調査・資料

天然添加物中の総臭素分析

(平成 12 年 7 月 26 日受理)

萩原輝彦* 安野哲子* 斉藤和夫*

Determination of Total Bromine in Natural Food Additives

Teruhiko HAGIWARA, Tetsuko YASUNO and Kazuo SAITO

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

Total bromine in 78 samples of natural food additive was determined. 2-Bromo-3-pentanone derived from the reaction of bromine with 3-pentanone was quantitated by capillary-gas chromatography with an electron capture detector (ECD-GC).

Total bromine higher than 1 ppm was detected in 23 samples out of 78 natural food additives. Among those samples, the concentrations of total bromine in licorice extract, licorice powder, coffee bean extract and stevia extract was 81 ppm, 25 ppm, 68 ppm and 21 ppm, respectively. In the manufacturing process of licorice extract from licorice powder, the total bromine concentration increased from 25 ppm to 91 ppm.

When sodium chloride was used as an additive in the preparation of natural food additive, bromide contained in the sodium chloride as an impurity was also detected.

(Received July 26, 2000)

Key words: 総臭素 total bromine; 臭化物 bromide; 天然添加物 natural food additive; ガスクロマトグラフィー (ECD) GC-ECD; 3-ペンタノン 3-pentanone

緒 言

栽培植物を起源とする天然添加物が多いが残留農薬に関する報告¹⁾は少なく、天然添加物中の農薬残留実態は不明である。高濃度に残留する臭素は臭化メチル、臭化エチル及び二臭化エチレンなどが殺虫、殺菌の目的でくん蒸剤として農産物に使用されていることに起因している。また、輸入農作物は病害虫が発見された場合、植物防疫法に基づきくん蒸処理が義務づけられているため、農産物からの臭素検出例²⁾は多い。

臭素イオンを慢性的に摂取した場合、発疹と精神機能障害を起こす作用がある。また、臭素は甲状腺ホルモンの合成においてヨウ素が臭素に置換されることにより、ラットの甲状腺に機能障害を引き起こすことも報告^{3), 4)}されている。FAO/WHO による臭素の一日摂取許容量は 1.0 mg/kg (体重)/日とされ、現在、我が国においては 44 種の農産物に総臭素として 20~180 ppm の残留基準が設定されている。食品添加物公定書⁵⁾及び日本食品添加物協会の自主規格⁶⁾などに天然添加物の品質を保証するための規格が設定されているが、総臭素については未設定である。

総臭素の定量法としてはイオンクロマトグラフィー

(IC)^{7)~9)}、HPLC¹⁰⁾及び蛍光 X 線装置 (XRF)^{11), 12)}を用いる方法が報告されている。確認は ICP/MS や LC/MS で確認することが考えられるが、食品分析への応用例は報告されておらず、保持時間に頼る以外にない。また、多種類の試料を分析する場合、XRF では個々の試料ごとに標準試料を作製する必要があり多大な労力が必要となる。衛生試験法・注解 (以下、注解法¹³⁾とする) では、臭素と 3-ペンタノンとの反応で生じる 2-ブロモ 3-ペンタノンを電子捕獲型検出器付キャピラリーガスクロマトグラフにより総臭素を測定する方法^{13), 14)}を採用している。GC-ECD 装置を用いる場合、GC/MS 分析への応用が可能であるため他法に比べピークの確認が容易であり、また、測定感度も優れている。今回、天然添加物 23 品目 78 検体を注解法¹³⁾により分析したので報告する。

実験方法

1. 試 料

平成 11 年度及び平成 12 年度に収集した既存添加物 22 種 77 検体及び食品加工用天然物 1 検体を試料とした。すなわち、既存添加物 (検体数) はデュナリエラカロテン (4)、パーム油カロテン (1)、クロロフィル (4)、アナトー色素 (5)、トコフェロール (3)、フィチン酸 (2)、チャ抽出物 (6)、

* 東京都立衛生研究所: 〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

カテキン (1), γ -オリザノール (5), ブドウ果皮色素 (2), ウコン色素 (8), ステビア末 (1), ステビア抽出物 (10), 酵素処理ステビア (3), カフェイン抽出物 (1), コウリヤン色素 (3), カカオ色素 (3), アラビアガム (3), 生コーヒー豆抽出物 (1), ϵ -ポリリシン (1), しらこたん白抽出物 (1), カンゾウ抽出物 (9) であり, また, 食品加工用天然物のカンゾウ末 (1) であった。

2. 試薬及び試液

注解法¹³⁾に従って作製した。水は蒸留した後, 超純水製造装置 (Mill-Q Labo: 日京テクノス(株)) により更に精製したものを使用した。その他の試薬は試薬特級を用いた。

