

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 30, 27~32 1995]

ワイン中の微量臭素のイオンクロマトグラフィー

鈴木義仁、吉村和恵・小泉 均
(山梨大学工学部化学生物工学科)

Determination of Trace Amounts of Bromine in Wine by Ion Chromatography

YOSHIHITO SUZUKI, KAZUE YOSHIMURA and HITOSHI KOIZUMI

*Department of Applied Chemistry and Biotechnology,
Faculty of Engineering, Yamanashi University, Takeda, Kofu 400, Japan*

Abstract

Wine samples containing 2M potassium hydroxide were dried and ashed at 525 °C or 800 °C for 15min. The residues were dissolved in 10ml of water and filtered. The anions were separated on a Yokogawa ICS-A35 anion exchange column, using a mixture of 4mM sodium carbonate and 1mM sodium bicarbonate as the eluent. The flow rate was 1.4mL/min. Chromatograms for bromide were obtained by the suppression system with a conductivity detector or with a UV detector. When the ashing was done at 525 °C, carbonized solid substances remained in the sample and interfered with the bromide chromatographic peak. On the other hand, using the UV detector at 205nm, no interference was observed in a sample ashed at 800 °C, showing that an ashing temperature of 525 °C is insufficient for bromide analysis. Nitrite, nitrate and bromide could be detected at UV 205nm. The detection limit of bromide was 0.01ppm in the presence of 0.5ppm nitrate. The recovery and reproducibility (RSD) were 66 and 2.48% (n=6) for 0.5ppm potassium bromide and 68 and 1.87% (n=6) for 0.575ppm dibromoacetophenone, respectively. Using this method, ten wine samples were analyzed and their bromide concentrations were found to vary between 0.08 and 0.52ppm. The method thus proved very effective in determining trace amounts of bromide in wines.

緒 言

臭素を含む農薬として除草剤や殺虫剤が土壌などに散布される結果として、農作物中に臭素が蓄積されることがある。日本では臭素に関する残留基準は小麦について20ppmと定められている¹⁾。さらに平成5年5月に、厚生省から小麦以外の穀物等について残留臭素基準が定められた²⁾。この中でぶどうについては20ppmと規定されている。直接ワ

インについての規定はないが、南米や南欧州などでは含臭素農薬が葡萄畑に使用されていることもあって、ワイン中の微量臭素の分析する方法を早急に確立しておく必要がある。

穀物などに含有される微量臭素の分析法については、灰化したのち、臭化物イオンとして溶液中に捕捉して分光光度法³⁾やイオン電極を用いて滴定するか、溶液中の臭化物イオンとイオン対を形成させ

て逆相分配クロマトグラフィーで分離し、検出する方法⁴⁾が採用されている。いずれの分析方法においても、試料は灰化処理を行って、臭化物イオンとして全臭素量を定量している。穀物類の灰化は水酸化ナトリウムを加えて最終温度550°Cで15分間の灰化処理が提案されているが²⁾、ワインに適用すると、この処理方法では灰化は困難で、イオンクロマトグラフィーで臭化物イオンとして検出することができなかった。これは、ワインでは糖質や多価フェノールなどの共存によって灰化が不完全となり、その結果クロマトグラム上で、未灰化物のピークが現れ分析を困難としたためである。

本研究では、イオンクロマトグラフィーに適用可能な灰化処理について研究した。

灰化法とイオンクロマトグラフィーとを組み合わせる事により、臭素以外の無機イオンについても同時分析が可能となることから、本法は広い分野に応用が期待される。以下、これらの研究結果について報告する。

実験方法

1. 調合溶液（既知試料）の調製

臭化物の回収率を求めるため、調合溶液を作製した。調合溶液はエタノール11g、酒石酸0.6g、ぶど

う糖1.6g、グリセリン0.5g、カテキン0.05gを100mlに溶かし、これに陰イオンとして塩素イオン30ppm、燐酸イオン90ppm、硫酸イオン120ppmを含む溶液を調製した。この溶液に臭化物イオンとして23ppmとなるように有機物のジプロモアセトフェノン、または無機物として臭化物イオンの5ppmに相当する臭化ナトリウムをそれぞれに加えて、臭素既知の調合溶液を作製した。なお、本研究に使用した試薬類は、いずれも市販品（東京化成）を用いた。

