

軽元素安定同位体比分析による小豆の原産地判別及び小豆加工品の原料原産地判別法の検討

井伊 悠介

II Yusuke

要約

炭素及び酸素安定同位体比分析による小豆の原産地判別法及び小豆加工品の原料原産地判別法の検討を行った。北海道産を中心にした国産 72 試料、中国及びカナダ産を中心にした外国産 68 試料を用いた。得られた結果から判別モデルを作成し、求めた特異度及び感度を評価したところ、良好な判別モデルではなく、炭素及び酸素安定同位体比分析のみによる小豆及び小豆加工品の産地判別は困難と考えられた。

1. はじめに

食品に関する表示は、食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づく食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）において、一般用生鮮食品にあつては「名称」及び「原産地」を、一般用加工食品にあつては「名称」、「原材料名」等を表示することとされている。さらに、輸入品以外では対象原材料の「原産地」を、輸入品では「原産国」を表示することとされている。

アズキ (*Vigna angularis*) はササゲ属の豆類で、日本ではあんや赤飯の原材料として利用されている。国内の年間生産量（乾燥子実）は 48,900 トンで、93% は北海道産である¹⁾（平成 27~30 年産の平均）。一方で、小豆や小豆加工品は輸入されており、年間輸入量は、乾燥子実が 20,600 トン（中国 49%、カナダ 48%）、冷凍されたものは 24,700 トン（中国 58%、タイ 34%）、砂糖を加えたものは 62,500 トン（中国 98%）である²⁾（平成 27~29 年の平均）。国産に比べ外国産は安価であることを考慮すると、産地偽装の懸念があることから、科学的手法による産地判別法の確立が望まれる。

農産物等の産地判別法に用いる手法として、安定同位体比や無機元素等の分析が挙げられる^{3,4)}。これらの手法による食品の産地判別の検討は、農林水産消費安全技術センター（FAMIC）でも実施しており、最近ではサトイモ⁵⁾、オクラ⁶⁾、乾燥ひじき⁷⁾、精米⁸⁾、ニンジン⁹⁾等の原料原産地判別法を報告している。

元素分析を加工食品の原料原産地判別の検討に用いる際は、加工工程による元素濃度の変動を考慮する必要がある。例えば、梅¹⁰⁾やワカメ¹¹⁾において、加工による元素濃度の変動が報告されている。日本食品標準成分表には、小豆と小豆加工品であるあんの水分、たんぱく質、元素等の成分量が収録されており、小豆とあんでは元素濃度が異なる傾向にある¹²⁾。

軽元素安定同位体比分析は、炭素や酸素等の試料に多く含まれる軽元素の安定同位体比を測定する手法であり、例えばコメ¹³⁾、りんご果汁¹⁴⁾、りんご¹⁵⁾、原木しいたけ¹⁶⁾、玄そば¹⁷⁾についての産地判別の報告がある。また鈴木ら¹⁸⁾は、うなぎ加工品について、活鰻とそれから製造した

蒲焼きを用いて加工工程の影響等を調査し、焼きの工程は炭素、窒素、酸素安定同位体比に影響を及ぼさないこと及び、活鰻と蒲焼きに用いたれでは炭素、酸素、窒素安定同位体比は異なるが、蒲焼きを測定する際に内側の組織を用いて水洗浄と脱脂を行うことでたれの影響を取り除いたことを報告している。これらの事例から類推すると、元素分析の適用が困難な加工食品でも軽元素安定同位体比分析の適用が期待できる。

そこで本調査研究では、炭素及び酸素の安定同位体比分析による小豆及び小豆加工品の原産地判別の検討について、小豆加工品の加工工程の影響の軽減法並びに国産及び外国産の小豆の判別モデルの検討を行った。

2. 実験方法

2.1 小豆加工品の加工工程の影響の軽減法の検討

小豆加工品の一例として加糖あんが挙げられる。あんには多量の砂糖が使われるため、加糖あんの安定同位体比は、原料小豆と砂糖の安定同位体比の間の値になる可能性がある。本調査研究では加工工程の影響の除去の検討対象を加糖あんとし、加工工程の影響の軽減法として、加糖あんから砂糖を除く手法を検討することとした。

