

元素分析及びストロンチウム安定同位体比分析による 冷凍ほうれんそうの原料原産地判別法の検討

森田 先恵¹, 伊澤 淳修¹, 申 基澈², 中野 孝教²
Sakie Morita, Atsunobu Izawa, Ki-Cheol Shin, Takanori Nakano

要 約

国産（日本産）及び中国産のほうれんそうを原料とした冷凍ほうれんそうについて、元素組成及びストロンチウム（Sr）安定同位体比を利用した原料原産地判別法を検討した。冷凍ほうれんそう 94 試料（国産 57 試料、中国産 37 試料）の 13 元素（Na、Mg、Al、K、Ca、Mn、Co、Ni、Cu、Rb、Sr、Cd、Pb）の濃度を測定し、サポートベクターマシンにより 4 元素（Na、K、Rb、Pb）を用いた判別モデルを構築した結果、測定した試料全ての原料原産地を正しく判別した。元素分析と同一の試料について、Sr 安定同位体比の測定を行い、Receiver Operatorating Characteristic（ROC）曲線により判別基準を設定した結果、国産 100 %（57/57）、中国産 91.8 %（34/37）の原料原産地を正しく判別した。以上のことから元素分析及び Sr 安定同位体比分析による冷凍ほうれんそうの原料原産地の判別の可能性が示唆されたが、Sr 安定同位体比分析では中国産の一部で国産との判別が難しいことが分かった。

1. はじめに

我が国における冷凍ほうれんそうの品質表示は、農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS 法）に基づき制定された加工食品品質表示基準（平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 513 号）により名称、原材料名等の表示が義務付けられ、輸入品にあつては原産国名を表示することとされた。また、野菜冷凍食品品質表示基準（平成 14 年 8 月 19 日農林水産省告示第 1358 号）により、輸入品以外の冷凍ほうれんそうにあつては、原材料のほうれんそうの原産地（以下「原料原産地」という。）の表示が義務付けられた。平成 25 年 6 月に制定された食品表示法及びこれに基づく食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号（平成 27 年 4 月 1 日施行））においても、同様に、名称、原材料名、原料原産地名等の表示が義務付けられている。

平成 24 年における冷凍ほうれんそうの輸入量は国内流通量（輸入量＋国産出荷量）の 8 割程度を占め、主な輸入先国は、中国（総輸入量の 89 %）、台湾（同 5 %）、ベトナム（同 4 %）となっている^{1, 2)}。輸入された冷凍ほうれんそうは、原料原産地が国産のものに比べて安価であり、原料原産地の偽装が懸念されることから、原料原産地名の真正性を客観的に検証する科学的検査技術の開発が求められている。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

² 大学共同利用機関法人人間文化研究機構総合地球環境学研究所

食品における産地の科学的検証法は、元素分析、軽元素安定同位体比分析及び Sr 安定同位体比を利用した方法が報告されている^{4)~10)}。これらの方法は、土壌や水質等の違いをそこで生育した農産物が反映することを利用したものである。

本研究では、原材料に国産のほうれんそうを使用している旨の表示がある冷凍ほうれんそうを対象に、元素分析と Sr 安定同位体比分析を用いて原料原産地の判別方法を検討した。

2. 実験方法

2. 1 試料

平成 25 年 4 月から平成 26 年 2 月にかけて、冷凍ほうれんそう 94 試料（国産 57 試料、中国産 37 試料）を入手した。国産は加工向けほうれんそうの出荷量を参考に製造工場から入手し、中国産は小売店から市販品を購入した。収集試料の内訳を表 1 に示した。

表 1 収集試料の内訳

道県	試料数	省	試料数
北海道	6	山東省	23
群馬県	2	黒龍江省	10
栃木県	1	江蘇省・安徽省	1
茨城県	6	福建省	3
千葉県	3		
大分県	2		
熊本県	4		
宮崎県	31		
鹿児島県	2		

