

## 植物・海藻等に対する試料調製法の開発と粉末内部標準法の適用

伊藤じゅん<sup>1)</sup>、齋藤義弘<sup>1)</sup>、二ツ川章二<sup>2)</sup>、世良耕一郎<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> (社) 日本アイソトープ協会滝沢研究所仁科記念サイクロトロンセンター  
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

<sup>2)</sup> (社) 日本アイソトープ協会アイソトープ部  
〒113-8941 東京都文京区本駒込 2-28-45

<sup>3)</sup> 岩手医科大学サイクロトロンセンター  
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

### 1 はじめに

現在、グローバルな環境汚染や酸性雨の影響を調べる等の目的から様々な分野で植物試料分析の需要が高まっている。また食品・栄養学的観点から、有害元素の体内摂取を評価する試料として昆布やわかめ等の海藻類の分析も注目されている。実際に NMCC においても色々な分野の研究グループが、トマトの葉やわさび、米、とうもろこし、わかめや昆布といった植物・海藻試料の分析を行っている。

従来これらの試料に関しては主に硝酸灰化法<sup>1)</sup>が用いられてきたが、この方法には2つの問題点があった。1つは揮発性の元素が失われてしまうことである。もう1つは容器の容量の問題から、多量の試料の場合、部分部分での分析を行っていたため試料全体の濃度を求めるためにはいくつもターゲットを作成しなくてはならず、調製および測定に手間がかかっていた。そのため試料調製の段階で試料全体を均一化することが望まれていた。本研究の第一の目的は、多量の試料全体を均一にするための調製法を標準化することである。本研究では粉末化した試料に粉末内部標準法<sup>2)</sup>を適用することにより、灰化中に失われる塩素、臭素等の必須元素の定量が可能になった。ヨウ素は体内の必須元素として知られ、食物中の含有量や日常の食事からの摂取に関する研究が NMCC においても行われている。ヨウ素も灰化操作により揮発してしまうため、粉末内部標準法の適用が有効である。

さらに本研究では、液体窒素を用いた均一化法をきのこ試料に対して応用した。有害元素の広域的汚染を調査する際、飲み水や土壌、エアロゾル、周辺の農作物など様々な試料の分析が必要とされるが、土壌中にはアルミニウム、シリコン、チタン、鉄が圧倒的に多いため、砒素、鉛といった有害元素を感度よく検出することは困難である。そこで周辺土壌の成分を反映し、さらに生物濃縮により種類により特定の元素を取り込むことが知られているきのこが、環境のモニターになり得るのではないかと考えた。ローカルな汚染の影響が少ない地域から試料を採取できれば、広域的な環境汚染に関して情報を得ることが可能である。一例を挙げると、きのこ試料の1つであるベニテング茸は、環境汚染の指標元素であるバナジウムを選択的に取り込むことが確認されている。

本研究は液体窒素を用いて多量の試料全体を均一化する手法の開発を目的とし、粉末化した試料を3つの方法で調製することによりその精度・再現性を確認することを試みた。さらにこの均一化法と粉末内部標準法の組み合わせを色々な試料へと応用し、その可能性を考察した。

## 2 試料

### 2.1 採取

試料として、2種類の海藻と3種類の植物の葉、5種類のきのこを用いた。海藻試料は本来食用とはされない根昆布と根わかめを用いた。昆布は岩手県山田湾周辺で採取され、わかめは岩手県唐丹湾周辺で採取された。これらはいずれも養殖されたもので、根が海中の網に絡みついた状態であった。

葉はコンフリー (*Symphytum officinate*)、ギンギシ (*Rumex japonicus*)、フキ (*Petasites japonicus*) の3種類で、いずれも滝沢研究所の敷地周辺で採取されたものである。コンフリーとギンギシは長さ約25センチの楕円形で、フキは直径約30センチの円形の葉であった。これらは室温で一日間自然乾燥させた。

きのこはベニテング茸 (*Amanita muscaria*(L.:Fr.)Pers.)、シロテング茸 (*Amanita neovoidea* Hongo)、なら茸 (*Armillariella mellea*(Vahl:Fr.)Karst.)、スッポン茸 (*Phallus impudicus* Pers.)、ツバアブラシメジ (*Cortinarius collinitus*(Sow.:Fr.)Fr.) の5種類で、いずれもローカルな汚染の影響が少ないと思われる安比高原周辺で採取された。これらをそれぞれかさ、茎、ひだ、石付の各部位に分けた。

