蛍光 X 線分析を用いたカボチャ種子の 微量分析および産地判別への応用

今井晶子¹, 大高亜生子¹, 中村 哲², 門倉雅史²,
鈴木忠直^{2,3}, 中井 泉^{1*}

¹ 東京理科大学理学部応用化学科

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター

³ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

Determination of Trace Elements in Pumpkin Seeds by X-Ray Fluorescence Analysis and Its Application to Identifying the Geographic Origin of Individual Pumpkins

Akiko Imai¹, Akiko Otaka¹, Satoru Nakamura², Masashi Kadokura²,
Tadanao Suzuki^{2,3} and Izumi Nakai^{1*}

¹ Department of Applied Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of
Science, 1-3 Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8601

² Food and Agricultural Materials Inspection Center, 2-1 Shintoshin, Chuo-ku, Saitama, Saitama 330-9731

³ National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

An easy analytical technique to determine the trace element composition of pumpkin seeds by energy dispersive X-ray fluorescence (XRF) analysis has been developed. Since the trace element compositions of pumpkin seeds reflect the characteristic compositions of the cultivation soils (i.e., the geographic origin of the pumpkin), the XRF technique was used to distinguish between pumpkins grown domestically and abroad. Pumpkin seed samples produced in Japan or imported from New Zealand, Mexico, and Tonga were used as samples, and were freeze-dried and pressed into disks after pulverization. The measurement conditions of an XRF spectrometer equipped with 3-dimensional polarization optics were optimized to carry out accurate quantitative analysis. As a result, linear calibration curves were obtained, and the measured concentrations of a standard sample were in good agreement with those determined by ICP-AES/MS analysis. A total of 118 pumpkin samples were analyzed quantitatively and the results were subjected to multivariate analysis for 12 elements (P, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, Mo, Ba) to discriminate the four geographical origins. LDA models were established based on the results, allowing the discrimination of the four origins of the pumpkin seeds with 70~80% accuracy. The present study shows the advantages of XRF analysis, which only requires an easy sample preparation procedure, over ICP-AES/MS analysis. We foresee future applications of the XRF technique to the widespread analysis of foods.

(Received Sep. 26, 2011 ; Accepted Mar. 24, 2012)

Keywords : pumpkins, inorganic elements, geographic origin, X-ray fluorescence analysis

キーワード : カボチャ, 無機元素, 産地判別, XRF

近年, 外国からの輸入作物が増え, 国内でも地域活性化を目的とした特産品のブランド化が相次いでいる。これにより人々は多くの食品の中からより良いものを選択できるようになり, 結果として食への関心も高まっている。一方, これら消費者の食の意識を悪用し, 外国産を国産と偽る, あるいは特定地域のブランド製品と偽る等で不正に利益を

得る産地偽装が次々と発覚している。平成 14 年以降, JAS 法の改正によりペナルティが大幅に強化されたが¹⁾, 産地偽装は後を絶たない。食が重要視されている現在, 優良な食品の産地保護と, 消費者の食に対する信頼を確保し安心した食生活を送るために産地偽装を客観的に判別する科学的手法が求められている。産地判別に有効な指標の 1 つとして微量元素組成が挙げられる。農作物の微量元素組成は育った土壌の組成や pH, 水分, 有機成分などに影響され²⁾, 微量元素はアミノ酸やビタミンのように変質しないため³⁾ 産地判別法に用いられている。これまで茶葉⁴⁾, ジャガイ

¹ 〒162-8601 東京都新宿区神楽坂 1-3

² 〒330-9731 埼玉県さいたま市中央区新都心 2-1

³ 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

* 連絡先 (Corresponding author), inakai@rs.kagu.tus.ac.jp

も⁵⁾、ワイン⁶⁾、カボチャ⁷⁾等の微量元素組成による産地判別が報告され、分析手法として誘導結合プラズマ発光分析法(ICP-AES)や誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)が用いられている。しかし、これらの手法では、試料の前処理には酸分解等による溶液化が必要なため時間がかかり、試料前処理のために化学実験設備と技術を持つ分析者が整っている環境でないと行えないため流通市場での分析には適さない。一方、同様に多元素分析が可能な手法として蛍光 X 線分析法が挙げられる。この手法は前処理が簡便かつ固体試料の非破壊分析も可能であることから、専門的な知識や技術は不要であり、これまでハウレンソウ⁸⁾、小麦粉⁹⁾、コーヒー豆¹⁰⁾等を対象に産地判別法が開発されている¹¹⁾。将来流通市場での適用を考えると、誰でも扱える分析技術が求められており、蛍光 X 線分析法は、そのような要求に答えることが期待できる手法である。ただ、食品分析への蛍光 X 線分析の応用は始まったばかりであることから、本研究ではこのような利点を持つ蛍光 X 線分析法を用いた食品の簡易・迅速な定量分析法の確立を目的として研究を進めた。そして、その応用としては食品の産地判別法の開発を目的として、ICP-AES/MS による分析ですでに産地判別が報告されているカボチャ⁷⁾について、比較して検討を加えた。

