

ゴボウの原産地判別の試料調製法の再検討

中村 哲, 法邑 雄司, 豊田 正俊

Satoru Nakamura, Yuji Homura, Masatoshi Toyoda

要 約

ゴボウ 28 試料について、ゴボウ表面の洗浄度合いを変えた場合及び皮の除去を行った場合の元素濃度の変動を確認し、既報のゴボウの原産地判別法の再評価を行った。その結果、既報の判別モデルはゴボウ表面に付着した土壌の除去の影響を受けやすく、判別能力が低くなる可能性があることが示された。また、前処理法の違いに影響されず、かつ判別能力が高い判別モデルが存在することが示された。

1. はじめに

ゴボウは、生鮮食品品質表示基準が制定される以前より原産地表示が義務づけられていた農産物 9 品目の 1 つであり、平成 10 年には原産地表示が義務化された。以来、原産地判別法の確立が求められていたが、平成 22 年に船木らが元素分析による原産地判別法を開発し¹⁾、原産地判別マニュアルとして実用化した。

その後、検討を重ねたところ、本判別法はゴボウの皮を除去せず、ゴボウ表面を洗浄したものを試料としていることから、ゴボウ表面の洗浄度合いが判別に影響している可能性が懸念された。

本研究では、ゴボウ表面の洗浄度合いを変えた場合及び皮の除去を行った場合どの程度元素濃度に変動があるか確認し、既報の判別モデルへの影響を評価したので報告する。また、皮を除去した場合の濃度変動に影響されない判別モデルの構築について考察を行ったので併せて報告する。

2. 実験方法

2. 1 試料

試料の前処理の検討に用いた試料は表 1 のとおりである。表 1 のうち、試料番号 1 から 10 までの試料(国産ゴボウ各 2 本)は、1 本の個体をゴボウ表面の処理の検討に、別の 1 本の個体をゴボウの皮の除去の検討に用いた。試料番号 11 から 18 までの試料(中国産ゴボウ各 1 本)は、ゴボウの皮の除去の検討に用いた。

表 1 試料の原産地

試料番号	原産地	試料番号	原産地
1	群馬県	11	中国
2	群馬県	12	中国
3	茨城県	13	中国
4	宮崎県	14	中国
5	宮崎県	15	中国
6	群馬県	16	中国
7	鹿児島県	17	中国
8	千葉県	18	中国
9	群馬県		
10	鹿児島県		

2. 2 試薬及び装置

試薬は、61 %硝酸（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）の 2 種を用いた。装置は、粉砕器 B-400（BÜCHI）、誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-OES）OPTIMA 5300V（PerkinElmer）及び誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）Elan DRC-e（PerkinElmer）を用いた。

2. 3 試料の前処理

ゴボウ 1 本について、樹脂製手袋を付けた手で表面を水道水により洗浄し、続いて超純水で表面を洗浄した。根の先端側については直径 1 cm 未満の部分、茎側については茎基部から 3 cm を除去した。縦に 2 等分、横に 8 等分に分割して交互に試料採取し、一方は超純水で洗浄した（以降の表面の処理又は皮の除去を行わない）後、粉砕器で粉砕を行った（標準サンプル）。もう一方については、ゴボウ表面をナイロンたわしで 10 回こすった（こすり洗い）又はセラミック製ピーラーで皮を 1 mm 程度除去した（皮の除去）後、超純水で洗浄して粉砕器で粉砕を行った（比較サンプル）。

