

かき類の元素分析及び軽元素安定同位体比分析による 原産地判別法の検討

小岩 智宏, 伊澤 淳修, 後藤 祐之介

Tomohiro Koiwa, Atsunobu Izawa, Yunosuke Gotou

要 約

国産（日本産）及び外国産（韓国産、中国産）のかき類（イワガキを除く）について、元素分析及び軽元素（炭素及び窒素）安定同位体比分析による原産地判別法を検討した。

218 試料（国産 128 試料、韓国産 74 試料、中国産 16 試料）を収集し、貝柱、胃、えら及び外套膜の 4 部位について、乾燥・粉碎し、23 元素（Li、Al、Ti、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、Rb、Sr、Y、Mo、Ag、Cd、Ba、Pb、P、Na、Mg、Ca、K 及び Fe）の濃度測定、炭素及び窒素安定同位体比の測定を行い、得られたデータの統計解析を実施した。

元素分析については、サポートベクターマシンによりえらの 8 元素（Cu、Zn、Y、Mo、Cd、Ba、Pb 及び Fe）を変数とする判別モデルを構築した結果、国産試料の 96 %、外国産試料の 93 % を正しく判別した。炭素及び窒素安定同位体比分析については、国産試料と外国産試料の分布が大きく重なっており判別が困難であった。

1. はじめに

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）には、食品を販売する際に表示しなければならない表示事項やその表示の方法が規定されており、生鮮食品においては原産地などを表示することが義務付けられている。

かき類（殻付き）の平成 27 年の養殖国内収穫量は約 16.4 万トンである¹⁾。主要な産地は広島県、岡山県、宮城県、兵庫県であり、瀬戸内海域での生産が約 8 割を占める。平成 28 年の輸入量は生鮮品、冷蔵品及び冷凍品で約 2.2 万トン（むき身換算率 0.15 として算出）であり、その 91 % を韓国産が占める²⁾。過去には韓国産カキを宮城県産に混入する等の事案が起きており、産地偽装が懸念されることから、原産地表示の真正性を確認するための科学的検証方法が必要とされている。

食品における原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 安定同位体比分析を利用した方法が報告されており^{3) - 6)}、水産物の原産地判別についても報告がある⁷⁾。これらの方法は、生育環境の違いが生産物に反映されることを利用したものである。窒素安定同位体比分析では、海域における閉鎖性等の違いにより異なる値を示す傾向があり、FAMIC においても、窒素安定同位体比分析を利用した鳴門産とその他の産地の乾わかめの原産地判別法の検討を行い、成果を得ている⁸⁾。

そこで元素分析及び軽元素安定同位体比分析を用いてかき類の原産地判別法について検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

収集試料の内訳を表1に示す。試料は、平成27年4月から平成29年2月にかけて218試料（国産128試料（生カキ105試料、冷凍カキ15試料、冷凍かきフライ（食用油脂で揚げたものを除く。以下同じ。）8試料）、韓国産74試料（生カキ18試料、冷凍カキ19試料、冷凍かきフライ37試料）、中国産16試料（冷凍かきフライ16試料））を入手した。イワガキについては収集対象外とした。国産試料は漁協などを通じて入手し、外国産試料は流通事業者などから市販向け商品を購入した。

表1 収集試料

産地	試料数
広島県	44
宮城県	32
岡山県	22
兵庫県	19
岩手県	3
三重県	3
北海道	2
福岡県	3
韓国	74
中国	16

2.2 試薬

実験に使用した水は、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 $>18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 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。検量線用混合標準溶液には単元素標準溶液（Li、Al、Ti、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、Rb、Sr、Y、Mo、Ag、Cd、Ba、Pb、P、Na、Mg、Ca、K、Fe及びIn、ICP分析用）を適宜希釈して調製した。

2.3 装置

試料調製には、真空凍結乾燥器（DRZ350WA、ADVANTEC）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。炭素及び窒素安定同位体比の測定には、元素分析/同位体比質量分析計（EA/IRMS）（Iso Prime EA、GV Instruments（現Elementar））を用いた。

