報 文

波長分散型蛍光 X 線分析装置による果実類
および穀類加工品の臭素の簡易分析法

(平成 21 年 8 月 25 日受理)

立石 恭也* 橋本 常生 牛山 慶子 酒井 奈穂子
馬場 糸子 永山 敏廣Simple Analytical Method of Bromine in Fruits and Grain Products
with Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence SpectrometerYukinari TATEISHI*, Tsuneo HASHIMOTO, Keiko USHIYAMA, Naoko SAKAI,
Itoko BABA and Toshihiro NAGAYAMATokyo Metropolitan Institute of Public Health: 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku,
Tokyo 169-0073, Japan; *Corresponding author

A simple analytical method was developed for the determination of total bromine in fruits and grain products by means of wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry (WDXRF).

Five gram samples of fresh fruits, frozen fruits, dried fruits and grain products were extracted with distilled water twice and diluted to 25 mL with distilled water. The sample solution (0.5 mL) was dripped onto the filter paper, which was dried and analyzed by WDXRF. The working curve was linear in the range of 0 to 10 $\mu\text{g/mL}$. Recoveries at the level of 5 $\mu\text{g/g}$ were 76–104%. The detection limit was 0.5 $\mu\text{g/g}$ and the determination limit was 1.5 $\mu\text{g/g}$ in foods. Compared to the GC-ECD method, this method gave equivalent results for fresh fruits, frozen fruits and grain products. In addition, some dried fruits, in which a slightly high level was detected, gave almost the same results with the GC-ECD method. Therefore, this method is considered to be available as an alternative to the GC-ECD method.

(Received August 25, 2009)

Key words: 蛍光 X 線分析 X-ray fluorescence analysis (XRF); 臭素 bromine; 残留農薬 pesticide residue; 食品 food; 電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフ GC-ECD; 点滴用ろ紙 instillation filter paper

緒 言

臭化メチルは殺虫、殺菌の目的で農産物のポストハーベスト農薬としてのくん蒸処理や土壌のくん蒸剤として広く使用されている。しかし、1992 年のオゾン層を破壊する物質に関するモントリオール議定書^{*1} 第 4 回締約国会合において、臭化メチルはオゾン層破壊に関与する物質と位置づけられたことから、2015 年を目途に不可欠用途など国際的合意に基づく例外的措置以外は使用が規制されることになった。現在、臭化メチルの代替農薬について検討されているが、土壌伝染性ウィルスなどに対し効果を示すものがないため^{1),2)}、例外的措置として部分的に臭化メチルの使用が認められる可能性がある。

臭化メチルは、くん蒸処理により分解し、食品中ではそ

の大部分が臭素化合物として残留する。そのため、食品衛生法では、臭素としてマンゴー、バナナ、かぶ類の葉などについて 20 ppm から 1,000 ppm までの基準値（暫定基準を含む）が設定されている。現在、臭素の分析には電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフ (GC-ECD) 法が通知されているが^{*2}、電気炉の温度を 2~3 時間かけて 550℃ に上げ、さらに 5 時間加熱を続けて灰化し、その後誘導体化が必要であるなど、操作が煩雑で分析に長時間を要する。最近ではイオンクロマトグラフ法^{3),4)} や高速液体クロマトグラフ法⁵⁾ などの報告も見られるが、いずれも灰化操作が必要である。一方、波長分散型蛍光 X 線分析 (WDXRF) による灰化を必要としない分析法も開発されており、米を対象とした分析法については比較的短時間での測定が可能である⁷⁾。しかし、この WDXRF による分析

* 連絡先

東京都健康安全研究センター：〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

*1 モントリオール議定書 http://www.env.go.jp/earth/ozone/montreal_protocol.html

*2 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)

法は水分存在下における測定が困難であることから、水分が多い生鮮野菜や果実類などでは、検体を乾燥後プレスし、ペレットにしてから測定するなど、測定用サンプルの調製に時間を要し、操作も煩雑である^{6)~8)}。

臭化メチルに由来する臭素化合物は、水に可溶であることが報告されている^{*3,3)}。そこで今回、食品中の臭素化合物を蒸留水で抽出し、WDXRFで臭素含有量を測定する簡易分析法について検討した。実際に臭化メチルでくん蒸した場合、試料への臭素添加量が制御できないことから、今回は通知試験法でも利用されている水溶性化合物である臭化カリウムを用いて分析手法の妥当性について検討を行った。その結果、食品中の臭素化合物を蒸留水で抽出し、その抽出液を点滴用ろ紙に滴下してWDXRFで測定する簡易分析法を確立したので報告する。

