蛍光X線分析顕微鏡を用いたチャの無機元素分析

静岡県茶業試験場*¹

佐田 康稔*²・西島 卓也*³・森田 明雄*⁴

独立行政法人 食品総合研究所*⁵

亀山 眞由美

(平成13年12月19日受理)

Analysis of Inorganic Elements in Tea Leaves by the X-Ray Fluorescence Microscope Analyzer

Yasutoshi SADA, Takuya NISHIJIMA, Akio MORITA

Shizuoka Tea Experiment Station

Mayumi OHNISHI-KAMEYAMA

National Food Research Institute

Summary

Inorganic elements in tea leaves (*Camellia sinensis* cv. Yabukita) were investigated using an X-ray fluorescence (XRF) microscope analyzer. The pixel-intensities from XRF images of potassium in new buds were higher than those in mature or immature leaves. The calcium content was higher in mature leaves than in immature leaves, especially in petiol.

The distribution of the inorganic elements was changed by the infection of tea anthracnose (*Colletotrichum theae-sinensis* (MIYAKE) YAMAMOTO). While calcium was accumulated at the lesion point, potassium was decreased as the progress of disease.

XRF microscope analyzer lead to simple, nondestructive and simultaneous element analysis in tea leaves. It will be useful for elucidation of response mechanism for physiological disorder or damage by disease and pest based on elements dynamics.

1 緒 言

無機元素は植物の物質代謝に必要な構成元

素であり、欠乏や過剰によって生育障害が起こるなど植物生育にとって不可欠な成分である。渡辺^{1,2)}は蛍光X線マッピング装置(X E

*¹ 〒439-0002 静岡県小笠郡菊川町倉沢1706-11

*² 現 静岡県静岡工業技術センター

*³ 現 静岡県農林大学校茶業分校

*⁴ 現 静岡大学農学部

*⁵ 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

MS)を用いて、ストレスなどの異常障害部の元素移行などをイネの葉身においてモニタリングしている。それによると、植物が組織回復できないほどのストレスや障害を受けた場合、初めにカリウムが障害部から他の組織へ移行し、障害を受けた表皮下の組織が過大な酸化状態になって、カルシウムがこの部分に集積する。次いでマンガンが蒸散流によって障害部へ集積することを明らかにしている。チャについては、石垣³⁾がX線マイクロアナライザーを用いて、マンガン過剰症による異常斑点部の障害要因を解析している。

チャは、他の植物に比べて、マンガンやフッ素、アルミニウムなどの無機元素を比較的多く含む。その中で、マンガンは施与量の増加とともに窒素含有率が漸次減少し、良質な茶ほどマンガン含有量が少ない⁴⁾。茶葉中のマンガン含有量は茶芽の部位によって異なり、下位葉に多く含まれる^{5,6)}。フッ素とアルミニウムの含有量には高い相関があり、新葉に少なく、古葉に多い^{4,7)}。また、チャの生育に大きく影響しているアルミニウムは、苦渋味成分であるカテキン類と錯体を形成した状態で存在していると推定されていることなど^{7,8)}、チャにおいては無機元素が生育のみならず、品質にも大きく影響していると考えられ、その動態を知ることが茶生産に重要である。

一般に、無機元素の分析には原子吸光法や蛍光法、プラズマ発光分光法等が用いられている⁹⁾。プラズマ発光分光法は高感度で多元素同時分析が可能であるという利点があり、茶の標準的な分析法としてもあげられているものの、いずれの分析方法においても煩雑な前処理が必要になる。

これに対して、蛍光X線分析顕微鏡(以下、XRF分析)は上記の元素検出法に比べて感度が低い、あるいは生体試料では測定面が平坦・平滑ではないと厳密な定量を行うことができないという短所はあるが、抽出や固定化などの前処理を必要とせず、非破壊で多元素同時分析が可能であるという長所がある。また、XRF分析は植物生体中の無機成分を大

気圧下で二次元走査することができるため、チャの生育や生理障害など茶葉中の無機元素動態を知るうえで有用な方法と考えられる。しかしながら、可搬型や携帯型のXRF分析装置は開発されておらず、永年作物であるチャを植栽された状態のまま測定するのは困難である。

