

食品素材のミネラル分析に関する研究 II

松田貴志*・山本展久*・佐野一成*・後藤優治*・松田みゆき*・北嶋俊朗**・竹中智哉***

*食品産業担当・**工業化学担当・***電子・情報担当

Research of Analysis of Minerals in Foods

Takashi MATSUDA*, Nobuhisa YAMAMOTO*, Kazunari SANNO*, Yuji GOTO*,

Miyuki MATSUDA*, Toshiro KITAJIMA**, Tomoya TAKENAKA***

*Food Industry Section, **Industrial Chemistry Section,

***Electronics and Information Technology Section

要 旨

食品中の微量元素の分析方法の確立を目指し、定量分析条件の検討に取り組んだ。乾燥海藻（ひじき）を試料として検討したところ、Ag, As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mn, Na, Ni, Rb, Se, Sr, Tl, V, Zn 及び P で、おおむね正確な定量結果が得られた。この結果をもとに、微量元素定量値を産地判別に应用できるか検討したところ、国内産及び国外産の乾燥海藻（ひじき）に対し、統計解析することで高い的中率で産地を判別できた。一方で、国内産と県内産の判別では数検体で誤判別の発生がみられた。

1. はじめに

食品には通常塩分由来の Na が多量に含まれることが多く、他に含まれる元素、特に微量元素の定量分析は難しい。その中、近年では消費者の健康志向を受け、微量ミネラル成分の機能性も注目され、食品中の微量元素分析の必要性が増してきた。また、食品の安全面から重金属の個別基準が設定され、微量な重金属の元素分析の必要性も高まってきている。

そこで、こうした状況に 대응するため、当センターが保有する分析機器を使用し、食品中の無機元素の定量分析条件を検討することとした。試料は、Na 等の主要な元素と他の微量な元素を豊富に含むという点、分析への水分量の影響が少ない点、さらに前処理方法に制約がある硬質試料である点から、乾燥海藻（ひじき）を選択した。

また、平成 29 年には、すべての加工食品を対象に原材料の産地表示を義務付けるように食品表示基準が改正された。しかしながら、産地の表示ミスや産地偽装が発生しており、これに対し、ワカメやコンブ等の海藻に含まれる微量元素量等を利用した生産地の判別は、すでに先行事例が報告されている¹⁻²⁾。

本研究では、食品中の微量元素の分析条件を検討した後、産地の明らかな検体を収集、分析し、産地判別にも应用できるかを検証した。

2. 方 法

分析方法として、試料を酸分解後、ICP 質量分析法（以下「ICP-MS」という。）または ICP 発光分析法（以下「ICP-OES」という。）を適用した。

2.1 試薬

ひじき粉末の認証標準物質として CRM 7405-b（産業技術総合研究所計量標準総合センター）を使用した。CRM 7405-b は、含有する無機元素の濃度として、As, Cd, Cu, Mn 及び Zn の 5 元素について認証値が付され、Al, Ba, Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Na, Ni, P, Pb 及び Sr の 13 元素について参考情報値が提供されている。Table1 に CRM7405-b に付されている認証値、Table2 に参考情報値を示す。CRM 7405-b の認証値は、乾燥質量換算質量分率で示されているため、水分含量を別途測定し、定量値を補正した。

酸は、60%硝酸（硝酸（1.38）有害金属測定用、富士フイルム和光純薬）を使用した。

Table 1 CRM 7405-b に係る無機元素の認証値

元素	認証値 (mg/kg)	拡張不確かさ (mg/kg)
As	49.5	1.0
Cd	1.25	0.04
Cu	4.48	0.12
Mn	22.6	0.5
Zn	13.6	0.5

Table 2 CRM 7405-b に係る無機元素の参考情報値

元素	参考情報値(mg/kg)
Al	310
Ba	17
Ca	18000
Co	1.9
Cr	5.5
Fe	210
K	36000
Mg	4000
Na	9000
Ni	3
P	780
Pb	0.2
Sr	1600

2.2 標準試薬

微量元素測定用として、29 元素 (Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hg, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, V, Zn) 混合標準溶液 (各元素濃度 10ppm, XSTC-13B, SPEX) を適宜希釈し、0.1ppb～100ppb となるように調製した。