### 2.2 調製

細かくちぎったそれぞれの試料を磁製の乳鉢に入れ、液体窒素を注ぎながら乳棒で擦り合わせた。この動作を数回繰り返すと試料は粒径が1 $\mu$ m以下の均一なパウダーになった。パウダー状になった試料を、(1)粉末直接法、(2)粉末内部標準法、(3)硝酸灰化法の各方法により調製を行い、ターゲットを作成した。(1)は内部標準を用いず、試料をコロジオン溶液でバックリングフィルム上に付着させる方法である。(2)は試料に内部標準元素としてパラジウムカーボン粉末を濃度が約10,000ppmになるよう加え、乳鉢で混ぜ合わせる。(3)は、試料に硝酸と内部標準元素としてインジウム溶液を濃度が約1,000ppmになるよう加え電子レンジで加熱する方法である。本法で完全に試料全体が均一化されているかを確認する目的で、各試料に対して(1)、(3)によるターゲットは4枚、(2)によるターゲットは4~6枚ずつ作成された。

## 3 測定および解析

測定はNMCCのPIXE分析システムにて行った。小型サイクロトロンからの2.9MeVの陽子ビームをターゲットに照射し、発生した特性X線を2台のSi(Li)検出器により同時に測定した<sup>3)</sup>。検出器1側には低エネルギーX線を吸収するために500 $\mu$ m厚のMylar filmが吸収体として装着され、K以上の元素の測定が行われた。一方、検出器2側にはX線を吸収するための吸収体を装着せず、計数率を調整するためのX線コリメータを取り付け、Na~Caまでの元素の測定が行われた。2台の検出器の橋渡しはKで行い、得られたスペクトルは、データ解析プログラムSAPIX<sup>4)</sup>により解析を行った。

図1-a)、b)は実際の根昆布のスペクトルである。a)は検出器1、b)は検出器2から得られたスペクトルで、灰線で示す粉末内部標準法によるターゲットの結果と黒線で示す硝酸灰化法によるターゲットの結果を重ね書したものである。黒線スペクトルには850チャンネル付近にヨウ素のK $\alpha$ ピークが認められ、灰線スペクトルの630チャンネル付近のピークは内部標準として加えたパラジウムのK $\alpha$ である。測定時間は一試料あたり約5分、平均ビーム電流は約100nAであった。

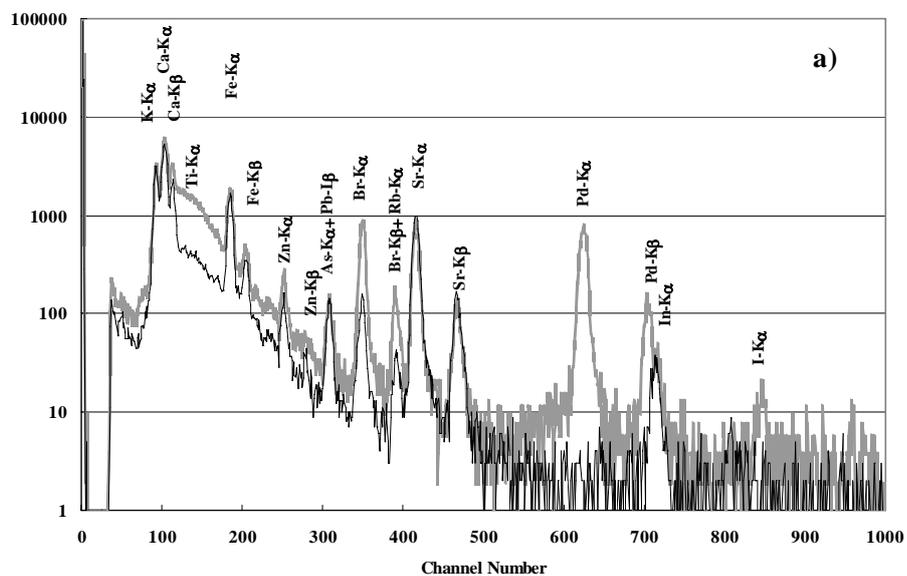


図 1-a) 根昆布スペクトル (検出器 1)