実 験 方 法

1. 装 置

分析装置には三次元偏光光学系エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 Epsilon 5 (PANalytical 製)を用いた。エネルギー分散型は感度が波長分散型に比べて低いといわれるが、本装置は偏光光学系を採用し、3つの直行する軸上に X 線管球、2次ターゲット、試料部、検出器が配置されている。この光学系を用いることでバックグラウンドが大幅に低減し S/N 比が向上される。また2次ターゲット材を選択できることから、分析元素に応じて最適な単色 X 線に近い励起エネルギーを選択でき、100 kV 励起の Gd 管球と Ge 検出器を用いることで重元素(～Nd)の K 線励起による高エネルギー蛍光 X 線分析が可能である。以上の特長から、本装置は食品中の高感度微量元素分析に適していると期待される。

2. 試 料

実試料には日本産 65 試料、ニュージーランド産 21 試料、メキシコ産 16 試料、トンガ産 16 試料の計 118 試料のカボチャを用いた。測定部位は産地間の差に影響しないよう個体差が小さく、コンタミネーションが少ないと考えられる種子と種皮を選択した。定量には検量線法を用いた。蛍光 X 線の定量における検量線の作成には、主成分が C, H, O などの軽元素で構成され、金属元素を微量元素として含む植物や穀物の以下の標準物質を用いた：NIST SRM 1515 (Apple Leaves)、NIST SRM 1567a (Wheat Flour)、NIST

SRM 1570a (Spinach Leaves)、NIST SRM 1573a (Tomato Leaves)、NMIJ CRM 7501-a, 7502-a (白米粉末)、NIES CRM No.10-a,b,c (玄米粉末)。蛍光 X 線におけるマトリックスの効果は、主に共存元素による励起 X 線、蛍光 X 線の吸収および励起現象として表せる。食品の構成成分の 99% は、炭水化物・脂質・タンパク質などの C, H, N, O を主成分としている。従って、本研究で用いたこれらの認証標準物質はカボチャと同質のマトリックスを持つものとして蛍光 X 線分析では扱うことが可能である。

3. 試料調製

蛍光 X 線分析では、定量値・分析の再現性を確かなものとするために試料形状を均一にする必要がある。一般的には粉碎により試料を微粉末にした後、圧力を加え錠剤化する手法が用いられる¹²⁾。正確な定量分析を行うため、本研究では最適な試料調製法を検討し、その形状を均一にして分析に用いた。

まず試料は凍結乾燥機で 24 時間乾燥させた。次にジルコニア製のミキサーミル (MM400 RETSCHE 製)で約 20 秒間粉碎した。錠剤成型器を用いて、6 tonf/cm³で3分加圧成型した。錠剤化した試料は専用のプラスチックカップとマイラー膜 (2.5 μm) を用いて固定し、分析に供した。また錠剤化の際に試料から油が流出するものがあつたので、この油をろ紙に含ませ同様にマイラー膜ではさんでカップに取り付け測定した。

食品は C, H, O といった軽元素が主成分であり励起 X 線が試料に吸収されずに深く浸入するため、その試料厚み(試料量)により蛍光 X 線の強度が変化してしまう。よって蛍光 X 線強度がそれ以上変化しない試料の厚み(無限厚)と、各ピークのバックグラウンド強度を用いてマトリックス効果を補正した規格化強度での変化を調べ、分析に用いる試料量を決定した。元素は Al₂O₃ターゲットで効率良く励起可能な Mo, Sr, Rb で検討した。なお分析対象の実試料の量が少ないことから、これらの検討には市販のカボチャの種子(日本産)を同様の試料調製を行い用いた。

4. 測定条件の検討

微量元素を高感度に分析するために装置の測定条件の検討および最適化を行った。検討には日本産 1 試料を用いた。まず装置に内蔵されている計 10 個の 2 次ターゲット (Al₂O₃, Ag, Mo, Zr, Ge, Fe, Ti, Al, CsI, Rh) から分析に最適なターゲット材を選択した。試料に照射される X 線のエネルギーは、分析対象元素の吸収端よりもやや高エネルギー側であるとき対象元素の励起効率が良い¹³⁾。よって、より多くの元素を効率良く励起可能な 2 次ターゲットを調べ、選択した。次に決定した各 2 次ターゲットを用いた時のそれぞれの測定時間を検討した。本研究では迅速な分析法の開発を目的としているため、時間検討では S/N 比と合計測定時間の兼ね合いを考慮しながら決定した。

5. 定量法

蛍光 X 線分析における定量法は、Fundamental Parameter 法 (FP 法) と検量線法の 2 種類がある。FP 法では多くの標準物質を用意する必要はないが軽元素では認証値とのずれが大きく、農産物食品のように軽元素が主成分の場合はマトリックスによる吸収が少ないことから検量線法による定量値の方が多くの元素において正確であると報告されている⁸⁾。そこで、本研究では検量線法を用いた。検量線は、前述した標準物質 9 試料を用いて最適化した条件を用いて作成した。