そこで、採取した茶葉を殺青処理および凍結乾燥処理をした茶葉について、非破壊でより簡便なXRF分析による無機元素分析法を検討するとともに、チャ炭疽病に罹病し、病斑が拡大していく茶葉を経時的に採取し、その無機元素動態をXRF分析法で調査した。

2 実験方法

2.1 茶葉試料の調製

殺青葉は静岡県茶業試験場温室内でペーパーポット育苗した‘やぶきた’1年生苗の成葉、新葉、心を2000年3月22日に採取し、電子レンジで1分間殺青した後、直ちにXRF分析を行った。凍結乾燥葉は、同様に殺青し、凍結乾燥処理をした後にXRF分析を行った。

2.2 炭疽病罹病葉の調製

供試したチャ炭疽病菌は1990年5月富士市石坂の静岡県茶業試験場富士分場内の‘やぶきた’樹に自然発生した病葉から常法により単孢子分離し、継代保存している菌株を用いた。供試菌株は茶葉培地を用い25°Cで約1ヶ月培養後、形成された分生子を極少量のTween20を添加した脱塩水に懸濁し、10⁷個/mlレベルの調製した分生子懸濁液を接種源とした。

二番茶生育期の1999年6月21日の降雨中に、この懸濁液約150ml/m²を‘やぶきた’茶株面に電動式噴霧器を用いて噴霧接種した。炭疽病病斑は接種から12日後に初発生を確認した。その後、炭疽病の各病斑ステージにあわせて、接種から15日、17日、19日、22日、29日後に第2～4葉位の罹病葉(成熟した二番茶の新葉)を採取し、直ちに電子レンジで殺青後、凍結乾燥処理し、分析まで0°Cで冷凍保管した。

2.3 蛍光X線分析顕微鏡の測定条件

蛍光X線分析顕微鏡XGT-2000V(堀場製作所製)を用いて、XRF分析を行った。測定条件は、X線ビームスポット: $\phi 100\mu\text{m}$, X線ターゲット: ロジウム(Rh), 管電圧: 50keV, 管電流: 1mA, 検出: Si検出器, スキャン速度: 1200秒/scan, 積算回数: 36回, マッピング画素数: 256×256 ピクセルとした。

XRF分析は厳密な定量を行うために測定面を平坦・平滑にする必要がある。そこで、茶葉試料は試料上面を平らにし、水の蒸散による形状変化を防ぐため、市販の家庭用ポリエチレンフィルムで被覆した。また、凍結乾燥茶葉は試料表面を平らにするため、分析前にイオン交換水を含水させ、同様に測定した。炭疽病罹病葉の凍結乾燥試料も同様に含水、被覆後に測定した。

3 実験結果および考察

3.1 茶葉中の無機元素

殺青後の成葉および新葉、心の各部分の蛍光X線スペクトルを測定し、X線透過像とカリウム、カルシウム、リン、マンガン、鉄について画像化した(図1)。各元素のマッピング画像は白色の濃い部分により多くの元素が分布していることを表す。その結果、カリウム(図1(B))は成葉、新葉の全体に存在し、心にやや多くみられた。また、カルシウム(図1(C))は成葉や硬化が始まった新葉に多く、特に葉柄に多く存在していた。リン(図1(D))は生育段階にかかわらず、成葉、新葉全体に分布していた。マンガン(図1(E))は成葉と硬化した新葉の周縁部に多く存在していた。鉄(図1(F))はマッピング画像でその存在部位を確認することはできなかった。

凍結乾燥処理後の茶葉についても殺青葉と同様に、X線透過像と各成分の画像化を行った(図2)。殺青葉と同様、カリウム(図2(B))は成葉、新葉全体に、カルシウム(図2(C))は成葉、特に葉柄に多くみられた。リン(図2(D))は成葉、新葉全体に分布し、マンガ

ン(図2(E))、鉄(図2(F))は成葉全体に分布していた。リンは殺青葉に比べて凍結乾燥葉でやや明瞭に確認することができたが、殺青葉と凍結乾燥葉の画像を比較してみると、両者の分布に顕著な差異は認められず、乾燥や分析時のイオン交換水含水処理などの前処理操作の違いで元素の分布状態が変わることはないと考えられた。