2.1.1 模擬あんの作製

小豆と砂糖の配合が既知の試料により検討を行う必要があるため、加糖あんを試作した（以下「模擬あん」という。）。模擬あんは小豆 100 g、砂糖（サトウキビ糖）120 g及び水 300 mLの割合で混合し、電気無水鍋（型番KN-HW24E-R、シャープ）により「つぶあん」モードで作製した。

2.1.2 模擬あんに含まれる砂糖の影響の軽減処理

温水抽出により模擬あんに含まれる砂糖の除去を行った。50 mLの遠沈管に模擬あん15 gを採取し、55 °Cに加温した超純水25 mLを加え、上下に激しく5回振り、この遠沈管を55 °Cの温水中に30分間静置した。その後、遠心分離（4200×g、10分間）を行い、上澄みを取り除いた。この操作を3回又は5回行った。これらの沈殿物及び砂糖の除去操作を実施していない模擬あん、すなわち温水抽出0回の模擬あんをそれぞれ15 g冷凍し、凍結乾燥機（FDS-1000またはFDU-1200、ともに東京理化工械）により水分を除去した。

2.1.3 試料の粉碎

模擬あんの原料小豆（5 g）及び凍結乾燥した模擬あんをそれぞれジルコニアコーン（ZC-100R、安井器械）とともに100 mLのポリプロピレン製チューブ（ST-10010、安井器械）に入れ、マルチビーズショッカー（MB831（S）型、安井器械）により粉碎した（4200 rpm、35秒）。ただし、2.1.2の砂糖の除去操作を実施していない温水抽出0回の模擬あんについては、粘性がありビーズショッカーによる粉碎が困難なため、本項の操作を実施せずに2.1.4に供した。

2.1.4 炭素及び酸素の安定同位体比の測定

2.1.3の試料、砂糖及び自家標準物質を金属カプセルに採取し、安定同位体比質量分析装置により、炭素及び酸素の安定同位体比を測定した（測定条件は表1のとおり）。安定同位体比は測定値を自家標準物質の結果により補正し、 δ 値を使って国際標準物質からの差の千分率（‰）として求めた（下式）。

(注) 国産小豆の収集は著者以外に農林水産消費安全技術センターの石田森生（現消費者庁）、勝藤繁、龍口久子、中村圭介が担当した。

$$\delta X = R_{\text{試料}}/R_{\text{国際標準物質}} - 1$$

ここでXは炭素及び酸素のそれぞれについて¹³C及び¹⁸Oを表し、R_{試料}は試料の、R_{国際標準物質}は国際標準の安定同位体比 (¹³C/¹²Cもしくは¹⁸O/¹⁶O) である。国際標準物質は、炭素安定同位体比についてはVienna PeeDee Belemnite (VPDB)、酸素安定同位体比についてはVienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) とした。

表1 炭素及び酸素の安定同位体比の測定条件

	炭素	酸素
金属カプセル		
材質	錫 (97.5 %以上)	銀 (99.99 %以上)
直径(mm)、高さ(mm)	5、9	3.3、5
試料採取量 (mg)	0.82 砂糖は0.85	0.33 砂糖は0.26
軽元素安定同位体比分析装置		
前処理装置	元素分析装置 FlashEA2000	熱分解型元素分析装置 TC/EA
質量分析装置	Delta V Advantage	Delta V Advantage
反応温度 (°C)	燃焼 1000 還元 750	熱分解 1400
カラム温度 (°C)	60	90
カラム長 (m)	3	1.2
ヘリウム (キャリア) 流量 (ml/分)	100	80