6. 定量値の評価

最適化した測定条件、標準物質から作成した検量線を用いて、本試料の測定、定量を行った。得られた定量値は、先行研究⁷⁾で得られた同一試料のカボチャの ICP-AES/MS による定量値と比較してその整合性を評価した。ICP-AES/MS による定量値が記載されていない元素については標準物質の認証値と得られた定量値の不確かさを考慮して値を評価し¹⁴⁾、不確かさが得られない場合は評価のずれ (Deviation) D (%) を式 (1) によって算出して整合性を調べた。また標準物質を用いて、食品中の各元素に対して最小検出限界 (Lower limit of detection, LLD) を式 (2)¹⁵⁾ から算出し、どのくらいまで検出できるかを調べた。このときのピーク強度、バックグラウンド強度は、本装置付属のソフトウェアによるピークフィッティング、ピーク分離を行って算出した。

$$D(\%) = \frac{[M]_{\text{measured}} - [M]_{\text{certified}}}{[M]_{\text{certified}}} \times 100 \quad (1)$$

$$LLD = 3 \frac{c}{I_{\text{net}}} \sqrt{\frac{I_{\text{BG}}}{t}} \quad (2)$$

ここで $[M]_{\text{measured}}$: 求めた元素濃度 (ppm), $[M]_{\text{certified}}$: 認証値 (ppm), c : 化学分析値 (ppm), I_{net} : ネット強度 (cps), I_{BG} : バックグラウンド強度 (cps), t : 測定時間 (s) である。一般的に検出下限はブランク試料の測定値の統計変動の 3 倍として与えられる。式 (2) はブランク試料からではなく、認証値が与えられている標準試料の測定から同様の検出下限を求めるための理論式で¹⁵⁾、蛍光 X 線分析では広く用いられている。

7. 統計処理

本試料を分析、定量後、一元配置分散分析と多重比較検定を用いて 4 産地 (日本、ニュージーランド、メキシコ、トンガ) 間で定量値に差がある元素を調べ¹⁶⁾、各産地の元素組成を特性化するために主成分分析を行った。本研究では適用範囲が広い Scheffe 法による多重比較検定を行った。その後、解析で得られた情報を用いて線形判別分析を行い 4 産地それぞれ判別できる式を構築した。統計処理には StatPartner2.0 (NEC ソフトウェア製) を用いた。

図1 試料量による蛍光 X 線強度の変化
(Al_2O_3 ターゲット, 3600 秒)

実験結果および考察

1. 試料量

図1にカボチャ種子を試料として、試料量を変化させたときの Mo, Sr, Rb の蛍光 X 線強度の変化の図を示した。図1から試料量が増加するにつれて蛍光 X 線強度は増加し 2.0 g (厚さ 4 mm) から一定となったことから、試料の無限厚は 4 mm と分かる。一方、規格化強度は、1.0 g (厚さ 2 mm) から一定となっている。よって本研究では用いることができる試料量が限られている場合を考慮し、試料量は 1.0 g で規格化強度を用いて定量を行うこととした。

2. 測定条件の最適化

2 次ターゲット検討では軽元素側 (1~10 keV) は Al, Ti, Fe, Ge, Al_2O_3 ターゲットを、重元素側 (11 keV~) は Rh, Zr, Ag, CsI, Mo, Al_2O_3 ターゲットと、軽元素・重元素の励起に適していると思われるターゲットで分けて行った。各々蛍光 X 線スペクトルを確認し、試料のピークがターゲット材由来の散乱 X 線およびそのエスケープピークと重ならず、励起効率が良いターゲットを調べた。その結果、軽元素側では Ca までの元素と Mn~Zn を効率良く励起する Ti, Ge ターゲットを、重元素側では Br~Sr を効率良く励起する Mo と、Ba が分析可能な Al_2O_3 ターゲットを選択した。各 2 次ターゲットで分析する元素とその規格化方法を表1にまとめた。

次に各ターゲットでの測定時間を検討した。本研究では 300 秒~7200 秒の範囲で測定時間 (Real time) を変化させ、ターゲットの検討と同様に各時間の蛍光 X 線スペクトルを比較して元素のピークが良く確認できるものを選択した。 Al_2O_3 ターゲットでの検討結果を図2に示す。図2より、Mo ピークは測定時間 1800 秒以上で確認できたが、Ba は 7200 秒でもピークが見えにくい。しかし、ICP-AES/MS によるカボチャの産地判別において Ba は国産と外国

産（特に日本-ニュージーランド間）の判別に用いられている有効な元素であることが報告されている⁷⁾。本研究ではできるだけ短時間に分析を行えることも目的としているため、 Al_2O_3 ターゲットでは3600秒で分析を行い、算出したBaの定量値を評価してから統計処理にBaを適用するかを判断した（後述）。同様にピークの有無からTi, Moターゲットでは600秒, Geターゲットでは300秒の測定時間とした。全測定時間は不感時間（デッドタイム）を考慮す

図2 Al_2O_3 ターゲットでの測定時間の検討
測定時間：(a), 300秒；(b), 600秒；(c), 1800秒；
(d), 3600秒；(e), 7200秒。

