

F-7000形分光蛍光光度計を用いた 蛍光指紋による食品分析技術

Introduction of food distinction technology by
fluorescence fingerprint measurement with F-7000

堀込 純*1

1. はじめに

蛍光指紋を用いた食品分析は、試料特有の自家蛍光パターン（蛍光指紋）を取得し、得られた膨大な蛍光強度の数値データを多変量解析することで、試料の種別や産地の判別¹⁾、試料の混合割合の算出²⁾、カビ毒などの危害物質の検知³⁻⁶⁾、機能性成分の定量などへの応用が期待されている。試料の蛍光指紋は、分光蛍光光度計の3次元蛍光スペクトル測定モードにて、励起波長と蛍光波長、蛍光強度の3事象を等高線図や鳥瞰図などでプロットすることで得る。蛍光は励起波長よりも長波長側に観測されること、同一成分であれば励起波長を変えても蛍光波長は変わらないことから、等高線図に描かれる蛍光強度の分布は指紋状に見て取れる。従来は着目する成分の励起波長・蛍光波長からなる単一のピーク波長を用いて成分の判別や定量を行っていたが、試料が有する多成分の蛍光情報を網羅的に解析することで、分析の高精度化が期待される。

2. F-7000形分光蛍光光度計と自動フィルタ付属装置について

F-7000形分光蛍光光度計は、クラス最高レベルのスキャンスピード（60,000 nm/min）と高速スキャンに対応したレスポンス処理の自動設定、迅速な励起波長切り替えなど3次元蛍光スペクトル測定の高スループット化技術が組み込まれている。この3次元蛍光スペクトル測定において、ゴーストピークとして出現する高次光の影響を簡便・迅速に取り除くことが課題であった。図1に示す自動フィルタ付属装置は、測定条件に合わせて自動でフィルタが挿入され、分光器特有の高次光（2次光、3次光など）の不要光の影響をなくすることができる（図2）。



図1 F-7000形と自動フィルタ付属装置の外観

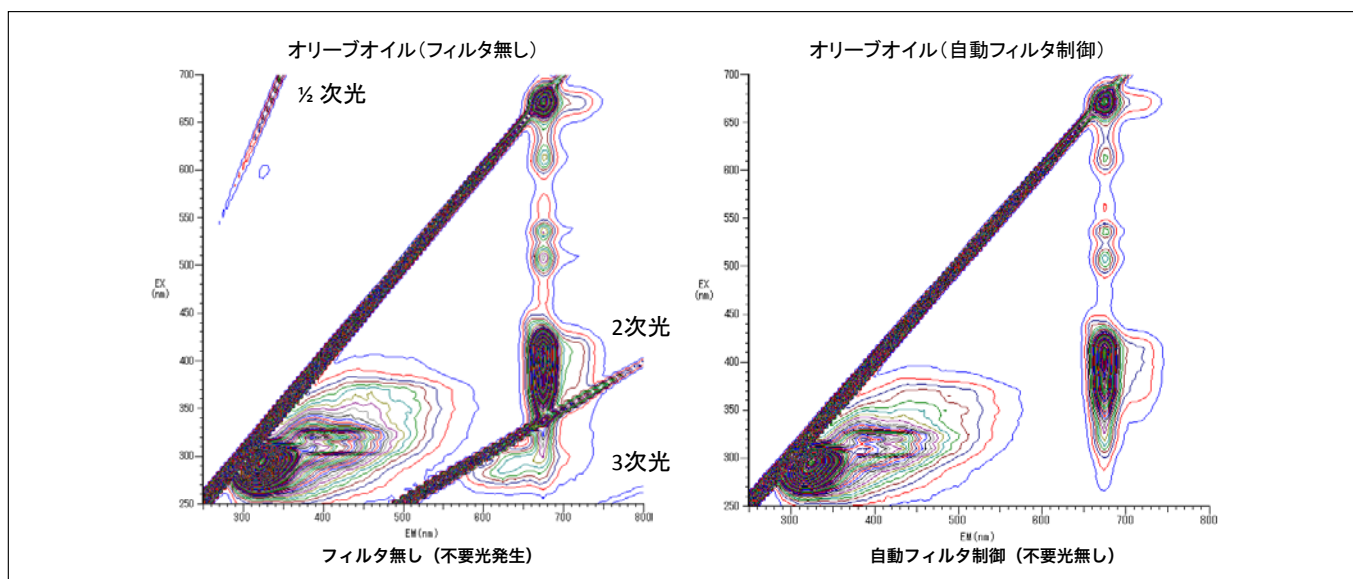


図2 3次元蛍光スペクトルの一例(オリーブオイル)

