

食品関係等調査研究報告

第45号

令和3年

Research Report of Food Products

Vol.45

2021



独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
Food and Agricultural Materials Inspection Center
(Incorporated Administrative Agency)
Saitama, Japan

はじめに

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）は、農林水産省の指示の下、肥料、農薬、飼料、食品等を対象として科学的な検査・分析を行い、農業生産資材の安全性の確保、食品等の品質の改善・表示の適正化等に技術で貢献することを使命としています。

食品表示については、食品表示法に基づく食品表示基準により、食品関連事業者が適切な表示をすることとなっています。FAMICでは、食品表示の真正性の確認のため、市販品等を対象に科学的検査を実施し、検査の結果、表示に疑義が認められた場合には、農林水産省に報告するとともに、表示監視行政機関等からの要請による検査・分析についても対応に努めているところです。

令和4年4月には食品表示基準の一部改正による加工食品の原料原産地表示が完全に義務化される中、その真正性の確認に対するニーズが高まっており、引き続き食品表示の監視業務を効率的かつ効果的に行うための検査・分析技術が求められています。

このため、FAMICでは、食品表示に関する調査研究分野において、重点化して取り組むべき検査・分析技術を明確化するとともに、研究機関や大学と連携して調査研究に取り組んでおり、その成果を食品表示の監視業務に活用していくこととしています。

今般、令和2年度までの調査研究の成果を収録した「食品関係等調査研究報告」第45号を発行しました。本研究報告が食品表示の適正化の一助となることを期待するとともに、関係各位には、成果の活用や検査・分析手法の更なる改良・開発に向けて、引き続き、ご指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

令和3年12月

独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
理事長 木内 岳志

目 次

シヨウガの原産地判別法における分析時間短縮についての検討 中村 哲	1
元素分析によるブロッコリーの原産地判別法の開発 川井 清明, 後藤 祐之介	8
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	15
炭素安定同位体比分析による小麦加工品の原料小麦の原産地判別法の検討 寺田 昌市, 一色 摩耶	24
【他紙掲載論文（抄録）】	
Dt1 遺伝子座に基づくダイズの国産・外国産判別検査法の開発 日本食品科学工学会誌 第68巻 第6号 2021年6月 石原 敏史, 岸根 雅宏, 岡崎 法子, 豊田 正俊, 澤田 桂子, 橘田 和美	33

シヨウガの原産地判別法における分析時間短縮についての検討

中村 哲
NAKAMURA Satoru

要約

元素分析及び Sr 安定同位体比分析を用いる現行のシヨウガの原産地判別法について、測定元素の変更、スクリーニング、酸抽出及び原子吸光分光光度計の使用を検討した。その結果、シヨウガから酸抽出した Rb の濃度を原子吸光分光光度計で測定してスクリーニングすることにより、元素分析の分析時間を 1 日程度短縮するとともに、Sr 安定同位体比分析の分析点数を半分程度に削減することが可能となった。

1. はじめに

シヨウガの原産地判別法は、平成 19 年に門倉ら¹⁾が元素分析による方法を、平成 29 年には松野ら²⁾が元素分析及びストロンチウム (Sr) 安定同位体比分析による方法を報告している。松野らの方法は、シヨウガを酸分解し、元素分析を行った後、酸分解溶液を精製して Sr 安定同位体比分析を行う。また、乾燥試料中濃度を計算する都合上、固形分測定も実施する必要がある。松野らが報告した方法は、同一の生育環境で生育したシヨウガがほぼ同じ判別結果を与えるという点で優れているが、元素分析及び Sr 安定同位体比分析の両方の分析終了までに 1 週間以上かかるという問題点がある。このため、検査現場への負担が大きく、分析時間の短縮を図る必要があった。

松野らの報告を見ると、外国産 43 点の Rb の乾燥試料中濃度の最大値は 6.1 mg/kg であるが、この濃度は国産 55 点の中央値 9.4 mg/kg よりも低いため、Rb の乾燥試料中濃度でスクリーニングすることにより国産試料の半分程度について Sr 安定同位体比分析を行わずに済むことになる。Rb は誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) よりも安価な原子吸光分光光度計 (AAS) でも測定可能であることから、汎用性が向上すると考えられる。

本研究では、シヨウガの原産地判別法のうち、主に元素分析に係る部分の時間短縮を図るため、以下の 4 点の検討を行ったので報告する。

- (1) 判別モデルに使用する元素の変更
- (2) 元素分析によるスクリーニング
- (3) 元素分析における酸抽出の検討
- (4) 元素分析における AAS の使用

2. 実験方法

2.1 判別モデルの再検討

中村らの報告^{3,4)}に準じて、松野ら²⁾が報告した元素分析の結果並びに元素分析及び Sr 安定同位体比分析の組合せについて教師付き分類を行った。ただし、モンテカルロ法の試行回数は各 10000

回とした。これにより、判別に使用する元素の削減を図った。また、元素分析によるスクリーニングを行った後、Sr 安定同位体比分析を行うため、元素分析による判別得点並びに元素分析及び Sr 安定同位体比分析の組合せによる判別得点の 2 次元分布を確認した。確認に当たっては、モンテカルロ法の試行のうち各 1000 回の結果を用いて、Duong & Hazelton の Plug in 法⁵⁾による 2 変量カーネル密度推定のバンド幅行列を得た後、その中央値を最終的なバンド幅行列として、モンテカルロ法の各結果を用いて、2 変量カーネル密度推定を行った。以上の操作を国産及び外国産のそれぞれについて実施した。

解析は R 4.0.2⁶⁾並びに R のパッケージ MASS 7.3-52、e1071 1.7-3 及び ks 1.11.7 により行った。

2.2 試料

国産と表示された市販のショウガ試料1点（約20個体）を入手し、松野らの方法²⁾に従い、皮、切断痕及び食害痕を除去した後、2～3 mm程度角の細切試料とし、全個体分を混合したものを品質管理用試料とした。

これとは別に、いずれも4個体以上のショウガ市販品で国産と表示されたもの7点及び外国産（全て中国産）と表示されたもの3点を試料として入手した。これらについても品質管理用試料と同様の手順で細切試料を調製し、各試料のうち2～5個体分を混合したもの（混合試料）を1試料当たり2点、計20点用意した。

2.3 試薬

実験には、超純水製造装置（MilliQ integral、メルクミリポア）で製造した超純水（比抵抗値18 MΩ・cm以上）を用いた。試料の酸抽出には、61 %硝酸（高純度電子工業用、関東化学）を用いた。試料の酸分解には、61 %硝酸（高純度電子工業用、関東化学）及び70 %過塩素酸（TAMAPURE AA-100、多摩化学工業）を用いた。元素濃度測定用の検量線用標準溶液は、単元素標準溶液（Li、Mg、Mn、Co、Cu、Zn、Rb、Sr、Mo、Cd、Ba及びCe、ICP分析用）を適宜希釈して調製した。AASにおける干渉を補正するため、RbのAAS用標準溶液には、Kを320 mg/L含むよう、硝酸カリウム（Suprapur、メルクミリポア）の1 %硝酸溶液を加えた。

Srの精製には、Sr resin（50-100 μm、Eichrom Technologies）を用いた。

2.4 装置

元素濃度の測定には、ICP-MS（Agilent 7800 ICP-MS、Agilent Technologies）及び誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-OES）（iCAP 6300 Duo、Thermo Fisher Scientific）並びに原子吸光分光光度計（AAS）（AA-6800、島津製作所）を用いた。Sr安定同位体比の測定には、高分解能誘導結合プラズマ質量分析装置（HR-ICP-MS）（ELEMENT XR、Thermo Fisher Scientific）を用いた。

2.5 酸抽出及び酸分解

酸抽出は、次の手順で行った。まず、細切試料約30 gを恒温乾燥器で100 °C、16時間以上乾燥した後、樹脂製袋に入れてハンマーで粉碎した。次に、樹脂製遠心チューブに粉碎試料0.5～0.6 gをひょう量し、1 %硝酸15 mLを添加して、1回/秒で30回転倒混和した後、1500 ×g以上で3分間遠心分離を行い、上澄みを採取した。1 %硝酸の添加から上澄みの採取までを計3回行い、全ての上澄みを合わせた後、1 %硝酸で50 mLに定容した。酸抽出溶液には、ICP-MSの内標準としてInを5 μg/Lの濃度で添加した。定容後の酸抽出溶液約20 mLをメンブレンフィルターでろ過し、最初の約5 mLを廃棄した残りの液を酸抽出溶液として以降の操作に供した。

また、酸抽出との比較用として、松野らの方法²⁾による品質管理用試料の酸分解溶液を供した。品質管理用試料は、最初の分析ランにおいて酸抽出及び酸分解を7点併行で実施し、以降は酸抽出を2点併行で実施した。また、品質管理用試料については、添加回収試験を2点併行で実施した。その他の試料は全て酸抽出を2点併行で実施した。

2.6 ICPによる元素濃度の測定

酸抽出溶液及び酸分解溶液のLi、Co、Cu、Zn、Rb、Mo、Cd及びCeの濃度をICP-MSにより、Mg、Mn、Sr及びBaの濃度をICP-OESにより測定した。測定条件は表1のとおりとした。

表 1 ICP-MS及びICP-OESの条件

プラズマ条件	ICP-MS	ICP-OES
RFパワー	1.55 kW	1.15 kW
プラズマガスフロー	15.0 L/min	13 L/min
補助ガスフロー	0.9 L/min	0.5 L/min
ネブライザガスフロー	1.07 L/min	0.5 L/min
ポンプ速度	6 rpm	25 rpm

2.7 AASによる元素濃度の測定

酸抽出溶液のRbの濃度を表2の条件でAASにより測定した。

表 2 AASの条件

条件	AAS
フレーム種類	アセチレン-空気
燃料ガス流量	1.8 L/min
積分時間	7 s
繰返し回数	1回
バックグラウンド補正	なし
波長	780.0 nm