ると1試料約1時間40分となる。同タイプの三次元偏光光学系蛍光X線分析装置による産地判別の先行研究⁸⁾⁹⁾では1試料3時間以上を要していたが、本研究ではより迅速な測定が可能となった。

3. 検量線の作成とICP-AES/MSの定量値との比較

9種類の標準物質を最適化した条件で分析し、最低でも3つの標準物質を用いて検量線を作成した。図3に検量線の一例としてMn, Zn, Srの検量線を示す。図3に見られるように全部で14元素(P, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, Mo, Ba)に対して直線性の良い検量線($r^2=0.9804\sim 1.0000$)を作成できた。この作成した検量線と最適化した測定条件を用いて、カボチャの種子試料を定量分析した。得られた定量結果を表2に示す。また同一試料3点におけるICP-AES/MSによる定量値⁷⁾と本研究で得られた定量値とを比較した結果を表3に示した。Fe, BrについてはICP-AES/MSによる定量値の記述がなかったため、NIST SRM 1515 (Apple Leaves), NIST SRM 1573a (Tomato Leaves), NIST SRM 1567a (Wheat Flour)と(1)式を用いてBrにおいては不確かさの記載がない参考値だったため得られた定量値とのずれを算出した。Feは拡張不確かさ U_Δ と認証値との差の絶対値 Δ_m を算出して評価した（表4, 5）。表3から蛍光X線分析による定量値は

表1 各2次ターゲットと分析対象元素

2次ターゲット	測定元素	規格化
Ti	P, S, K, Ca	2次ターゲットのコプトン散乱強度
Ge	Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn	
Mo	Br, Rb, Sr	
Al_2O_3	Mo, Ba	BG強度

図3 定量分析用の検量線 ppm（質量分率）

表 2 XRF による各産地のカボチャの定量結果*

	日本 (n=65)	ニュージーランド (n=21)	メキシコ (n=16)	トンガ (n=16)
P	$6.33 \times 10^3 \pm 0.70 \times 10^3$	$6.11 \times 10^3 \pm 0.80 \times 10^3$	$6.09 \times 10^3 \pm 0.75 \times 10^3$	$5.70 \times 10^3 \pm 0.38 \times 10^3$
K	$7.12 \times 10^3 \pm 1.92 \times 10^3$	$6.12 \times 10^3 \pm 0.70 \times 10^3$	$6.74 \times 10^3 \pm 0.87 \times 10^3$	$5.19 \times 10^3 \pm 0.76 \times 10^3$
Ca	790±180	781±120	959±210	863±68
Mn	29±7	27±3	27±2	31±3
Fe	68±12	70±16	62±10	68±5
Co	0.041±0.032	0.023±0.024	0.023±0.023	0.057±0.020
Ni	1.88±2.57	3.04±2.32	1.09±0.55	0.22±0.20
Cu	6.8±1.3	6.7±0.9	6.5±0.6	7.1±0.3
Zn	65±10	59±6	54±6	62±3
Br	0.6±1.0	16.9±29.0	1.9±1.0	80.7±11.4
Rb	5.6±2.5	11.5±7.6	3.7±1.5	3.0±0.7
Sr	1.7±0.8	2.7±0.8	10.4±5.9	4.2±1.0
Mo	1.4±0.6	1.2±0.6	1.9±0.8	0.5±0.1
Ba	0.60±0.60	0.50±0.40	1.00±0.60	0.22±0.17

* 乾燥重量あたり, 平均値±標準偏差で表記.

ppm: 質量分率.