3. 蛍光指紋分析の3つの特徴

ここで、蛍光指紋分析の3つの大きな特徴を示す。

3-1 膨大な情報量にて判別分析が可能

一般的に励起波長と蛍光波長は紫外域から可視域の波長範囲(200 nm ~ 800 nm 程度)で測定する。得られる蛍光強度は、数万点となるが、この膨大な数値データを多変量解析し判別分析に用いる。

3-2 分析の簡便性

一般的に食品や農作物を機器分析する際には、さまざまな工程を伴う前処理を行う。蛍光指紋分析は極力試料そのものが有する自家蛍光を測定する。そのため、粉碎、溶解、ろ過など必要最低限の前処理で測定することが可能である。果実の切片や生肉などの試料を直接分析することも多々ある。煩雑な前処理が不要なことも魅力の一つである。また、試料は溶液状態、固体状態(板状・粉末状等)にて分析可能である。

3-3 分析コストの低減

一般的な分析機器に比べて装置の導入コストやランニングコストが安価である。例えばカビ毒の分析例が藤田ら³⁻⁶⁾によって報告されているが、蛍光指紋による分析法は、高額な質量分析法などの前段階の試料選別(スクリーニング分析)に用いることで分析コストの低減が期待される。

4. 蛍光指紋を用いた食品分野への応用事例

4-1 でんぷんの原材料ごとの判別例

トウモロコシ、馬鈴薯、小麦を原料とするでんぷんを用意し、蛍光指紋の測定結果からでんぷんの種別判別を試みた。試料は粉末セルに0.7 cc程度を封入し、試料表面の蛍光を測光することができる固体試料ホルダに設置した(図3)。得られた蛍光指紋を図4に示す。それぞれの試料にて、いくつかのピークが確認された。蛍光波長300 nm付近に観測されたピークはタンパク質を構成するアミノ酸に由来するピークと推測される。出現するピーク波長は試料間で大きな差は確認されなかったが、ピーク強度の違いが確認された。そこで、ピークやバレーに相当する代表的な波長の蛍光強度を抽出し、主成分分析を行った。結果を図5に示す。縦軸は主成分1、横軸は主成分2である。それぞれの原料ごとにプロットが大別されていることが分かる。例えば、混合品が入るとプロット位置が純品と異なることが見て取れる。これはトウモロコシ由来と馬鈴薯由来の混合品と推定される。主成分分析を用いることで、未知試料の原材料の把握、品質管理、不良品解析への応用が期待される。