2.8 Sr安定同位体比の測定

酸抽出溶液については、Sr 80 ng相当量を樹脂製ヒータブルビーカーに採取し、200 °Cで溶液を乾固した後、61 %硝酸4 mL及び70 %過塩素酸1 mLを添加して、乾固するまで200 °Cで加熱を続けることにより酸分解を行った。酸分解溶液については、Sr 80 ng相当量を樹脂製ヒータブルビーカーに採取し、200 °Cで溶液を乾固した。8 mol/L硝酸6 mLによりビーカー中の乾固物を溶解し、これをSr resinに負荷した。8 mol/L硝酸3 mLを添加してSr resinを洗浄した後、0.05 mol/L硝酸 2 mLでSr を溶出させた。溶出液のSrの濃度をICP-MSで測定した後、Sr濃度が20 µg/Lとなるよう0.05 mol/L硝酸で希釈し、溶液のSr安定同位体比をHR-ICP-MSにより測定した。HR-ICP-MSによる測定手順は篠崎ら⁷⁾の方法に従った。

3. 結果及び考察

3.1 判別モデル

判別モデルを再構築した結果、Rb の乾燥試料中濃度を変数変換した値並びに Rb の乾燥試料中濃度及び Sr 安定同位体比の組合せで判別モデルが得られた。再構築した判別モデルの判別得点の2変数カーネル密度推定分布を図1に示す。図1のとおり、Rb の乾燥試料中濃度でスクリーニングを行うことにより、国産試料の半分程度について Sr 安定同位体比分析を行わずに済むことが確

認められた。このため、以降の検討において AAS で測定する元素は Rb のみとした。

新たな判別モデルを用いて、Rb の乾燥試料中濃度でスクリーニングを行い、Rb の乾燥試料中濃度及び Sr 安定同位体比の組合せによる判別得点が負の場合を外国産、それ以外を国産としたとき、国産試料の 100 % (55/55)、外国産試料の 93 % (40/43) を正しく判別した。

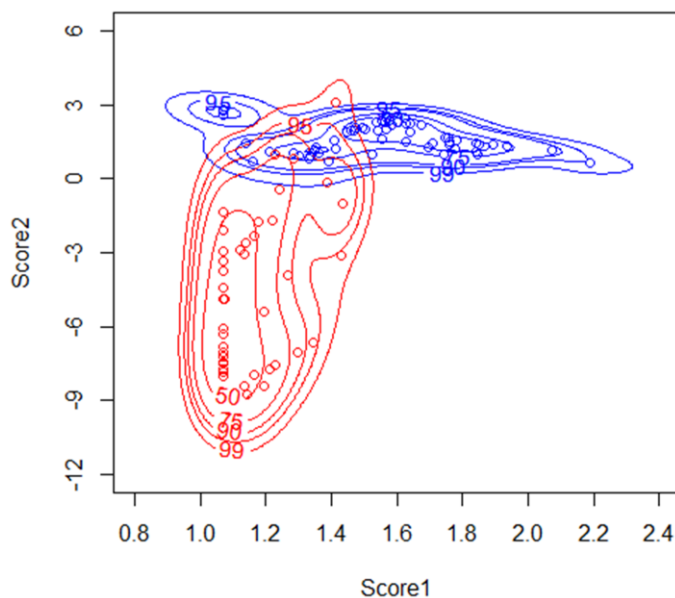


図1 Rb濃度の変数変換及び判別得点の2変量カーネル密度推定

Score1 : Rb濃度の変数変換

Score2 : Rb濃度及びSr安定同位体比の組合せによる判別得点

青 : 国産、赤 : 外国産

50、75、90及び99はそれぞれ分布の50%、75%、90%及び99%が含まれる等高線

3.2 酸抽出及び酸分解による元素分析

ICP及びAASによる品質管理用試料7点の酸抽出及び酸分解の乾燥試料中濃度の比較を表3に示す。Mo及びCe以外については、酸抽出及び酸分解のICPによる濃度比が0.93~1.09であり、ほぼ同等の結果であった。RbのAASの結果についても同様であった。また、併行精度については、酸抽出の方が酸分解よりも全体的に良好な結果となった。これは、試料を乾燥して粉砕することにより、細切試料よりも均質性が高くなったためと考えられた。一方、Moについては酸抽出において低回収率となったが、Moは酸抽出効率が他の元素よりも低く、真度に問題があると考えられた。Ceも酸分解と比較すると酸抽出の結果が低くなったが、Horwitzの修正式⁸⁾による再現相対標準偏差が22%であることから、明確に問題があるとまでは言えなかった。Coについては添加回収試験において2点中1点が高回収率となったが、この結果は試料の保管に使用していたシルカゲルデシケーターからの汚染を受けたものと考えられ、対策を取った後の分析では問題がなかったことから、分析法自体には問題ないものと考えられた。品質管理用試料の酸抽出は、以降のランでは2点併行で実施したが、Liにおいて管理外れが発生した。原因は試料の乾燥に使用した器具の汚染が考えられたが、明確には判明しなかった。

本来であれば、中村らの方法³⁾により方法の変更に伴う不確かさを計算するのが望ましいが、前述のとおり、酸分解の結果は細切試料の均質性の問題により併行精度が他の野菜類の酸分解の結果と比較すると悪い。酸分解における併行相対標準偏差は、Horwitzの修正式による再現相対標

標準偏差の 0.22~1.10 倍（全体としては 0.62 倍）であり、方法の変更に伴う標準不確かさを計算すると Horwitz の修正式による再現相対標準偏差の 0.44 倍程度の値となってしまいます。この影響により、仮に問題ない分析結果だったとしても、見かけ上の不確かさが増大してしまうとともに、別の方法、例えば検定による比較を行った場合も検出力が低くなってしまいます。このため、品質管理用試料以外の試料について酸分解との比較を実施しなかった。

混合試料 20 点の酸抽出による試料の ICP 及び AAS による Rb 濃度の測定結果の比較を図 2 に示す。ICP との濃度比は 0.88~1.03 であり、ショウガの Rb の乾燥試料中濃度の Horwitz の修正式による再現相対標準偏差が 9~17%であることを考慮すると、おおむね同等であると考えられた。Rb を AAS で測定する場合の条件については Tanaka ら⁹⁾が条件を検討しているが、ショウガにおける元素濃度を考慮すると、K の干渉が最も影響が大きく、他の元素はほとんど影響しないものと考えられた。そのため、ショウガ酸抽出溶液における K 濃度を 320 mg/L 程度として、標準溶液に K を添加することで干渉を低減した。K の添加量を 320 mg/L とした場合及び 0~480 mg/L とした場合（いずれも 2 点併行）の比較を図 3 に示す。K の濃度が 160~480 mg/L の範囲で定量値の比が 0.90~1.10 の範囲に収まっており、ショウガ試料の濃度比の結果とほぼ一致した。

混合試料 20 点の 2 点併行の結果から計算した酸抽出における併行相対標準偏差は、ICP では Horwitz の修正式による再現相対標準偏差の 0.14~0.73 倍（Mo を除く。）、AAS では Horwitz の修正式による再現相対標準偏差の 0.37 倍であった。

AAS における Rb の検出限界は溶液中濃度換算で 6 µg/L（乾燥試料中濃度換算で 0.56 mg/kg）であり、Tanaka ら⁹⁾の報告値 6.5 µg/L と概ね一致した。なお、装置によってはこの値を満たさないことがあるため、判別モデルの計算に当たっては 15 µg/L（乾燥試料中濃度換算で 1.4 mg/kg）を用いた。

松野らの方法²⁾では、酸分解を行った後 ICP-MS 及び ICP-OES による測定が必要であり、固形分測定も必要であることから、分析には 4 日程度を要していたが、酸抽出及び AAS を使用した場合は 3 日程度で分析可能となった。また、酸抽出を行うことにより酸分解を行う点数が削減されるため、過塩素酸対応ドラフトの使用頻度が下がり汎用性が高くなるとともに、硝酸及び過塩素酸の使用量も削減することが可能となった。

表 3 品質管理用試料の酸分解及び酸抽出の比較

元素	酸抽出・ICP			酸分解・ICP			酸抽出・AAS		
	平均 (n = 7) (mg/kg)	標準偏差 (n = 7) (mg/kg)	添加回収率 平均 (n = 2) (%)	平均 (n = 7) (mg/kg)	標準偏差 (n = 7) (mg/kg)	添加回収率 平均 (n = 2) (%)	平均 (n = 7) (mg/kg)	標準偏差 (n = 7) (mg/kg)	添加回収率 平均 (n = 2) (%)
Li	4.8×10^{-3}	0.6×10^{-3}	110	4.9×10^{-3}	0.7×10^{-3}	108			
Mg	2716	91	109	2550	102	90			
Mn	124.2	4.1	108	117.2	6.6	93			
Co	12.0×10^{-3}	0.4×10^{-3}	183	12.9×10^{-3}	1.3×10^{-3}	103			
Cu	3.60	0.08	104	3.77	0.18	95			
Zn	38.6	0.7	105	39.3	2.5	89			
Rb	27.7	0.2	112	26.5	1.1	95	27.4	0.6	105
Sr	4.39	0.10	103	4.05	0.12	95			
Mo	0.59	0.01	63	1.16	0.11	98			
Cd	0.129	0.003	108	0.130	0.013	99			
Ba	41.1	0.9	102	38.4	2.7	91			
Ce	24.2×10^{-4}	0.9×10^{-4}	101	30.9×10^{-4}	1.4×10^{-4}	103			