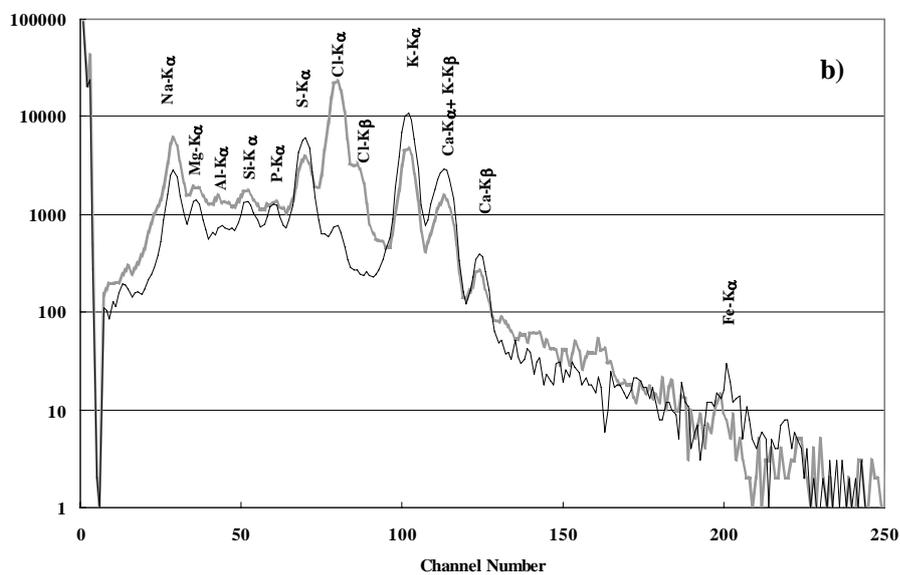


図 1-b) 根昆布スペクトル (検出器 2)

## 4 結果および考察

### 4.1 海藻試料

図 2-a)、b)は3つの方法で調製された根昆布の元素濃度を比較したものである。「n」は粉末直接法で作成された4つのターゲット、「Pd」は粉末内部標準法による6つのターゲット、「A」は硝酸灰化法による8つのターゲットの結果を示している。灰化は2回独立に行われ(A1、A2)、1つの容器から4つのターゲットが作成された。粉末直接法によるターゲットの絶対値は硝酸灰化法による8つのターゲットから求めたポタシウムの平均値でノーマライズしたものである。試料が完全に均一化されているかを確認するために粉末内部標準法によるターゲットは6枚作成し、粉末直接法および硝酸灰化法により作成したターゲットの結果と比較した。その結果6枚のターゲット間のばらつきは小さく、さらに硝酸灰化法による結果とも大体一致した。これは液体窒素を用いて多量の試料全体が完全に均一化されたということを物語っており、他の生物試料への応用が有望である。またこの結果から灰化により塩素、臭素は失われることが分かるが、液体窒素による均一化と粉末内部標準法による調製を組み合わせることにより、ハロゲン元素を含むすべての元素の絶対値を求めることが可能である。今回、根昆布からは2,000ppm前後のヨウ素が検出された。また褐藻類は砒素濃度が高いことで知られているが、実際に測定した結果、砒素濃度は200ppm前後であった。