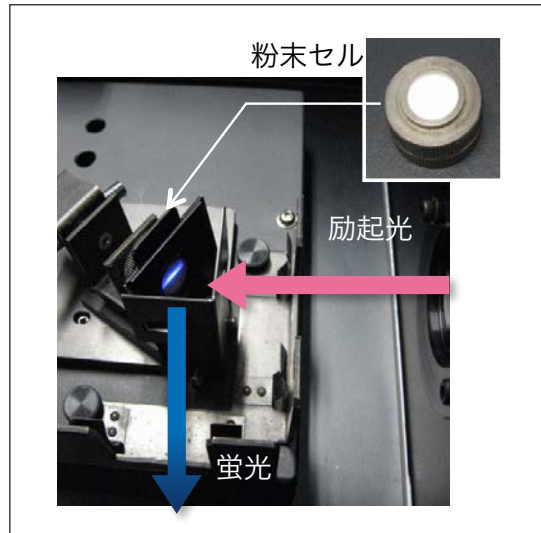


図3 サンプル設置

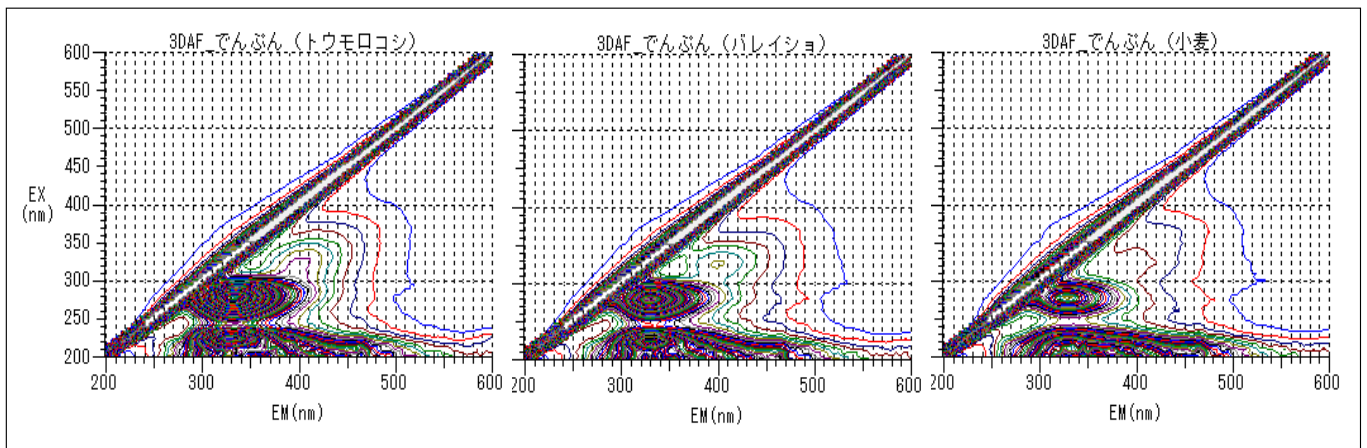


図4 各原材料ごとのでんぷんの蛍光指紋

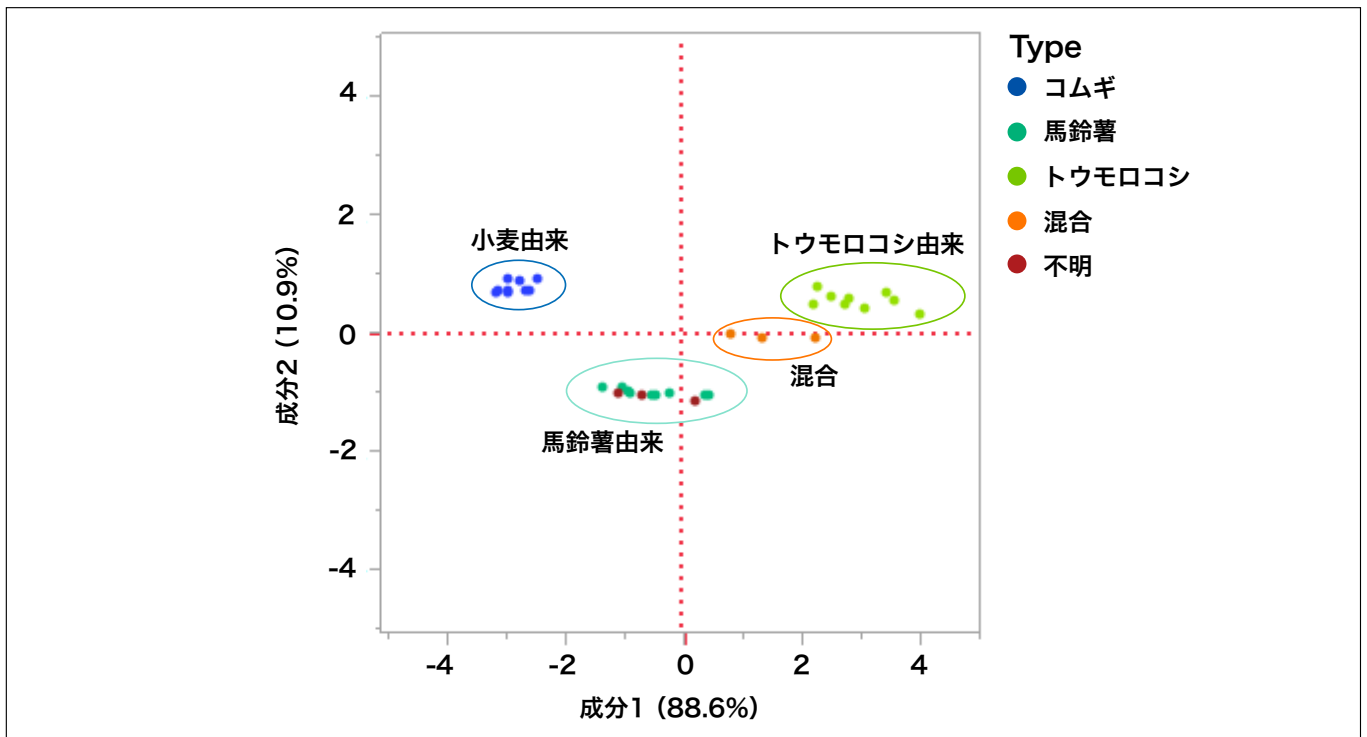


図5 主成分分析結果

4-2 ウコン粉末の混合比率算出例

春ウコン粉と秋ウコン粉の蛍光指紋を測定し、春ウコン粉に特異的な蛍光波長を用いて、春ウコン粉と秋ウコン粉の混合比の推定を行った。図 6-a に春ウコン粉 0%，秋ウコン 100%，図 6-b に春ウコン粉 100%，秋ウコン 0% の蛍光指紋を示す。また、模擬試料として春ウコンにて 25%，50%，75% となるように配合したものを用意した。それぞれの蛍光指紋の測定結果を図 6-c ~ 図 6-e に示す。励起波長 340 nm，蛍光波長 440 nm に春ウコン粉に特有の蛍光ピークが確認された。春ウコン 0% を STD1 とし、春ウコン 100% を STD2 として、この波長における蛍光強度を用い検量線を作成し、春ウコンと秋ウコンの混合粉の蛍光強度から混合比を算出した (図 7)。