2. 装置

臭化物イオンを分離・検出するためイオンクロマトグラフィーはFig.1に示すような流路でカラム、検出器を用いて構成した。

カラムは陰イオンカラムICS-A35 (4.6mmΦ x 150mm、横河電機)とガードカラムICS-A3Gを用いた。溶離液は1.0mMの炭酸水素ナトリウムと4.0mMの炭酸ナトリウムの混合溶離液を用い、1.4 ml/minの流速で送液した。検出器は電気伝導度検出器、脱気はDegasys, DG-1200 (ラボコーテック)を使用した。試料はループインジェクターを用いて100μl導入した。

3. 灰化法

臭素を含む調合溶液を、既発表の方法⁴⁾に基づ

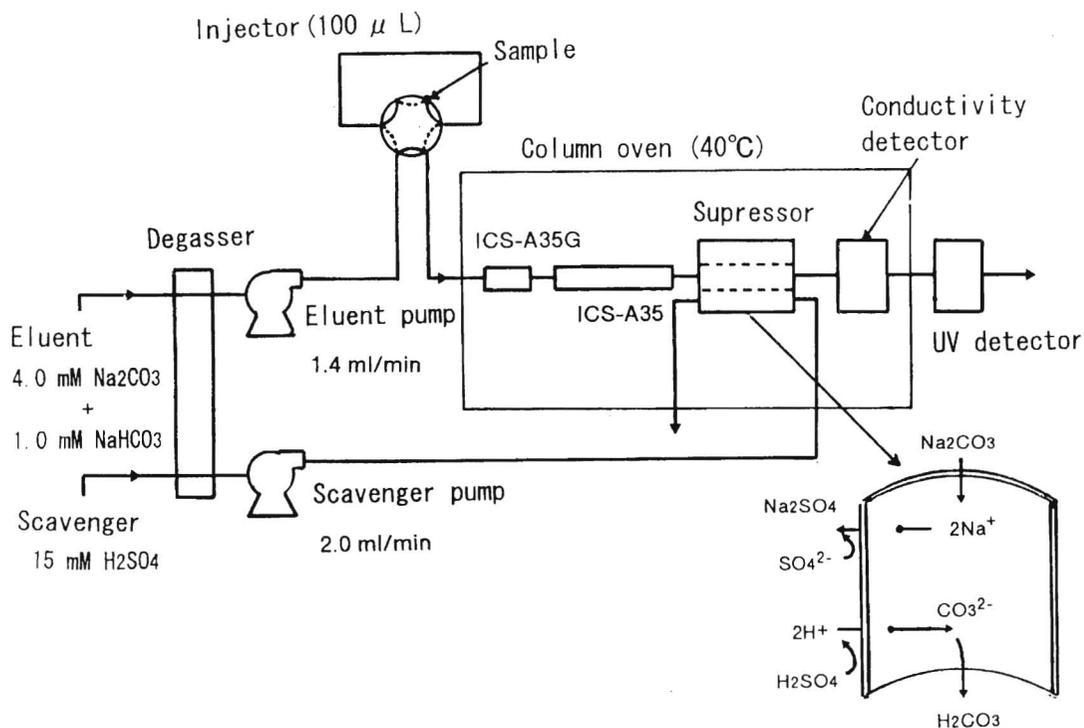


Fig. 1. Flow diagram of ion chromatography.

いて灰化した。すなわち、白金るつばに調合溶液または市販のワイン10mlを量りとり、2M水酸化カリウム水溶液0.75mlを加えて、熱風下で乾燥させた。ついで、電気炉に入れ60分から90分間で所定の温度(525、600、700、800°C)まで昇温した。この温度で15分間灰化したのち、冷却した。放冷後、るつばの内容物は水を加えて正確に10mlとしたのち、0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過した。このろ液100 μ lをクロマトグラフに導入した。