2.4 試料調製

冷凍かきフライについては流水で衣を除去し、かきを取り出した。セラミック製カッターを用いて、貝柱、胃、えら及び外套膜を採取した。部位毎に超純水で洗浄後、凍結乾燥を行い、ポリエチレン製袋に入れ樹脂製ハンマーで粉砕したものを粉砕試料とした。

2.5 元素分析

粉砕試料約25mgを採取した樹脂製ヒータブルビーカーに61%硝酸を10mL加え、樹脂製時計皿でふたをし、120℃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2.5mL加え、徐々に温度を上げながら180~230℃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。次に時計皿を外し、約230℃で加熱して乾固した。ビーカーに1%硝酸を5mL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、25mL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5 $\mu\text{g/L}$ になるように加え、1%硝酸で定容後、元素濃度測定用試料溶液とした。試料は3点併行で分析した。

Li、Al、Ti、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、Rb、Sr、Y、Mo、Ag、Cd、Ba、Pb及びFeの濃度は

内標準法（内標準：In）で ICP-MS により、P、Na、Mg、Ca 及び K の濃度は検量線法で ICP-OES により、表 2 の条件で測定した。

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	1.3 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

2.6 炭素及び窒素安定同位体比分析

粉碎試料約 0.95 mg をスズ製カプセルに採取し包み込んだ後、EA/IRMS により、表 3 の条件で測定した。試料は 2 点併行で分析した。

表 3 EA/IRMS の測定条件

燃焼管温度	1030 °C
還元管温度	670 °C
GCカラム温度	115 °C

2.7 分析部位の検討

まず約半数の試料について、貝柱、胃、えら及び外套膜の元素濃度、炭素及び窒素安定同位体比を測定し、得られたデータなどをもとに分析に適した部位についての検討を行った。残りの試料の測定及び判別法の検討については、ここで決定した分析部位を対象に実施した。

2.8 判別モデルの構築

国産については各産地の収穫量¹⁾を反映するように選択した 79 試料、外国産については全試料を判別モデルの構築に用いた。また、国産の残り 49 試料は国産ブラインド試料として、構築した判別モデルの判別性能の確認に用いた。

測定した元素濃度、炭素及び窒素安定同位体比を説明変数として、線形判別分析及びサポートベクターマシン（SVM）により最適な判別モデルの構築を検討した。線形判別分析は R 3.4.1 の MASS パッケージを使用し、SVM は e1071 を使用した。解析は中村ら⁹⁾の方法に従った。構築した判別モデルの未知試料に対する判別率は、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。できるだけ少ない元素数で高い判別率が得られるモデルを最適な判別モデルとして選択した。

3. 結果及び考察

3.1 分析部位の検討

3.1.1 元素分析

貝柱については、判別率及び併行精度が他部位より劣っており、また金属製のかき剥きナイフによる汚染が懸念された。胃については、周辺組織と癒着しており、胃のみを採取するのに時間を要し、周辺組織除去の再現性にも難があった。残る外套膜とえらについては判別率が同程度で

あったため、組織の一番外側に位置することから汚染が懸念される外套膜ではなく、えらを分析部位とした。

3.1.2 炭素及び窒素安定同位体比分析

4 部位とも炭素及び窒素安定同位体比の分布が同様の傾向を示したことから、分析の効率を考慮し、元素分析と同じくえらを分析部位とした。

3.2 判別法の検討

3.2.1 元素濃度の測定結果

国産試料と外国産試料の粉砕試料中元素濃度を表 4 に示す。

表 4 粉砕試料中の元素濃度(mg/kg)