表 3 XRF と ICP-AES/MS⁷⁾ による定量値の比較*

	日本 ICP-AES/MS	日本 XRF	ニュージーランド ICP-AES/MS	ニュージーランド XRF	メキシコ ICP-AES/MS	メキシコ XRF	トンガ ICP-AES/MS	トンガ XRF
P	$6.93 \times 10^3 \pm 0.34 \times 10^3$	$5.78 \times 10^3 \pm 0.17 \times 10^3$	$7.74 \times 10^3 \pm 0.96 \times 10^3$	$6.26 \times 10^3 \pm 1.00 \times 10^3$	$7.79 \times 10^3 \pm 0.23 \times 10^3$	$6.32 \times 10^3 \pm 0.18 \times 10^3$	$7.62 \times 10^3 \pm 0.38 \times 10^3$	$5.76 \times 10^3 \pm 0.19 \times 10^3$
K	$6.32 \times 10^3 \pm 0.57 \times 10^3$	$5.65 \times 10^3 \pm 0.15 \times 10^3$	$6.66 \times 10^3 \pm 1.52 \times 10^3$	$5.93 \times 10^3 \pm 1.20 \times 10^3$	$8.41 \times 10^3 \pm 0.77 \times 10^3$	$7.44 \times 10^3 \pm 0.92 \times 10^3$	$5.74 \times 10^3 \pm 0.38 \times 10^3$	$4.92 \times 10^3 \pm 0.21 \times 10^3$
Ca	568±79	753±90	572±163	740±189	645±74	861±92	713±19	848±68
Mn	27±7	28±5	26±4	27±3	25±1	26±1	36±3	33±1
Fe	—	68±12	—	70±16	—	62±10	—	68±5
Co	0.059±0.046	0.017±0.018	0.013±0.004	0.015±0.013	0.046±0.025	0.026±0.023	0.126±0.023	0.072±0.011
Ni	1.81±1.47	2.15±1.90	2.59±0.99	3.35±1.09	0.72±0.11	1.35±0.95	0.16±0.03	0.40±0.34
Cu	6.6±1.4	6.5±1.2	6.8±1.9	6.8±1.2	6.2±0.2	6.0±0.1	7.2±0.4	6.7±0.2
Zn	60±8	60±4	59±7	57±5	57±4	54±3	67±2	62±4
Br	—	0.6±1.0	—	16.9±29.0	—	1.9±1.0	—	80.7±11.4
Rb	4.5±3.9	5.0±3.8	15.7±13.7	16.1±12.9	3.3±1.1	3.7±1.0	2.6±0.6	2.8±0.6
Sr	2.6±2.4	2.5±2.5	2.8±0.8	2.8±0.8	8.7±4.4	8.7±4.6	4.3±0.4	4.2±0.4
MO	1.5±0.4	1.2±0.3	1.3±0.6	1.2±0.6	3.2±0.6	2.4±0.5	0.5±0.1	0.5±0.1
Ba	0.20±0.12	0.23±0.20	0.43±0.16	0.56±0.33	0.90±0.20	0.73±0.24	0.29±0.03	0.24±0.12

* 乾燥重量あたり, 平均値±標準偏差で表示 (n=3).

ppm: 質量分率.

表 4 認証標準物質の認証値と測定値の比較 (Fe)

	定量値 /ppm (n=3)	認証値 /ppm	拡張不確かさ U _Δ	差の絶対値 Δ _m
Wheat Flour	13.9±0.9	14.1±0.5	2.1	0.2
Apple Leaves	76±1	83±5	10.3	6.9
Tomato Leaves	369±2	368±7	14.5	1.3

包含係数 k=2. ppm: 質量分率.

表 5 認証標準物質の認証値と測定値の比較 (Br)

	定量値 /ppm (n=3)	認証値 /ppm	ずれ (%)
Apple Leaves	1.4±0.06	1.8	20.6
Wheat Flour	7.2±0.3	6.0	20.3
Tomato Leaves	1300±16.0	1300.0	1.7×10^{-6}

ppm: 質量分率.

P, Ca など軽元素ではやや両者の差が大きい, その他の元素は ICP-AES/MS による定量値と良い一致を示した. ここで厳密な値の比較のため, 室間再現標準偏差 $\hat{\sigma}_R$, 再現許容差 R を, 分析対象試料の種類, 定量法に関わらず, 濃度の変数になるとされる Horwitz の式 (3), (4)¹⁶⁾¹⁷⁾ から算出した.

$$\hat{\sigma}_R = 0.02 c^{0.8495} \quad (3)$$

$$R = 2.8 \times s_R \quad (4)$$

ここで $\hat{\sigma}_R$ は空間再現標準偏差, c は質量分率である。その結果, 定量値で差があった P, Ca 以外では許容差を常に超える元素は見られなかった。P, Ca の他にメキシコ産では Ni, Rb, トンガ産では Ni において許容差を僅かに超える結果となったが, これらの元素はばらつきが大きい, 又は微量のために許容差を超えたものと思われる。なおこれらの元素について t 検定により ICP-AES/MS と XRF の定量値との有意差を検証したところ, 有意差はないと認められた。P の定量値は, 各産地とも ICP-AES/MS の定量値の約 80% となり, 蛍光 X 線分析による値が ICP-AES/MS の値よりも低くなる系統誤差と考えられる。これは蛍光 X 線分析では軽元素の分析精度が低く, 検量線の精度や, マトリックスの影響を受けていることが要因と考えられる。P, Ca は定量値に差が見られたが, XRF, ICP-AES/MS とともに相対標準偏差を算出したところ, 両者の値は近い値となり, 絶対値には違いがあるものの各産地の濃度変動は同様の傾向を示すため, 以後の統計処理に使用した。また Ba も許容差の範囲内におさまっていたため, 適用していくこととした。しかし, Co については本装置付属のソフトウェアによるピーク分離において Fe の K β ピークとの分離に難があったため, 信頼性に欠けると判断して統計処理からは除外した。表 4, 5 から高濃度側では認証値と良く一致しているが, 低濃度側で Br は約 20% のずれが見られ, 標準物質を増やす等, 定量真度の向上には検討の余地が見られる。しかし Fe は差の絶対値 Δ_m が拡張不確かさ U_Δ よりも小さく, 実試料の定量結果 (表 3) から多くの元素において再現許容差の範囲内におさまっていたため, 本法の定量値と ICP-AES/MS で得られた定量値との整合性を確認した。ただし, 厳密な定量精度に関しては課題が残る。