2. 2 試薬

実験に使用した水は、超純水製造装置（Milli-Q Element A10、日本ミリポア）で製造した超純水（比抵抗値 $>18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 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）、70 %過塩素酸（TAMAPURE-AA-100、多摩化学工業）を用いた。Sr 安定同位体比測定において、 ^{87}Sr の検出の妨害となる ^{87}Rb を除去するために、35 %塩酸（Ultrapur-100、関東化学）、塩化ナトリウム（特級）、陽イオン交換樹脂（DOWEX 50WX8: Mesh size 200-400、H⁺型 ムロマチテクノス）を用いた。検量線用標準液には単元素標準溶液（Na、Mg、Al、K、Ca、Mn、Co、Ni、Cu、Rb、Sr、Cd、Pb 及び In、ICP 測定用）を適宜希釈して調製した。

2. 3 装置

収集試料の粉碎には、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、誘導結合プラズマ発光分析装置（ICP-OES）（725-ES、Varian（現 Agilent Technologies））及び誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）（820MS、Varian（現 Agilent Technologies））を使用した。Sr 安定同位体比の測定は、大学共同利用機関法人人間文化研究機構総合地球環境学研究所に設置されている二重収束型マルチコレクター誘導結合プラズマ質量分析装置（MC-ICP-MS）（Neptune plus、Thermo Fisher Scientific）を用いた。

2. 4 試料調製

各収集試料について、1 試料あたり 200 ~ 250 g をミキサーで粉碎し、粉碎した試料から樹脂製薬さじを用いて、20 ~ 25 g を樹脂製ヒータブルビーカーに採取し、ビーカー内

壁に様に広げた。ビーカーを恒温乾燥機に入れ、80 °Cで18時間以上乾燥させた。乾燥した試料をポリエチレン製袋へ移し、樹脂性ハンマーで粉碎し、乾燥・粉碎した乾燥試料を作製した。作製した乾燥試料は、樹脂製保存瓶に入れ、酸分解までデシケーター内で保存した。

2. 5 酸分解

乾燥試料を樹脂製薬さじを用いて樹脂製ヒータブルビーカーに 0.5 ± 0.05 g の範囲で採取し、61 %硝酸を 10 mL 加え、樹脂製時計皿でふたをして、120 °Cのホットプレート上で加熱した。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 %過塩素酸を 2.5 mL 加え、徐々に温度を上げながら 180 ~ 230 °Cの範囲で加熱し、分解液が透明かつ無色または薄い黄色になるまで分解した。次にふたを外し、約 230 °Cで加熱して乾固した。ビーカーに 1 %硝酸を 10 mL 程度加え、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、内標準として In を定容後 5 µg/L になるように加え、1 %硝酸で定容後、機器測定用試料溶液とした。ICP-OES 測定用試料溶液は、機器測定用試料溶液を 1 %硝酸で体積比で 10 倍に希釈したものを用いた。Sr 安定同位体比分析に用いる機器測定用試料溶液は、0.45 µm メンブランフィルターでろ過を行った。

2. 6 カラム処理 (Sr安定同位体比分析)

Sr 安定同位体比分析は、陽イオン交換樹脂で精製・濃縮を行った。

陽イオン交換樹脂を塩酸溶液に懸濁させ、カラム管に充填し、陽イオン交換カラムを調製した。使用の際には、カラムを塩化ナトリウム水溶液と塩酸溶液でコンディショニングを行った。あらかじめ機器測定用試料溶液を樹脂製ヒータブルビーカーに移し、ホットプレート上で 200 °Cで乾固した。残留物を塩酸溶液で溶解し、カラムに負荷し、塩酸溶液を加えて Sr を溶出させた。Sr を含む溶出液を 85 ~ 90 °Cのホットプレート上で乾固し、残留物に 3 %硝酸を加え溶解し、Sr 安定同位体比測定用試料溶液を調製した。