3. 装置及び GC 条件

ECD 付ガスクロマトグラフ: Hewlett Packard 社製 HP-6890, カラム: J & W 社 製 DB-5 (30 m $\times$ 0.32 mm i.d., 膜厚 0.25 μ m), カラム温度: 50 $^{\circ}$ C (1 分)–10 $^{\circ}$ C/分–200 $^{\circ}$ C (1 分), 注入量: 1 μ L, split (10:1), キャリヤガス: ヘリウム 15.0 psi (圧力: 定圧), 検出器温度: 300 $^{\circ}$ C

4. 試料溶液の調製

注解法¹³⁾に従って操作した。ただし, 植物油が 30~90% 添加されているカロテン類, クロロフィル及びトコフェロールなどの天然添加物製剤については 5% 水酸化カリウム・エタノール液 10 mL のほか, 水酸化カリウム 1 g を加えて灰化した。また, フィチン酸には水酸化カリウム 2 g を加えてアルカリ性であることを確認した後灰化した。水酸化カリウムを追加した場合, 同量の水酸化カリウムで試薬ブランクを作製し, この臭素量をアルカリを追加して灰化した試料の定量値から差し引いた。

5. 誘導体化及び定量操作

注解法¹³⁾に従って操作した。ただし, 分液漏斗の代わりに共栓試験管を使用して抽出操作を行った。

6. 塩化ナトリウム中の臭素分析

塩化ナトリウム 50 mg を 50 mL メスフラスコに精密に量り水 25 mL で溶解し, メチルオレンジ試薬 1 滴を加え 0.1 mol/L 硫酸を加えて淡赤色とした後, 水で 50 mL とした。この液 10 mL を採り, 上記の 5. 誘導体化及び定量に従って臭素分析を行った。

7. カンゾウ抽出物の作製

カンゾウ末 100 g に 500 mL の水を加え 2 日間冷浸漬し, 四重に重ねたガーゼでろ過した。更に, 残留物に水 300 mL 加えて 12 時間冷浸漬し, これを四重に重ねたガーゼでろ過し, ろ液を合わせた。ろ液をホットプレート上で 300 mL として, 冷後, エタノール 100 mL を加えて 2 日間冷所に放置した。この液を上記と同様なガーゼでろ過し, ろ液をホットプレート上で蒸発濃縮して黒褐色のエキスを得た。

8. 塩化物物の分析

水に可溶な試料は 1.0 g を精密に量り, 水に溶かして 100.0 mL としたものを試料溶液とした。水に不溶な試料

Fig. 1. GC Chromatograms of bromine detected from sodium chloride* solution with (a) and without (b) addition of sulfamic acid

*10 mg of sodium chloride was derivatized by the analytical method.

(GC-ECD conditions)

Apparatus: HP6890, Column: DB-5, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d., 0.25 μ m film thickness (J&W).

Oven temp.: 50 $^{\circ}$ C (1 min)–(10 $^{\circ}$ C/min)–200 $^{\circ}$ C(1 min); Inj. temp.: 200 $^{\circ}$ C; Inj. vol.: 1 μ L, Split: 10:1; Carr. gas: He 15.0 psi (const. press.); Det. temp.: 300 $^{\circ}$ C

は 1.0 g を精密に量り, 500 $^{\circ}$ C で 15 時間電気炉に入れ乾式分解させた。冷後, 残留物に水を加えて溶解して 100.0 mL としたものを試料溶液とした。なお, 試料溶液に浮遊物や沈殿が出現した場合はろ過した液を試料溶液とした。試料溶液 10.0 mL を量り 0.1 mol/L 硝酸銀試液で自動滴定装置 (平沼産業(株)製 COM-900 型) により塩化物物の分析を行った。この塩化物物分析値から塩化ナトリウム量を換算して求めた。

結果及び考察

1. 不純物としての臭化物の影響

塩化ナトリウム溶液を注解法¹³⁾に従って分析して得たクロマトグラムを Fig. 1 に示した。GC/MS により保持時間 2.7 分付近のピークは 3-ペンタノン塩素誘導体及び 3.7 分付近のピークは 3-ペンタノン臭素誘導体であることを確認した。三橋は塩素イオン 50 mg を用いてスルファミン酸 2 mg から 50 mg を誘導体化の際に添加した場合の効果について詳細に解説しており, スルファミン酸の添加量を変化させても効果は一定であり, 塩素誘導体の生成は抑制され, 臭素誘導体の生成は促進されると報告¹⁴⁾している。

一方, 添加物として加えられた塩化ナトリウム中に不純物として含まれる臭化物の食品中の臭素分析に与える影響については検討されていない。そこで, 食塩や試薬の塩化ナトリウム 10 mg 中の臭素含量を分析したところ, 試薬として使われているものでは 0.001~0.007% であったのに対して, 料理用の塩化ナトリウムでは 0.082% であっ

た (Table 1). この結果から料理用食塩 1% を含有する試料では 8.2 ppm の臭素が検出されることになる. 天然添加物製剤の場合, 品質を保持するなどの目的で塩化ナトリウムが 10% 程度添加される場合がある (Table 2). したがって, 天然添加物中の総臭素を分析する際に試料中の塩化ナトリウム含量の影響が無視できないと考えられ, 臭素分析のほか, 塩化ナトリウム含量を調べる必要がある. すなわち, 検出された臭素がくん蒸処理あるいは塩化ナトリウムの不純物によるものかを判断する必要がある.