金属カプセルはルディスイス社製、前処理装置及び質量分析装置はサーモフィッシャーサイエンティフィック社製である。

2.1.5 軽減法の評価

原料小豆、砂糖、軽減処理を行っていない模擬あん及び軽減処理を行った模擬あんの安定同位体比を比較し、軽減法の効果を評価した。

2.2 判別モデルの作成

2.2.1 モデル試料の収集

産地の判別モデル作成のために国産及び外国産の小豆を収集した^(注)。国産は農業協同組合、外国産は商社、小売店から主に収集した。国産は、生産量が国内の93%を占める北海道を中心に72試料(北海道産 [57]、群馬県産 [2]、栃木県産 [2]、長野県産 [3]、京都府産 [2]、兵庫県産 [3]、岡山県産 [3])、外国産は、乾燥子実の輸入量の約半分を占める中国(49%)とカナダ(48%)を中心に68試料(中国産 [37]、カナダ産 [25]、豪州産 [4]、アルゼンチン産 [1]、タイ産 [1])を収集した。

2.2.2 モデル試料の測定

モデル試料5gを2.1.3と同様に粉碎し、目開き150µmのふるいを通過したものを収集し、2.1.4と同様に炭素及び酸素の安定同位体比を測定した。

2.2.3 判別モデルの作成

2.2.2で得られた測定結果より、中村らの方法¹⁹⁾²⁰⁾をもとに判別式を作成し、以下の2つの判別基準値(試料の判別得点がそれ以上になると国産と判別する値)について、特異度(国産小豆を

国産と正しく判別する確率)及び感度(外国産小豆を外国産と正しく判別する確率)を求めて、判別モデルを評価した。1つ目は判別得点0を判別基準値とした。2つ目はROC曲線を作成し、感度100%、偽陽性(国産小豆を外国産小豆と誤って判別する確率)0%の点から一番距離が短い、ROC曲線上の点に対応する感度、偽陽性を与える判別得点の値を判別基準値とした。

3. 結果及び考察

3.1 小豆加工品に含まれる砂糖の影響の軽減の検討

測定結果を図1及び表2に示す。温水抽出を行っていない模擬あんの安定同位体比は炭素にあつては-19.24%、酸素にあつては29.06%であり、当初の予想通り原料小豆と砂糖のおおよそ中間の値であつた。原料小豆模擬あんの安定同位体比の差の絶対値(%)は、抽出回数が0回、3回、5回の順に、炭素では8.21、0.58、0.30であり、酸素にあつては5.52、0.11、0.07であつた。チューキー・クレーマーの検定を行ったところ(有意水準1%)、炭素安定同位体比においては原料小豆と3回の温水抽出の間で有意差が認められたが、原料小豆と5回の温水抽出、及び3回と5回の温水抽出の間で有意差は認められなかった。酸素安定同位体比においては原料小豆と3回の温水抽出、原料小豆と5回の温水抽出、及び3回と5回の温水抽出の間で有意差は認められなかった。よつて炭素安定同位体比では5回の、酸素安定同位体比では3回の温水抽出により、両元素の安定同位体比について砂糖の影響を除去できると考えられた。このことは、使用された副原材料に応じた前処理を行うことで原料小豆の安定同位体比を推定することが期待できることを示している。

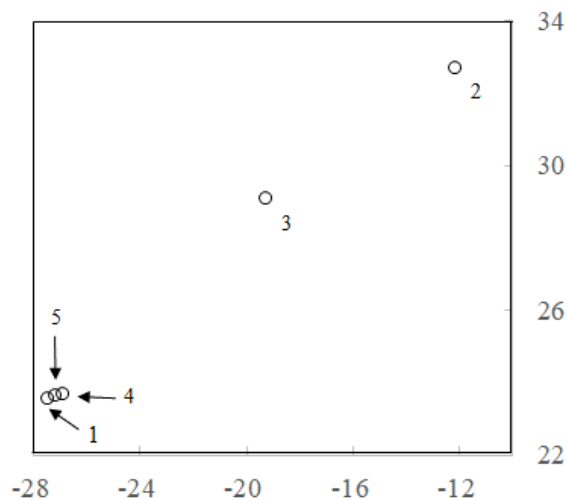


図1 原料小豆、砂糖及び模擬あんの炭素及び酸素安定同位体比の分布

横軸は炭素安定同位体比(‰)、縦軸は酸素安定同位体比(‰)を示す。1は原料小豆、2は砂糖、3は軽減処理をしていない模擬あん、4は軽減処理(3回の温水抽出)を行った模擬あん、5は軽減処理(5回の温水抽出)を行った模擬あんの平均値を示す($n=2-5$)。