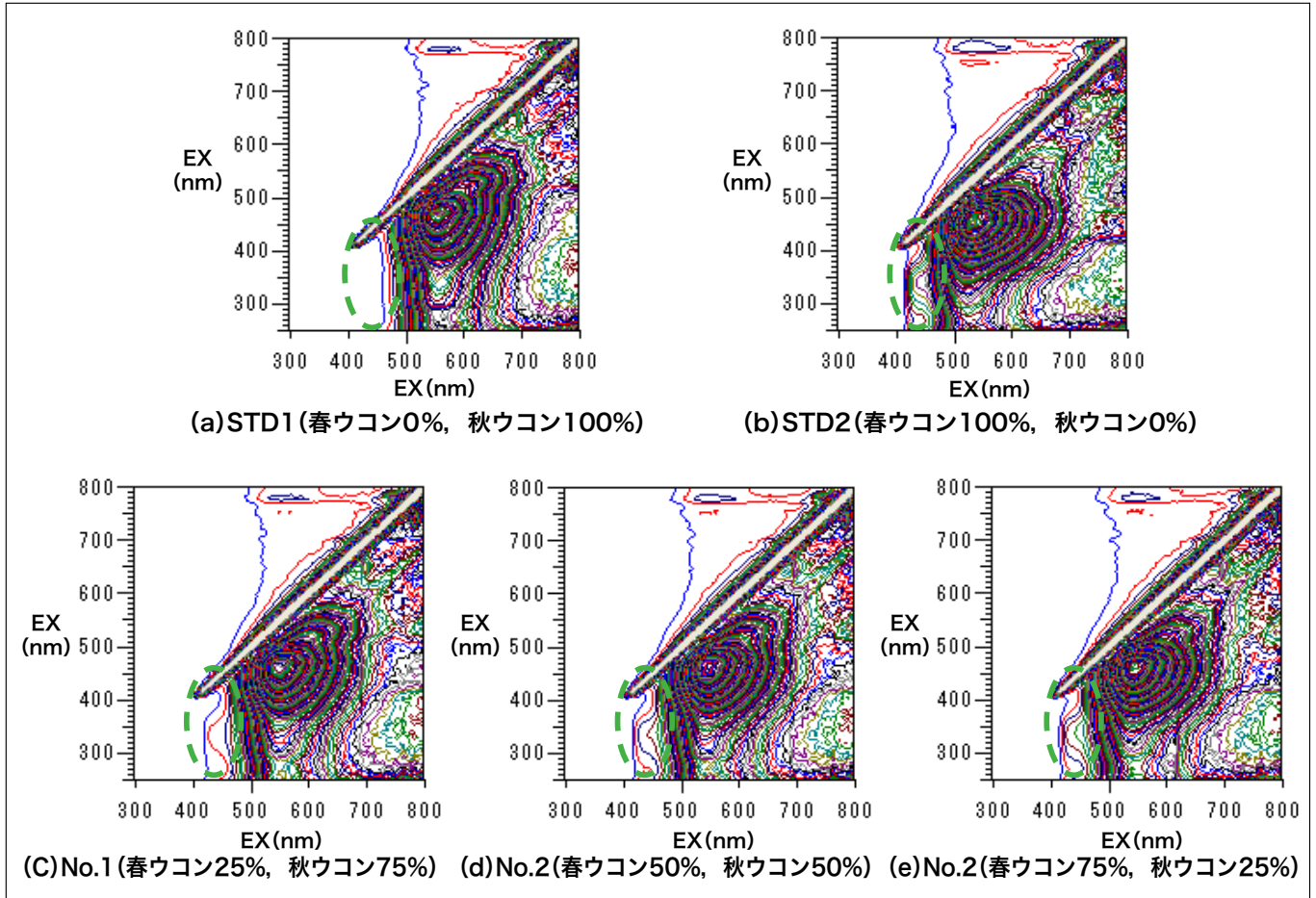


図6 ウコンの混合比別3次元蛍光スペクトル

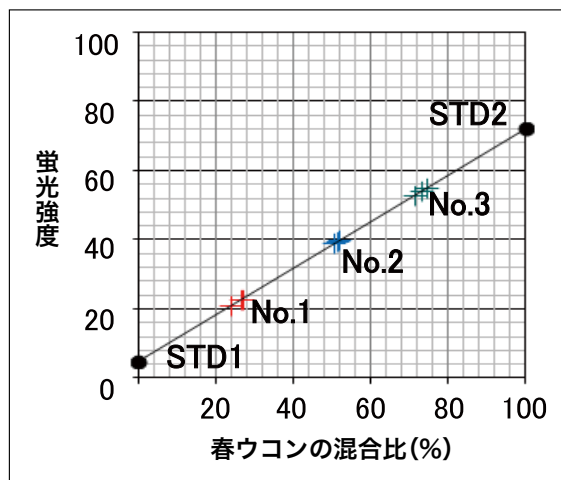


図7 蛍光強度と混合比 (%) の相関

測定の結果, 測定誤差の範囲内で理論混合比との一致が確認された(表1, 表2)。試料特有の蛍光指紋から識別波長を探索し, その蛍光強度または蛍光強度比を用いることで, 粉末試料の混合比率推定が可能となる。

表1 試料の蛍光強度 (N=3)

	STD1	STD2	No.1	No.2	No.3
1	5.51	72.58	22.90	39.86	54.10
2	4.68	72.76	20.96	39.51	55.15
3	4.91	71.29	22.98	38.94	53.05
平均値	5.04	72.21	22.28	39.44	54.10

表2 春ウコン混合比 (%) の算出結果 (N=3)

	No.1	No.2	No.3
1	26.6	51.8	73.0
2	23.7	51.3	74.6
3	26.7	50.5	71.5
混合比算出値	25.7	51.2	73.0
理論混合比	25.0	50.0	75.0

4-3 オリーブオイルの判別分析例