試料中に高濃度に含まれる主要元素である Ca, Fe, K, Mg, Na, P, Sr は、単元素標準溶液 (各元素濃度 1000ppm, Fe, Mg, P 及び Sr は富士フィルム和光純薬, Na, K 及び Ca はメルク) を混合して適宜希釈し、0.1～10ppm となるように調製した。

2.3 水

標準試薬の希釈、使用器具の洗浄等には超純水 (Mili-Q Integral MT3S, メルクまたは RFU424CA, ADVANTEC) を使用した。

2.4 酸分解

酸分解は、マイクロウェーブ分解装置 (START D, マイルストーンゼネラル) を用いて密閉系での圧力容器分解を行った。0.5g の試料を電子天秤で秤量後、試料を専用の分解容器に入れ、硝酸を添加後、2 段階の分解プログラムに沿って分解を行った。1 段階目は、60%硝酸 8mL を添加後、2 分間で 70℃ まで昇温、3 分間で 50℃ まで降温、20 分間で 180℃ まで昇温、180℃ で 10 分間保持した。2 段階目として、1 段階目の分解後、分解溶液の温度が 40℃ 以下まで降温後、60%硝酸 1mL を追加で添加し、25 分間で 210℃ まで昇温、210℃ で 30 分間保持した。酸分解後の溶液は、超純水で 100mL になるようにメスアップした。

2.5 ICP-MS の分析条件

ICP-MS は、Agilent 8800 シリーズトリプル四重極 (Agilent) を使用した。測定元素は、Li, Be, Al, V, Cr,

Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Ag, In, Cs, Ba, Tl, Pb, Bi, Na, K, Ca, Mg, Fe, P 及び Sr の 29 元素とした。また、ピークパターンは 1 ポイント、繰り返しは 3 回、スweep回数/繰り返しは 100 とし、プラズマ条件はオートチューニングにより試料測定開始時に最適化した。測定モードは、ヘリウム、高エネルギーヘリウム (HEHe)、水素、酸素、または No Gas の中から元素に応じて選択した。非スペクトル干渉の補正及び感度の経時変動を補正するため³⁾、Rh を内標準元素として用いた。

2.6 ICP-OES での分析条件

ICP-OES は、SPS3520UV-DD (エスアイアイ・ナノテクノロジー) を使用した。測定元素は、比較的高濃度に試料に含まれる Na, Mg, Al, K, Ca, Fe, P 及び Sr の 8 元素とした。各元素の測定波長 (nm) は、Na (589.592), Mg (279.635), Al (167.079), K (769.896), Ca (393.477), Fe (238.204), P (213.618) 及び Sr (216.596) とした。積分回数は 3 回、キャリアガス流量は 0.8L/min, 高周波出力は 1.2kW とした。

2.7 試験用ひじきの収集

試験用のひじきは、県内の海藻加工食品製造業者から入手した。試料用のひじきは、原草を水戻し、洗浄後、蒸煮し、乾燥させた製品を用いた。試料数は、40 (うち国内産 22 (大分県産 8, その他国内産 14), 韓国産 9, 中国産 9) とした。

2.8 試験用ひじきの前処理

ひじき約 5g を電子天秤で秤量し、チャック付きポリエチレン袋に入れた。さらに 2 枚のポリエチレン袋に入れ、紙ウエスで包み、木槌でひじきを粗く破碎した。粗破碎後のひじきをメノウ乳鉢に少量ずつ入れ、さらに細くなるまで破碎した。その後、乾燥機を用いて 105℃ で 1 時間乾燥させ、試験用の検体とした。

2.9 認証値、参考情報値との比較

CRM7405-b に付されている認証値及び参考情報値と定量結果を比較し、測定法の妥当性を検証した。

2.10 定量下限値の検証

マイクロウェーブ分解装置の分解容器に 60%硝酸のみを添加し、試料の分解プログラムと同一のプログラムで分解を行い、超純水でメスアップした溶液を 10 検体繰り返し測定し、得られた標準偏差の 10 倍を方法定量下限値 (MQL) とした。また、認証標準物質に値付けされた認証値及び参考情報値の 10 分の 1 を「目標定量下限値」として定義し、MQL と比較した。