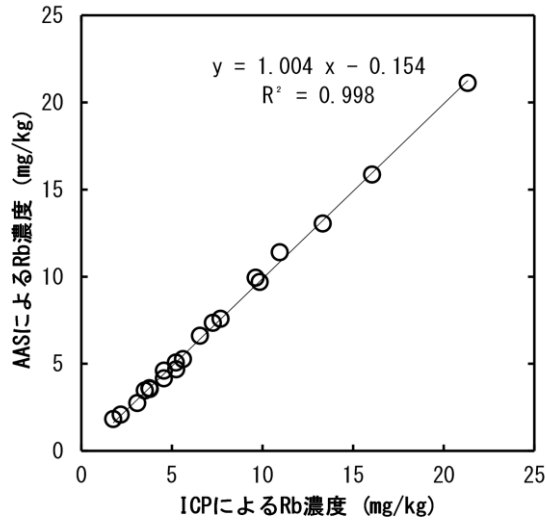


図2 酸抽出溶液の ICP 及び AAS による Rb 濃度の比較

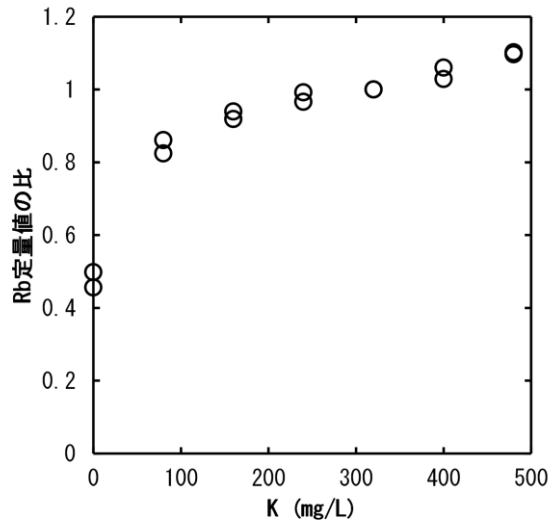


図3 AAS における Rb 定量値の K の干渉

3.3 Sr 安定同位体比分析

品質管理用試料の7点併行の平均値及び標準偏差は酸抽出溶液で0.70856及び0.00027、酸分解溶液で0.70837及び0.00028であり、有意な差は見られなかった。混合試料20点の2点併行の結果から得られた併行標準偏差の値は0.00035であり、HR-ICP-MSにおける併行標準偏差の報告値0.00033~0.00040⁷⁾と一致した。Srは酸抽出において十分回収できており、その後のSr resinによる精製工程並びに精度及び真度についても問題なかったことから、十分な精確さで測定できていることが確認された。

4. まとめ

ショウガの原産地判別法について、元素分析の測定元素をRbのみとし、酸抽出を行いAASで測定してスクリーニングを行う方法を開発した。その結果、元素分析の分析時間を1日程度短縮するとともに、Sr安定同位体比分析を行う点数を半分程度に削減することが可能となった。

文献

- 1) 門倉雅史, 有山薫: 無機分析によるショウガの原産国判別法の開発, 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, **31**, 8-15 (2006)
- 2) 松野和久, 井伊悠介, 寺田昌市, 太田民久, 申基澈, 陀安一郎: ショウガの元素分析及びストロンチウム安定同位体比分析による原産地判別法の検討, 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, **41**, 8-14 (2017)
- 3) 中村哲, 法呂雄司, 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食品関係等調査研究報告, **37**, 1-10 (2013)
- 4) 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)
- 5) Duong, T.; Hazelton, M. L.: Plug-in Bandwidth Matrices for Bivariate Kernel Density Estimation. *Nonparametr. Statist.*, **15**, 17-30 (2003).
- 6) The R Project for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, 2021-08-18, <<https://www.r-project.org/>>
- 7) 篠崎美由起, 有山薫, 川崎晃, 平田岳史: 単一検出器型高分解能誘導結合プラズマ質量分析装置を用いる穀物のストロンチウムと鉛の同位体比分析, 分析化学, **59** (11), 1003-1011 (2010)
- 8) Thompson, M.: Recent Trends in Inter-laboratory Precision at ppb and Sub-ppb Concentrations in Relation to Fitness for Purpose Criteria in Proficiency Testing. *Analyst*, **125**, 385-386 (2000).
- 9) Tanaka, G.; Tomikawa, A.; Kawamura H.: Determination of Rubidium in Biological Materials Using Atomic Absorption Spectroscopy. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**(9), 2310-2316 (1977).

元素分析によるブロッコリーの原産地判別法の開発

川井 清明, 後藤 祐之介
KAWAI Kiyooki, GOTOU Yunosuke

要約

生鮮ブロッコリーについて、元素分析による原産地判別法の検討を行った。国産の生鮮ブロッコリー60点及び外国産の生鮮ブロッコリー31点（米国産23点、メキシコ産8点）を収集し、これらの粉碎試料について15元素の濃度を測定し、国産と外国産の判別モデルを構築した。その結果、判別モデル構築に用いた試料での検証における正しく産地を判定した割合（以下「的中率」という。）は、国産及び外国産ともに100%となり、国産－外国産判別に十分な判別性能のある判別モデルが得られた。

1. はじめに

生鮮ブロッコリーをはじめとする一般用生鮮食品の表示にあつては、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、名称及び原産地の表示が義務付けられ、原産地については原則、国産品にあつては都道府県名を、輸入品にあつては原産国名を表示しなければならない。

令和元年の生鮮ブロッコリーの国内出荷量は153,700トン¹⁾であるのに対し、生鮮ブロッコリーの輸入量は9,813トン²⁾であり、外国産ブロッコリーの主な輸入相手国は、米国（75.1%）、次いでメキシコ（14.6%）、中国（8.0%）、豪州（2.3%）である。輸入品は、国産に対して比較的安価であり、かつ外観で原産地を判別することが難しいことなどから産地偽装が懸念され、原産地表示の真正性を確認するための科学的検証法の開発が求められている。

食品における原産地及び原料原産地に関する科学的検証法は、元素分析や安定同位体比分析を利用した方法が報告されている^{3)~12)}。これらの方法は、土壌や水質等の生育環境の違いが生育した農産物等の元素濃度や安定同位体比に影響を与えることを利用した判別法である。

本研究では、生鮮ブロッコリーについて元素分析による原産地判別の可能性について検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

生鮮のブロッコリー (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) を対象とした。ただし、茎ブロッコリー及び調整（カット等）したもの等は対象外とした。

収集した試料の内訳を表1に示す。国産試料については、都道府県別のブロッコリー生産量¹⁾（平成27~29年の3年間の平均）の割合を参考にして60点を収集^(注)した。外国産試料については、国ごとのブロッコリーの輸入量²⁾（平成27~30年の4年間の平均）の割合を参考にして

31 点（米国産 23 点及びメキシコ産 8 点）を収集した。これら全てを判別モデル構築用試料とした。

表 1 収集試料の内訳

	原産地	試料数	生産割合(%)	原産地	試料数	生産割合(%)
国産	北海道	10	16.7	和歌山	1	0.8
	青森	1	0.8	鳥取	2	3.8
	福島	2	2.8	島根	1	0.5
	栃木	1	1.1	岡山	1	0.7
	群馬	2	4.2	山口	1	0.5
	埼玉	5	9.6	徳島	3	6.0
	千葉	1	1.3	香川	4	8.0
	東京	1	1.4	愛媛	1	0.6
	神奈川	1	1.0	高知	1	0.6
	新潟	1	1.0	福岡	2	3.2
	石川	1	0.9	長崎	2	4.8
	長野	3	6.4	熊本	2	2.5
	静岡	1	1.1	宮崎	1	0.8
	愛知	5	10.2	鹿児島	2	2.1
	兵庫	1	0.7			
					計	60
<hr/>						
	原産地	試料数	輸入割合(%)			
外国産	米国	23	86.3			
	メキシコ	8	6.6			
		計	31	92.8		

2.2 試薬

実験には、超純水製造装置（Milli-Q Element A10、メルクミリポア）で製造した超純水（比抵抗値 18 MΩ・cm 以上）を用いた。試料の酸分解には、61 %硝酸（高純度電子工業用、関東化学）及び 70 %過塩素酸（TAMAPURE-AA-100、多摩化学工業）を用いた。各元素の検量線用混合標準溶液は、単元素標準溶液（Li、Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Cu、Zn、Sr、Cd、Cs、Ba 及び Tl、ICP 分析用、SCP SCIENCE 及び AccuStandard）を適宜希釈して調製した。また、In（ICP 分析用、SCP SCIENCE）を内標準溶液として、検量線用混合標準溶液及び試料溶液に添加した。

2.3 装置

試料の粉碎には、セラミック刃のミキサー（B-400、日本ビュッヒ）を用いた。元素濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）（820MS、Varian（現 Agilent Technologies））及び誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-OES）（725-ES、Varian（現 Agilent Technologies））を用いた。

2.4 試料調製

ブロッコリー1 株全体を超純水ですすぎ、セラミック製包丁を用いて中央の太い茎（以下「主軸」という。）と花らいに向かう枝を切り離した。更にセラミック製はさみを用いて、切り離れた枝から花らいを除去し、花らいと残った茎（以下「花茎」という。）に分離した。

(注) 国産試料の収集は、農林水産消費安全技術センターの勝藤繁、佐藤浩幸、徳原美緒、石田森生（現消費者庁）、龍口久子、小川恵吾、今村正彦、栗本温子、中村圭介、堤光典、荒尾祐子が担当した。

花茎及び主軸は、超純水で表面を洗浄した。花らいは、ある程度のかたまりに分けて超純水でため洗いをした。洗浄後、各部位ごとに、ミキサーを用いて粉碎し、以後の試料（以下「粉碎試料」という。）とした。ただし、粉碎量が不足し刃が空回りする場合は、セラミック製包丁でみじん切りした後、二重にした樹脂製袋へ入れ、樹脂製ハンマーを用いて試料全体に概ね 2 mm 以上の粒がほとんど残らない程度まで粉碎した。

2.5 酸分解

粉碎試料約 5.0 g を樹脂製ヒータブルビーカーに採取し、61 % 硝酸 10 mL を加えて樹脂製時計皿でふたをし、ホットプレート上で 120 °C に加熱した。褐色のガスが発生する激しい反応が収まった後に放冷し、70 % 過塩素酸 2.5 mL を加え、徐々に温度を上げながら 200 °C まで加熱し、分解液が透明、かつ無色又は薄い黄色になるまで分解した。時計皿を外し、約 230 °C で分解液を蒸発乾固させた後、樹脂製ヒータブルビーカーに 1 % 硝酸 10 mL 程度を加え、ビーカー内の残留物をホットプレート上で加熱・溶解し、50 mL 容樹脂製全量フラスコに移す操作を 3 回繰り返した。樹脂製全量フラスコには、内標準として In を 5 µg/L となるように加え、1 % 硝酸で 50 mL に定容後、元素濃度測定用試料溶液とした。各試料について 2 点併行で実施した。