市販のオリーブオイルとバージンオリーブオイルの蛍光指紋を測定した。図8に測定結果を記す。希釈などの前処理を行わず, PMMA製のセルに試料を入れ, 試料表面からの蛍光を測光した。すべてのオリーブオイルで励起波長250 nm ~ 450 nm, 蛍光波長300 nm ~ 600 nm付近(領域1)と励起波長300 nm ~ 700 nm, 蛍光波長650 nm ~ 750 nm(領域2)の2つの領域で蛍光ピークが確認された。領域1は酸化生成物に相当する蛍光, 領域2はクロロフィルに相当する蛍光と示唆されている⁷⁾。領域1から蛍光ピーク(i)励起波長320 nm, 蛍光波長400 nmおよび領域2から蛍光ピーク(ii)励起波長415 nm, 蛍光波長675 nmの蛍光強度をピックアップし, 蛍光強度比((ii)/(i))を算出した。蛍光強度比を比較したところ, バージンオリーブオイルの方が, オリーブオイルよりも高い値を示した。バージンオリーブオイルは, オリーブの果実から搾り取った油であり, 精製などの処理を行っていないことから, オリーブの果実に含まれるクロロフィルが高く検出されている。一方, オリーブオイルは, 精製などの処理を行っているため, その過程でクロロフィルの含有量が低下したため低く検出されたものと考えられる。また, 酸化生成物に相当する蛍光もバージンオリーブオイルの方が低い値となっている。実際には, バージンオリーブオイルは, 酸度や香り・風味などの品質基準によって定められるので, 本方法にてオリーブオイルの品質を決定付けることはできないが, 偽造品などの簡易判定への応用が考えられる。