2. 天然添加物中の総臭素

23 品目 78 検体について総臭素及び塩化ナトリウムの定量を行った. その結果, 6 検体から 10 ppm 以上の総臭素が検出された (Table 2). しらかたん白抽出物から 13 ppm の総臭素及び 7.9% の塩化ナトリウムが検出された. しらかたん白抽出物は魚類の精巢から得られた塩基性タンパク質を主成分とするものであり, 臭化メチルなどによりくん蒸される可能性はない. したがって, 品質を保持する目的で添加された塩化ナトリウム中の臭化物が検出されたものと考えられた. また, 生コーヒー豆抽出物から 68 ppm の総臭素が検出された. 成田らはホンジュラス産, ガテマラ産及びインドネシア産の生コーヒー豆から, それぞれ, 84 ppm, 21 ppm 及び 20 ppm の臭素を検出したと報告¹⁵⁾している. 日本では生コーヒー豆には総臭素の残留基準値は設定されていない. しかし, 米国では臭化メチルはポストハーベスト農薬に分類され, 残留基準は総臭素として 75 ppm に設定されている. 今回, 臭素が検出された生コーヒー豆抽出物は同時に塩化ナトリウムが 3% 検出されていることから, くん蒸により残留したもの及び塩化ナトリウムの添加によるものの合算した分析値で

はないかと推定できる. 今後, 生コーヒー豆及び生コーヒー豆抽出物中の臭素の残留実態を継続して調査する必要がある.

カンゾウ末及びカンゾウ抽出物の各 1 検体から, それぞれ 25 ppm 及び 81 ppm の総臭素を検出した. これらは同じ製造業者の製品であった.

このほか, ステビア抽出物及びチャ抽出物から 21 ppm 及び 16 ppm の総臭素がそれぞれ検出された. これらの臭素は原料植物のくん蒸に由来し検出された可能性が高いものと考えられた.

3. カンゾウ抽出物製造時の臭素濃縮

25 ppm の総臭素を含有したカンゾウ末を用いてカンゾウ抽出物を作製した. 製造工程には蒸発濃縮操作があり, 濃縮時に含有成分濃度は高くなると考えられる. この濃縮の程度は水分含量の分析により把握することができる. 予備試験においてカンゾウ抽出物中の水分が 54.3% から 49.5% へ減少するのに伴って, 臭素濃度は 13 ppm から 21 ppm に濃縮された (Table 3). そこでカンゾウ抽出物を作製したところ, 最終水分含量は 4.1% となり, 臭素の分析結果は 91 ppm であった (Table 3). これは実際の天然添加物製剤であるカンゾウ抽出物 (水分 4.7%) の臭素濃度が 81 ppm であった結果と比較した場合, ほぼ類似した傾向を示した. 天然添加物は栽培植物の抽出物や濃縮物であるものが多いことから, 栽培期間中や保存のため使用された農薬などの有害物質も原料植物の濃度より濃縮

Table 3. Concentration of Total Bromine (Br) during the Manufacturing Process of Licorice Extract from Powdered Licorice*

Sample	Br (ppm)	Water (%)
Licorice extract A**	13	54.3
B**	17	52.1
C**	21	49.5
Licorice extract***	91	4.1

*: Powdered licorice contained total bromine at 25 ppm

** : Extract was sampled before obtaining the finished product.

***: Finished product

Table 2. Result of Determination of Total Bromine (Br) and Sodium Chloride (NaCl) in Natural Food Additive

Sample	Br (ppm)	NaCl (%)	Sample	Br (ppm)	NaCl (%)
Licorice extract A	81	1.5	Coffee bean extract	68	3.0
B	8	nd	Cacao color A	4	4.7
C	1	nd	B	4	nd
D	1	nd	C	2	5.1
Powdered licorice	25	nd	Tea extract A	16	nd
Powdered stevia	21	nd	B	7	1.0
Kaoliang color A	8	12	C	6	nd
B	2	nd	D	1	nd
C	2	nd	Turmeric oleoresin A	8	nd
Dunaliella carotene A	4	nd	B	1	13
B	2	nd	Milt protein	13	7.9
C	2	nd			

nd: <1.0%

されているのではないかと懸念されている。今回、臭素は製造工程で濃縮されることが実験的に初めて確認された。

天然添加物製剤は直接飲食されることはなく、食品中に100～1,000倍程度以上希釈されて使用される。通常では高濃度の臭素を摂取する可能性はなく、健康上特に問題はないと考える。