茶葉中の無機成分含有量は上位葉ほどリン酸、カリウムが多く、カルシウム、マンガン、鉄などは逆に硬化した下位葉に多いとされる^{5,6)}。殺青葉と凍結乾燥葉のマッピング画像(図1, 2)をみると、カリウム、リンは新葉、心に確認できるが、カルシウム、マンガン、鉄は成葉のみで認められ、新葉や心では確認できない。マッピング画像の各元素分布は部位別含有量^{5,6)}と同様の傾向を示しており、XRF分析は茶葉中の元素の分布や動態が解析できると考えられた。

図3に殺青葉分析時の蛍光X線スペクトルを示した。図中に記したように、蛍光X線スペクトルはカリウム、カルシウムのほかに、硫黄、アルミニウムなどの微量元素が認められたが、これらの元素は分布する部位をマッピング画像で確認することはできなかった。このことから、これらの元素は特定の部位に局在しているのではなく、茶葉全体に広く分布していることが示唆された。

このように、カリウム、カルシウムなどの含有量の比較的多い無機元素であれば、XRF分析によって、局所への移行、茶葉内の動態を多元素同時に把握することが可能と考えられた。また、電子レンジによる殺青処理をした茶葉、凍結乾燥茶葉など、茶葉の処理形態にかかわらず分析ができるものと考えられた。一般の化学分析では、局所の無機元素を分析することは難しいが、XRF分析は茶葉の無機元素の動態が把握できる有用な方法と考えられた。

3.2 チャ炭疽病壊死病斑の拡大と無機元素の動態

炭疽病菌懸濁液接種後15日~29日後の病斑を図4(A)に示す。病斑は接種15日後に葉

図1 蛍光X線分析顕微鏡マッピング画像による茶殺青葉の元素分布
 (A) X線透過像 (B) カリウムの蛍光X線マッピング画像 (C) カルシウムのマッピング画像
 (D) リンのマッピング画像 (E) マンガンのマッピング画像 (F) 鉄のマッピング画像
 * 各マッピング画像は白色の濃い部分により多くの元素が分布していることを表す。

図2 蛍光X線分析顕微鏡マッピング画像による凍結乾燥茶葉の元素分布
(A) X線透過像 (B) カリウムの蛍光X線マッピング画像 (C) カルシウムのマッピング画像
(D) リンのマッピング画像 (E) マンガンのマッピング画像 (F) 鉄のマッピング画像
* 各マッピング画像は白色の濃い部分により多くの元素が分布していることを表す。

図3 蛍光X線顕微鏡による茶殺青葉の蛍光X線スペクトル
*図中のKα, Kβ, LαβはそれぞれK系列, L系列のスペクトルを表す。

脈部に、17日後には壊死が周縁の葉肉部に拡大し、明瞭な炭疽病病斑となった。また、接種22～29日後には典型的な炭疽病の大型壊死病斑が形成され、X線透過像でも病斑部が黒く写し出され、明瞭にとらえることができた(図4(B))。

炭疽病壊死病斑の拡大によるカリウムの動態を図4(C)に、カルシウムの動態を図4(D)に示した。葉脈周辺に壊死が拡大する接種17日後、茶葉全体が白く、カリウム、カルシウムが茶葉全体に分布していたが、その後、壊死の拡大とともに壊死病斑部が徐々に黒くなり、カリウムが消失していた(図4(C))。逆に、カルシウムは病斑部の白色が濃くなり、カルシウムが病斑部に蓄積していく様子が認められた(図4(D))。マンガンは、接種29日後の炭疽病罹病葉において、他の部位よりも壊死病斑部に白い点がやや多くみられた程度であり、その動態は判然としなかった(図4(E))。

また、鉄、硫黄およびその他の元素をマッピング画像化した、いずれの元素も炭疽病の壊死病斑部に局在するような動態は認められなかった。

一般に、植物は過度のストレスを受けると葉にクロロシス(黄化)やネクロシス(壊死)症状を発現することが多い。すでに緒言で述べたように、イネでは障害部分におけるカリウムの消失、カルシウム、マンガンの集積が知られているが、チャ炭疽病罹病葉の場合、カリウム、カルシウムは同様の傾向を示したが、マンガンの集積は認められなかった。