2. 7 測定

Na、Mg、K、Ca は、検量線法にて ICP-OES により、Al、Mn、Co、Ni、Cu、Rb、Sr、Cd、Pb は内標準法 (内標準： 115 In) にて、ICP-MS により、表 2 の分析条件で測定した。Sr 安定同位体比は、Sr 安定同位体比測定用試料溶液を MC-ICP-MS により、表 3 の分析条件で測定した。

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	1.3KW	1.20KW
プラズマガスフロー	15.5 L/min	15 L/min
補助ガスフロー	1.5 L/min	1.5 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	0.08 rps	15 rpm

表3 MC-ICP-MSの測定条件

RFパワー	1.2KW
プラズマガスフロー	15 L/min
補助ガスフロー	0.7-0.8 L/min
ネブライザーガスフロー	0.85 L/min
ネブライザー(吸入量)	PFA(100 μ L/min)
検出器配置 m/z (cup)	83 (L3), 84 (L2), 85 (L1) 86 (C), 87 (H1), 88 (H2)
脱溶媒装置	Aridus II
スweepガスフロー	4.2 L/min
スプレーチャンバー温度	40 $^{\circ}$ C
脱溶媒装置温度	160 $^{\circ}$ C
測定ブロック数	1
測定サイクル数	30

2. 8 解析

2. 8. 1 元素データの解析

測定した元素の濃度比を説明変数としてサポートベクターマシンにより判別式を構築した。サポートベクターマシンは R 3.0.2 の e1071 パッケージを使用した。各収集試料について、判別得点 0 における国産冷凍ほうれんそうを国産と判別する確率（特異度）及び中国産冷凍ほうれんそうを中国産と判別する確率（感度）を算出した。

2. 8. 2 Sr安定同位体比データの解析

測定した Sr 安定同位体比の分布範囲において、各 Sr 安定同位体比を産地判別の基準値としたときの、国産冷凍ほうれんそうを国産と判別する確率（特異度）及び中国産冷凍ほうれんそうを中国産と判別する確率（感度）を算出し、特異度から求めた偽陽性率（1 - 特異度）を横軸、感度を縦軸にプロットして ROC 曲線を描き、偽陽性率 0、感度 1 に最も近い値を産地判別の基準値とした。得られた基準値による特異度と感度を示した。

3. 結果及び考察

3. 1 元素分析

3. 1. 1 元素濃度の測定

収集試料の、13 元素（Na、Mg、Al、K、Ca、Mn、Co、Ni、Cu、Rb、Sr、Cd、Pb）の測定結果を表 4 に示した。13 元素の測定結果について、マンホイットニーの U 検定を行った。その結果、国産と中国産の試料間で Rb 以外の 12 元素で有意差（ $p < 0.05$ ）が見られた。

表 4 乾燥試料中の元素濃度

	国産 (mg/kg)												
	Na	Mg	Al	K	Ca	Mn	Co	Ni	Cu	Rb	Sr	Cd	Pb
平均値	1.6×10 ³	5.1×10 ³	3.2×10	50.7×10 ³	9.6×10 ³	3.6×10	12.5×10 ⁻²	5.5×10 ⁻¹	8.9	28.6	2.5×10	4.2×10 ⁻¹	7.2×10 ⁻²
標準偏差	1.4×10 ³	1.6×10 ³	1.7×10	13.3×10 ³	3.3×10 ³	2.3×10	7.6×10 ⁻²	2×10 ⁻¹	4.1	9.8	2×10	4.6×10 ⁻¹	3.8×10 ⁻²
最小値	0.2×10 ³	2.5×10 ³	0.6×10	23.8×10 ³	5.4×10 ³	1.4×10	4×10 ⁻²	2.6×10 ⁻¹	3.1	7.2	0.7×10	0.8×10 ⁻¹	2.5×10 ⁻²
第1四分位数	0.6×10 ³	3.6×10 ³	1.8×10	41.9×10 ³	7.6×10 ³	2.2×10	6.7×10 ⁻²	4×10 ⁻¹	6.1	23.3	1.3×10	1.6×10 ⁻¹	4.4×10 ⁻²
中央値	1.2×10 ³	4.8×10 ³	2.7×10	47.6×10 ³	8.8×10 ³	2.8×10	9.5×10 ⁻²	5.1×10 ⁻¹	7.9	28.1	1.7×10	2.6×10 ⁻¹	6.6×10 ⁻²
第3四分位数	2.4×10 ³	6.5×10 ³	3.8×10	58.6×10 ³	10.7×10 ³	4×10	17.1×10 ⁻²	6.3×10 ⁻¹	10.3	34.3	3.1×10	3.9×10 ⁻¹	8.4×10 ⁻²
最大値	6.4×10 ³	8.3×10 ³	8.2×10	84.5×10 ³	22.5×10 ³	12.2×10	31.1×10 ⁻²	11×10 ⁻¹	27.3	62.5	11×10	23.1×10 ⁻¹	20.2×10 ⁻²