次に NIST SRM 1515 (Apple Leaves), NIES CRM 10-c (玄米粉末) を用いて, (2) 式から最小検出限界 (Lower limit of detection, LLD) を求めたところ, 重元素はサブ ppm レベルの定量が可能であることが分かった (表 6)。以上より, 本法はカボチャに含まれる微量元素の, 簡便な高感度定量法として有用であると考えられる。

また錠剤化の際に流出した油をろ紙に含ませ, 油に含まれる無機元素を定性分析した。ブランクとして何も含まれていないろ紙と, 各産地 3 試料ずつ油を測定し, 蛍光 X 線スペクトルで違いを確認した。その結果, ニューゼーランド産, メキシコ産, 特にメキシコ産試料において K のピークが大きく現れており, K が油に含まれ流出していることがわかった。そのほかの元素ではブランクと大きな違いは見られなかった。油の流出量は試料によって様々であり, K がどれくらい流出するか正確な値は予測できない。

表 6 蛍光 X 線分析法の検出限界 ppm (質量分率)

元素	検出限界
P	21
K	2.5
Ca*	0.44
Mn	0.44
Fe	0.40
Ni*	0.13
Cu	0.11
Zn	0.12
Br	0.14
Rb	0.12
Sr	0.11
Mo	0.078
Ba	0.45

試料: NIST SRM 1515 (Apple Leaves),

*印は NIES CRM 10-c (玄米粉末)。

よって Co と同様に, 定量値の信頼性の欠如から産地判別のための統計処理には K の定量値は用いなかった。

4. 産地判別への応用

実試料の各元素の定量値を用いて, 有意水準 95% の一元配置分散分析, 多重比較検定を行い, 産地間の元素濃度を比較した¹⁸⁾。一元配置分散分析を行った結果, P, Ca, Mn, Ni, Zn, Br, Rb, Sr, Mo, Ba において 4 産地間で有意差が認められたため, これら元素について多重比較検定を行った。その結果, 3 産地以上で有意差が認められた元素: Br, Rb, Sr, Mo。一部の産地間で有意差が認められた元素: P, Ca, Ni, Zn, Ba と, どの産地間でどの元素に有意差が認められたかを見出すことができた。

これらの結果を参考に元素を選択して主成分分析を行った。主成分分析では 2 軸に用いる主成分の累積寄与率が 50% 以上となるように用いる元素を選択し分析を行った。主成分得点プロットおよび因子負荷量プロットを図 4 に示す。図 4 より Br, Rb, Sr, Mo と Zn, Ba を用いることで, 各産地のプロットが特徴的な分布を示していることが分かる。特にトンガ産試料は図 4 の上部に位置しており, 第 2 主成分に対する Br の寄与が大きい又は Mo の寄与が小さいと考えられる。メキシコ産, ニューゼーランド産試料は全体的に分布が広がり, 同一産地内で組成がばらついてることが分かった。図 4 からメキシコ産, トンガ産, ニューゼーランド産試料は明確に分離していたが, ニューゼーランド産試料と日本産試料はプロットで一部重なりが見られた。そこで日本産とニューゼーランド産の 2 産地間で t 検定 (有意差 95% 水準) を行い, 有意差が認められた元素 (Mn, Zn, Ni, Br, Rb, Sr, Mo) を用いて主成分分析を行ったところ, 図 5 に示すように日本とニューゼーランドの分布は図 4 より分かれたが, 明確に識別するには難しい結果となった (図 5)。

図4 4産地での主成分得点プロットと因子負荷量プロット

◆, 日本; □, メキシコ; ×, ニュージーランド; ○, トンガ.

図5 日本-ニュージーランド間での主成分得点プロットと因子負荷量プロット

◆, 日本; ×, ニュージーランド.

次に線形判別分析により, 産地を判別する式を構築した. 2 群間を分ける式を構築するため, 日本-ニュージーランド, 日本-トンガなど2 産地ごとに判別式を構築した. 元素は偏 F 値に基づき判別式に大きく寄与する元素から取捨選択し, 判別式を何種類か構築した. その中で最も高い判別率を示した式を以下 (5)~(10) に示す.

日本-ニュージーランドの判別式:

$$Y = -0.0859 [\text{Fe}] + 0.0774 [\text{Zn}] - 0.031 [\text{Br}] - 0.3325 [\text{Rb}] \\ - 1.8392 [\text{Sr}] - 1.0661 [\text{Mo}] + 1.9664 [\text{Ba}] + 8.531 \quad (5)$$

日本-メキシコの判別式:

$$Y = 0.0012 [\text{P}] - 0.1592 [\text{Fe}] + 0.133 [\text{Zn}] - 1.545 [\text{Sr}] \\ - 4.7978 [\text{Mo}] + 12.13 \quad (6)$$

日本-トンガの判別式:

$$Y = 0.3338 [\text{Mn}] - 0.7341 [\text{Cu}] - 2.9725 [\text{Br}] + 0.4723 [\text{Rb}] \\ + 4.0075 [\text{Mo}] + 1101.483 \quad (7)$$