2.6 元素濃度の測定

試料溶液中の元素濃度は、ICP-MS を用いて内標準法（内標準：In）により Li、Cu、Cd、Cs 及び Tl を、ICP-OES を用いて検量線法により Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Zn、Sr 及び Ba を、それぞれ表 2 の測定条件で測定した。これらの値を用いて粉碎試料中の元素濃度を算出した。

表 2 ICP-MS 及び ICP-OES の測定条件

プラズマ条件	ICP-MS	ICP-OES
RFパワー	1.3 kW	1.20 kW
プラズマガスフロー	15.5 L/min	15.0 L/min
補助ガスフロー	1.55 L/min	1.50 L/min
ネブライザーガスフロー	0.95 L/min	—
ネブライザーガス圧力	—	200 kPa
ポンプ速度	5 rpm	15 rpm

2.7 水分測定

水分測定は石井ら⁴⁾の方法に従った。粉碎試料約 5.0 g をアルミ箔容器に採取して、恒温乾燥器を用いて 70 °C で 24 時間乾燥し、重量の差から粉碎試料中の水分含有率を求めた。

2.8 判別モデルの構築

判別モデルの構築は、中村ら³⁹⁾の方法に準じた。測定したモデル構築用試料の粉碎試料中の元素濃度及び水分含有量から算出した乾燥試料中元素濃度、Ca 又は P に対する乾燥試料中元素濃度の比及びそれらの常用対数を説明変数として、線形判別分析（LDA）、二次判別分析（QDA）及びサポートベクターマシン（SVM）を組み合わせて解析することにより判別モデルを検討、構築した。構築した判別モデルの未知試料に対する的中率は、判別モデル構築用試料を用いた Leave-one-out cross validation（LOOCV）により確認した。

3. 結果及び考察

3.1 粉碎に供する部位の検討

ブロッコリーは、花らい、花茎及び主軸で形態が大きく異なるため、粉碎試料に供する部位を選定した。試料ごとに、これら3部位に分けて粉碎試料を調製し、比較検討した。

元素濃度の検討には、国産3点、米国産2点及びメキシコ産1点の計6点を用いた。測定した元素濃度及び水分の結果を表3に示す。同じ試料でも部位によって濃度差のある元素も見られたが元素濃度の測定上不都合はなかった。

試料調製での操作において、花らいは、多数のつぼみが密集しており、表面に超純水をかけるだけでは十分な洗浄が困難であったため、他の部位と異なり、容器に超純水をためてその中に浸漬して洗う必要があった。また、花らいはつぼみの成長度合いが商品により異なり、配送・保管中に腐敗が起りやすく、扱いづらい点があった。主軸は、個体ごとにカットされている位置が異なること、また、主軸をカットして販売されている商品もあり、カット位置による濃度変動が発生しやすい点があった。

以上のとおり、全ての部位で元素濃度の測定上不都合はなかったが、花らい及び主軸は試料調製において不都合があったため、最も扱いやすい花茎を粉碎試料に供する部位とすることとした。

表3 ブロッコリーの部位別の乾燥試料中元素濃度 (mg/kg) 及び水分 (%)

試料	部位	Li	Na	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Sr	Cd	Cs	Ba	Tl	水分	
国産1	花らい	0.00896	487	2579	8336	33108	4140	23.6	82.2	5.79	54.3	2.46	0.095	0.00234	0.344	0.0346	89.7	
	花茎	0.00361	746	1800	5756	46389	3738	10.7	39.1	4.39	24.2	5.59	0.086	0.00143	0.587	0.0278	92.5	
	主軸	0.00397	813	1528	4526	62639	3784	7.8	19.1	4.37	17.1	6.45	0.111	0.00142	0.750	0.0256	93.4	
国産2	花らい	0.0127	340	2328	7168	30882	5051	32.7	63.1	5.76	79.2	5.19	0.061	0.0541	1.46	0.0498	87.2	
	花茎	0.0095	433	1617	4995	32145	4056	11.9	28.7	3.85	44.7	10.95	0.065	0.0406	2.51	0.0397	90.4	
	主軸	0.0109	604	1402	4829	42959	3668	10.3	12.7	3.52	25.6	11.37	0.070	0.0422	3.10	0.0331	92.0	
国産3	花らい	0.00468	288	2260	8820	32314	4167	20.66	84.4	9.58	73.0	7.8	0.0549	0.078	1.29	0.091	88.8	
	花茎	0.00242	482	1898	6465	40412	5741	10.18	38.5	4.08	32.7	23.8	0.0515	0.075	2.81	0.087	91.7	
	主軸	0.00268	605	1812	5459	65696	4901	7.34	18.4	3.82	20.3	22.3	0.0598	0.081	3.22	0.087	93.6	
米国産1	花らい	0.0627	1426	2513	8210	35216	5549	26.8	63.7	4.24	47.2	11.7	0.093	0.00353	3.90	0.0126	88.3	
	花茎	0.0162	1943	1917	5090	36980	5383	10.3	25.6	2.73	21.8	21.7	0.072	0.00254	6.18	0.0099	91.4	
	主軸	0.0116	2111	1711	4253	48514	4180	6.9	10.2	2.82	14.4	18.1	0.095	0.00226	5.50	0.0104	92.6	
外国産	米国産2	花らい	0.345	2209	1745	7025	29395	4152	27.5	75.6	4.41	60.3	12.0	0.151	0.0610	1.73	0.0552	88.1
	花茎	0.356	3411	1190	4578	22829	3218	11.5	27.7	3.34	21.5	24.2	0.131	0.0400	2.78	0.0203	90.2	
	主軸	0.454	7062	1557	3941	28857	4418	10.5	14.9	3.30	15.4	36.4	0.201	0.0309	5.00	0.0107	90.9	
メキシコ産1	花らい	0.175	2500	2391	9300	34891	3913	39.8	76.2	5.01	67.6	29.4	0.128	0.00617	5.38	0.0492	89.0	
	花茎	0.251	4689	1380	5602	38961	4258	18.7	31.8	3.78	30.2	69.0	0.120	0.00461	10.25	0.0286	90.5	
	主軸	0.269	6936	1371	4817	49012	4458	16.0	14.4	3.50	18.7	67.8	0.135	0.00517	11.62	0.0423	91.3	

3.2 元素濃度の測定結果

モデル試料（国産 60 点及び外国産 31 点（米国産 23 点、メキシコ産 8 点））の各元素の乾燥試料中濃度及び水分の各種統計量を表 4 に示す。

表 4 ブロッコリーの乾燥試料中元素濃度 (mg/kg) 及び 水分 (%)

	国産 (n = 60)							
	Li	Na	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe
平均	0.0142	344	1530	5444	35248	3136	12.31	32.0
標準偏差	0.0353	246	487	1044	4373	607	5.30	8.2
最小値	<0.003	87	686	3353	26587	2095	5.91	18.7
第1四分位数	<0.003	196	1147	4722	31978	2657	8.45	25.7
中央値	0.0044	270	1594	5522	35170	3099	11.14	32.6
第3四分位数	0.0106	439	1870	6067	38641	3404	14.63	35.7
最大値	0.2191	1586	2715	7553	45362	4630	30.36	53.7

	国産 (n = 60)							
	Cu	Zn	Sr	Cd	Cs	Ba	Tl	水分
平均	3.37	26.6	11.07	0.0634	0.0281	4.06	0.148	90.3
標準偏差	0.80	9.1	6.26	0.0530	0.0361	2.92	0.262	1.7
最小値	1.87	12.0	2.88	<0.01	<0.002	<0.5	0.001	84.9
第1四分位数	2.94	19.6	7.22	0.0291	0.0039	1.67	0.038	89.1
中央値	3.29	24.6	10.17	0.0455	0.0151	3.22	0.091	90.7
第3四分位数	3.84	31.5	13.59	0.0737	0.0371	5.83	0.169	91.9
最大値	5.50	53.8	42.21	0.2205	0.1657	12.66	1.935	92.7

	外国産 (n = 31)							
	Li	Na	Mg	P	K	Ca	Mn	Fe
平均	0.267	3562	1821	4817	33452	3908	12.11	30.4
標準偏差	0.210	1634	323	732	5892	856	2.20	4.9
最小値	0.010	1494	1211	3485	22922	2505	9.13	22.5
第1四分位数	0.075	2113	1583	4320	28893	3348	10.42	27.1
中央値	0.192	3398	1838	4656	33827	3837	11.77	29.1
第3四分位数	0.445	4566	2029	5296	37345	4394	13.36	33.8
最大値	0.652	6501	2674	6141	44586	6022	19.11	44.9

	外国産 (n = 31)							
	Cu	Zn	Sr	Cd	Cs	Ba	Tl	水分
平均	3.34	26.4	33.9	0.227	0.0197	2.36	0.0217	91.8
標準偏差	0.71	5.1	15.2	0.212	0.0233	1.88	0.0192	1.1
最小値	1.88	16.4	16.1	0.048	<0.002	<0.5	0.0039	89.2
第1四分位数	2.78	21.9	22.6	0.112	0.0031	1.47	0.0076	91.2
中央値	3.33	25.0	25.9	0.155	0.0117	1.99	0.0129	92.1
第3四分位数	3.94	30.4	48.9	0.210	0.0282	2.37	0.0327	92.8
最大値	4.60	34.8	71.6	0.982	0.0838	10.66	0.0680	93.2

3.3 元素濃度による判別の検討

モデル試料の乾燥試料中元素濃度を用いて、国産－外国産判別モデルを構築した。

検討の結果、SVMによりCaに対する11元素（Li、Na、Mg、P、K、Mn、Cu、Sr、Cd、Cs及びBa）の濃度比の常用対数を説明変数とする国産と外国産の判別式を構築した。その後 LOOCVにより得られた判別得点からカーネル密度推定を行い、国産－外国産の判別モデルを構築した。