	中国産 (mg/kg)												
	Na	Mg	Al	K	Ca	Mn	Co	Ni	Cu	Rb	Sr	Cd	Pb
平均値	18.5×10 ³	6.5×10 ³	8.5×10	24×10 ³	12.4×10 ³	7.4×10	18.4×10 ⁻²	10.2×10 ⁻¹	10.1	28.4	6.1×10	4.7×10 ⁻¹	32.3×10 ⁻²
標準偏差	6.2×10 ³	1.3×10 ³	2.7×10	6.9×10 ³	3.7×10 ³	4.4×10	6.1×10 ⁻²	6×10 ⁻¹	2.5	14.6	1.8×10	1.9×10 ⁻¹	12.8×10 ⁻²
最小値	10.8×10 ³	3.9×10 ³	2.8×10	11.5×10 ³	5.8×10 ³	2.3×10	7.8×10 ⁻²	4.1×10 ⁻¹	6.2	7.9	2.7×10	1.8×10 ⁻¹	11.3×10 ⁻²
第1四分位数	14.3×10 ³	5.6×10 ³	6.7×10	19.4×10 ³	9.7×10 ³	4.1×10	14.1×10 ⁻²	6×10 ⁻¹	8.7	16.7	4.9×10	3.3×10 ⁻¹	23.9×10 ⁻²
中央値	15.9×10 ³	6.5×10 ³	8.3×10	23×10 ³	12.1×10 ³	6.3×10	18×10 ⁻²	8.1×10 ⁻¹	9.5	23.4	6×10	4×10 ⁻¹	29.4×10 ⁻²
第3四分位数	24.3×10 ³	7.7×10 ³	9.8×10	27.4×10 ³	14.3×10 ³	9.1×10	23×10 ⁻²	12.7×10 ⁻¹	11.7	38.8	7×10	6.1×10 ⁻¹	42.2×10 ⁻²
最大値	30.5×10 ³	8.6×10 ³	14.2×10	39.5×10 ³	21.6×10 ³	20.6×10	31.2×10 ⁻²	33.7×10 ⁻¹	18.9	70.2	10.3×10	9×10 ⁻¹	58.9×10 ⁻²

3. 1. 2 元素データの解析

2. 8. 1 で構築した判別式を示した (式)。

$$(式) \quad Y = 5.990 \times 10^{-5} [K] + 1.106 \times 10^{-4} [Ca] - 1.633 \times 10^{-2} [Al] - 1.793 \times 10^{-2} [Mn] + 3.731 [Co] - 1.926 \times 10^{-2} [Rb] - 2.517 \times 10^{-2} [Sr] - 5.842 [Pb] + 0.679$$

ここで、[K]、[Ca]、[Al]、[Mn]、[Co]、[Rb]、[Pb]は、それぞれの元素の乾燥試料中濃度(mg/kg)を示す。

判別得点のヒストグラムを図1に示した。この判別モデルにおいて、判別得点 Y が 0 以上の場合は国産、0 未満の場合は中国産と判別したところ、収集試料は全て正しく判別され特異度及び感度は 100.0 %となった。