	国産											
	Li	Al	Ti	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Rb	Sr	Y
平均	3.7×10^{-1}	6.4×10	2.2×10	1.1	10.3×10	1.5×10^{-1}	6.8×10^{-1}	1.8×10^2	1.6×10^3	2.6	9.7	3.2×10^{-1}
標準偏差	3.4×10^{-1}	12.6×10	1.3×10	0.0	6.4×10	0.5×10^{-1}	4.0×10^{-1}	1.2×10^2	0.7×10^3	1.0	3.2	4.0×10^{-1}
最小値	0.8×10^{-1}	1.9×10	0.8×10	1.1	2.7×10	0.8×10^{-1}	3.1×10^{-1}	0.06×10^2	0.2×10^3	0.6	4.4	0.3×10^{-1}
第1四分位数	2.0×10^{-1}	1.9×10	1.3×10	1.1	6.1×10	1.2×10^{-1}	3.8×10^{-1}	1.0×10^2	1.1×10^3	1.9	7.5	1.1×10^{-1}
中央値	2.9×10^{-1}	1.9×10	1.6×10	1.1	9.1×10	1.5×10^{-1}	5.8×10^{-1}	1.5×10^2	1.4×10^3	2.5	9.1	2.1×10^{-1}
第3四分位数	3.9×10^{-1}	4.1×10	3.1×10	1.1	12.3×10	1.8×10^{-1}	8.1×10^{-1}	2.1×10^2	2.0×10^3	3.4	11.6	3.2×10^{-1}
最大値	25.3×10^{-1}	89×10	5.4×10	1.4	40.9×10	3.5×10^{-1}	24.3×10^{-1}	7.5×10^2	3.7×10^3	4.6	20.8	28.4×10^{-1}

	国産										
	Mo	Ag	Cd	Ba	Pb	P	Na	Mg	Ca	K	Fe
平均	3.7×10^{-1}	4.6	3.0	3.6×10^{-1}	8.0×10^{-1}	8.4×10^3	8.6×10^3	1.8×10^3	0.9×10^3	6.5×10^3	1.9×10^2
標準偏差	3.3×10^{-1}	3.3	1.5	3.6×10^{-1}	4.2×10^{-1}	0.7×10^3	4.1×10^3	0.5×10^3	0.2×10^3	2.6×10^3	1.1×10^2
最小値	2.1×10^{-1}	0.1	1.2	1.0×10^{-1}	1.2×10^{-1}	5.0×10^3	2.2×10^3	0.8×10^3	0.5×10^3	1.1×10^3	0.9×10^2
第1四分位数	2.1×10^{-1}	2.5	2.0	1.3×10^{-1}	4.9×10^{-1}	8.0×10^3	5.6×10^3	1.4×10^3	0.7×10^3	4.3×10^3	1.3×10^2
中央値	2.4×10^{-1}	3.7	2.5	2.2×10^{-1}	7.6×10^{-1}	8.4×10^3	8.1×10^3	1.6×10^3	0.8×10^3	6.7×10^3	1.5×10^2
第3四分位数	3.6×10^{-1}	5.5	3.4	4.7×10^{-1}	10.8×10^{-1}	9.0×10^3	10.8×10^3	2.1×10^3	1.0×10^3	8.3×10^3	2.2×10^2
最大値	21.6×10^{-1}	19.0	9.0	21.9×10^{-1}	19.2×10^{-1}	9.8×10^3	21.5×10^3	3.6×10^3	1.8×10^3	12.0×10^3	8.3×10^2