その判別得点のヒストグラムとカーネル密度推定の結果を図1に示す。

この判別モデルにおいて判別得点が正の場合に国産と判別するとき、モデル構築用試料の的中率は、国産試料 100% (60/60)、外国産試料 100% (31/31) であり、国産及び外国産とも全てを正しく判別した。

事前確率が 1% で誤判別が最小となる判別基準 (判別得点 -0.27) の場合は、特異度が 99.997%、感度が 99.5% となり、国産ブロッコリーと外国産ブロッコリーの判別モデルとして良好な精度の結果が得られた。

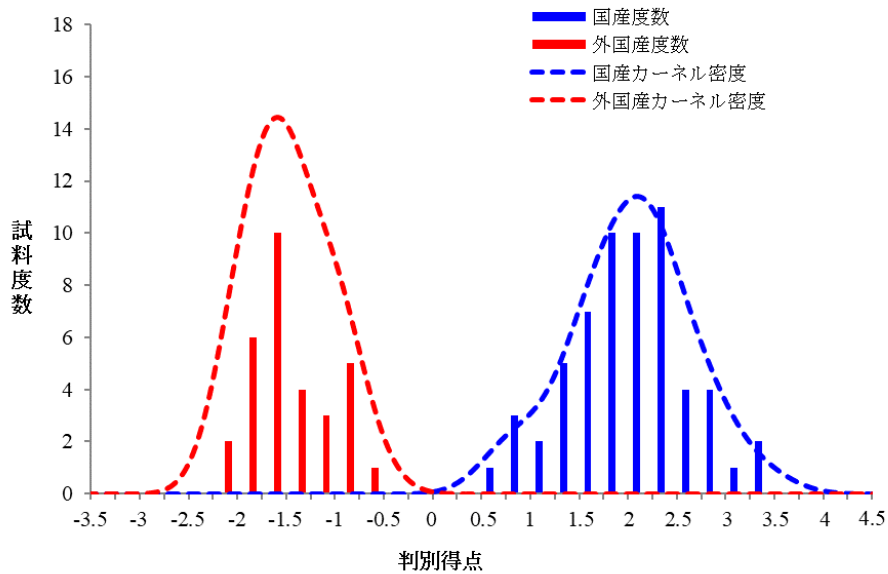


図1 判別モデルの判別得点とカーネル密度

4. まとめ

本研究では、元素濃度による生鮮ブロッコリーの原産地判別法を検討した。粉碎試料について 15 元素の乾燥試料中濃度を説明変数として国産と外国産を判別するモデルを検討したところ、SVMにより構築した Ca に対する 11 元素 (Li、Na、Mg、P、K、Mn、Cu、Sr、Cd、Cs 及び Ba) の濃度比の常用対数を説明変数とする判別モデルが得られた。このモデルにおける判別モデル構築用試料の的中率は、国産試料及び外国産試料とも 100% となり、実用可能な判別精度が得られた。なお、今後、生産地や輸入先の変化などにより判別モデルの判別能力が変化していくことがあるため、定期的に由来の確かな試料を用いて、判別モデルの検証を行うことが望ましい。

謝辞

本研究を実施するにあたり、国産ブロッコリーの収集にご協力いただいた農業協同組合の皆様へ深く感謝いたします。

文献

- 1) 野菜生産出荷統計, 農林水産省 (2015~2017, 2019)
- 2) 財務省貿易統計, 財務省 (2015~2019)
- 3) 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食品関係等調査研究報告, **37**, 1-10 (2013)
- 4) 石井修人, 箱田晃子, 石原敏史, 山川義正: カボチャの元素分析による原産地判別法の改良, 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, **41**, 1-7 (2017)
- 5) 後藤祐之介, 伊澤淳修, 申基澈, 中野孝教: ネギのストロンチウム安定同位体比分析による原産地判別法の検討, 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, **40**, 17-24 (2017)
- 6) 松野和久, 井伊悠介, 寺田昌市, 太田民久, 申基澈, 陀安一郎: ショウガの元素分析及びストロンチウム安定同位体比分析による原産地判別法の検討, 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, **41**, 8-14 (2017)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)

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った。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 であった。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。よっ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。

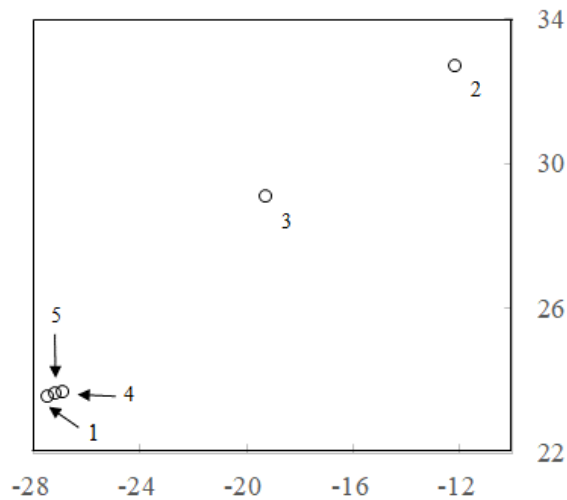


図 1 原料小豆、砂糖及び模擬あんの炭素及び酸素安定同位体比の分布

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。

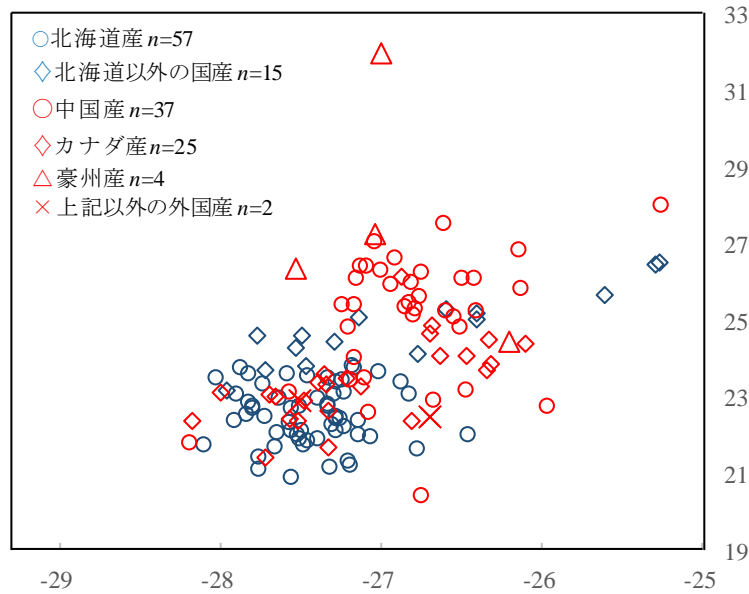


図2 判別モデル作成用の小豆の炭素及び酸素安定同位体比の分布

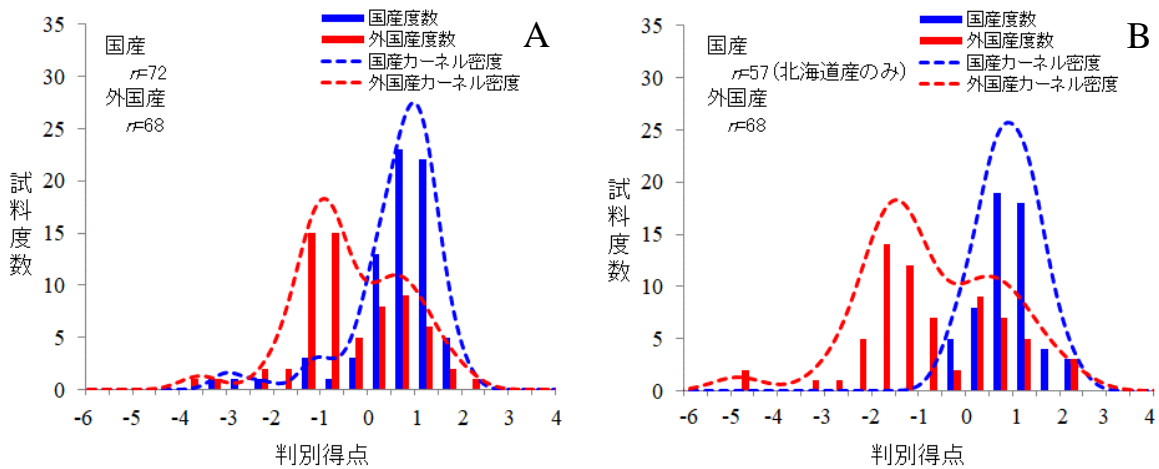


図3 炭素及び酸素安定同位体比分析による国産と外国産の小豆の判別得点とカーネル密度

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。

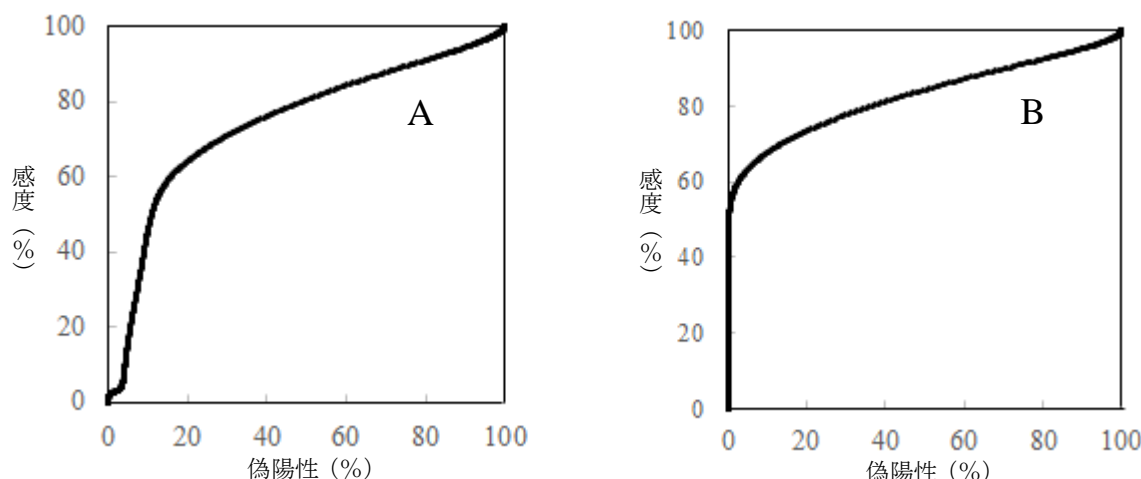


図 4 炭素及び酸素安定同位体比による国産と外国産の判別基準値設定のための ROC 曲線

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）

炭素安定同位体比分析による小麦加工品の 原料小麦の原産地判別法の検討

寺田 昌市¹, 一色 摩耶²

TERADA Shoichi, ISSHIKI Maya

要約

小麦加工品は、消費者の国産志向や品質の優れた新品種の普及により、「国産小麦使用」と表示した商品が近年増加している。表示の真正性を確認する科学的手法が必要であり、多様な種類の小麦加工品に対応できる原料小麦の原産地判別法を開発したので報告する。小麦加工品からでん粉を抽出することで、製粉、加熱、副原料の混合などの加工による安定同位体比への影響をわずかに抑えることに成功した。これにより、小麦粉試料で作成した1つの判別モデルでめん、パン、菓子類などの小麦加工品に適用できる判別法となった。国産（日本産）101点及び外国産72点の小麦粉試料（原産地は小麦加工品の原料小麦の原産地を示す。以下同じ。）の炭素安定同位体比を用いた判別モデルは、誤判別率が最小になる判別基準値を設定した場合、国産101点中99点（98%）、外国産72点全て（100%）を正しく判別した。