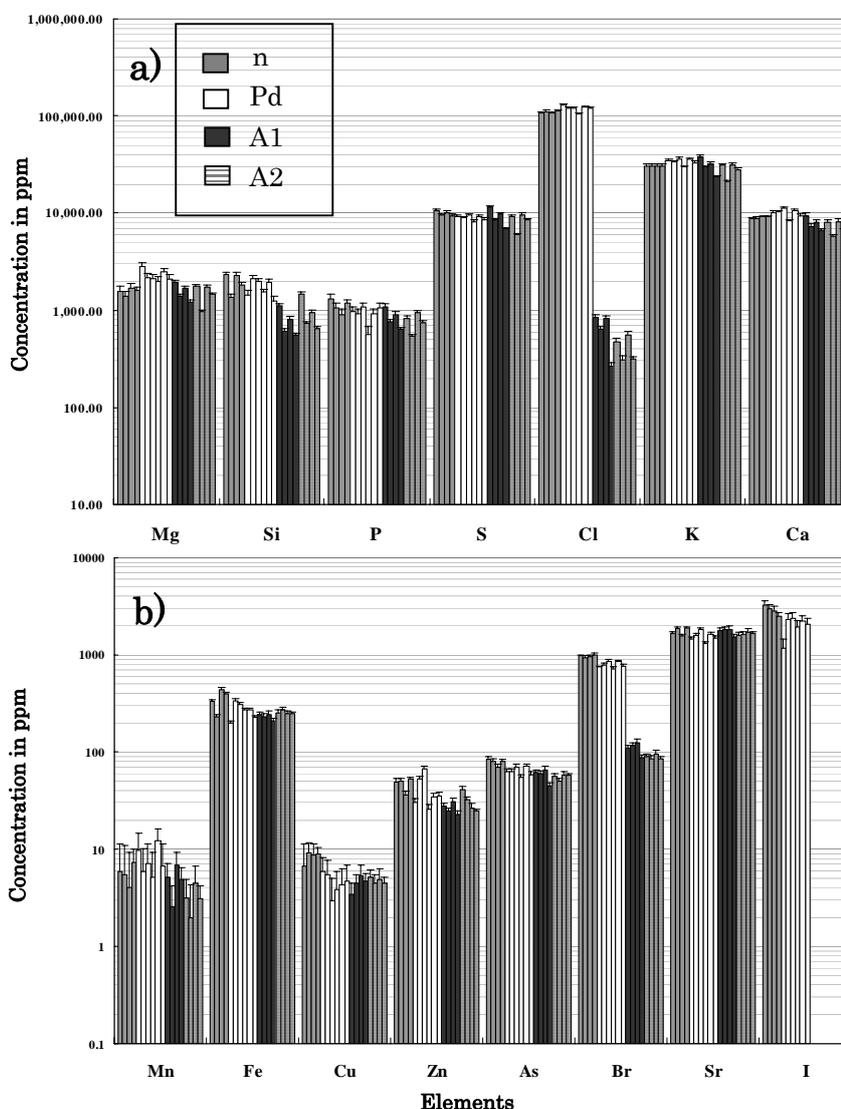


図 2-a)、b) 根昆布の元素濃度の比較

図 3 は各方法により調製された根わかめの平均元素濃度と標準偏差を示したものである。ターゲット数は根昆布の場合と同様である。3つの方法による結果は大体一致しているが、軽元素側で粉末内部標準法によるターゲットの値がやや高めにれている。これは、粉末直接法によるターゲットは試料がかたまりを作って厚くなることもあり、それによる自己吸収の影響と考えられる。今の段階では原因をはっきりと断定できないが、測定上の誤差要因で高く出るとは考えにくいいため、おそらく粉末内部標準法による値のほうが正しいのではないかとと思われる。また、根昆布と同様に根わかめからも砒素が検出されその濃度は 100ppm 前後であった。

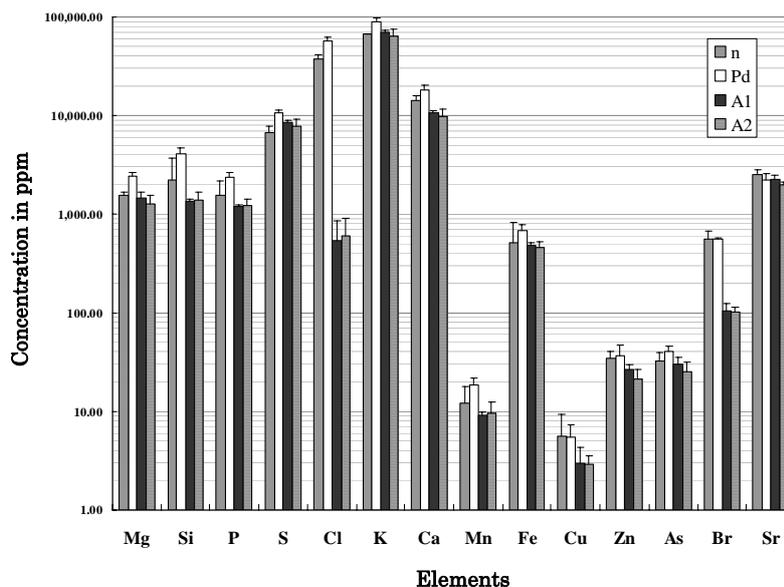


図 3 根わかめの平均元素濃度

#### 4. 2 植物の葉試料

図 4 に 3つの方法で調製されたコンフリーの葉の元素濃度と標準偏差を示す。ターゲット数は海藻試料の場合と同様である。図からも分かるように、粉末内部標準法によるターゲットの臭素濃度が他法のものに比べてずっと高くなっている。この原因は特定できないが、粉末内部標準法によるターゲット間の標準偏差がかなり小さいことから、高く出た方が正しい値であると考えられる。また海藻試料の場合も同様であったが、粉末直接法によるターゲットはコロジオン溶液でフィルムに付着させる際に試料がかたまりを作り厚くなることがあった。そのためビーム照射により熱をもち、測定している間に臭素が揮発した可能性も考えられる。