	外国産											
	Li	Al	Ti	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Rb	Sr	Y
平均	3.3×10^{-1}	9.3×10	2.0×10	1.2	5.9×10	1.6×10^{-1}	7.7×10^{-1}	3.0×10^2	1.2×10^3	1.6	10.9	2.3×10^{-1}
標準偏差	4.2×10^{-1}	12.3×10	1.0×10	0.3	3.3×10	0.6×10^{-1}	5.8×10^{-1}	2.3×10^2	0.6×10^3	0.8	5.7	2.3×10^{-1}
最小値	0.8×10^{-1}	1.9×10	0.9×10	1.1	1.1×10	0.9×10^{-1}	3.1×10^{-1}	0.8×10^2	0.4×10^3	0.3	4.4	0.5×10^{-1}
第1四分位数	1.7×10^{-1}	2.6×10	1.5×10	1.1	3.6×10	1.1×10^{-1}	3.1×10^{-1}	1.3×10^2	0.8×10^3	1.0	7.4	1.1×10^{-1}
中央値	2.1×10^{-1}	4.4×10	1.7×10	1.1	5.4×10	1.4×10^{-1}	5.3×10^{-1}	2.1×10^2	1.0×10^3	1.4	9.4	1.6×10^{-1}
第3四分位数	3.4×10^{-1}	9.9×10	2.0×10	1.1	7.1×10	1.8×10^{-1}	10.2×10^{-1}	4.0×10^2	1.4×10^3	2.1	12.9	2.7×10^{-1}
最大値	37.4×10^{-1}	71.8×10	6.9×10	2.8	18.8×10	4.1×10^{-1}	28.7×10^{-1}	13.5×10^2	3.6×10^3	4.0	32.8	15.2×10^{-1}

	外国産										
	Mo	Ag	Cd	Ba	Pb	P	Na	Mg	Ca	K	Fe
平均	3.0×10^{-1}	6.9	7.4	10.7×10^{-1}	9.7×10^{-1}	8.4×10^3	5.1×10^3	1.4×10^3	1.3×10^3	3.2×10^3	2.3×10^2
標準偏差	1.4×10^{-1}	3.7	4.3	8.1×10^{-1}	3.4×10^{-1}	1.1×10^3	2.4×10^3	0.4×10^3	0.8×10^3	1.9×10^3	1.3×10^2
最小値	2.1×10^{-1}	1.1	1.9	1.2×10^{-1}	1.8×10^{-1}	6.0×10^3	0.9×10^3	0.8×10^3	0.6×10^3	0.3×10^3	0.4×10^2
第1四分位数	2.1×10^{-1}	4.3	4.7	4.2×10^{-1}	7.0×10^{-1}	7.7×10^3	3.2×10^3	1.2×10^3	0.8×10^3	1.7×10^3	1.5×10^2
中央値	2.5×10^{-1}	5.8	6.1	7.8×10^{-1}	9.9×10^{-1}	8.4×10^3	4.5×10^3	1.4×10^3	1.1×10^3	2.8×10^3	2.0×10^2
第3四分位数	3.2×10^{-1}	9.1	8.1	15.9×10^{-1}	11.8×10^{-1}	9.0×10^3	6.8×10^3	1.6×10^3	1.5×10^3	4.2×10^3	2.6×10^2
最大値	12.6×10^{-1}	18.8	21.3	35.4×10^{-1}	21.2×10^{-1}	12.4×10^3	10.1×10^3	2.4×10^3	5.3×10^3	8.9×10^3	7.7×10^2

各元素とも、検出限界未満の測定値については検出限界値にして取り扱った。

3.2.2 炭素及び窒素安定同位体比の測定結果

国産試料と外国産試料の炭素及び窒素安定同位体比を表5に示す。

表5 炭素及び窒素安定同位体比(‰)

	炭素安定同位体比		窒素安定同位体比	
	国産	外国産	国産	外国産
平均	-19.441	-19.010	11.290	10.375
標準偏差	0.738	1.240	1.672	1.090
最小値	-21.509	-22.905	7.043	7.989
第1四分位数	-19.906	-19.547	9.999	9.640
中央値	-19.271	-19.114	11.796	10.128
第3四分位数	-18.938	-18.252	12.609	10.963
最大値	-18.261	-15.384	14.057	13.363

3.3 判別法の検討

3.3.1 元素分析による判別の検討

測定結果を使って最適な判別モデルの検討を行い、Cu、Zn、Y、Mo、Cd、Ba、Pb及びFeの濃度の常用対数を説明変数とする判別モデルを構築した。次に、LOOCVにより得られた判別得点について、Bartlett検定及び一元配置分散分析により生カキ、冷凍カキ、冷凍かきフライの3群間の差を検定した。その結果、国産試料については群間差が確認されず、外国産試料については群間差が確認されたため、国産試料は3群をまとめて、外国産試料は3群を個別に分布を作成することとした。判別得点のヒストグラムを図1(a)～(c)に示す。