4. 供試料

実試料として、山梨大学発酵化学研究施設及び市販のワイン計10種類を用いた。

実験結果および考察

1. イオンクロマトグラフィーの条件検討

試料を灰化操作すると、最終的には無機陰イオンが灰分中に残存することになるため、共存の無機イ

オンのイオンクロマトグラフィーを行い、種々の溶離条件を検討した。共存の7種のイオンは4mM Na₂CO₃+1mM NaHCO₃で最適な分離を示した。

また、検出方法(UV検出と電気伝導度検出)についても検討した。臭素イオンは電気伝導度以外に紫外検出も可能であるため、選択性のある紫外検出器についても検討の必要がある。特に、灰化操作で電気伝導度検出されるピークが多く現れるので臭化イオンの検出を妨害する恐れがあった。Fig.2.には最適な溶離条件で標準陰イオンを分離したときの二つの検出方法で得られたクロマトグラムを示した。両者を比較した結果、紫外検出205nmで灰化試料を検出することとした。

2. 灰化温度の影響

臭素が有機物として23.1ppm、無機物として5 ppmを添加した市販ワインを525°Cで灰化したとき得られたクロマトグラムをFig.3.(A)に示した。

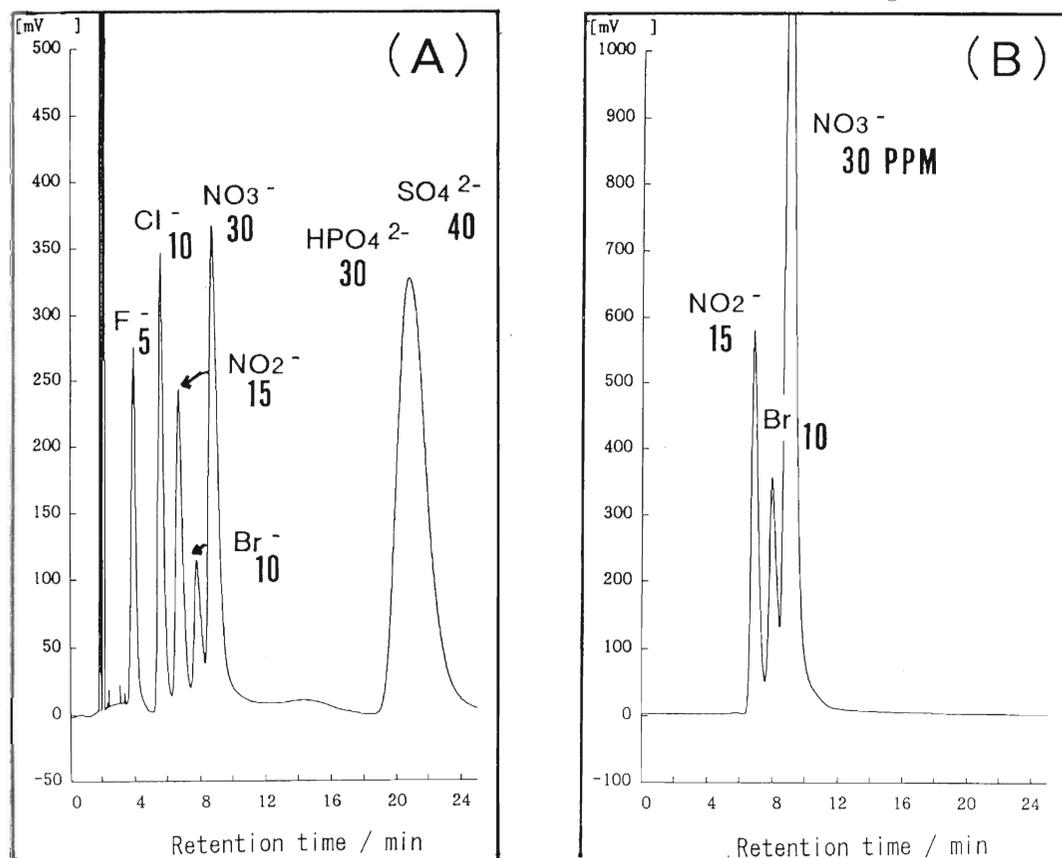


Fig. 2. Chromatograms of standard anions obtained by (A) conductivity detector and (B) UV detector (205nm). column: Yokogawa ICS-A35 (4.6mm i.d. x 150mm); eluent: 4mM Na₂CO₃+1mM NaHCO₃, 1.4ml/min; column oven temp.: 40°C. Figures around peak tops represent the anion concentrations.