ま と め

1) 天然添加物及び天然添加物製剤等23種類78検体を分析したところ、21検体から1ppm以上の臭素が検出された。特にカンゾウ抽出物(81ppm)、カンゾウ末(25ppm)、生コーヒー豆抽出物(68ppm)及びステビア抽出物(21ppm)はくん蒸処理に起因したと考えられる臭素が検出され、今後も調査を継続する必要がある。

2) 塩化ナトリウム中に不純物として含まれる臭化物がGC-ECD法で検出された。このため、天然添加物製剤では臭素分析のほか、塩化物分析及び文献調査も行い、くん蒸処理に起因する臭素残留であるか判断する必要がある。

3) 抽出・濃縮して製造される天然添加物では製造工程において臭素は濃縮され、その濃度が高くなることが明らかになった。

文 献

- Hagiwara, T., Yasuno, T., Haneishi, N., Saito, K., Analysis of *n*-methyl carbamate pesticide residues in natural food additives by high-performance liquid chromatography. Tokyo Eiken Nenpo (Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.), **50**, 193-197 (1999).
- 東京都食品環境指導センター編“くらしの衛生・'99食品衛生データブック”東京都, 1999, p. 14.
- Leeuwen, F. X. R., Tonkelaar, E. M. D., Logten, M. J., Toxicity of sodium bromide in rats: Effect on endocrine system and reproduction. *Fd. Chem. Toxic.*, **21**, 383-389 (1983).
- Loeber, J. G., Franken, M. A. M., Leeuwen, F. X. R., Effect of sodium bromide on endocrine parameters in the rat as studied by immunocytochemistry and radioimmunoassay. *Fd. Chem. Toxic.*, **21**, 391-404, (1983).
- Tanimura, A. *et al.* eds., “Shokuhinn Tenkabutsu Koteisho, 7th Ed.”, Tokyo, Hirokawa Shoten, 1999. (ISBN4-567-01852-4C3047)
- 日本食品添加物協会自主規格専門委員会編“化学合成品以外の食品添加物自主規格”第2版, 東京, 日本食品添加物協会, 1993.
- Taguchi, N., Hirata, K., Amakawa, E., Ohnishi, K., Nishijima, M., Sakai, S., Hamada, A., Determination of total bromine in foods by ion chromatography. *Eisei Kagaku (Jpn. J. Toxicol. Environ. Health)*, **38**, 289-294 (1992).
- Miyahara, M., Saito, Y., Determination of bromide in food by unsuppressed ion chromatography with ultraviolet detection after microwave digestion in a sealed PTFE vessel. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1,127-1,131 (1994).
- Okamoto, T., Isozaki, A., Nagashima, H., Determination of chloride and sulfate in color additives by ion chromatography on ceramic carbon column. *Bunseki Kagaku*, **45**, 865-871 (1996).
- Jain, A., Chaurasia, A., Sahasrabudhhey, B., Verma, K. K., Determination of bromide in complex matrices by pre-column derivatization linked to solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **746**, 31-41 (1996).
- Wakisaka, T., Morita, N., Hirabayashi, T., Nakahara, T., Rapid determination of trace phosphorus, sulfur, chlorine, bromine and iodine by energy dispersive X-ray fluorescence analysis with monochromatic excitations. *Bunseki Kagaku*, **47**, 157-161 (1998).
- Takada, T., Takano, I., Nagayama, T., Kobayashi, M., Ito, M., Tamura, Y., Kimura, N., Kitayama, K., Yasuda, K., X-Ray fluorescence spectrometric determination of total bromide in rice. Tokyo Eiken Nenpo (Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.), **50**, 134-137 (1999).
- Nippon Yakugakkai, ed., “Eisei Shikhenho Chukai (Methods of analysis in health science, with commentary) 2000, Tokyo, Kanehara Shuppan, p. 409-410. (ISBN4-307-47033-8)
- Mitsuhashi, T., Improved gas chromatographic determination of total bromine in agricultural products, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **36**, 409-412 (1995).
- Narita, M., Miyata, M., Kamakura, K., Hirahara, Y., Okamoto, K., Hasegawa, M., Koiguchi, S., Miyoshi, T., Yamana, T., Tonogai, Y., Ito, Y., Studies on analysis organophosphorus, carbamate and pyrethroid pesticides as well as determination on residual bromine in raw coffee beans. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **35**, 371-379 (1994).