で発表した。)

文 献

- 1) 川上房雄：植物防疫，**53**(9)，364-369，1999.
- 2) 厚生省告示第237号(1999)“食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件”平成11年11月22日
- 3) 上村尚，西島基弘，永山敏廣，他：食衛誌，**21**(3)，214-218，1980.
- 4) 田口信夫，平田恵子，天川映子，他：衛生化学，**38**(3)，289-294，1992.
- 5) 高田千恵子，高野伊知郎，永山敏廣，他：東京衛研年報，**50**，134-137，1999.
- 6) 小玉修嗣，山本敦，松永明信，他：富山衛研年報，**17**，225-227，1994.
- 7) 三橋隆夫：食衛誌，**36**(3)，409-412，1995.