判別得点が正の試料を国産、負の試料を外国産と判別した場合、国産試料の96%、外国産試料の93%を正しく判別した。また、国産ブラインド試料についても98%を正しく判別した。判別モデルの的中率を表6に示す。

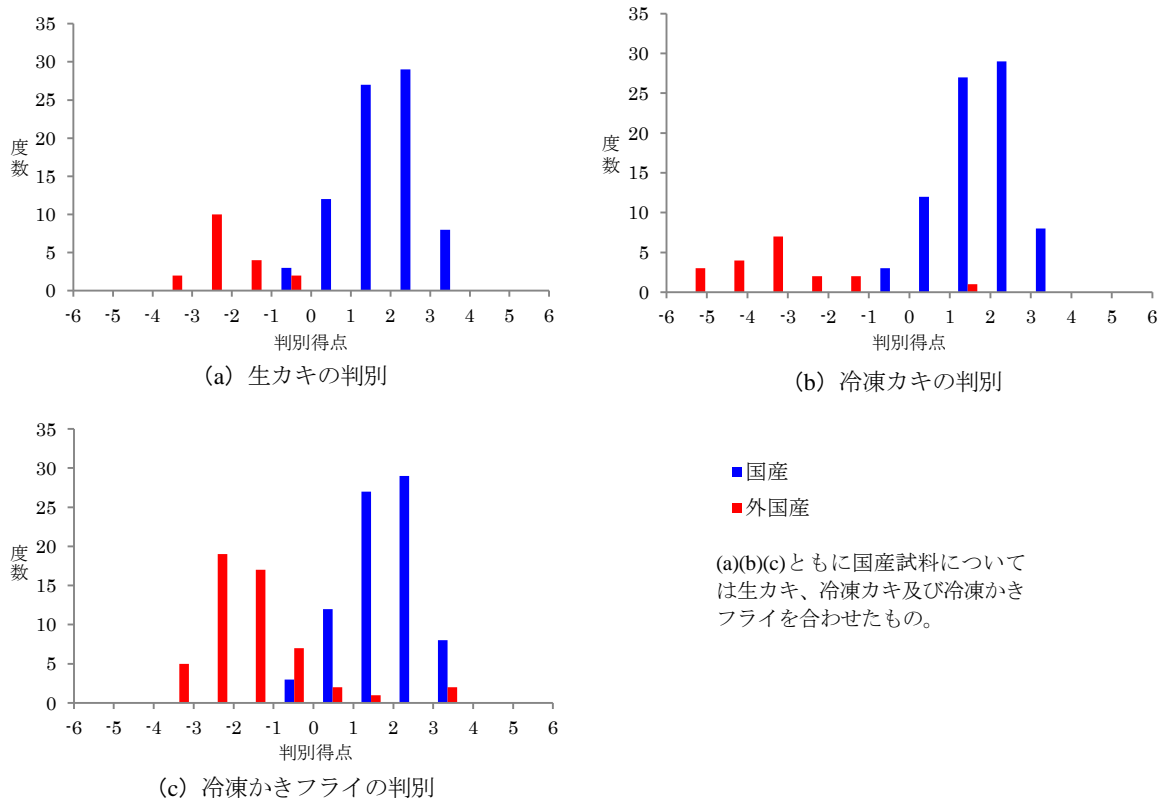


図1 LOOCVの判別得点のヒストグラム

表 6 LOOCV により構築した判別モデルの的中率

	全体	種類別		
		生カキ	冷凍カキ	冷凍かきフライ
国産	96 % (76/79)			
外国産	93 % (84/90)	100 % (18/18)	95 % (18/19)	91 % (48/53)
国産ブラインド試料	98 % (48/49)			