一方、炭疽病菌が茶葉に侵入した場合、宿主の抵抗反応として、その部位の細胞壁が部分的に肥厚して菌の侵入を阻止することが報告されている¹⁰⁾。このことから、無機元素の局所への移行が炭疽病菌の侵入に対して何らかの役割を果たしている可能性も考えられた。しかし、無機元素の移行はストレスや壊死によって起きるといわれており、茶葉中のカリウム、カルシウムの動態が炭疽病菌の侵入に対する反応であるのかどうかについては今回の実験からは明らかとならなかった。今後、他の病害における無機元素の移行を調査することによって、無機元素の局在と病害に対する茶樹の反応の関係解明につながるものと期待される。

図4 炭素病罹病葉における病斑拡大と蛍光X線マッピング画像による各元素の動態

(A)炭素病罹病葉写真(写真中の日数は炭そ病菌接種からの日数) (B)X線透過像
(C)カリウムのマッピング画像 (D)カルシウムのマッピング画像 (E)マンガンのマッピング画像

*各マッピング画像は白色の濃い部分により多くの元素が分布していることを表す。

4 摘 要

蛍光X線分析顕微鏡を用いた茶葉の無機元素分析について検討した。その結果、カリウムは成葉、新葉の全体に存在し、新芽の心やや多くみられた。また、カルシウムは成葉や大きな新葉に多く存在し、特に葉柄に多く存在していた。

この方法を用いて、チャ炭疽病に罹病した茶葉の無機成分を分析したところ、カルシウムは次第に炭疽病特有の壊死病斑部に集積し、逆にカリウムは病斑部から消失していった。炭疽病による壊死の進行とともに茶葉中の無機元素が移行することが明らかとなった。

蛍光X線分析顕微鏡による無機元素分析は茶殺青葉および凍結乾燥茶葉中において、その存在部位とその動態を多元素同時に分析することが可能であり、生理障害、病虫害などに対する茶樹の反応を解明するうえで有用な方法であることが明らかとなった。

5 謝 辞

炭疽病、蛍光X線分析法の茶への利用について御助言下さった独立行政法人食品総合研究所流通安全部長永田忠博博士、並びにポット育苗した茶苗を提供下さった静岡県茶業試験場育種研究室長（現静岡県農業水産部お茶室専門監）中村順行氏に厚く御礼申し上げる。

6 引 用 文 献

- 1) WATANABE, H. and Y. KOBAYASHI (1986): X-Ray Induced Transport of Inorganic Elements in Living Rice Leaves Observed with X-Ray Fluorescence Element Mapping Spectrometry. Agric. Biol. Chem. 50(8), 2077-2082.
- 2) 渡辺久男(1990): 蛍光X線マッピング装置による植物モニタリング技法の開発, ぶんせき 2, 155-161.
- 3) 石垣幸三(1978): 茶樹の栄養特性に関する研究, 茶試研報No.14, 134-142.
- 4) 小西茂樹(1991): 茶樹の栄養生理. 村松敬一郎編, 茶の科学, 朝倉書店, pp. 21-32
- 5) 三輪悦夫・高柳博次・中川致之 (1978): 葉位別にみた茶葉の化学成分含量, 茶研報No.47, 48-52
- 6) 池谷賢次郎(1991): 茶の化学成分量とその含有量. 村松敬一郎編, 茶の科学, 朝倉書店, pp. 91-92.
- 7) 永田忠博(1994): 茶葉成分の特徴. 岩浅潔編著, 茶の栽培と利用加工, 養賢堂, pp. 37-44
- 8) 永田忠博(1990): 新しい分析法による茶の品質に係わる成分の研究, 茶研報No.72, 53-58
- 9) 池谷賢次郎・高柳博次・阿南豊正(1990): 茶の分析法, 茶研報No.71, 43-74.
- 10) 安藤康雄・浜屋悦次 (1986): チャ炭そ病菌の侵入に対する宿主の抵抗反応, 茶技研No.69, 35-43.