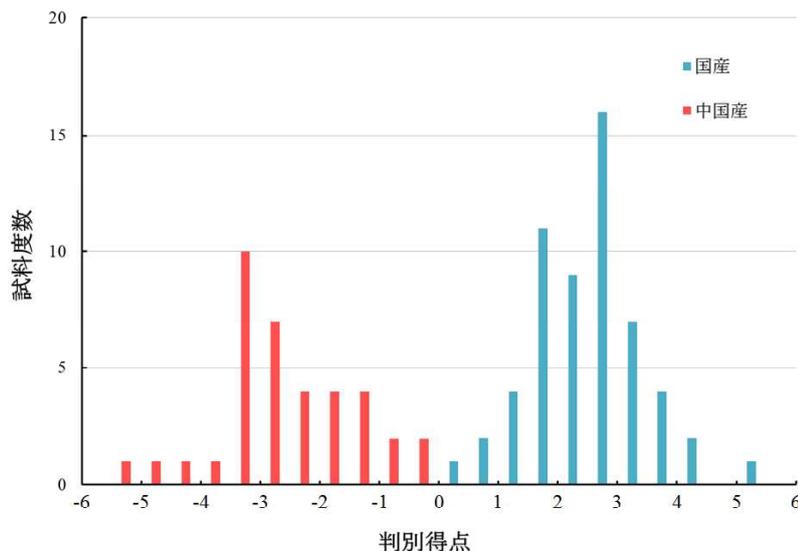


図1 元素分析による判別得点のヒストグラム

3. 2 Sr安定同位体比

3. 2. 1 Sr安定同位体比の測定

国産収集試料の Sr 安定同位体比の範囲は 0.7045 ~ 0.7096 で、平均値は 0.7078、標準偏差は 0.0012 であり、中国産収集試料の Sr 安定同位体比の範囲は 0.7063 ~ 0.7150 で、平均値は 0.7121、標準偏差は 0.0019 であった。測定結果について、マンホイットニーのU検定を行った。その結果、国産と中国産の試料間で有意差 ($p < 0.05$) があった。

3. 2. 2 Sr安定同位体比データの解析

測定結果のヒストグラムを図 2 に示した。ROC 曲線 (図 3) から得られた基準値 0.7104 において、国産収集試料は全て国産と判別され、特異度は 100.0 % となった。中国産収集試料は、37 試料中 34 試料が中国産、3 試料が国産と判別され、感度は 91.9 % となった。

