農産物中の総臭素分析法^{*1}

(昭和 54 年 11 月 6 日受理)

上村 尚^{*2} 西島基弘^{*2} 永山敏廣^{*2}
安田和男^{*2} 斉藤和夫^{*2} 井部明広^{*2}
牛山博文^{*2} 直井家壽太^{*2}

Analytical Procedure for Total Bromide in Agricultural Products

(Studies on Bromide Residues in Agricultural Products
and Processed Foods. I)

Hisashi KAMIMURA, Motohiro NISHIJIMA, Toshihiro NAGAYAMA,
Kazuo YASUDA, Kazuo SAITO, Akihiro IBE,
Hirofumi USHIYAMA and Yasuta NAOI

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
24-1, Hyakunincho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo)

An analytical procedure was developed for the qualitative and quantitative determination of total bromide residues in agricultural products, using a detector tube.

A 20 g sample was added to 25 ml of alkaline monoethanolamine solution and ashed. The ashed residue was dissolved in 0.1 N NaOH and filtered into a flask. Next, 0.5 g potassium permanganate and 5 ml of phosphoric acid were added, and the analysis apparatus (Fig. 1), including a detector tube, was assembled. After bubbling air (flow rate, 80 ml/min) through the sample solution for at least 3 hours, the detector tube was removed from the apparatus and the length of the color change in the tube was measured. (The bromine reacted nearly quantitatively with fluorescein to produce tetrabromofluorescein, and the color changed from yellow to reddish-pink.)

The recoveries of bromide added to rice, wheat, chestnut and cherry were more than 97%, and the detection limit was 1 ppm.

The present method was found to be satisfactory for the qualitative and quantitative determination of total bromide in agricultural products.

(Received November 6, 1979)

まえがき

臭化メチルは燻蒸剤として、穀類、種実類および果実類など広範囲の農産物に使用されている^{1),2)}。

燻蒸後の臭化メチルの残留量は総臭素として定量される場合が多く^{3),4)}、分析法は WHO が提唱した方法が一般的に用いられている⁵⁾。しかしこの方法は、多量の試薬を必要とし、かつ試薬調製の操作が繁雑であり、またヨウ素滴定法であるため終点が不明瞭であり、10 ppm

以下を定量するには熟練を必要とする。

そこで我々は、果実類や穀類などの農産物に残留している臭素を簡易に、かつ精度よく定量するため、試料を灰化後、過マンガン酸カリウムを加えて酸化し、生成した遊離臭素を通気して追い出し、フルオレセインを用いた検知管により定量する方法を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料、試薬および装置

1.1 試料

農産物のうち、臭化メチル燻蒸を行う可能性のある次

^{*1} 農産物および加工食品中の残留臭素に関する研究 (第1報)

^{*2} 東京都立衛生研究所: 東京都新宿区百人町 3-24-1

Fig. 1. Apparatus for total bromide determination

A, water bath

B, flask (two necks, 200 ml)

C, detector tube ($2\phi \times 120$ mm)

のものを対象とした。

- 1) 穀類：玄米，精白米，小麦および小麦粉
- 2) 種実類：クリ
- 3) 果実類：チェリー（アメリカ産および日本産）

1.2 試薬

1) 臭素イオン標準溶液：臭化カリウム 0.149 g を精秤して，水に溶かして 100 ml とし，さらに水で 10 倍に希釈して用いた。

2) フルオレセイン溶液：フルオレセイン（和光純薬工業（株）製）0.5 g をエタノールに溶かして 100 ml としたものを原液とし，しゃ光して保存した。用時原液をエタノールで 20 倍に希釈して使用した。

3) 検知管用充てん剤：フルオレセイン溶液 20 ml にポリアミド（和光純薬工業（株）製，ポリアミド C-200）5 g を加え，時々混和しながら 30 分間浸漬した後，G-3 ガラスフィルターを用いてアスピレーターで吸引ろ過した。ろ過終了後，さらに約 10 分間アスピレーターで吸引し続けたものを充てん剤として用いた。