2.11 添加回収試験

測定元素のうち、Li, Be, V, Ga, Se, Rb, Ag, In, Cs, Tl 及び Bi は、CRM7405-b の認証値及び参考情報値が示さ

れていない。よって、これらの元素の定量値の妥当性を検証するため、CRM7405-bに29元素混合標準溶液を添加し、酸分解後、ICP-MSで定量し、添加した濃度に対する定量値の比から回収率を算出した。

2.12 統計解析

ひじき中の無機元素の平均値について、各産地間での有意差をTukey-Kramer検定⁴⁾及びSteel-Dwass検定⁴⁾により検証した。無機元素濃度から、当該試料がどの産地に属するかを判定するために判別分析を行った。上記の統計解析には、統計解析ソフト(BellCurve for Excel, 株式会社社会情報サービス)を使用した。判別分析結果は、交差検証法の一つである「1つ取って置き法」により検証した⁵⁾。1つ取って置き法は、あるデータを判別する際に、当該データを除いたn-1個のデータから判別関数を構築し、あらかじめ除いた1個のデータを判別するものである⁵⁾。

3. 結果と考察

3.1 認証値、参考情報値と定量値の比較

Fig. 1に認証値(As, Cd, Cu, Mn及びZn)と定量値の比を示す。定量値は、7回の測定値の平均値とした。いずれの元素も、認証値に対する定量値の比は80%以上120%未満とおおむね正確な定量結果が得られた。

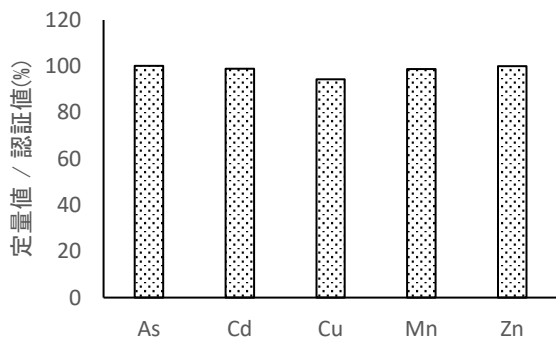


Fig. 1 定量値と認証値の比

Fig. 2にAl, Ba, Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Na, Ni, P, Pb及びSrに係る参考情報値とICP-MSまたはICP-OESでの定量値の比を示す。

Alの参考情報値に対する定量値の比が70%とやや低く、一方でMgは200%と高くなった。Al及びMg以外の元素は、参考情報値に対する定量値の比が80%以上120%未満のおおむね正確な定量結果が得られた。

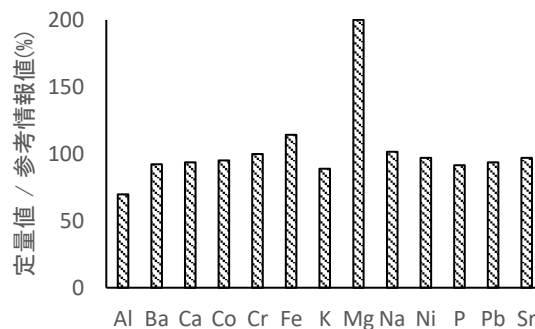


Fig. 2 定量値と参考情報値の比

Table3に各元素ごとの平均値及び変動係数を示す。Pbの変動係数が11%と高くなった。

Table 3 平均値(単位:mg/kg)と変動係数(単位:%)

元素名	平均値 (n=7)	認証値 (参考情報値)	標準 偏差	CV*1
As	48.7	49.5	2.0	4.1
Cd	1.26	1.25	0.05	4.0
Cu	4.34	4.48	0.21	4.9
Mn	22.7	22.6	0.73	3.2
Zn	13.84	13.6	0.48	3.5
Al	220	(310)	9.6	4.4
Ba	16	(17)	0.72	4.5
Ca	17000	(18000)	861	5.1
Co	1.8	(1.9)	0.072	3.9
Cr	5.6	(5.5)	0.21	3.8
Fe	250	(210)	14	5.5
K	33000	(36000)	2400	7.3
Mg	7900	(4000)	320	4.1
Na	8800	(9000)	580	6.6
Ni	3	(3)	0.15	4.9
P	700	(780)	35	5.0
Pb	0.2	(0.2)	0.022	11
Sr	1500	(1600)	65	4.2