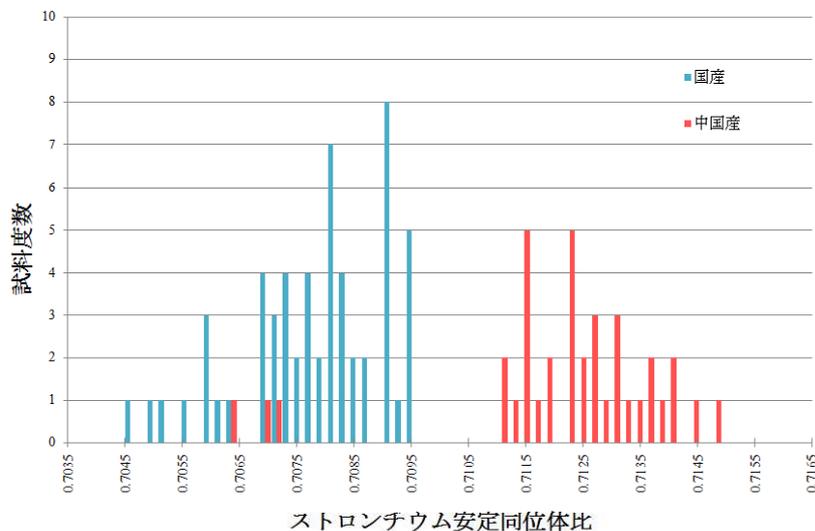


図 2 Sr安定同位体比のヒストグラム

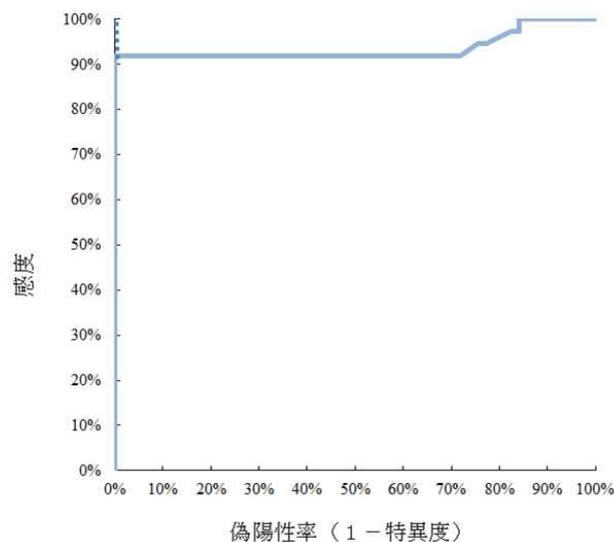


図 3 Sr安定同位体比のROC曲線

4. まとめ

本調査研究により、元素濃度 (Na、K、Rb、Pb) 及び Sr 安定同位体比による冷凍ほうれんそうの原料原産地を判別するモデルが構築できた。元素濃度による判別では、収集試料は全て正しく判別された。Sr 安定同位体比による判別では、収集試料は 96.8 % (91/94) が正しく判別された。以上のことから、元素分析及び Sr 安定同位体比による冷凍ほうれんそうの原料原産地の判別の可能性が示唆されたが、Sr 安定同位体比による判別は、中国産の一部試料において国産との判別が困難であると考えられた。

5. 謝 辞

本研究を行うにあたり、冷凍ほうれんそうの試料をご提供くださいました株式会社綾・野菜加工館、イシハラフーズ株式会社、農業生産法人有限会社四位農園、株式会社ジェイエイフーズみやざき、株式会社トミイチ、水戸冷凍食品株式会社、株式会社和郷、有限会社ワールドファームに深く感謝いたします。

6. 文 献

- 1) 財務省 平成 24 年貿易統計
- 2) 一社団法人日本冷凍食品協会, 平成 24 年 (1 ~ 12 月) 冷凍食品の生産・消費について
- 3) 農林水産省 平成 24 年野菜生産出荷統計
- 4) Kaoru Ariyama, Yoshinori Aoyama, Akashi Mochizuki, Yuji Homura, Masashi Kadokura, and Akemi Yasui, Determination of the Geographic Origin of Onions between Three Main Production Areas in Japan and Other Countries by Mineral Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 347-354.
- 5) 門倉雅史, 法邑雄司, 渡邊裕之, 堀田博, 鈴木忠直, 安井明美: 無機元素組成によるカボチャの原産地判定技術, *日本食品科学工学会誌*, 57, 78-84 (2010).
- 6) 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).
- 7) Liu, H-C.; You, C-F.; Huang, K-F.; Chung, C-H. Precise determination of triple Sr isotopes ($\delta^{87}\text{Sr}$ and $\delta^{86}\text{Sr}$) using MC-ICP-MS. *Talanta*, 2012, 88, 338-344.
- 8) P. Degryse, J. Schneider. Pliny the Elder and Sr-Nd isotopes: tracing the provenance of raw materials for Roman glass production. *Journal of Archaeological Science*, 2008. 35. 1993-2000.
- 9) S.S. Schmidberger, A. Simonetti, D. Francis. Small-scale Sr isotope investigation of clinopyroxenes from peridotite xenoliths by laser ablation MC-ICP-MS-implications for metasomatism. *Chemical Geology*, 2003, 199, 317-329.
- 10) T. Waight, J. Baker, D. Peate. Sr isotope ratio measurements by double-focusing MC-ICPMS: techniques, observations and pitfalls. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2002, 221, 229-244.