ニュージーランド-メキシコの判別式:

$$Y = 0.0061 [\text{P}] - 1.4412 [\text{Mn}] + 0.2411 [\text{Rb}] - 0.7638 [\text{Sr}] \\ - 10.3478 [\text{Mo}] + 21.1559 \quad (8)$$

ニュージーランド-トンガの判別式:

$$Y = 0.0479 [\text{Ca}] - 0.231 [\text{Br}] + 1.0221 [\text{Rb}] - 4.6475 [\text{Sr}] \\ + 5.4936 [\text{Mo}] - 24.2564 \quad (9)$$

メキシコ-トンガの判別式:

$$Y = 0.0614 [\text{Ca}] + 2.2388 [\text{Mn}] - 1.5607 [\text{Br}] - 5.2506 [\text{Rb}] \\ + 19.0087 [\text{Mo}] - 62.5322 \quad (10)$$

ここで [Fe], [Zn], [Br], [Rb], [Sr], [Mo], [Ba], [P], [Mn], [Cu], [Ca] はそれぞれの元素の試料中濃度 (ppm, 乾燥重量

図 6 判別フローチャート

図 7 判別得点プロット

(a) 式 (11) と式 (12) を用いた場合.

(b) 式 (11) と式 (13) を用いた場合.

◆, 日本; ○, ニュージーランド; △, メキシコ; ■, トンガ.

あたりの定量値)を示す。各式により算出された判別得点が正か負かによって2群間を分けることができる。主成分分析でトンガ産はBrの寄与が大きい、又はMoの寄与が小さいという結果が得られたが、トンガ産を判別する式の偏F値を比較すると、Brの偏F値が最低でも7倍以上高く、トンガ産ではBrの寄与が大きいことが分かる。

本研究では簡易・迅速な判別を目的としているため、より簡易で一意的なモデルとして4産地を2段階で判別する方式を検証した。図6のようなフローチャートを作成し、式(11)で日本、ニュージーランドとメキシコ、トンガを判別し、式(12)、式(13)で日本-ニュージーランドとメキシコ-トンガを判別した。この判別方法を用いることで、未知試料の判別の際にどこの産地かの位置づけが2産地ごとの判別よりも容易となり、少ない式数で判別できる。式(12)ではt検定で日本-ニュージーランド間で差があるとされた元素、式(11)および式(13)は多重比較検定でそれぞれの産地間で差があるとされた元素を用いて構築した。

$$Y = 0.0042 [\text{Ca}] - 0.1854 [\text{Br}] + 0.5497 [\text{Rb}] - 1.4566 [\text{Sr}] - 2.5464 [\text{Mo}] + 7.8097 \quad (11)$$

$$Y = 0.033 [\text{Mn}] - 0.2562 [\text{Ni}] + 0.0331 [\text{Zn}] - 0.0349 [\text{Br}] - 0.2308 [\text{Rb}] - 1.2242 [\text{Sr}] - 0.5971 [\text{Mo}] + 3.37 \quad (12)$$

$$Y = -1.1893 [\text{Br}] - 3.0562 [\text{Rb}] + 0.754 [\text{Sr}] - 6.21 [\text{Mo}] + 8.7407 [\text{Ba}] + 40.9237 \quad (13)$$

ここで[Ca], [Br], [Rb], [Sr], [Mo], [Mn], [Ni]および[Zn]はそれぞれの元素の試料中濃度(ppm, 乾燥重量あたりの定量値)を示す。実試料の定量値を式(11)および式(12)に代入し各判別得点をプロットしたものと、同様に式(11)および式(13)の判別得点をプロットしたものを図7に示す。式(11)および式(12)は日本とニュージーランドを判別する式であり、図7(a)からプロット右上部に日本産、右下部にニュージーランド産が分布していることから、二式が、日本産とニュージーランド産を識別しているが、分布から明確に分けるには改善が必要である。メキシ

表 7 各産地の判別正答率 (%)

産地	2産地ごとの判別	ICP-AES/MSでの判別	フローチャートでの判別
日本	88	90	88
ニュージーランド	71	78	62
メキシコ	75	88	75
トンガ	100	—	100

コ産、トンガ産の2産地は式(11)および式(13)を用いることで明瞭に識別することができた。

これら判別法の正答率を算出するため 10-fold cross validation を行い、2産地ごとの判別は ICP-AES/MS による判別⁷⁾と比較した(表7)。表7より、4産地を約70~80%の正答率で判別可能と分かる。フローチャート方式での判別は2産地ごとの判別よりも正答率は低く誤判別リスクが高いため、より正答率を向上することが課題となる。トンガ産では2産地ごとの判別、フローチャートでの判別ともに正答率100%となったが、これはトンガ産で特徴的であった Br の寄与が判別に貢献していると考えられる。今回の XRF 法で得られた定量値に基づくカボチャ種子の判別は、正答率からは不十分であり、本法を判別法として確立するには、着目元素を増やすなどのさらなる改善が必要であろう。