表 2 原料小豆、砂糖及び模擬あんの炭素及び酸素安定同位体比

試料	炭素安定同位体比 (‰)			酸素安定同位体比 (‰)		
	n	平均値	標準偏差	n	平均値	標準偏差
原料小豆	3	-27.44a	0.16	4	23.54a	0.32
模擬あん (温水抽出0回)	5	-19.24b	0.06	5	29.06b	0.69
模擬あん (温水抽出3回)	5	-26.86c	0.08	5	23.65a	0.09
模擬あん (温水抽出5回)	5	-27.15ac	0.02	5	23.62a	0.13
砂糖	2	-12.12	0.2	2	32.68	1.04

原料小豆と模擬あんの平均値についてテューキー・クレーマーの検定を行った (有意水準1%)。異なるアルファベット間には有意差がある。

3.2 小豆の安定同位体比分析による産地判別モデルの作成

判別モデル作成用の小豆試料の炭素及び酸素安定同位体比の測定結果を表3及び図2に示す。炭素安定同位体比 (‰) の平均値±標準偏差は、国産の小豆試料では -27.31 ± 0.55 ($n=72$)、外国産の小豆試料では -26.93 ± 0.54 ($n=68$)、酸素安定同位体比 (‰) の平均値±標準偏差は、国産の小豆試料では 22.52 ± 0.54 ($n=72$)、外国産の小豆試料では 24.53 ± 1.91 ($n=68$)であり、どちらの安定同位体比も、国産の小豆試料が低く (表3及び図2)、平均値には有意差が認められた (有意水準1%)。

表 3 小豆の判別モデル作成用試料の炭素及び酸素安定同位体比の測定結果

産地	n	炭素安定同位体比 (‰)		酸素安定同位体比 (‰)	
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
国産	72	-27.31	0.55	22.52	0.77
国産 (北海道のみ)	57	-27.43	0.33	22.99	1.23
外国産	68	-26.93	0.54	24.53	1.91
外国産 (中国産のみ)	37	-26.80	0.49	25.08	1.66
外国産 (カナダ産のみ)	25	-27.12	0.57	23.39	1.06
外国産 (豪州産のみ)	4	-26.94	0.55	27.52	3.21

既報¹⁹⁾²⁰⁾を基に国産と外国産の小豆の産地判別のモデルを作成した。その際、判別精度として特異度は99%以上、感度は50%以上を目標とした。炭素及び酸素安定同位体比の測定結果から算出される判別得点の分布とカーネル密度を図3に、ROC曲線を図4に、作成したモデルにおける判別基準値及びそれに対応する特異度、感度、産地別の正答率を表4に示す。

国産の小豆試料を全て用いて作成した判別モデルにおいて、判別基準値を0にした場合、感度は62%、特異度は82%であった。ROC曲線 (図4A) を利用して判別基準値を0.202にした場合は、特異度は77%に低下した一方で、感度は67%に向上した (表4)。どちらも、目標を満たす判別モデルではなかった。

安定同位体比の平均値の差の絶対値は、主要産地の北海道産と外国産の方が国産 (全試料) と外国産よりも差が大きい結果であった。このため国産試料を北海道産に限定すれば、上記より優れた判別精度である判別モデルの作成が期待された。判別モデルを作成したところ、国産の判別得点と外国産の判別得点の重なりが軽減された (図4A及びB)。このモデルの判別式を用いて判別基準値を0とした場合、特異度は90%、感度は68%であり、ROC曲線 (図5B) を利用して判別基準値を0.187とした場合、感度は84%、特異度は71%でいずれの場合も、目標とした条件を満たすことはできなかった。