4) モノエタノールアミン・アルカリ溶液：モノエタノールアミン（和光純薬工業（株）製）15 ml および水酸化ナトリウム 3 g をエタノール 380 ml に溶解したものをを用いた。

5) その他の試薬：すべて市販特級品を用いた。

1.3 装置

- 1) 臭素発生装置：装置を Fig. 1 に示した。
- 2) 検知管用ガラス管：内径 2 mm のガラス管を，長さ約 12 cm に切断した。
- 3) ポンプ：（株）日本治生産業製 Air Pump NS-2 型

2. 検知管の作製

検知管用ガラス管の下方に綿栓をし，他方より充てん

剤を約 5 cm の高さから木製の板に繰り返し落下させながら約 10 cm になるまで充てんし，さらに綿栓したものを検知管とした。

3. 試験溶液の調製

よく粉砕した試料 20 g を秤取し，モノエタノールアミン・アルカリ溶液 25 ml を加えて混和した。1 夜放置した後，沸騰水浴中で蒸発乾固し，赤外ランプで炭化後，500° の電気炉で灰化した。灰分に 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を 5 ml 加え溶解後，ろ紙でろ過した。残渣を水で洗浄し，ろ液を 20 ml としたものを試験溶液とした。

4. 定性および定量

試験溶液 10 ml を 300 ml の二口フラスコにとり，水 150 ml および過マンガン酸カリウム 0.5 g を加え，リン酸 5 ml を加え酸性とした後，直ちに検知管を装着した。水浴温度 50°，空気流量 80 ml/min の条件で 3 時間通気し，検知管の下部に赤桃色の呈色層が出現したか否かを確認し，呈色したものについては呈色層の長さを測定し，同様の操作を行い作成した検量線から臭素の含量を算出した。

結果および考察

1. 検知管呈色物質

検知管内の赤桃色呈色物質は臭素がフルオレセインと反応して，モノ，ジ，トリまたはテトラブロモフルオレセインかあるいはそれらの混合物が生成したものと考えられる。

そこで検知管に出現した赤桃色の部分を集め，エタノールで赤桃色の呈色物質を溶出し，減圧下で濃縮後，濃縮液を薄層プレート（Kiesel gel 60 メルク社製）に塗布した。同時にジブロモフルオレセインおよびテトラブロモフルオレセイン（いずれも東京化成（株）製）を薄層ブ

Fig. 2. Thin layer chromatogram of standards and extracted from color parts

A, extracted from color parts; B, fluorescein; C, dibromofluorescein; D, tetrabromofluorescein; E, xanthene dyes; a, acid red; b, eosine; c, erythrosine; d, phloxine; e, rose bengal

Fig. 3. Mechanism of the color reaction

レートに塗布した。展開溶媒は酢酸エチル・メタノール・25% アンモニア水 (9:2:1.4) を用いて展開したクマトグラムを Fig. 2 に示した^{6)~8)}。検知管に出現した呈色層の抽出液は薄層上で単一のスポットが得られた。これはテトラブロモフルオレセインの R_f 値と一致し、色調も同様であった。これらはいずれも紫外線 (365 nm) を照射し観察した場合、黄橙色のけい光が観察された。また、紫外線 (254 nm) の場合は、いずれも、淡黄緑色のけい光が観察された。これらのことから、検知管内の呈色物質は Fig. 3 に示したとおり、テトラブロモフルオレセインの単一物質であることが判明した⁹⁾。

2. 検知管の検討

検知管を作製するにあたり、充てん剤として用いる担体の種類および担体に吸着させるフルオレセインの濃度について検討を加えた。

2.1 担体

担体としてポリアミド、フロリジル、シリカゲルおよびアルミナについてそれぞれ実験方法 1.2 および 2 に準じて検知管を作製し、担体の色調および呈色層の色調を比較した結果を Table 1 に示した。フルオレセインを担体に吸着させたときの色調は、ポリアミド、フロリジルおよびアルミナでは黄色、シリカゲルでは緑黄色であった。呈色層の色調は、ポリアミドでは赤桃色、フロリジルおよびシリカゲルでは淡桃色であった。しかしアルミナの場合は先端以外の部分で脱色する傾向がみられ、シリカゲルでは呈色層の境界部分が不明瞭であり、実用には適さなかった。ポリアミドとフロリジルを比較した場合、ポリアミドの方が呈色層の色調が鮮明であり、また境界部分も明瞭であった。そこで検知管内の充てん剤はポリアミドを用いることとした。