Fig.3.(A)から明らかのように、臭化物イオンのピークが検出された。臭化物イオン以外のピークもクロマトグラム上に出現していた。あらかじめ作成した検量線からFig.3.(A)の結果を定量すると定量値はばらつき、微量を添加した調合溶液からの回収率は278%を示す結果も得られ、臭化物イオンピークに共存物による妨害が生じていることが分かった。

臭素を含まない調合溶液を用いても、クロマトグラム上に臭化物イオンの保持時間に重畳するピークが現れたことから、この525°Cにおける灰化は適切ではなく、未灰化物がクロマトグラム上に多数存在することが分かった。

従って、イオンクロマトグラフィーに適切な灰化条件を検討する必要がある。

そこで、灰化を600、700、800°Cの各温度について検討した。各温度における燃焼物は以下全く同様に操作してICを行った。その結果、温度800°Cで15分間灰化すると、Fig.3.(B)に示したように灰化に伴う臭化物ピークと重なる未燃焼物のピークが消失す

ることが分かった。

従って、以後の灰化操作は次のように行うことにした。ワイン試料10mlを量りとり、これに2M水酸化カリウム水溶液0.75mlを加えて、熱風下で乾燥させた。ついで、電気炉に入れ90分間で800°Cに昇温した。この温度で15分灰化したのち、冷却した。放冷後、るつぼの内容物は水を加えて正確に10mlとしたのち、0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過した。このろ液100 μ lをICに導入することとした。

実施例として、オーストラリア産および山梨大学発酵化学研究施設産ワインからのクロマトグラムをFig.4.に示す。

Fig.4.より、硝酸イオンのピークに近接して現れるが、明らかに臭化物イオンの検出が可能である。この他、ワイン中の含窒素化合物から由来すると思われる硝酸イオン、亜硝酸イオンのピークも検出された。