1. はじめに

「国産」、日本で生産されたことを表すこの言葉には、「安心」、「安全」、「おいしい」など優れたイメージを持たれる方も多いのではないだろうか。これは、もはや「国産ブランド」とも言える状況である。しかし、ブランドには偽物が出回るのが常であり、偽物は買いたくないと思う消費者がいることで、原産地表示の判別技術の必要性が生じている。消費者の原産地表示への関心の高さを受けて、食品表示法（平成25年法律第70号）に基づき定められた食品表示基準（平成27年内閣府令第10号）が平成29年9月に改正され、それまで原産地表示は生鮮食品と一部の加工食品に限られていたが、輸入品を除く全ての加工食品に原料原産地表示が義務づけられた。

農林水産消費安全技術センター（以下「FAMIC」という。）では、消費者の関心の高い「原産地」を中心に食品の表示が正しく表示されているかどうか科学的手法により検査している。FAMICが用いる科学的手法には、主にDNA分析、元素分析（元素組成分析）、安定同位体比分析がある。FAMICでは判別法の開発も行っており、これまでタマネギ、のり、りんごジュース等の原産地判別法を開発している^{2)~4)}。

小麦加工品は、うどん、中華めん、食パン、洋菓子等多種多様で日本の食生活になくてはならないものである。しかし、原料となる小麦の国産流通量は、平成27年度～令和元年度の平均で年間80万トンであり、同時期の外国（アメリカ、カナダ及びオーストラリア）からの年間輸入量493万トンに対してわずか16%にすぎない⁵⁾。一方で、国産小麦使用と表示された小麦加工品は市場で多く見られ、近年は増加傾向にある。これは、消費者の国産志向や外国産小麦に負けないうどんやパンへの加工適性をもつ新品種（「きぬあかり」、「せときらら」等）の普及の影響が

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター横浜事務所

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

考えられる。また、平成 28 年以降の国産小麦の取引価格は、概ね外国産小麦と同水準であったが、ここ数年は流通量の多い「きたほなみ」や「ゆめちから」等の国産小麦が外国産小麦より高値で取引されている⁵⁾。このような状況の中、小麦加工品の原料小麦の産地表示の真正性を確認する原産地判別法が必要とされている。

小麦加工品の原産地判別法は、小麦粉を対象とした軽元素安定同位体比分析による原産地判別法が報告されており、炭素安定同位体比で国産が外国産よりも有意に低い値をもつことが示されている⁶⁾。しかし、この報告では小麦粉以外の小麦加工品への適用が検討されていない。小麦加工品には加工の方法や副原料の配合の様々な組合せがあるため、幅広い小麦加工品（特に加工度の高い商品）を適用対象とするには、加工による安定同位体比への影響を抑えることが非常に重要である。これまでに、FAMIC では、加工度の高いうなぎ蒲焼きの原産地判別法に軽元素安定同位体比を用いたことがあり⁷⁾、うなぎ表面に付着したたれの洗浄によって、加工による安定同位体比への影響を抑えることができた。そこで本研究では、炭素安定同位体比分析における加工の影響を軽減する試料調製の方法を検討し、幅広い小麦加工品を対象とした原料小麦の原産地判別法の開発を行った。

2. 実験方法

2.1 小麦の製粉、試料調製及び安定同位体比測定

2.1.1 小麦（玄麦）の製粉

判別モデル構築用の試料を小麦（玄麦）の形状で入手した場合は、異物を取り除いた小麦約 50 g に、霧吹きで水を加えて袋に密封した状態で一晚放置した後、石臼製粉機（Fidibus21 KoMo、家庭用電動石臼製粉機）により製粉し、150 μm のふるいにかけて通過した小麦粉とし、以降の検証に供した。全ての試料は小麦粉の状態以降の調製及び測定を行った。

2.1.2 試料調製

試料調製は、下記のとおり 3 種類の方法で行った。

一般的な方法	粉砕した小麦加工品を水で洗浄後、ヘキサソートイソプロパノール（3+2）により脱脂した。
簡易でん粉抽出法	粉砕した小麦加工品に 10 g/L ドデシル硫酸ナトリウム及び 0.15 mol/L 亜硫酸ナトリウムを含む溶液を加え、45℃で 15 分間加温後、遠心（14000 ×g、3 分間）した。得られた沈殿を 200 mL/L エタノールで洗浄後、ヘキサソートイソプロパノール（3+2）により脱脂した。
改良でん粉抽出法	粉砕した小麦加工品に 10 g/L ドデシル硫酸ナトリウム、0.15 mol/L 亜硫酸ナトリウム及び 10 mg/L プロテアーゼ K を含む溶液を加え、45℃で 15 分間加温後、遠心（14000 ×g、3 分間）した。得られた沈殿を 200 mL/L エタノールで洗浄、ヘキサソートイソプロパノール（3+2）により脱脂した。脱脂した試料に 16 mg/L α-アミラーゼ溶液を加え、45℃で 15 分間加温後、遠心（14000 ×g、3 分間）し上清を得た。

2.1.3 炭素安定同位体比測定

炭素安定同位体比の測定には、元素分析計（Flash 2000, Thermo Fisher Scientific）を接続した安定同位体比質量分析装置（Delta V Advantage, Thermo Fisher Scientific）を使用した。測定条件は、燃焼管温度 1000℃、還元管温度 750℃、GC カラム温度 65℃とした。

炭素安定同位体比は δ 値を使って国際測定標準からの偏差として表し、単位は‰とした。すなわち、

$$\delta^{13}\text{C} = \text{R}_{\text{試料}} / \text{R}_{\text{標準}} - 1$$

である。

ここで R は炭素の同位体比 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) を表し、標準は国際測定標準を表す。国際測定標準は、Vienna PeeDee Belemnite (VPDB) とした。

2.2 加工による安定同位体比への影響の検証

2.2.1 副原料、加熱による影響

小麦加工品及びそれに用いた原料小麦粉の炭素安定同位体比を比較して、副原料及び加熱による影響を確認した。試料調製の方法が「一般的な方法」と「簡易でん粉抽出法」の場合は、ゆでうどん、生中華めん及び食パンを製作して用いた。「改良でん粉抽出法」の場合は、ホットケーキ、ドーナツ及びクッキー（以下「菓子類」という。）を製作して用いた。これら的小麦加工品に使用した副原料及びその製作方法を表 1 に示す。加工による影響が許容範囲内か否かを判断するための検定は、JISZ8402-6 8.4.9.3.2 の平均値の差の検定を用い、その際の併行標準偏差は 0.10 ‰ とした。

表1 加工による影響の検証に用いた小麦加工品の副原料及び製作方法

小麦加工品	副原料	製作方法
ゆでうどん	塩	小麦粉に副原料を加えて練り合わせた後、製めんしたものを沸騰水中で約10分間加熱した。
生中華めん	卵、塩/かんすい	小麦粉に副原料を加えて練り合わせた後、製めんした。
食パン	砂糖、バター、スキムミルク、塩、ドライイースト	小麦粉に副原料を加えて、ホームベーカリーにより製した（焼成時の最高温度約170℃）。
ホットケーキ	牛乳、卵、砂糖、塩/膨張剤	小麦粉に副原料を加えてよく混ぜた後、180℃のフライパンで両面を中心に火が通るまで焼いた。
ドーナツ	卵、砂糖、牛乳、サラダ油/膨張剤	小麦粉に副原料を加えて練り合わせた後、厚さ10 mmのドーナツ状に成型して、170℃の油で3分間揚げた。
クッキー	バター、砂糖、卵	小麦粉に副原料を加えて練り合わせた後、厚さ5 mmに成型して、180℃のオーブンで12分間焼成した。

2.2.2 製粉による影響

ロール式製粉機（ビューラー社製試験用小型製粉機）又は石臼製粉機で同一ロットの小麦を製粉した。それぞれの小麦粉から「簡易でん粉抽出法」により調製し、これらの炭素安定同位体比を比較して製粉による影響を確認した。製粉による影響が許容範囲内か否かの検定は、2.2.1 と同様に行った。

2.3 判別モデルの構築

判別モデル構築用に、国産は 25 品種、101 点、外国産は 6 銘柄、72 点（米国産：3 銘柄、24 点、カナダ産：1 銘柄、23 点、豪州産：2 銘柄、25 点）の小麦（玄麦）又は小麦粉を用いた。国産は農業協同組合等から、外国産は製粉会社等からそれぞれ入手した。判別モデル構築用試料の詳細な産地を表 2 に示す。