Table 1. Change of Color After Reaction on Various Carrier

Carrier	Color tone	
	Before reaction	After reaction
Polyamide	Yellow	Reddish pink
Florisil	Yellow	Light pink
Silica gel	Greenish yellow	Light pink
Alumina	Yellow	Decolorization

2.2 フルオレセインの濃度

フルオレセインのポリアミド吸着量が色調および感度に影響を与えることが考えられる。そこで 0.01~0.03 % のフルオレセインエタノール溶液にポリアミドを加え、それぞれ検知管を作製した結果、0.01% 以下では呈色層の色調が鮮明でなく、0.03% 以上では呈色層の色調が鮮明になるが、呈色層の長さが短くなるため感度が低下する現象が生じた。そこで、以後の実験では、フルオレセイン濃度は 0.025% とした。

3. 試料浴槽の温度

フラスコ中に臭素イオン標準溶液 5 ml を加え、空気流量を 80 ml/min に保持し、試料浴槽の温度を 25~100° に変化させた場合の呈色層の長さを Fig. 4 に示した。試料浴槽温度の上昇に伴い、呈色層の長さは短くなる傾向がみられた。75° では時間の経過に伴い検知管内に水蒸気の付着がみられ、100° では水蒸気の発生が激

Fig. 4. Effect of various temperature of the water bath on color length
Flow rate, 80 ml/min.

a) Aeration was not possible at 100°C in an apparatus shown in Fig. 1.

Fig. 5. Effect of bubbling time on color length
Temperature of water bath, 50°C
Flow rate, 80 ml/min

しくなるため検知管中に水滴を生じ通気不能となった。また、低温になるに従い呈色層の長さが一定となる時間が長時間を要するため、以後の実験における試料浴槽の温度は、検知管中に水蒸気の付着がみられず、また比較的短時間で呈色層の長さが一定となる 50° とした。

4. 通気量

通気量が1分間に 40 ml 以下では試料中のバブリングが不良であり、回収率に変動がみられた。また1分間に 100 ml 以上では装置の接続部から遊離臭素がもれる場合があった。通気量が 50~80 ml の範囲ではバブリングが良好であり、一定の回収率が得られた。また流量が多い場合は短時間で呈色層の長さが一定となるため、以後の実験における通気量は 80 ml/min とした。

5. 通気時間

二口フラスコに臭素イオン標準溶液 5 ml および水 150 ml を加え、通気量を 80 ml/min、試料浴槽温度 50° に保持したときの呈色層の長さを Fig. 5 に示した。呈色層は経時的に長くなるが3時間を経過すると一定となった。そこで通気時間は3時間以上とした。

6. 検量線の作成

二口フラスコに臭素イオン標準溶液を 2, 4, 6, 8 および 10 ml とり、実験方法 4. に従い操作を行った。得られた呈色層の長さを測定し、検量線を Fig. 6 に示した。臭素イオン含量が 0~600 μg の範囲で直線関係が得られた。

7. 妨害物の検討

検知管内の赤桃色の呈色物質は遊離臭素とフルオレセインの反応物であるため、他のハロゲンもフルオレセインと反応し影響することが考えられる。そこで二口フラスコに臭素イオン標準溶液 5 ml、さらにヨウ素イオンおよび塩素イオンをそれぞれ 500 μg および 1000 μg 添加し、実験方法 4. に従い操作した結果は Table 2 に示

Fig. 6. Calibration curve with standard bromide solution

したとおりであり、ヨウ素および塩素による妨害は全く見られなかった。

また、試料中の各種成分による妨害を考え、臭化メチル燐蒸の施されていないことを確認した玄米、栗およびチェリーなどについて実験方法 3. に従い試験溶液を調製し、フルオレセインとの反応物質の有無について検討したが、いずれも妨害を示す物質は認められなかった。