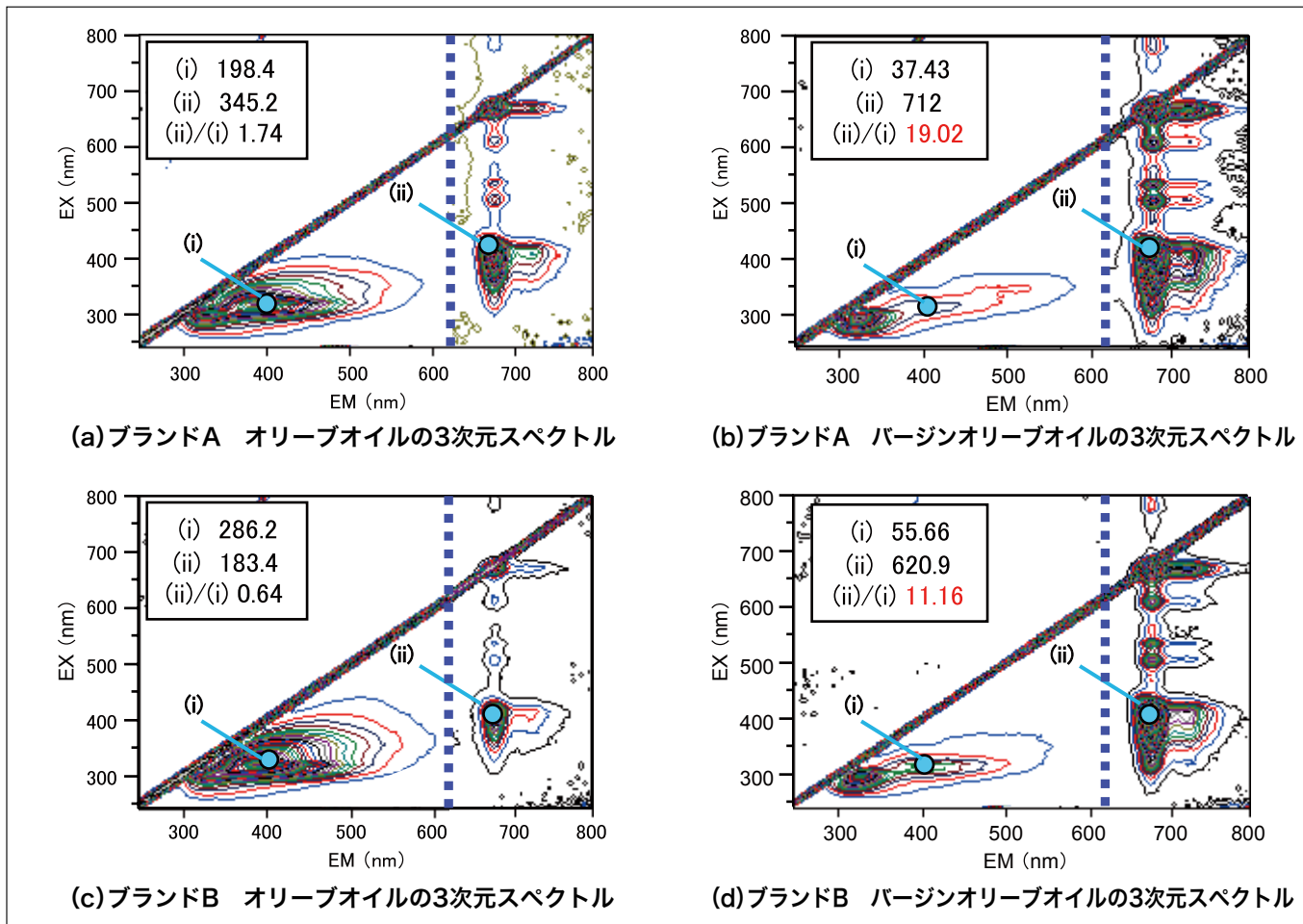


図8 オリーブオイルの3次元蛍光スペクトル

4-4 パイナップルの判別分析例

果実製品としてパイナップルを例に挙げ、3次元蛍光スペクトルを測定し種類の分別を行った。パイナップルジュースの蛍光指紋を図9に示す。3次元蛍光スペクトル測定の結果、アミノ酸、ビタミン、クロロフィルと推測される蛍光指紋が確認された。次に、各パイナップル試料にて3次元蛍光スペクトル（蛍光指紋）を取得し、主成分分析を行った。試料は、幅広セルに入れ、固体試料ホルダに設置した。ジャムや果実など不均一な試料は石英板に試料が密着するように封入して設置した。

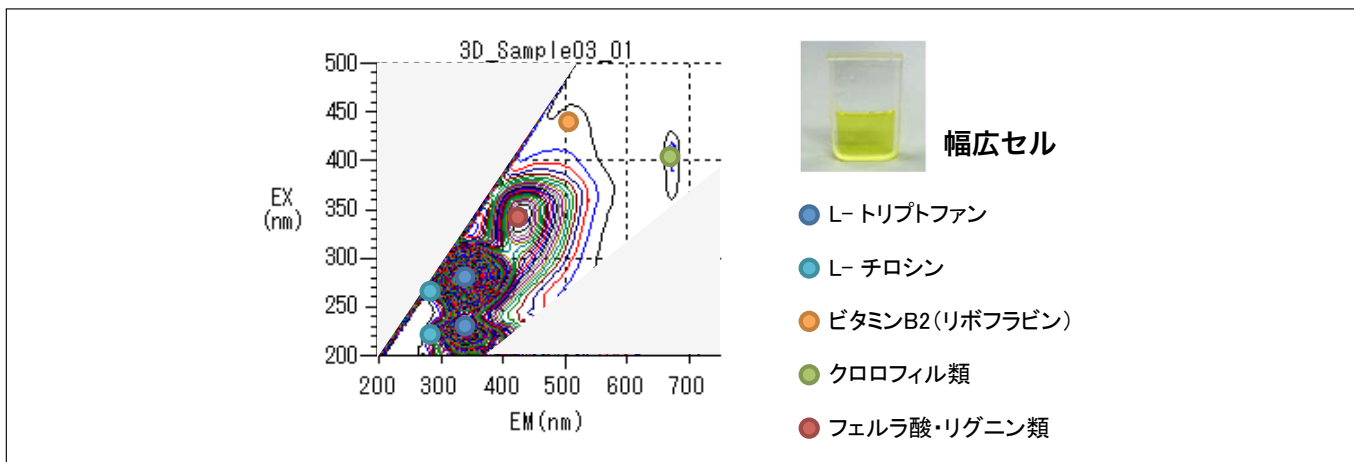


図9 パイナップルジュースの蛍光指紋と自家蛍光物質の予測

図10に各試料の主成分分析による判別例を示す。生のパイナップル果実は、主成分1と主成分2が正の値となり、缶詰のパイナップル果実は原点付近の値となった。パイナップルのみから作られたジャムは原点付近の値であり、マンゴーとのミックスジャムは主成分1が正の値、主成分2は負の値となった。ストレートタイプのパイナップルジュースは、主成分1が原点からわずかに負の値であり、主成分2はわずかに正の値であった。濃縮還元タイプのパイナップルジュースは主成分1と主成分2は負の値であった。今回の結果では、主成分1と主成分2の算出値が正であるほど加工されていない状態であるという特徴が得られた。