これらのことから、炭素及び酸素安定同位体比による小豆の原産地判別及び小豆加工品の原料

原産地判別は困難と考えられた。

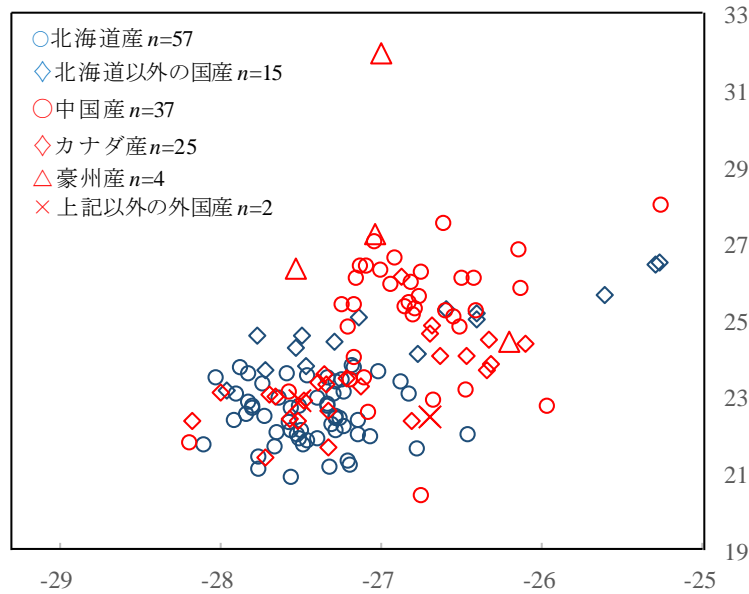


図2 判別モデル作成用の小豆の炭素及び酸素安定同位体比の分布

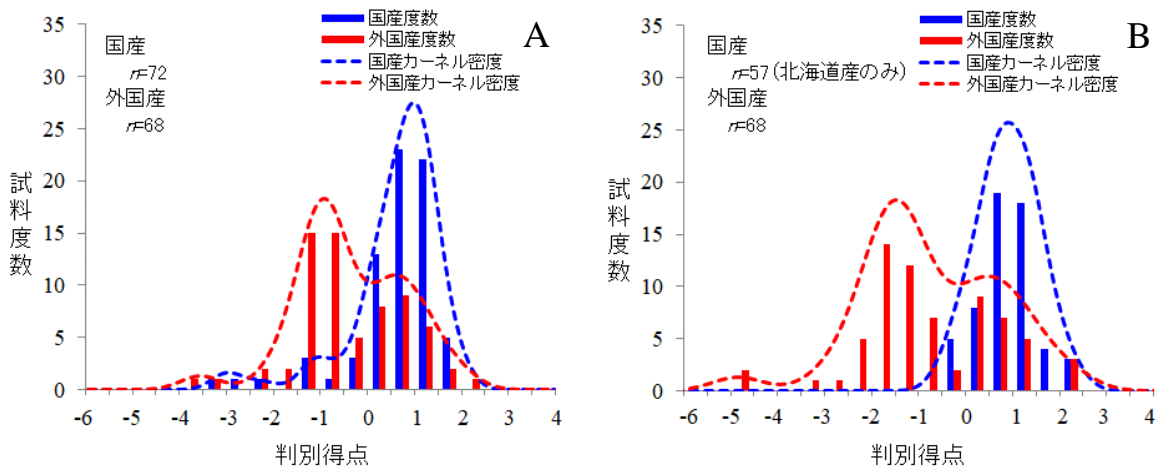


図3 炭素及び酸素安定同位体比分析による国産と外国産の小豆の判別得点とカーネル密度

3.3 産地間の炭素及び酸素安定同位体比の違い

リンゴ¹⁴⁾、りんご果汁¹⁵⁾、原木しいたけ¹⁶⁾、玄そば¹⁷⁾の国産試料及び中国産試料の炭素及び酸素安定同位体比の測定結果(平均値 ± 標準偏差(%))を比較したところ国産より中国産が高い結果であった。今回の小豆も、これらの事例と同様に炭素及び酸素安定同位体比は中国産が高い傾向であった。この傾向の理由は、産地間での生育環境の違いが考えられ、例えばリンゴでは、鈴木らは中国の方が日本より、炭素安定同位体比にあつては雨量が少ないことから乾燥の程度が高いこと、酸素安定同位体比にあつては雨水のそれが高いことを原因の可能性として挙げている。