8. 添加回収試験

あらかじめ臭素の存在しないことを確認した玄米、小麦、栗およびチェリーに臭素イオン標準溶液を 1 ml および 5 ml 添加し、1 夜放置後、モノエタノールアミン・アルカリ溶液を加え、本法に従い回収試験を行ったところ、それぞれの回収率は Table 3 に示したとお

Table 2. Effect of Haloid (I^- and Cl^-) on the Present Method

Haloid	Br^-		
	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
I^- (1000 μg)	0	0	—
	500	504	101
Cl^- (1000 μg)	0	0	—
	500	496	99

Table 3. Recovery of Bromide Added to Agricultural Products

Sample	Total bromide		
	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
Rice	100	97	97
	500	509	102
Wheat	100	98	98
	500	504	101
Chestnut	100	102	102
	500	492	98
Cherry	100	95	95
	500	496	99

Table 4. Contents of Total Bromide in Agricultural Products

Sample	No. of sample	No. of detection	Total bromide (ppm) min.-max.
Unpolished rice	3	1	10
Polished rice	17	11	Trace-5 (2.3) ^{a)}
Wheat	2	0	—
Flour	3	3	10-16 (12.4)
Chestnut	10	7	20-215 (94)
Cherry (imported)	4	4	Trace-6 (3.5)
Cherry (domestic)	2	0	—

^{a)} Values in parentheses indicate the average

りであり、95～102% であった。また、本法の確認限度は臭素として 1 ppm であった。

9. 市販品の結果

市販の玄米、精白米、小麦、小麦粉、栗、チェリー（日本産およびアメリカ産）について本法を適用した結果を Table 4 に示した。臭素は玄米 3 検体中より 1 検体、精白米は 17 検体中 11 検体、小麦粉は 3 検体中 3 検体、栗は 10 検体中 7 検体、アメリカ産チェリー 4 検体中 4 検体から検出された。特に、栗の総臭素量は平均 94 ppm であったが、うち 1 検体に 215 ppm と高濃度に検出されたものがあつた。

ま と め

穀類、種実類および果実類などの農産物に残留した臭素の分析法を検討した。

臭素がフルオレセインと反応して赤桃色のテトラブロモフルオレセインを生成することを利用し、フルオレセインをポリアミドに吸着させたものを充てん剤とし、検知管による定量法を作製した。

試料を灰化後、臭素発生装置に移し検知管を装着した。試料浴槽温度 50°, 通気量 80 ml/min で 3 時間通気し、検知管中に出現した赤桃色の呈色層の長さより定量を行った。

本法の回収率は 95～102% であり、確認限度は 1 ppm であった。試料の固有成分による妨害、またよう素、塩素による妨害を考え検討を行ったが、いずれも影響はみ

られなかった。以上の結果、本法は農産物中に残留する総臭素試験法として十分に適用できるものと思われる。

本研究の要旨は日本食品衛生学会第 37 回学術講演会（1979 年 5 月、東京）において発表した。

文 献

- 1) 上遠 章: “農薬綜典” p. 271～273 (1956) 朝倉書店。
- 2) 武藤聰雄: “農薬概説” p. 648～650 (1970) 技報堂。
- 3) Turner, A.: J. Sci. Fd Agric. 15, 265～268 (1964).
- 4) Getzendaner, M. E.: J. Agr. Food Chem. 14, 56～58 (1966).
- 5) FAO/WHO: “Codex Committee on Pesticide Residues Third Session Method of Analysis of Pesticide Residues Recommended by The Joint Meeting on Pesticide Residues” p. 8～12 (1968).
- 6) 竹下隆三, 坂上米次: 衛生化学, 15, 72～76 (1969).
- 7) 竹下隆三: 衛生化学, 16, 293～306 (1970).
- 8) 西島基弘, 上村 尚, 冠 政光, 高橋尚子, 中里光男, 渡利優子, 木村康夫, 直井家壽太: 食衛誌. 18, 463～469 (1977).
- 9) 林 敏夫: 食品衛生研究, 20, 1207～1211 (1970).