*1) 変動係数

3.2 定量下限値の比較

Table4にMQLと目標定量下限値を比較した結果を示す。

Pbは、目標定量下限値未満のMQLを達成できなかった。よって、Table3においてPbの変動係数が高くなった原因について、操作ブランク値の定量値を十分に低く抑えられておらず、また変動も大きいことが考えられる。

その他の元素は、すべての分解プログラムで目標定量下限値未満のMQLを達成できた。

Table 4 MQLと目標定量下限値(単位:mg/kg)

元素名	標準偏差 (n=10)	MQL	目標定量 下限値	判定
As	0.0014	0.01	4.95	○
Cd	0.00018	0.002	0.125	○
Cu	0.01271	0.127	0.448	○
Mn	0.00101	0.01	2.26	○
Zn	0.0102	0.10	1.36	○
Al	0.117	1.2	31	○
Ba	0.001	0	1.7	○
Ca	0.68	6.8	1800	○
Co	0.0008	0.01	0.19	○
Cr	0.0093	0.09	0.55	○
Fe	0.0099	0.10	21	○
K	22	220	3600	○
Mg	0	0	400	○
Na	20	200	900	○
Ni	0.0241	0.24	0.3	○
P	2.4	24	78	○
Pb	0.0027	0.03	0.02	×
Sr	3.2	32	160	○

3.3 添加回収試験

Table5に添加回収試験の結果を示す。

Inは、添加対象物であるCRM7405-b中での濃度が定量下限値未満となったため、回収率を算出できなかった。その他の元素は、91~106%までの良好な回収率が得られた。

Table 5 添加回収試験の結果

	未添加濃度 (mg/kg)	添加濃度 (mg/kg)	回収濃度 (mg/kg)	回収率 (%)
Li	0.296	0.218	0.221	101
Be	0.007	0.022	0.022	102
V	1.31	1.089	1.151	106
Ga	0.078	0.223	0.218	98
Se	0.126	0.218	0.204	94
Rb	13.6	5.447	5.464	100
Ag	0.021	0.022	0.020	92
In	ND	0.022	-	-
Cs	0.037	0.218	0.197	91
Tl	0.002	0.022	0.022	100
Bi	0.007	0.022	0.020	93

3.4 試験用ひじきの定量

Table6に試験用ひじきに係る産地ごとの平均値と変動係数を示す。

CRM7405-bと同様、いずれの産地もNa, Mg, K, Ca, P及びSrの濃度が高くなった。一方で、In及びTlは、ほ

とんど検出されなかった。

Table 6 試験用ひじきに係る産地ごとの平均値(単位:mg/kg)と変動係数(単位:%)

	Japan(n=22)		Korea(n=9)		China(n=9)	
	平均	CV*1	平均	CV*1	平均	CV*1
Na	12000	13	12000	13	13000	37
Mg	6200	10	6200	7	6200	5
K	44000	11	41000	8	48000	31
Ca	15000	8	15000	7	17000	33
P	820	16	1100	8	1500	14
Sr	1400	8	1400	9	1300	14
Li	0.49	96	1.2	16	1.2	55
Be	0.004	51	0.031	39	0.021	42
Al	77	78	800	22	530	54
V	1.1	60	2.2	17	1.5	19
Cr	0.38	28	1.3	25	0.90	25
Mn	24	86	27	19	22	35
Fe	81	44	590	20	410	57
Co	0.20	34	0.42	15	0.19	26
Ni	1.6	35	2.8	12	4.0	10
Cu	2.7	36	2.7	19	8.7	9
Zn	13	39	12	17	15	37
Ga	0.027	64	0.26	21	0.16	35
As	120	47	140	12	110	29
Se	0.066	34	0.083	21	0.085	24
Rb	17	9	18	7	17	4
Ag	0.025	37	0.048	26	0.065	21
Cd	1.1	45	1.4	17	1.9	6
In	0.000	192	-*2	-*2	-*2	-*2
Cs	0.035	86	0.14	20	0.092	31
Ba	13	17	20	12	50	12
Tl	0.003	58	0.009	27	0.007	44
Pb	0.43	68	0.86	34	0.65	39
Bi	0.009	57	0.022	12	0.018	36