表2 判別モデル構築用試料の産地内訳

国産試料		外国産試料	
北海道	51点	米国	24点
埼玉県	5点	カナダ	23点
群馬県、茨城県、長野県	各4点	豪州	25点
福岡県、愛知県、滋賀県、熊本県、栃木県、大分県、香川県	各3点		
岩手県、宮城県、兵庫県	各2点		
佐賀県、三重県、青森県、静岡県、秋田県、京都府	各1点		

3. 結果及び考察

3.1 加工による安定同位体比への影響の検証

3.1.1 副原料、加熱による影響

小麦加工品にはめん、パン、菓子等幅広い種類がある。これらは小麦粉に塩、卵、牛乳等の副原料を加え、ゆで、焼き、揚げ等の加熱をして作られる。この加工が炭素安定同位体比に与える影響を確認するため、「一般的な方法」で調製した、ゆでうどん、生中華めん及び食パンとそれに用いた原料小麦粉の炭素安定同位体比を測定し、その値を比較した。この結果を表3に示す。原料小麦粉との差は、ゆでうどんで0.20%、生中華めんで0.52%、食パン（クラム：柔らかい部分）で1.13%であり、いずれも許容差を超えていた。このように「一般的な方法」による調製には、副原料や加熱による影響があることが分かった。これは、ゆでうどんはゆでの工程によるでん粉の流出の影響、生中華めんは副原料の卵の影響、食パンは副原料の牛乳が加熱により変性した影響が主にあると推測される。加工による影響がある場合は、加工の種類ごとに判別モデルを作成する必要が生じるため、同一の方法を幅広い小麦加工品に対応することが困難となる。

そこで、副原料や加熱による影響は、小麦成分の流出又は小麦以外の成分の流入によって生じると予想して、小麦の主成分であるでん粉を抽出し、これを測定することでその影響を抑える方法を検討した。しかし、でん粉をそのまま抽出しようとすると、抽出液の粘度が高く、他の成分と分離することが難しかった。このため、小麦以外の成分（たんぱく質、水溶性成分、脂質等）を除去して、でん粉を残す方法として「簡易でん粉抽出法」を設計した。「簡易でん粉抽出法」で調製したゆでうどん、生中華めん及び食パンとその原料小麦粉の値を比較したところ、原料小麦粉との差は、ゆでうどんで0.02%、生中華めんで0.11%、食パン（クラム）で0.03%であり、「一般的な方法」と比べて大幅に小さくなり、いずれも許容差を下回っていた（表3）。これにより「簡易でん粉抽出法」が副原料や加熱による影響を抑えることが確認できた。これは、ゆでうどんのゆで工程で流出するでん粉が、「簡易でん粉抽出法」のたんぱく質を除去する過程で小麦及び他の小麦加工品でも同様に流出したためと考えられる。

一方、原料小麦粉との差が食パン（クラスト：「みみ」の部分）では0.15%であり、食パン（クラム）より大きく、許容差をわずかに上回っていた（表3）。この違いは、食パンのクラムとクラストの加工時の違いである焼成時に達する最高温度が原因と考えられる。クラムの最高温度が約

100℃で平衡に達するのに対して⁸⁾、クラストは170℃近くまで達していると予想される。高温で加熱することにより、メイラード反応等で変性した副原料が「簡易でん粉抽出法」では除去できなくなったものと推察される。

表3 小麦加工品における炭素安定同位体比への加工による影響

試料調製方法	試料	併行 点数	炭素安定同位体比(‰)		原料小麦粉 との差(‰)	許容差 (‰)
			平均値	標準偏差		
一般的な 方法	ゆでうどん	2	-24.16	0.02	0.20	0.20
	— 原料小麦粉	2	-24.36	0.04	—	—
	生中華めん	2	-24.72	0.03	0.52	0.20
	食パン	2	-24.11	0.04	1.13	0.20
	— 原料小麦粉	2	-25.24	0.00	—	—
簡易 でん粉 抽出法	ゆでうどん	3	-24.00	0.04	0.02	0.16
	— 原料小麦粉	3	-24.02	0.03	—	—
	生中華めん	2	-24.86	0.01	0.11	0.15
	食パン(クラム)	20	-24.78	0.04	0.03	0.06
	食パン(クラスト)	2	-24.60	0.04	0.15	0.15
— 原料小麦粉	20	-24.75	0.07	—	—	
改良 でん粉 抽出法	ホットケーキ	2	-27.23	0.08	0.14	0.20
	ドーナツ	2	-27.28	0.00	0.08	0.20
	クッキー	2	-27.25	0.01	0.12	0.20
	— 原料小麦粉	2	-27.37	0.07	—	—

この結果を受けて、変性したたんぱく質を除去しやすくするため、除去時にプロテアーゼを追加し、また、でん粉以外の不溶性成分を除くため、アミラーゼによってでん粉を溶液化し精製する工程を追加した「改良でん粉抽出法」を設計した。検証は、食パンに比べて副原料に卵、牛乳を多く使用し、高温で加熱した菓子類の褐変部分を避けてサンプリングして用いた。「改良でん粉抽出法」で調製した菓子類とその原料小麦粉の炭素安定同位体比を比較したところ、原料小麦粉との差は0.08~0.14‰であり、いずれも許容差を下回っていた(表3)。これにより「改良でん粉抽出法」が、より多くの副原料やより高温の加熱による影響を抑えられることが確認できた。

3.1.2 製粉による影響

3.1.1において、ゆでうどんでは、でん粉の流出による小麦粉の成分割合の変化が炭素安定同位体比に影響を与えると推測された。このことから予想すると、製粉方法により得られる小麦粉の成分割合が異なることで、同一ロットの小麦からでも様々な炭素安定同位体比の小麦粉を作製することができる。

そこで、成分割合の異なる小麦粉が調製されるロール式製粉機と石臼製粉機により同一ロットの小麦を製粉して、「簡易でん粉抽出法」により製粉による影響を抑えることができるかを検証した。試料ごとに各製粉機による小麦粉の炭素安定同位体比を比較したところ、製粉による差は0.06‰及び0.08‰であり、いずれも許容差を下回っていた(表4)。これにより「簡易でん粉抽出法」により製粉による影響を抑えられることが確認できた。

表4 製粉による炭素安定同位体比への影響

試料	併行 点数	炭素安定同位体比 (‰)		製粉による 差 (‰)	許容差 (‰)
		平均値	標準偏差		
試料 1 (ロール式製粉機)	4	-25.03	0.01	0.08	0.14
	4	-24.95	0.03		
試料 2 (ロール式製粉機)	4	-22.97	0.04	0.06	0.14
	4	-23.03	0.06		

3.2 判別モデルの構築

3.2.1 判別モデルの炭素安定同位体比の分布と判別精度

3.1 において、でん粉抽出により製粉、加熱、副原料等の加工による影響を抑えることに成功し、小麦粉試料で作成した1つの判別モデルをめん、パン、菓子等の幅広い小麦加工品に適用できる判別法となることが分かった。次に、小麦加工品のモデル試料として、国産101点及び外国産72点の小麦粉の炭素安定同位体比を測定した結果を図に示す。国産が -26.7 ± 0.6 ‰（平均値±標準偏差、以下同じ。）に対して、米国産が -24.4 ± 0.4 ‰、カナダ産が -24.5 ± 0.4 ‰、豪州産が -23.2 ± 0.4 ‰であった。これらは、鈴木ら（2019）の報告と同様、国産が外国産よりも低い炭素安定同位体比を示す傾向であった⁶⁾。なお、鈴木らの報告値よりも平均値で0.6~1.6‰低いのは、でん粉を抽出したことによる測定成分の違いから生じたと考えられる。

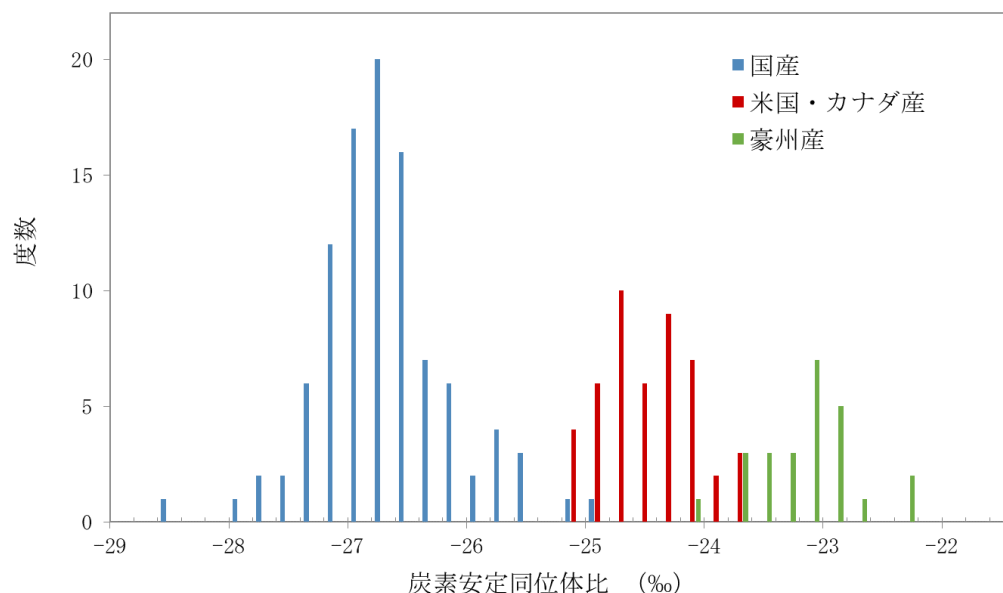


図 判別モデルの炭素安定同位体比のヒストグラム

国産小麦の栽培環境の特徴は、外国産小麦の栽培環境に比べて年間降水量が多く、水田作が多いことが挙げられる。小麦産地付近⁹⁾¹⁰⁾の年間降水量(平年値)¹¹⁾は、北海道帯広市が920 mm(国内では比較的少ない降水量)に対して、米国ワシントン州東部(Spokane)が421 mm、カナダアルバータ州南東部(Medicine Hat)が327 mm、豪州西オーストラリア州パース近郊(Wongan Hills)が395 mmであり、国産小麦の方が湿潤な栽培環境であることがわかる。また、日本の小麦の作付面積の64%が水田作であり、その割合は北海道以外の都府県では94%(北海道は26%)になる。水田は土壌の保水力が高く、小麦では湿害が出やすい程であるので、湿潤な栽培環境になりやすい。これまでの報告では、鈴木ら(2009)がコメの水田作と畑作での炭素安定同位体比への影響について報告しており、水田作の方が低い炭素安定同位体比となる傾向であった¹²⁾。また、炭素安定同位体比は植物の水利用効率の指標として使われることがあり、水利用効率が小さい場合、すなわち湿潤な栽培環境にある場合は、炭素安定同位体比は低くなる傾向にあることが知られている¹³⁾。これは、湿潤な栽培環境では、葉の気孔が開いた状態になりやすく、蒸散が増えて水利用効率が下がるとともに、気孔内の二酸化炭素も入れ替わりやすくなり、取り込みにくい重い二酸化炭素($^{13}\text{CO}_2$)の濃度が上がらなくなるため、軽い二酸化炭素($^{12}\text{CO}_2$)がより多く取り込まれることで、炭素安定同位体比($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)は低くなると説明できる。このように、国産小麦が外国産小麦よりも低い炭素安定同位体比を示す傾向は、国産小麦の方が湿潤な栽培環境であることがその要因のひとつとして考えられる。