図 5 はフキの葉の元素濃度と標準偏差を示している。3方法による結果はほとんど一致し、標準偏差も相対的に小さかった。低 Z 側で粉末直接法によるターゲットの元素濃度が高くなるという傾向が海藻、コンフリーと同様に見られたが、原因は今のところ分かっていない。この試料は粉末直接法でも均一でかなり薄いターゲットを作成することができたので、標準偏差を考慮しても臭素濃度は粉末内部標準法とほぼ同じ値が得られた。硝酸灰化法では塩素、臭素は大部分が失われることが分かった。また、フキの葉からは他の 2つの植物よりずっと高濃度のルビジウムが検出された。

図 6 はギンギシの葉の元素濃度と標準偏差を比較したものである。この試料は量が少なかったため灰化は一回しか行わなかった。塩素、臭素、シリコンを除く元素の結果は 3方法とも大体一致した。

これらの結果から液体窒素を用いた均一化法が海藻および植物試料に適用できることが分かり、一回の測定でナトリウムより重いすべての元素濃度の平均値を定量的に求めることが可能となった。

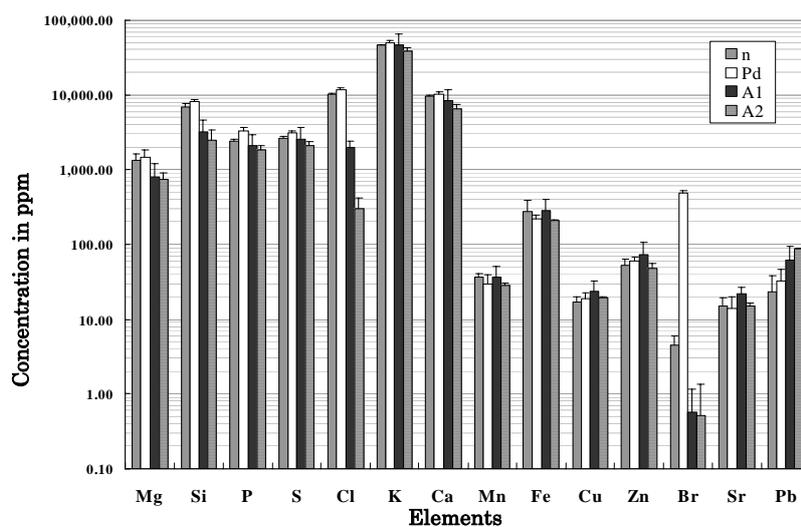


図4 コンフリーの葉の平均元素濃度

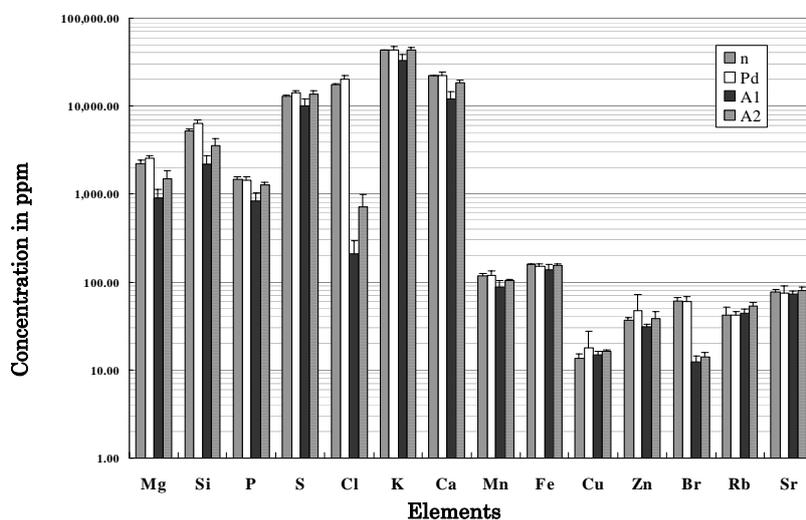


図5 フキの葉の平均元素濃度

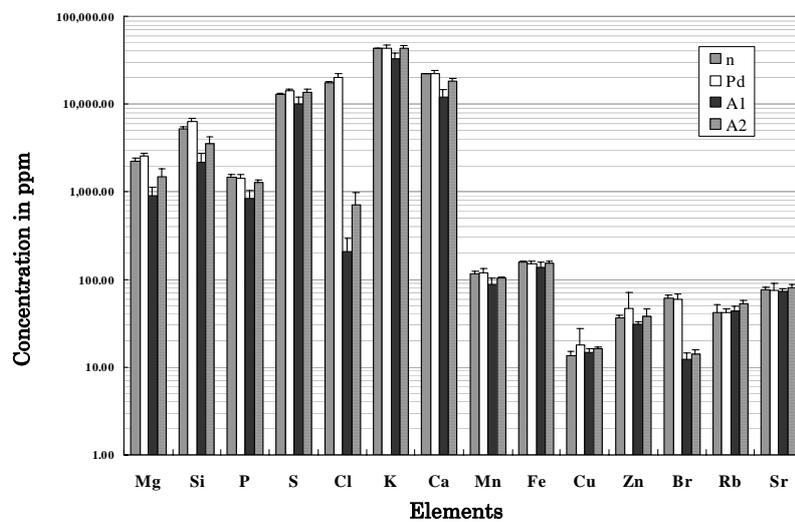


図6 ギシギシの葉の平均元素濃度

### 4. 3 きのご試料

表1は3つの方法で調製されたベニテング茸かさの元素濃度を表したものである。「Pd」は粉末内部標準法、「Untreated」は粉末直接法、「Ashing」は硝酸灰化法を意味する。再現性を確認することと硝酸灰化法によるターゲットから得られた値と比較する目的で、粉末内部標準法によるターゲットは4枚作成した。±以降の値は、「Pd」は4つのターゲットの標準偏差、「Untreated」および「Ashing」は実験誤差を示している。実験誤差は主にスペクトルのフィッティング(2-30%)、X線吸収体の透過率(3-8%)、検出効率(3-8%)からきている。表から分かるように、粉末内部標準法による値はハロゲン元素を除き、硝酸灰化法による値とよく一致した。さらに4つのターゲット間の標準偏差が小さいことから再現性が確認され、きのご試料全体が完全に均一化されていることが証明された。

表1 ベニテング茸か사의平均元素濃度

	Pd	Untreated	Ashing
F	74.2 ± 54	ND	ND
Na	2070 ± 400	160 ± 96	59.0 ± 55