結 言

三次元偏光光学系エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置を用いて、乾燥後、粉碎し錠剤成形するだけという、湿式分解のために化学実験室を必要とする ICP-AES/MS 法に比べて簡便な前処理、かつ1時間40分という短時間の測定でカボチャ種子における無機元素組成の高感度定量分析を行うことができた。産地判別に有力な重元素もサブ ppm レベルで分析でき、得られた定量値は試料調製過程で油から流出した K とピーク分離ができなかった Co を除いて整合性が示された。また実試料を用いた統計処理から、日本、ニュージーランド、メキシコ、トンガの4産地を70~80%の正答率で判別可能であった。測定元素数を増やす等、産地判別にはさらなる改良が必要であるが、カボチャの微量元素の簡便な定量法としては蛍光 X 線分析が有効であることを示すことができた。特に ICP-AES/MS では測定が難しいとされる Br を簡易迅速に分析でき、トンガ産で多く含まれていると分かったことは今後の食品分析への本法の応用にあって有益な情報と言える。今後、より明確な判別を行うためには、分析試料数を増やし、Co など測定できなかった元素の定量化や、検量線精度の向上を目指し、判別式を改善することなどが有用であることが予想される。本研究で開発した蛍光 X 線による食品の微量元素分析法が、将来商品検査での簡易、迅速なスクリーニング法として多くの食品に適用されることも期待され

る。

要 約

蛍光 X 線分析による食品中の微量元素の簡易・迅速な分析法の開発を行ったところ、三次元偏光光学系エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置を用いることで以下のように、カボチャ種子の無機元素組成の高感度定量が可能であった。最適化した測定条件で検量線を作成した結果、14 元素 (P, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, Mo, Ba) で直線性の良い検量線が得られた。また各元素の検出限界を算出したところ、重元素ではサブ ppm レベルの定量が可能であった。そこで、産地判別への応用を試み、カボチャ種子(日本、ニュージーランド、メキシコ、トンガ)計118試料を定量し、産地間で有意な差が見られた元素の定量値を用いて多変量解析を行った結果、4産地を判別する式を構築し、その正答率は70%~80%となった。本研究により、簡便な試料前処理で高感度な定量分析が可能な蛍光 X 線分析の食品分析における有用性を示すことができた。

研究に関してご助言下さいました東京電機大学の保倉明子准教授に深く感謝致します。

文 献

- 食品表示の監視について、農林水産省の web site <http://www.maff.go.jp/j/jas/kansi/index.html> (2011 年 3 月アクセス確認)
- Ariyama, K. and Yasui, A., *JARQ*, **40**(4), 333-339 (2006).
- Di Giacomo, F., Del Signore, A. and Giaccio, M., *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 860-866 (2007).
- Marcos, A., Fisher, A., Rea, G. and Hill, S. J., *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**, 521-525 (1998).
- Anderson, K.A., Magnuson, B. A., Tschirgi, M. L. and Smith, B., *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1568-1575 (1999).
- Maarse, H., Slump, P., Tas, A. C. and Schaefer, J., *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, **184**, 198-203 (1987).
- 門倉雅史, 法邑雄司, 渡邊裕之, 堀田 博, 鈴木忠直, 安井明美, 日本食品科学工学会誌, **57**, 78-84 (2010).
- 築田陽子, 保倉明子, 松田賢士, 水平 学, 中井 泉, 分析化学, **56**, 1053-1061 (2007).
- 大高亜生子, 築田陽子, 保倉明子, 松田賢士, 中井 泉, 分析化学, **58**, 1011-1022 (2009).
- 赤峰生朗, 大高亜生子, 保倉明子, 伊藤勇二, 中井 泉, 分析化学, **59**, 863-871 (2010).
- “食品表示を裏づける分析技術”, 2 章, 日本分析化学会 表示・起源分析技術研究懇談会編, (東京電機大学出版局), (2010).
- Margui, E., Queralt, I. and Hidalgo, M., *Trends in Anal. Chem.*, **20**, 1-11 (2009).
- Margui, E., Van Meel, K., Van Grieken, R., Buendia, A., Fontas, C., Hidalgo, M. and Queralt, I., *Anal. Chém.*, **81**, 1404-1410 (2009).
- Linsinger, T., Application Note 1 測定結果と認証値との比較, http://irmm.jrc.ec.europa.eu/reference_materials_catalogue/user_support/erm_application_notes/application_

-
- note_1/Documents/erm_application_note_1_japanese. pdf,
(2012 年 3 月アクセス確認).
- 15) 西埜 誠, “蛍光 X 線分析の実際”, 16 章, 中井 泉編, (朝倉書店), (2005).
- 16) 永田忠博他, “食品分析法の妥当性確認ハンドブック”, pp. 26-28, (株式会社サイエンスフォーラム), (2007).
- 17) Thompson, M., *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).
- 18) 門倉雅史, 臼井裕一, 有山 薫, 日本食品科学工学会誌, **53**, 489-497 (2006).
(平成 23 年 9 月 26 日受付, 平成 24 年 3 月 24 日受理)
-