*1) 変動係数, *2) 群内の全データが定量下限値未満

3.5 産地間の有意差の検定

5%の有意水準で、Tukey-Kramer検定⁴⁾及びSteel-Dwass検定⁴⁾ですべての産地間の平均値に有意差のあった元素は、P, Ni, Ga, Cs及びBaの5元素となった。

3.6 判別分析

Tukey-Kramer検定⁴⁾及びSteel-Dwass検定⁴⁾で有意差のあったP, Ni, Ga, Cs及びBaの5元素を計算開始時の変数として用いた。計算の過程で判別に有効な変数を選択する手法として、変数増減法及び変数減減法による変数選択を行った⁵⁾。変数の追加または除去の基準は文献に従い、F=2.0を用いた⁵⁾。判別関数として、関数1及び関数2の二つの関数を用いて正準判別

を行った。関数 1 及び関数 2 により計算された判別得点をプロットした散布図を Fig. 3 に示す。

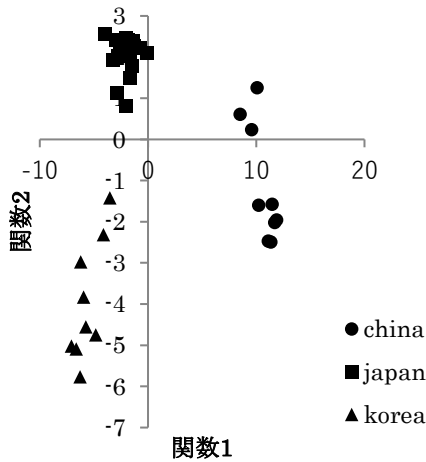


Fig. 3 判別得点の散布図

変数選択の結果、変数増減法と変数減増法のいずれにおいても Ga 及び Ba の 2 元素が選択された。

Table 7 に判別関数の係数と定数項を示す。

Table 7 判別関数の係数と定数項

変数	関数 1	関数 2
Ga	-28.6683	-26.5579
Ba	0.4451	0.0084
定数項	-7.1550	2.6777

各試料について、関数 1 及び関数 2 を用いて各群の重心からのマハラノビスの平方距離⁵⁾を求め、当該距離が最も小さい群を試料が属する群として判別した。あらかじめ把握している産地を「観測値」、計算の結果から推定される産地を「予測値」とし、両者の一致率である判別の中率を Table 8 に示す。

予測値に対する観測値はすべて合致し、判別の中率は 100%となった。

Table 8 各産地ごとの判別の中率

		予測値			判別の中率
		China	Japan	Korea	
観測値	China	9	0	0	100%
	Japan	0	22	0	100%
	Korea	0	0	9	100%
				全体	100%

Table 9 に 1 つ取って置き法から求めた判別の中率を示す。1 つ取って置き法でも、予測値に対する観測値はすべて合致し、判別の中率は 100%となった。

Table 9 1 つ取って置き法から求めた判別の中率

		予測値			判別の中率
		China	Japan	Korea	
観測値	China	9	0	0	100%
	Japan	0	22	0	100%
	Korea	0	0	9	100%
				全体	100%

3.7 大分県産ひじきの判別

国内産のうち、県産(以下「Oita」と示す.)とその他の国内産(以下「Japan2」と示す.)を判別した。

Table 10 に国内産ひじきの平均値と変動係数を示す。

Table 10 国内産ひじきの平均値(単位:mg/kg)と変動係数(単位:%)

	Oita (n=8)		Japan2 (n=14)	
	平均値	CV*1	平均値	CV*1
Na	11000	8	12000	17
Mg	6100	11	6200	8
K	42000	12	44000	10
Ca	15000	9	14000	6
P	780	12	890	14
Sr	1400	8	1300	10
Li	0.37	46	0.47	99
Be	0.003	62	0.005	43
Al	94	85	73	71
V	1.4	67	0.81	16
Cr	0.41	18	0.36	35
Mn	40	69	15	50
Fe	99	42	75	43
Co	0.21	29	0.20	43
Ni	1.9	39	1.5	38
Cu	3.1	12	2.6	51
Zn	15	33	12	46
Ga	0.029	54	0.028	76
As	120	74	110	19
Se	0.078	29	0.057	42
Rb	16	9	17	8
Ag	0.022	35	0.028	44
Cd	1.0	47	1.0	53
In	0.001	141	_*2	_*2
Cs	0.046	105	0.027	35
Ba	14	16	13	19
Tl	0.003	70	0.003	52
Pb	0.61	58	0.33	70
Bi	0.008	63	0.010	58