Mg	672 ± 110	528 ± 81	413 ± 45
Al	1410 ± 270	999 ± 80	619 ± 43
Si	4220 ± 300	4200 ± 150	1170 ± 52
P	7170 ± 440	6050 ± 200	5060 ± 160
S	4550 ± 200	4120 ± 150	3790 ± 120
Cl	32000 ± 970	30900 ± 950	1060 ± 65
K	66900 ± 2700	66900 ± 2100	50200 ± 2600
Ca	110 ± 230	1220 ± 60	843 ± 58
V	1.16 ± 2.5	3.60 ± 2.9	ND
Mn	59.7 ± 3.3	86.6 ± 3.4	52.0 ± 3.0
Fe	964 ± 190	2070 ± 63	817 ± 43
Cu	25.4 ± 2.7	37.0 ± 1.8	23.7 ± 1.6
Zn	146 ± 12	186 ± 6.1	132 ± 7.0
As	2.00 ± 1.0	ND	ND
Br	9.70 ± 1.5	10.5 ± 1.4	4.40 ± 0.90
Ag	145 ± 57	188 ± 18	ND
Pb	9.40 ± 4.7	6.00 ± 3.7	7.00 ± 2.0

表2は粉末内部標準法により調製された5種類のきのごこの元素濃度を表したものである。ベニテング茸は4つの部位(かさ、茎、石突、ひだ)の結果が示されているが、それ以外のきのごはすべての部位を採取することができなかった。±以降の値は4つのターゲットの標準偏差を表している。この表から、ベニテング茸かさには他のきのごこと比べて一桁以上高い濃度のバナジウムが集積していることが明らかになった。また臭素濃度も高いことが分かった。その他の特徴としてシロテング茸は塩素、鉄、銀、ツバアブラシメジは鉄を濃縮していることが挙げられる。特にシロテング茸が銀を濃縮することは興味深く、明確な特徴であると言える。なら茸に関しては目立った特徴は観察されなかった。

茎の部分に関しては、ベニテング茸が他のきのごこと比較して高濃度のバナジウムを含むことが明らかになった。またその他にベニテング茸の臭素、シロテング茸の塩素と鉄、スッポン茸のマンガン濃度が高いことが分かった。シロテング茸は茎の部分からも銀が検出されたが、かさの部分ほど高濃度ではなかった。

直接周辺土壌と接触している石突の部分に関しては2種類のきのごこの結果であるが、ベニテング茸はかさと同様、バナジウムおよび臭素濃度が高いことが分かった。シロテング茸はかさの部分とほぼ同濃度の塩素と銀を濃縮していることが分かった。