実験方法

1. 試料

2007年4月～2008年8月に東京都内で市販されていた生鮮果実6種類、冷凍果実3種類、乾燥果実4種類および穀類加工品4種類を使用した。

2. 試薬等

臭化カリウム：特級 和光純薬工業(株)製。

臭素標準溶液：臭化カリウム 148.9 mg を正確に量り採り、蒸留水に溶解し、100 mL として標準原液 (1 mg/mL) とした。用時、蒸留水で希釈し、0.2～10 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液とした。

水酸化カリウム：特級 関東化学(株)製

5% 水酸化カリウム溶液：水酸化カリウム 5 g を蒸留水に溶解し 100 mL とした。

ろ紙：桐山漏斗用 No. 5A 60 mm ϕ , (有)桐山製作所製。

セルシート：ポリプロピレン製 厚さ 5 μm , 理学電機工業(株)製。

点滴用ろ紙：ウルトラキャリー, 理学電機工業(株)製。

中空カップ：アルミニウム製 XRF 専用カップ, 理学電機工業(株)製。

3. 装置

WDXRF 装置：ZSX PrimusII 理学電機工業(株)製、X線管球：エンドウインドウ型ロジウム (Rh) ターゲット、遠心分離器：Allegra™ 6KR ベックマン(株)製。

4. 蛍光 X 線分析法

1) 蛍光 X 線測定条件

(1) X 線励起条件

ターゲット：ロジウム (Rh), 管電圧 60 kV, 管電流 60 mA

(2) 光学系条件

分光結晶：LiF (200), 検出器：SC (シンチレーションカウンター)

Fig. 1. Background correction by WDXRF

(3) スキャン条件

測定スペクトル, 測定時間および Net 強度の算出: 臭素の X 線強度 Br- $K\alpha$ (29.95 deg, 20 s), バックグラウンド 1 の X 線強度 BG1 (29.16 deg, 10 s), バックグラウンド 2 の X 線強度 BG2 (30.78 deg, 10 s).

(4) X 線照射部条件

X 線照射測定径: 30 mm, 雰囲気: 真空

(5) 定性方法

スキャンしたレンジ (28.5～32.0 deg) のうち, 妨害のないことを確認した 29.95 deg を臭素の $K\alpha$ 線と帰属した。

(6) 定量

BG1 および BG2 の 2 点を結んだ線における 29.95 deg の強度をバックグラウンド強度 (BG) とし, 29.95 deg における Br- $K\alpha$ のピーク強度から BG を差し引いた強度 (Net) を求めた。Fig. 1 にこれらの関係について説明図を示した。この Net 強度から, Fig. 2 に示した 0～10 $\mu\text{g/g}$ の範囲の検量線を用いて, 絶対検量線法により定量値を算出した。

2) 試験溶液の調製

細切した試料 5 g を正確に量り採り, 生鮮および冷凍果実は 10 mL, 穀類加工品, 乾燥果実等の乾燥品は 15 mL の蒸留水を加え 15 分間振とう後, 2,500 rpm で 5 分間遠心分離を行い, その上澄みを吸引ろ過した。残さにさらに蒸留水 10 mL を加え, 1 回目と同様の操作を繰り返した。ろ紙を蒸留水で洗い込みながらろ液を合わせ, 25 mL に定容して試験溶液とした。

3) WDXRF による測定

試験溶液 500 μL を点滴用ろ紙に滴下後, 5% 水酸化カリウム溶液 10 μL を滴下し, 室内に静置して乾燥した。このろ紙を中空カップの上に乗せ, さらに上からセルシートで覆い, 試料ホルダー (内径 30 mm) に装着して WDXRF により測定した。

5. GC-ECD による測定

通知法^{*2}に従った。

*3 上村 尚, 西島基弘, 永山敏廣, 他: 日本食品衛生学会第 38 回学術講演会講演要旨集, 1979, 6 p.

結果および考察

1. WDXRF 分析条件の検討

X 線管球は、同じ出力でも電圧と電流の割り振り方によって感度に差が生じる。そこで、臭素標準溶液を用いて管球の最適な出力条件について検討した。管球の出力として初期設定である 50 kV-60 mA、および 60 kV-60 mA、50 kV-70 mA、40 kV-90 mA の 4 つの条件で臭素濃度と X 線強度の関係について比較した。60 kV-60 mA が最も X 線強度が高く、相関係数も 0~10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で $R^2=0.9997$ と良好な直線性が見られた。なお、低濃度 (0~2 $\mu\text{g/mL}$) の濃度範囲についても $R^2=0.996$ と良好であった。また、S/N 比についても 0~1 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲まではほとんど差がなかったが、2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では 60 kV-60 mA が最も高かった。そこで、管球の出力条件は 60 kV-60 mA とした (Fig. 2)。

2. ろ過方法の検討

試料 5 g を蒸留水 20 mL で 15 分間抽出したときの抽出液を用いてろ過方法を検討した。ろ紙による自然ろ過では、マンゴーなど粘度の高い検体や穀類加工品などではろ紙が目詰まりすることがあった。吸引ろ過では、ろ過は可能であったが、ろ液に濁りが見られた。しかし、このろ液の濁りは WDXRF 測定に影響しなかったことから、ろ紙

Fig. 2. Working curve of bromine under various output conditions of the X-ray tube

Voltage-Current: ■ 50 kV-60 mA; ◆ 60 kV-60 mA; ▲ 50 kV-70 mA; ● 40 kV-90 mA.