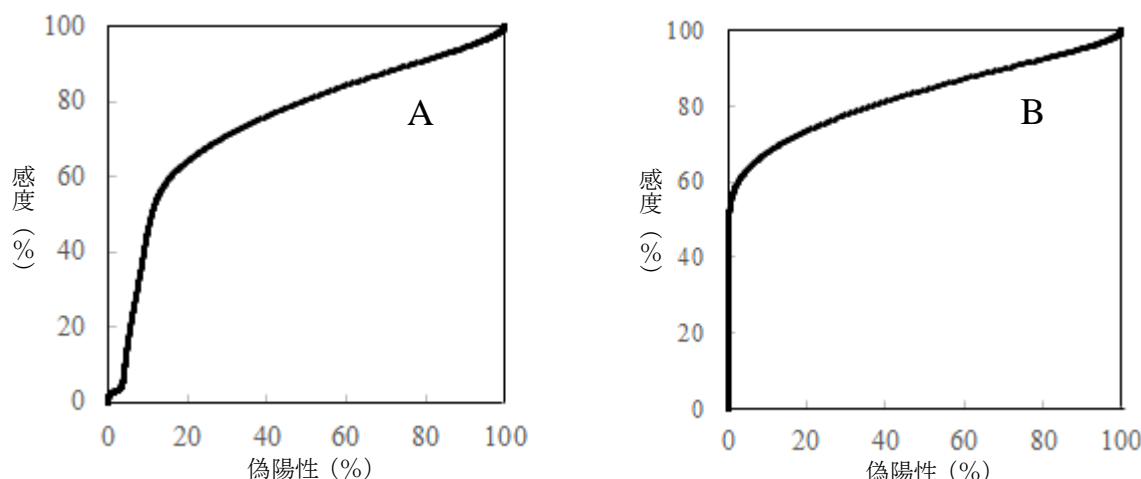


図4 炭素及び酸素安定同位体比による国産と外国産の判別基準値設定のためのROC曲線

偽陽性は国産小豆を外国産小豆と誤って判別する確率であり、 $100(\%) - \text{特異度}(\%)$ である。判別モデル用の小豆はAは全ての国産試料、Bは国産試料のうち北海道産のみである。

表4 判別モデルにおける産地判別の基準及び判別精度

判別モデルにおける 国産試料	試料の 判別得点	判別得点による 試料の判別結果	特異度 (%)	感度 (%)	モデル試料の正答率 (%)	
					国産	外国産
収集した全ての試料 <i>n</i> =72	0未満	外国産	82	62	88	62
	0以上	国産				
北海道のみの試料 <i>n</i> =57	0.202未満	外国産	77	67	77	64
	0.202以上	国産				
	0未満	外国産	90	68	91	65
	0以上	国産				
0.187未満	外国産	71	84	88	72	
0.187以上	国産					

外国産試料はいずれの場合でも*n*=68である。

4. まとめ

炭素及び酸素の軽元素安定同位体比分析による小豆及び小豆加工品の産地判別法を検討した。小豆加工品において、副原材料が安定同位体比の推定に影響を及ぼす恐れがあることから、この影響の軽減を検討した。この結果、模擬あんでは温水抽出により砂糖の影響を軽減できることが分かった。次に、国産72試料、外国産68試料を測定して判別モデルを作成した。国産と外国産で炭素及び酸素安定同位体比の平均値に有意な差が見られたが、判別得点0による判別精度とROC曲線から求めた判別得点による判別精度の比較では、前者の方が特異度は高く、感度は低い傾向であった。ただし、良好な判別モデルは得られず、炭素及び酸素の安定同位体比分析では小豆及び小豆加工品の産地判別は困難と考えられた。