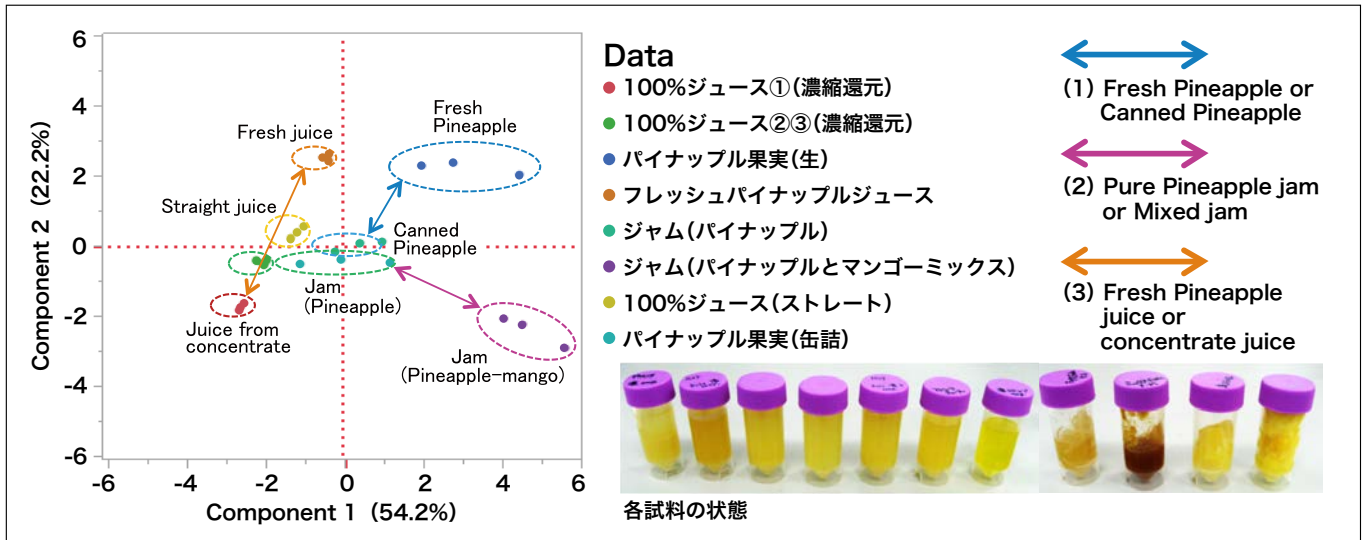


図10 各試料の主成分分析による判別例

5. 終わりに

食品分野では、多種多様な試料が存在し、分析によって着目する観点も目的によって大きく異なる。そのため、現在は試料・目的に応じた分析手法の確立など応用事例の拡充に関する研究がなされている⁵⁾。蛍光指紋分析を食品分野に応用する試みは、多方面の研究成果が報告されてきており、ここ数年で注目度が飛躍的に向上してきている。蛍光指紋分析が、従来の方法よりも簡便に迅速な測定手法として確立され、社会に貢献できる技術となることに期待している。

参考文献

- 1) 中村結花子, 藤田かおり, 杉山純一, 葛瑞樹, 柴田真理朗, 吉村正俊, 粉川美踏, 鍋谷浩志, 荒木徹也, 「蛍光指紋計測によるマンゴーの産地判別」日本食品科学工学会誌, 59, 387-393 (2012)
- 2) 杉山武裕, 藤田かおり, 葛瑞樹, 杉山純一, 柴田真理朗, 粉川美踏, 荒木徹也, 鍋谷浩志, 相良泰行, 「励起蛍光マトリクスによるそば粉と小麦粉の混合割合の推定」, 日本食品科学工学会誌, 57, 238-242 (2010)
- 3) 藤田かおり, 葛瑞樹, 杉山純一, 「励起蛍光マトリクス計測を応用したデオキシニバレノールの新規判別法」日本食品科学工学会誌, 55, 177-182 (2008)
- 4) Fujita K., Tsuta M., Kokawa and Sugiyama J., Detection of deoxynivalenol using fluorescence excitation-emission matrix, *Food and Bioprocess Technol.*, 3, 922-927 (2010)
- 5) 藤田かおり, 葛瑞樹, 杉山純一, 久城真代, 柴田真理朗, 「蛍光指紋による小麦粉中のデオキシニバレノールの非破壊計測」, 日本食品科学工学会誌, 58, 375-381 (2011)
- 6) 藤田かおり, 杉山純一, 葛瑞樹, 小澤徹, 柴田真理朗, 吉村正俊, 粉川美踏, 久城真代, 「蛍光指紋を利用したコムギ中のカビ毒の非破壊簡易検出法の開発」, 農業情報研究, 21, 11-19 (2012)
- 7) Jakob Christensen, Lars Nørgaard, Rasmus Bro, and Søren Balling Engelsen., Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems, *Chemical Reviews*, 106 (6), 1979-1994 (2006)

著者所属

*堀込 純
(株)日立ハイテクサイエンス 光学技術部