のみで吸引ろ過したろ液をそのまま試験溶液とした。

3. 抽出時間と回数の検討

細切したオートミール、生鮮マンゴーおよび冷凍ブルーベリーの各試料 5 g に試料中濃度が 5 $\mu\text{g/g}$ となるように臭素標準溶液を添加し、30 分間放置後、蒸留水 20 mL を加え、5 分、10 分、15 分および 20 分間振とう抽出を行い、それぞれの回収率を比較した。各振とう時間について 2 回ずつ試行した結果の平均を Table 1 に示した。振とう時間を 15 分以上にすると、80% 以上の回収率が得られたが、残さにまだ臭素が残っていることが考えられたことから、さらに抽出を行った。

残さにさらに 10 mL の蒸留水を加えて、1 回目と同じ時間でそれぞれ振とう抽出を繰り返し、2 回合わせた回収率を比較した (Table 1)。その結果、15 分間ずつ 2 回抽出することで、回収率がほぼ 100% となった。5 分間ずつ 2 回抽出でも十分な回収率は得られているが、今回は抽出操作の確実性を考慮して、試料からの抽出は 15 分間ずつ 2 回で行うこととした。

4. 検出下限および定量下限

本法における検出下限および定量下限はブランク試料を実測する方法を用いて算出した⁹⁾。すなわち臭素のピークが検出されなかった試料を続けて 10 回測定し、それぞれの X 線強度から標準偏差を求めた。検出下限は標準偏差の 3 倍、定量下限は標準偏差の 10 倍として、Fig. 2 に示した検量線の式から濃度に換算した。生鮮、冷凍および乾燥果実、穀類加工品の 4 種における標準偏差を試料中の濃度に換算した値は 0.06~0.15 であり、各食品における検出下限は 0.2~0.5 $\mu\text{g/g}$ 、定量下限は 0.7~1.5 $\mu\text{g/g}$ であった。したがって、本法では検出下限を 0.5 $\mu\text{g/g}$ 、定量下限を 1.5 $\mu\text{g/g}$ とした。

GC-ECD 法 (通知法) における定量限界が 1 $\mu\text{g/g}$ であることから、本法の定量限界は通知法とほぼ同等であった。

5. 添加回収実験

あらかじめ臭素が検出されないことを確認した市販の生鮮果実 2 検体、冷凍果実 3 検体、乾燥果実 2 検体、穀類加工品 2 検体の計 9 検体に 5 $\mu\text{g/g}$ (試料溶液中で 1 $\mu\text{g/}$

Table 1. Effect of extraction time and frequency on recovery

Extraction time (min)	Recovery (%) [*]					
	Oatmeal		Fresh mango		Frozen blueberry	
	Extracted		Extracted		Extracted	
	Once	Twice	Once	Twice	Once	Twice
5	73.1	94.9	77.6	101.4	87.6	96.2
10	75.5	98.3	70.2	96.4	86.4	95.4
15	81.0	101.4	78.6	98.7	90.9	103.0
20	84.5	104.2	80.9	99.6	87.1	95.2

^{*} The sample was spiked at the level of 5 $\mu\text{g/g}$ with bromine as bromide and the analyte was extracted with water after standing for 30 minutes.

Each value is the mean of two trials.

Fig. 3. WDXRF spectrum chart of bromine standard and samples

Output signals were processed for smoothing.

Table 2. Recoveries of bromine from spiked samples

	Sample	Recovery (%)	C.V. (%)
Fresh fruits	Mango	87.0	5.3
	Kiwifruit	89.3	5.1
Frozen fruits	Strawberry	89.7	5.1
	Blueberry	93.4	2.6
	Lychee	85.4	4.0
Dried fruits	Cranberry	103.9	3.7
	Raisin	97.3	4.7
Grain products	Oatmeal	88.6	4.2
	Rye flour	76.4	7.7

5 µg/g of bromine as bromine ion was added to the sample. Each value is the mean of three trials.

mL) となるように標準溶液を添加して回収実験を行った。臭素を添加したライチ抽出液と無添加のライチ抽出液および臭素 1 µg/mL の標準溶液の WDXRF スペクトル (9 点スムージング処理) を Fig. 3 に示した。いずれの試料でも臭素のピークが検出でき、付近に妨害ピークは見られなかった。回収率は 76.4~104%, 変動係数 2.6~7.7% (3 回試行) と良好な結果が得られた (Table 2)。