謝辞

本調査研究の実施にあたり、試料収集にご協力頂いた農業協同組合、輸入商社、製造事業者の皆様にお礼申し上げます。

文献

- 1) 農林水産省：作物統計，2019-1-27，
<https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/index.html>
- 2) 財務省：貿易統計，2019-4-19，<<https://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm?M=29&P=0>>
- 3) 安井明美：食品の産地判別技術の展望，食品衛生学雑誌，**50**，191-197（2009）
- 4) 鈴木彌生子：軽元素安定同位体比分析及び微量元素分析による食品の産地判別，分析化学，**68**，671-682（2019）
- 5) 高嶋康晴，小岩智宏，豊田正俊，山川義正，寺田昌市，渡邊彩乃，中村哲：サトイモの原産地判別法の開発，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**43**，12-19（2019）
- 6) 後藤祐之介，小岩智宏，申基澈，陀安一郎：元素分析及びストロンチウム安定同位体比分析によるオクラの原産地判別検査法の開発，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**43**，20-26（2019）
- 7) 高嶋康晴，松野和久：元素分析による乾燥ひじきの原料原産地判別法の開発，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**44**，1-7（2020）
- 8) 山川義正，中村哲，石井修人：元素分析による精米の原産地判別法の開発，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**44**，8-15（2020）
- 9) 後藤祐之介，川井清明，申基澈，陀安一郎：元素及び重元素安定同位体比分析によるニンジンの産地判別法の開発，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**44**，16-25（2020）
- 10) 古市幸生，水野隆文，山下佳伸，鈴木淳史，小畑仁，梅宮善章：和歌山県産南高梅の梅干加工工程におけるミネラル及び有機酸含量の変化，日本食品科学工学会誌，**52**，472-478（2005）
- 11) 絵面智宏，國分敦子，阿部洋俊，濱田真子，加藤栄一，鈴木彌生子：加工による影響を受けにくい微量元素組成による原藻わかめ，湯通し塩蔵わかめおよび乾わかめの産地判別，日本食品科学工学会誌，**63**，427-432（2016）
- 12) 文部科学省：日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）
- 13) 鈴木彌生子，中下留美子，赤松史一，伊永隆史：生元素安定同位体比解析によるコシヒカリの産地判別の可能性，日本食品科学工学会誌，**55**，250-252（2008）
- 14) 中下留美子，鈴木彌生子：安定同位体比分析による国産及び輸入リンゴ果汁の原産国判別の可能性，分析化学，**58**，1059-1061（2009）
- 15) 鈴木彌生子，中下留美子，河邊亮，北井亜希子，富山眞吾：炭素・酸素安定同位体比分析による青森県産および中国産リンゴの産地判別の可能性，日本食品科学工学会誌，**59**，62-75（2012）
- 16) 時本景亮，田淵諒子，作野えみ，鈴木彌生子，川崎晃，平田岳史：原木栽培シイタケの産地判別におけるストロンチウム同位体分析，炭素・窒素・酸素同位体分析および微量元素濃度分析の有用性比較，財団法人日本きのこセンター菌茸研究所研究報告，**49**，28-34（2019）
- 17) 鈴木彌生子：安定同位体比分析を用いる玄そばの産地判別の可能性，分析化学，**70**，1-8（2021）
- 18) 鈴木彌生子，中下留美子，伊永隆史：安定同位体比分析によるウナギ加工品の産地判別の可能性，分析化学，**58**，1067-1070（2009）
- 19) 中村哲，法邑雄司，豊田正俊：ゴボウの原産地判別の試料調製法の再検討，農林水産消費安全技術センター調査研究報告，**37**，1-10（2013）

- 20) 中村哲：元素分析によるネギの原産地判別マニュアルの検証，農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告，**43**，1-11（2019）