国産は3群をまとめて取り扱うため、種類別の的中率は記載せず。

3.3.2 炭素及び窒素安定同位体比分析による判別の検討

国産試料と外国産試料の炭素及び窒素安定同位体比の分布を図2に示す。炭素、窒素ともに国産試料と外国産試料の重なりが大きく、判別は困難であった。なお、国産試料については瀬戸内海とそれ以外の海域で窒素安定同位体比が分かれる傾向が確認された。

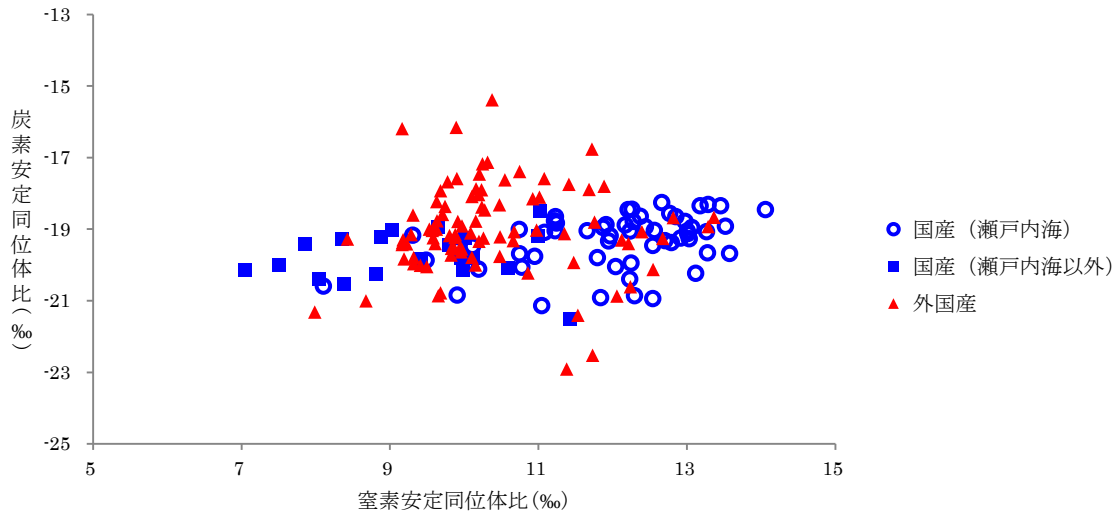


図2 炭素及び窒素安定同位体比の分布

4. まとめ

本研究では、元素分析及び軽元素（炭素及び窒素）安定同位体比分析によるかき類（イワガキを除く）の原産地判別法を検討した。国産 128 試料、韓国産 74 試料、中国産 16 試料を収集し、分析した。その結果、これらの元素分析により国産試料の 96 %、外国産試料の 93 % を正しく判別できる判別モデルが構築できた。炭素及び窒素安定同位体比分析については、国産試料と外国産試料の分布が大きく重なっており判別が困難であった。

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れる。

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生産者、漁業協同組合、卸売業者、製造業者等の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) 農林水産省漁業・養殖業生産統計
- 2) 財務省貿易統計
- 3) 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*, **55**(2), 347-354(2007)
- 4) 門倉雅史, 法呂雄司, 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**(2), 78-84 (2010)
- 5) 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**(2), 69-75(2012)
- 6) 伊澤淳修, 青山恵介, 申基澈, 中野孝教 : ストロンチウム安定同位体比によるタケノコ等野菜の水煮加工品の原料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**, 6-15 (2014)
- 7) 諸橋保, 青山恵介, 浪越充司, 木村康晴, 服部賢志 : 元素分析による湯通し塩蔵わかめの原料原産地判別, 日本水産学会誌, **77**(2), 243-245(2011)
- 8) Hisaaki Hiraoka, Sakie Morita, Yunosuke Gotou, Satoshi Hattori, Testuo Ishikawa, Keiichi Okano: Confirming the authenticity of the geographical origin of Naruto dried wakame *Undaria pinnatifida* using stable nitrogen isotope ratios, *Fisheries Science*, **80**(3), 635-642(2014)
- 9) 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調査研究報告, **37**, 1-10(2013)