6. GC-ECD 法との比較

GC-ECD 法により臭素の残留が認められた生鮮果実 4 検体, 乾燥果実 2 検体および穀類加工品 2 検体の計 8 検体について本法における測定値と比較した (Table 3)。今回比較に用いた食品からの検出量は, チェリーで基準値の 1/2 以下, 他の食品では基準値の 1/10 以下であった。

GC-ECD 法から得られた測定値は本法から得られた値

Table 3. Results of sample analysis by WDXRF and GC-ECD

	Sample	GC-ECD (µg/g)	WDXRF (µg/g)	MRLs (ppm)
Fresh fruits	Mango	1.4	2.0	20
	Cherry	6.8	9.0	20
	Banana	2.0	1.9	20
	Navel orange	1.2	2.2	30
Dried fruits	Fig	7.7	12.9	250
	Kiwifruit	0.5	1.5	30
Grain products	Wheat flour	1.7	1.7	50*
	Cracker	2.5	3.5	50*

MRLs: Maximum residue limits
Each sample was measured once.
* MRL of wheat is shown.

以下であり, その差は 2.2 µg/g 以下, ほとんどは 1 µg/g 以下であった。しかし, 乾燥いちじくにおいては, GC-ECD 法による値が本法によるものよりも 5.2 µg/g 低く, 比較的差が見られた。そこで, GC-ECD 用に調製した誘導体化前の試験溶液を用いて本法に従い分析したところ, 測定値は 7.6 µg/g と GC-ECD の結果 7.7 µg/g とほぼ同じであった。この結果から, 前処理における灰化操作, 誘導体化などにより臭素が損失し, GC-ECD 法のほうが低い測定値となったと推察された。

食品における臭素の基準値 (MRLs) は最も低いもので 20 ppm であり, また, 本法の方が通知法よりも若干高い値を示す傾向が見られることから, 本法は基準遵守を判断する試験法として十分使用可能であると考えられた。

ま と め

WDXRF を用いた生鮮果実, 冷凍果実, 乾燥果実および穀類加工品中臭素の簡易分析法を確立した。本法は臭素化合物を蒸留水で抽出し, その抽出液を点滴用ろ紙に滴下し乾燥させた後, WDXRF により測定する。GC-ECD 法と比較した場合, 灰化や誘導体化などの作業の手間が省け, 測定にかかる時間も短縮された。また, 測定値も GC-ECD 法と同様の結果が得られた。定量限界は MRLs と比べて十分に低く, 本法において最も時間を要する点滴ろ紙の乾燥は, 専用のろ紙乾燥機などの利用により, さらに大きく短縮できる可能性がある。これらのことから, 本法は簡易, 迅速な GC-ECD 法の代替法として十分使用できると思われた。

文 献

- 1) Nishi, K. Present situation of methyl bromine and its alternative. *Proceedings of Vegetable and Tea Science*, **3**, 35-41 (2006).
- 2) Tashiro, S. The present condition of the methyl bromine alternative pesticides. *Proceedings of Vegetable and Tea Science*, **3**, 21-28 (2006).
- 3) Oshima, H., Yamada, S., Saito, I., Hayakawa, J. A

- simple method for determination of bromine in cereals by ion chromatography. Aichi-ken Eisei Kenkyu-shoho (Report of Aichi Prefectural Institute of Public Health), **43**, 23–27 (1993).
- 4) 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 (1980).
 - 5) Sadamasu, Y., Ibe, A., Tabata, S., Miyakawa, H., Yasui, A., Yasuda, K. Analytical procedure for bromine in agricultural products and foodstuffs by high-performance liquid chromatography. Tokyotoritsu Eisei Kenkyujo Kenkyu Nenpo (Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health), **51**, 100–104 (2000).
 - 6) Tsutsui, T., Ohta, M., Chatani, Y., Adachi, T. X-ray fluorescence spectrometric determination of total bromine in agricultural products. Annual Report of Kyoto Prefectural Institute of Hygienic and Environmental Science, **37**, 19–24 (1992).
 - 7) Takada, C., Takano, I., Nagayama, T., Kobayashi, M., Ito, M., Tamura, Y., Kimura, N., Kitayama, K., Yasuda, K. X-ray fluorescence spectrometric determination of total bromine in rice. Tokyotoritsu Eisei Kenkyujo Kenkyu Nenpo (Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health), **50**, 134–137 (1999).
 - 8) Mino, Y., Yukita, M. Determination of high levels of bromine in vegetables using X-ray fluorescence spectrometry. Journal of Health Science, **51** (3), 365–368 (2005).
 - 9) 中井 泉編. 蛍光 X 線分析の実際, 東京, 朝倉書店, 2005, p. 217–219. (ISBN978-4-254-14072-9)