炭素安定同位体比を用いた判別モデルは、誤判別率が最小になる判別基準値(-25.4%)を設定した場合、国産101点中99点(98%)、外国産72点(100%)全てを正しく判別し、小麦加工品の原料小麦の原産地判別法としてFAMICでの検査に使用できる判別精度があることが分かった。なお、今回の判別モデルは50gと少量の小麦を製粉した小麦粉試料を多数用いているが、市販の小麦粉は数百倍以上の多量な小麦から製粉されているため、各原産国の炭素安定同位体比は平均化されておりその範囲より狭いものと予想できる。

また、小麦加工品は複数原産国の小麦粉を混ぜて使うことも想定されるが、その場合でも小麦加工品の炭素安定同位体比は、配合割合に応じて各原産国の値の間の値を示す。このため、多少異なる産地の小麦を配合した場合でも、主に配合された原産国を推定することが可能である。

3.2.2 判別モデルにおける炭素安定同位体比の品種間差の検証

モデル試料の国産及び米国産について、同一品種(米国産では銘柄)で5点以上測定している小麦の品種に対して産地ごとに一元配置分散分析を行い、品種間差があるかを検証した。その結果、国産6品種の平均値が-26.8~-26.6% (国産の平均値:-26.7%)、米国産3銘柄の平均値がいずれも-24.4% (米国産の平均値:-24.4%)であり、国産、米国産ともに有意水準5%で有意な品種間差は認められなかった(表5)。

表5 判別モデルにおける炭素安定同位体比の品種間差

品種・銘柄	主な栽培地域	点数	炭素安定同位体比 (‰)		一元配置分散分析によるp値
			平均値	標準偏差	
きたほなみ	北海道	32	-26.6	0.5	0.93
ゆめちから	北海道	8	-26.7	0.2	
春よ恋	北海道	9	-26.8	0.6	
さとのそら	関東北部	7	-26.8	0.6	
チクゴイズミ	九州北部	7	-26.7	0.2	
農林61号	近畿・東海	5	-26.6	0.7	
DNS	米国北部平野※	8	-24.4	0.4	0.98
HRW	米国中部平野※	8	-24.4	0.4	
WW	米国北西部※	7	-24.4	0.4	

※ DNS、HRW、WWの主な栽培地域は、判別モデルに使用した試料の栽培地域ではなく、一般的な栽培地域を示す。具体的には、米国北部平野（モンタナ州、ノースダコタ州、サウスダコタ州、ミネソタ州）、米国中部平野（カンサス州、ネブラスカ州、コロラド州、テキサス州、モンタナ州、オクラホマ州）、米国北西部（ワシントン州、オレゴン州、アイダホ州）である。

また、各品種は主な栽培地域が異なることから、各栽培国内での地域差も大きくはないことが読み取れる。このように、小麦粉の炭素安定同位体比は、原料小麦の品種や国内地域差の影響は大きくないことが分かった。

4. まとめ

本研究では、多様な種類の小麦加工品に対応できる原料小麦の原産地判別法を検討した。小麦加工品から除たんぱく質、200 mL/L エタノール洗浄、脱脂、アミラーゼ抽出によりでん粉を抽出することで、製粉、加熱、副原料の混合等の加工による安定同位体比への影響をわずかに抑えることが可能となった。これにより、小麦粉試料で作成した1つの判別モデルをめん、パン、菓子等の幅広い小麦加工品に適用可能とした。また、国産（日本産）101点及び外国産72点の小麦粉試料の炭素安定同位体比を用いた判別モデルを作成し、誤判別率が最小になる判別基準値を設定した場合、国産101点中99点（98%）、外国産72点全て（100%）を正しく判別した。

以上の結果から、多様な種類の小麦加工品の原料小麦の原産地表示の真正性を検証するための方法を確立した。

なお、今後、原料小麦の栽培環境や栽培地域の変化等により判別モデルの判別能力が変化していくことがあるため、定期的に原産地の確かな試料を用いて、判別モデルの妥当性の確認を行うことが望ましい。

謝辞

本研究を実施するにあたり、試料の提供にご協力いただきました農業協同組合、製造業者、試験・研究機関、行政機関等の皆様に心より御礼申し上げます。

文献

- 1) 日本政策金融公庫, 消費者動向調査 (令和3年7月調査) 食の志向等に関する調査結果 (令和3年9月)
- 2) 有山薫, 門倉雅史: 無機分析によるタマネギの原産国 (日本-外国) 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, **32**, 1-5 (2008)
- 3) 澤田桂子, 井口潤, 浪越充司: DNA分析によるのりの原産地判別法の検討, 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, **38**, 16-22 (2014)
- 4) 渡邊彩乃, 寺田昌市: 炭素・酸素安定同位体比分析によるりんごジュースの原料りんごの原産地判別法の検討, 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, **40**, 25-32 (2017)
- 5) 農林水産省, 麦をめぐる最近の動向 (令和3年9月)
- 6) 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** (9), 671-682 (2019)
- 7) 一色摩耶, 中村哲, 高嶋康晴, 寺田昌市, 鈴木彌生子: 安定同位体比分析によるうなぎ加工品の原料原産地判別, 日本食品科学工学会誌, **61** (2), 54-61 (2014)
- 8) 相良泰行: 食パン焼成プロセスにおける熱及び物質移動のメカニズム, 冷凍, **80** (932), 23-29 (2005)
- 9) 関根久子: 米国における小麦生産の現状と課題, 関東東海北陸農業経営研究, **108**, 33-42 (2018)
- 10) 関根久子, 齋藤陽子, Matt Yamamoto: 豪州における小麦生産の実態と特徴, 関東東海北陸農業経営研究, **109**, 33-41 (2019)
- 11) 各種データ・資料, 気象庁, 2021-9-30, <<https://www.jma.go.jp/jma/menu/menureport.html>>
- 12) 鈴木彌生子, 中下留美子, 赤松史一, 伊永隆史: 安定同位体比分析による国産米の産地及び有機栽培判別の可能性, 分析化学, **58** (12), 1053-1058 (2009)
- 13) 半場祐子: 光合成研究のための安定同位体測定法, 低温科学, **67**, 73-82 (2009)

[他 紙 掲 載 論 文]

(抄 録)

日本食品科学工学会誌 第68巻 第6号 2021年6月 より抄録

Dt1 遺伝子座に基づくダイズの国産・外国産判別検査法の開発

石原 敏史, 岸根 雅宏, 岡崎 法子, 豊田 正俊, 澤田 桂子, 橋田 和美

Dt1 遺伝子座に基づくダイズの国産・外国産判別検査法の開発

石原 敏史¹, 岸根 雅宏², 岡崎 法子², 豊田 正俊¹, 澤田 桂子¹, 橘田 和美²
ISHIHARA Toshifumi¹, KISHINE Masahiro², OKAZAKI Noriko², TOYODA Masatoshi¹,
SAWADA Keiko¹, KITTA Kazumi²

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター

² 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門

抄録

豆腐や豆乳等の大豆加工品の原料となる食用大豆は、国内需要量の大部分を輸入大豆に依存しており、原料単価の違いから、一般的に国産原料を使用した商品の方が外国産原料を使用した商品よりも高い価格で取引されている。このため、原料原産地表示が適正であるか否かを確認するために産地判別法の確立が求められている。本研究は、国産ダイズと外国産ダイズを判別することを目的に、ダイズの無限/有限伸育を決める遺伝子であるDt1 (GmTfl1) の第1イントロンに存在する挿入・欠失に着目し、国産ダイズと外国産ダイズを判別する手法の検討を行った。第1イントロンに欠失がない遺伝子型をa型、欠失がある遺伝子型をb型とし、それぞれ135 bp、162 bpにバンドが検出されるようにプライマーを設計し、国産ダイズおよび外国産ダイズの遺伝子型の確認を行った。その結果、国産82品種中、81品種はb型であったのに対し、米国産33試料中32試料、カナダ産24試料中24試料はa型であった。以上のことから、当該プライマーを活用した検査法により、ダイズ品種の国産・外国産の推定が可能であることが示唆された。また、国産ダイズと外国産ダイズから抽出したDNA溶液を混合した試料の場合、外国産ダイズ由来のDNAが濃度比で2.5%以上混入された場合に外国産ダイズの混入を検出することができた。このことから、国産大豆と外国産大豆が混合された場合においても、外国産ダイズの混入を検出可能であることが示唆された。当該判別法については、加工食品への導入検討を行うことにより、大豆加工品の原料原産地のスクリーニング検査法の確立が期待できる。

**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
第45号**

令和3年12月発行

発行： 独立行政法人 農林水産消費安全技術センター
〒 330-9731 埼玉県さいたま市中央区新都心 2 - 1
さいたま新都心合同庁舎検査棟
電話： 050 - 3797 - 1851
FAX： 048 - 600 - 2373