これらのきのこは同じ地域で同じ時期に採取されたものであり、周辺土壌はほぼ同条件と思われる。それゆえに結果の違いはそれぞれのきのこの生理機能によるものと考えられる。きのこは種類によって特定の元素を選択的に取り込む性質のあることが分かり、より多くの種類を分析することにより様々な元素に関する情報を得ることが期待できる。さらにかさの部分は茎や石突の部分と比べて、土壌成分(アルミニウム、シリコン、チタン、鉄等)の影響を受けにくいと思われるため、この部分での分析が有効であると思われる。

表 2-1 ベニテング茸の平均元素濃度と標準偏差

	<i>Amanita muscaria</i>			
	Cap	Stem	Hard tip	Lamella
F	29.1 ± 25	29.6 ± 41	36.8 ± 120	51.7 ± 41
Na	1680 ± 340	4360 ± 490	5840 ± 500	3180 ± 470
Mg	1020 ± 600	620 ± 140	461 ± 130	674 ± 270
Al	581 ± 260	445 ± 280	1190 ± 310	702 ± 190
Si	1830 ± 1300	945 ± 380	4090 ± 700	360 ± 250
P	7820 ± 320	3460 ± 170	3220 ± 170	9320 ± 1400
S	2320 ± 270	1290 ± 170	2270 ± 1100	3260 ± 620
Cl	4280 ± 440	6640 ± 340	4320 ± 700	4710 ± 420
K	39900 ± 1300	43400 ± 2000	13200 ± 560	43200 ± 4600
Ca	304 ± 94	319 ± 90	813 ± 84	322 ± 170
V	60.5 ± 8.3	73.7 ± 20	423 ± 16	118 ± 14
Mn	8.90 ± 5.3	18.4 ± 8.6	83.2 ± 5.6	7.40 ± 3.5
Fe	159 ± 120	125 ± 37	470 ± 49	142 ± 27
Cu	26.5 ± 1.1	12.0 ± 2.2	9.40 ± 3.4	33.2 ± 6.0
Zn	145 ± 11	100 ± 8.5	139 ± 12	227 ± 27
As	1.50 ± 1.1	0.80 ± 1.3	0.400 ± 0.40	1.30 ± 0.50
Br	127 ± 12	181 ± 19	184 ± 8.9	81.4 ± 10
Ag	ND	ND	ND	ND
Pb	3.30 ± 4.1	3.20 ± 0.80	9.90 ± 1.5	4.40 ± 2.3

表 2-2 シロテング茸の平均元素濃度と標準偏差

	<i>Amanita neovoidea</i>		
	Cap	Stem	Hard tip
F	74.2 ± 54	14.7 ± 34	6.60 ± 44
Na	2070 ± 400	3200 ± 420	3010 ± 380
Mg	672 ± 110	732 ± 250	77.0 ± 60
Al	1410 ± 270	213 ± 78	776 ± 92
Si	4220 ± 310	1940 ± 340	2460 ± 230
P	7170 ± 440	5060 ± 220	1240 ± 250
S	4550 ± 200	3380 ± 240	1270 ± 200
Cl	32000 ± 970	47400 ± 2200	23400 ± 3500
K	66900 ± 2700	74800 ± 3100	29100 ± 4700
Ca	1100 ± 230	471 ± 160	739 ± 320
V	1.20 ± 2.5	1.10 ± 1.7	1.90 ± 1.1
Mn	59.7 ± 3.3	32.6 ± 2.3	25.7 ± 2.6
Fe	964 ± 190	444 ± 100	511 ± 130
Cu	25.4 ± 2.7	17.6 ± 2.3	10.4 ± 2.1
Zn	146 ± 12	131 ± 7.7	74.5 ± 12
As	2.00 ± 1.0	0.400 ± 0.50	0.900 ± 0.70
Br	9.70 ± 1.5	33.1 ± 2.1	8.60 ± 2.1
Ag	145 ± 57	31.4 ± 18	37.2 ± 12
Pb	9.40 ± 4.7	5.40 ± 4.9	5.80 ± 3.1