3. 回収率と再現性・定量操作

灰化操作は800°C、15分のように高温で行うた

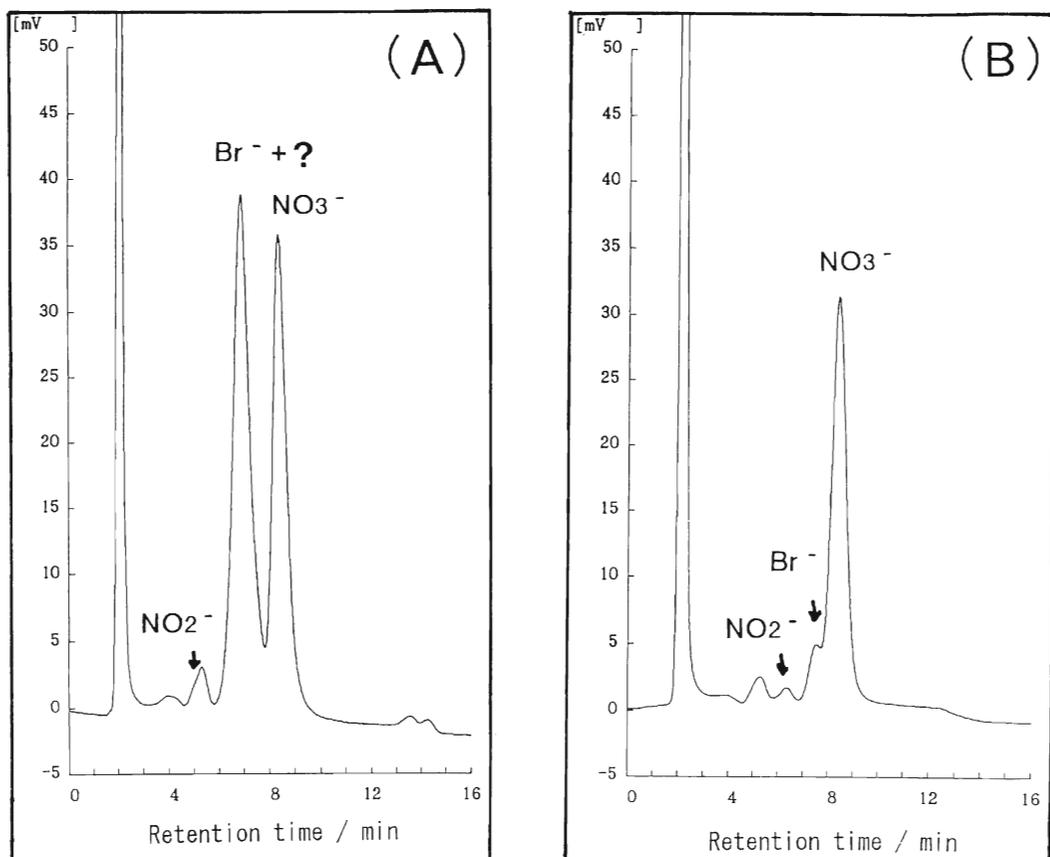


Fig. 3. Chromatograms obtained by ashing wine at (A) 525°C, and (B) 800°C.

Detector: UV 205nm. The other chromatographic conditions were same as in Fig. 2.

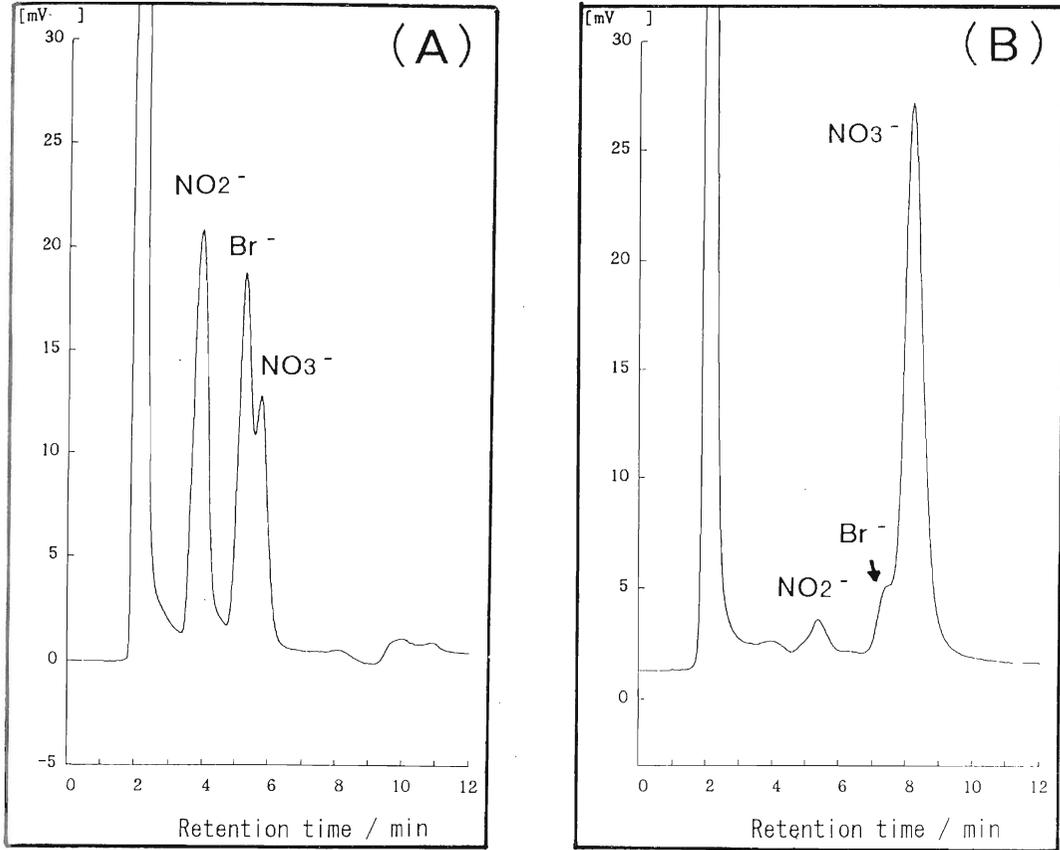


Fig. 4. Typical chromatograms of bromide ions in wine: (A) Australia, (B) Japan (Yamanashi University).