*1) 変動係数, *2) 群内の全データが定量下限値未満

大分県産, その他国内産, 韓国産及び中国産の 4 産

地を対象に Tukey-Kramer 検定⁴⁾及び Steel-Dwass 検定⁴⁾を行ったところ、すべての産地間に有意差のある元素はなく(有意水準 5%), また、大分県産とその他国内産の 2 産地間で有意差が認められた元素は、Mn のみであった。

すべての産地間に有意差のある元素がなく、変数の絞り込みが困難であるため、国内産、韓国産及び中国産の判別分析で用いた Ga 及び Ba に加えて、大分県産とその他国内産の 2 産地間で有意差が認められた Mn を変数として判別分析を行った。Table11 に大分県産、その他国内産、韓国産及び中国産の 4 産地の判別率を示す。

大分県産ひじき 8 検体のうち 3 検体はその他国内産のひじきと誤判別され、判別率の中率は 63%となった。その他国内産、韓国産及び中国産の判別率の中率は 100%となった。

Table 11 大分県産ひじきの判別率の中率

		予測値				判別率
		China	Japan2	Korea	Oita	
観測値	China	9	0	0	0	100%
	Japan2	0	14	0	0	100%
	Korea	0	0	9	0	100%
	Oita	0	3	0	5	63%
					全体	93%

4. まとめ・今後の計画

食品中の無機元素に係る分析方法の確立を目的として、認証標準物質の定量や添加回収試験による分析条件の検討を行った。

本研究で検討した試験方法により、製品段階のひじき中の無機元素のうち、Ag, As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mn, Na, Ni, Rb, Se, Sr, Tl, V, Zn, P については、おおむね正確な定量結果が得られた。よって、これらの元素の定量分析については、今後、依頼試験等の企業支援に活かすことができる。

一方で、Al, Mg 及び Pb については、今回の測定法では測定値の正確さやばらつきの精度が十分ではなく、測定値の有効性に十分留意する必要がある。

判別分析により、製品段階のひじきの判別分析を行ったところ、Ga 及び Ba の 2 元素を用いて、国内産、韓国産及び中国産の 3 つの産地の判別は、高い判別率を実現できた。しかしながら、Ga, Ba 及び Mn の 3 元素を用いた大分県産、その他国内産、韓国産及び中国産の 4 つの産地の判別は、大分県産とその他国内産の産地間で誤判別の発生がみられた。

今後は、本研究で検討した食品中の無機元素分析手

法や、産地ごとの無機元素組成の傾向を県内企業等に情報提供し、無機元素分析に関する技術支援を充実させていきたい。

また、サンプル数が判別結果に与える影響や、産地判別に有効な新たな指標成分の測定法も検討していきたい。

謝 辞

本研究の推進にあたり、ひじきの生態等についてご助言をいただいた農林水産研究指導センター水産研究部北部水産グループの関係職員の皆様にご心より感謝申し上げます。

参考文献

- (1) 名塚英一, 門倉雅史, 神谷光行, 有山薫.” 湯通し塩蔵わかめの原産国判別技術の検討(第3報)” . 農林水産消費技術センター調査研究報告. 独立行政法人農林水産消費技術センター, 2006, No. 30, p. 1-8.
- (2) 服部賢志, 塚田政範, 法邑雄司. 無機元素分析によるコンブの原料原産地判別. 日本水産学会誌. 2009, 75(1), P. 77-82.
- (3) 田尾博明ら.” 干渉の種類と補正法”. 分析化学実技シリーズ機器分析編・17 誘導結合プラズマ質量分析. (公社)日本分析化学会, 2015, p. 87
- (4) 栗原伸一. 入門統計学-検定から多変量解析・実験計画法まで-. オーム社, 2011, p. 150-154, 156-157
- (5) 杉山高一ら. シリーズ多変量データの統計科学1 多変量データ解析. 朝倉書店, 2014, p. 55-58, 70, 80-81