表 2-3 なら茸、ツバアブラシメジ、スッポン茸の平均元素濃度と標準偏差

<i>Cortinarius collinitus</i>			<i>Armillariella mellea</i>		<i>Phallus impudicus</i>	
	Cap	Stem	Cap	Stem	Cap	Stem
F	29.6 ± 20	ND	F	68.3 ± 46	F	38.6 ± 29
Na	4470 ± 270	12500 ± 1400	Na	3070 ± 560	Na	4430 ± 410
Mg	980 ± 290	719 ± 190	Mg	1280 ± 210	Mg	2900 ± 270
Al	353 ± 110	359 ± 60	Al	1500 ± 670	Al	608 ± 220
Si	570 ± 140	1260 ± 340	Si	4930 ± 420	Si	994 ± 490
P	5540 ± 750	1280 ± 190	P	7960 ± 170	P	5380 ± 310
S	2220 ± 250	888 ± 100	S	2910 ± 160	S	5270 ± 280
Cl	2380 ± 300	3040 ± 360	Cl	4960 ± 83	Cl	11400 ± 620
K	41700 ± 5500	12700 ± 1300	K	51800 ± 730	K	45800 ± 2200
Ca	781 ± 260	516 ± 110	Ca	1110 ± 250	Ca	895 ± 300
V	5.70 ± 3.2	ND	V	3.20 ± 2.7	V	2.70 ± 6.3
Mn	45.0 ± 19	21.0 ± 1.8	Mn	24.5 ± 3.4	Mn	624 ± 13
Fe	135 ± 23	178 ± 99	Fe	459 ± 48	Fe	396 ± 110
Cu	85.7 ± 15	17.6 ± 3.2	Cu	55.0 ± 9.6	Cu	36.8 ± 14
Zn	98.1 ± 12	42.3 ± 4.9	Zn	82.0 ± 19	Zn	72.3 ± 17
As	0.100 ± 0.30	0.400 ± 0.50	As	ND	As	1.20 ± 3.0
Br	12.9 ± 2.9	24.0 ± 3.9	Br	15.5 ± 1.0	Br	4.70 ± 3.2
Ag	ND	ND	Ag	ND	Ag	ND
Pb	9.40 ± 2.5	3.90 ± 2.0	Pb	6.20 ± 2.2	Pb	12.0 ± 8.5

## 5 まとめ

試料全体の平均元素濃度を求めるため、液体窒素を用いた均一化法により多量の海藻・植物・きのこ試料を粉末化した。さらに粉末内部標準法がこの方法により調製した試料に対しても適用できるということが分かり、塩素や臭素、ヨウ素といった揮発性元素の定量が可能になった。

以上の実験や考察により得られた知見は、次のようにまとめられる。

1. 液体窒素を用いて多量の海藻・植物・きのこ試料を均一な粉末状にすることにより、試料全体の平均元素濃度を求めることが可能となった。
2. 土壌、灰、塵等の分析のために開発された粉末内部標準法が、液体窒素を用いた均一化法によって調製された粉末試料に対しても完全に適用できることが分かった。これにより、塩素、臭素、ヨウ素を含むすべての元素の定量分析が可能となった。
3. 本均一化法により海藻・植物・きのこ試料の測定を行い、精度・再現性を確認することができた。本法は様々な研究分野の試料への応用が有望である。
4. きのは種類によって特定の元素を選択的に濃縮する性質のあることが分かった。例えばベニテング茸はバナジウム、シロテング茸は銀と塩素を特にかさの部分に集積することが明らかになった。より多くのきのこを分析することにより、様々な元素に関して有益な情報を得られると思われる。
5. きのはグローバルな環境汚染のモニターとなることが期待できる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、試料調製に関して秋田県環境センターの斉藤勝美先生に適切なお指導をいただきました。また、盛岡大学短期大学部の小嶋文博先生には海藻試料を提供していただくとともに必須元素に関して有益なお助言をいただきました。深く感謝致します。

参考文献

1. S. Futatsugawa et al. "Present Status of NMCC and Sample Preparation Method of Bio-Samples. "*Int'l Journal of PIXE* Vol. **3-4**, 319-328 (1993)
2. K. Sera and S. Futatsugawa, "Quantitative Analysis of Powdered Samples Composed of High-Z Elements. "*Int'l Journal of PIXE* Vol. **8-2,3**, 185-202 (1998)
3. K. Sera, T. Yanagisawa, H. Tsunoda, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, S. Suzuki and H. Orihara., "Bio-PIXE at the Takizawa facility (Bio-PIXE with a baby cyclotron)",*Int'l Journal of PIXE* Vol. **2**, No.3 325-330 (1992)
4. K. Sera and S. Futatsugawa, "Spectrum Analysis Taking Account of the Tail, Escape Functions and Sub-lines. (SAPIX version 4) "*Int'l Journal of PIXE* Vol.**10**-3,4, 101-114 (2000)