Chromatographic conditions were the same as in Fig. 2.

め、ワイン中の臭素化合物の揮散が予想される。そこで、ワインに無機臭素として臭化カリウムを、有機臭素としてジブロモアセトフェノンを添加したのち、上記に記載の方法で灰化操作し、ICより回収率を求めた。0.1~1.0ppmの範囲で調製した試料について、いずれも添加量の66~68%の回収率が得られた。高温下での灰化操作を伴うため回収率は低い値となったが、繰り返しの再現性は2.48%以内であり、分析法として良好な結果となった。

従って、あらかじめ、本法によって回収率を求めておくと微量の臭素含量が定量可能である。

その結果をTable 1.に示す。

4. 検量線の作成と検出限界

種々の濃度に臭化物イオンを含む調合溶液を調製し、上記の灰化操作を行い、ICで得られたクロマトグラムより、ピーク面積と導入量との関係(検量線)を求めた。検量線は、臭素含有量の0.1~500

ppmの範囲での直線性 ($Y=907.3X+20.1$, $r^2=0.999$) を示し、検出下限は相対誤差10%となる0.01ppmが最小検出量であった。

5. 実際試料の分析

市販のワインを購入し、上記の方法によって灰化したのち、ICによって分析を行った。その結果をTable 2.に示した。なお、日本産ワイン以外は市販品を購入した。

日本産ワインは本学の農場で栽培し、醸造した甲州ワインで、栽培時には臭素を含む農薬は使用して

Table 1. Recovery and reproducibility of the method.

Addition	Amount added (ppm)	Recovery (%)	R.S.D (%) (n=6)
Potassium bromide	0.50	66.0	2.48
Dibromoacetophenone	0.575	68.0	1.87

Table 2. Bromide concentration in wines.

Country of production	Bromide concentration (ppm)
Japan (Yamanashi Univ.)	0.09
USA	0.42
Chile	0.13
France A	0.10
France B	0.08
Italy A	0.11
Italy B	0.11
Australia	0.52
Portugal	0.31
Spain	0.15

いない。従って、0.1ppm前後は農薬から由来の臭素ではなく、自然界からのものと推察している。アメリカ産、オーストラリア産、ポルトガル産ワインは明らかに無農薬のワインに比べて、臭素含有量に有意差があり、農薬由来のものと推定される。

ま と め

穀物中に存在する臭素の微量分析については、既にいくつかの分析方法が提案されているが、これらの方法による試料灰化操作ではワインのように多量の糖質、有機酸、フェノール類等を共存していると、十分な灰化が困難となり、その結果クロマトグラムには多数の分解物に起因するピークが現れた。これらのピークは臭化物イオンピークの定量を妨害

するため、この灰化法ではイオンクロマトグラフィーへの適用はできない。

本研究ではワイン中の微量臭素のイオンクロマトグラフィーの方法を確立するため、イオンクロマトグラフィーに適した灰化操作の検討を行った。また、ワイン中に同時に共存する無機イオンも分析を可能とするための分析条件の研究を行った。

その結果、ICのための試料処理として温度を上昇させて灰化を行い、臭素誤差を少なくするために、あらかじめ作成した検量線を用いることにより、変動係数3%以内で微量定量が可能となった。

従来の方法に比較して、煩雑でなく、共存イオンの分析も可能である等の利点がある。

本研究の一部分はASEV JAPAN1993年度大会、東京、1993、11月(ASEV JAPAN REPORTS, 4, 170-173 (1993))に発表した。

文 献

- (1) 食品衛生法に基づく食品-添加物等の規格基準：厚生省告示第370号(1959.12)。
- (2) 食品衛生法に基づく食品-添加物等の規格基準：厚生省告示第239号(1991.10)。
- (3) D.F.Boltz; in "Colorimetric Determination of Nonmetal", 2nd Ed., Interscience Publishers, New York, 1978, pp.39.
- (4) 石井康雄 第16回農薬残留分析研究会資料集、山梨、1992、10月、pp.7-8.