調製の様子を図 1 に示す。



図1 ゴボウの前処理の様子

左上：水道水による表面の洗浄、右上：分割後の状態

左下：ナイロンたわしで表面をこすった後の状態（左：処理済、右：未処理）

右下：皮を除去した後の状態

2. 4 分析

分析法は既報¹⁾に準じた。すなわち、粉碎試料 2 g を硝酸及び過塩素酸で分解し、溶液を乾固した後、ICP-MS 用内標準である In を 5 $\mu\text{g/L}$ になるよう添加し、1 %硝酸を用いて 50 mL に定容とした。ただし、本研究では、既報と異なりふっ化水素を使用しなかった。ICP-MS により Sc, Co, Ni, Zn, Rb, Cd, La, Ce, Nd, Sm, Gd 及び Tl の 12 元素を、ICP-OES により Na, Mg, Al, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Sr 及び Ba の 11 元素を定量し、溶液中濃度を決定した。これとは別に粉碎試料 5 g を 70 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間乾燥し、ゴボウ中の水分濃度を決定した。溶液中濃度及び水分濃度から各元素の乾燥試料中濃度を計算し、解析に用いた。なお、Sc については、試料中濃度が定量限界を下回る試料が多いことが既報で判明しているため、解析を実施しなかった。

2. 5 解析

洗浄度合い及び皮の除去の影響を評価するために、以下の計算を行った。なお、以下の計算は前処理法（こすり洗い及び皮の除去）及び原産地（国産及び中国産）の区別に実施した。

まず、各試料について比較サンプルの標準サンプルに対する乾燥試料中濃度の常用対数の差 x を計算し、全試料の平均値 \bar{x} 及び標準偏差 s を計算した。次に、比較サンプル（こすり洗い及び皮の除去）の標準サンプルに対する濃度比 R_w を式 1 により計算した。

$$R_w = 10^{\bar{x}} \quad \dots \text{(式 1)}$$

このとき、各試料の濃度比は式 2 に示す標準偏差 $s(R_w)$ でばらつきを持つ。

$$s(R_w) = R_w \times s \times \log 10 \quad \dots \text{(式 2)}$$

ここから、各試料における処理前後の濃度変動を式 3 により濃度 w の相対標準不確かさ $u(w) / w$ に換算した。

$$u(w) / w = [(1 - R_w)^2 + s^2(R_w)]^{0.5} \quad \dots \text{(式 3)}$$

式 3 及び Horwitz の修正式²⁾による再現標準偏差の推定値を合成することにより、濃度の合成標準不確かさを推定した。なお、以降の計算は皮の除去を行った場合についてのみ実施した。

多変量解析の方法は一色ら³⁾の方法に準じた。すなわち、既報の判別モデルを構築したデータを用い、変数及び変数の合成標準不確かさから、Leave-one-out cross-validation (LOOCV) 判別得点及び判別得点の標準不確かさを計算した。判別得点 Y の標準不確かさ $u(Y)$ は、変数間の相関がないと仮定して、式 4 により計算した⁴⁾。

$$u^2(Y) = \sum_i \left(\frac{\partial F}{\partial q_i} \right)^2 u^2(q_i) \quad \dots \text{(式 4)}$$

Y : 判別得点

$u(Y)$: 判別得点の標準不確かさ

q_i : i 番目の変数

$u(q_i)$: q_i の標準不確かさ

$Y = F(q_1, q_2, \dots, q_i, \dots)$

判別得点及び判別得点の標準不確かさから、Silverman の経験則⁵⁾によるカーネル密度推定のバンド幅及び判別得点の標準不確かさを合成したものを最終的なバンド幅として、カーネル密度推定により判別得点分布を推定した。Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線⁶⁾を描くことにより、最適となる判別モデルを計算した。なお、ROC 曲線を描くに当たり、国産試料を陰性試料、外国産試料を陽性として扱った。ROC 曲線の特定の接線の傾きの値に対して接線が最も左上になるよう、前進ステップワイズによる変数選択を行った後、判別への寄与が小さい変数を手動で除去することにより最適となる判別モデルを決定した。接線の傾きの値は 0.001 から 1000 までの 19 種類の値に対して検討したが、本

報告では接線の傾きの値が 0.01 から 100 までの値に対して最適化された結果を示す。

多変量解析に当たっては R 2.15.0 (<http://www.r-project.org/>) を使用し、MASS パッケージに同封された lda 関数による線形判別分析 (LDA) 及び e1071 パッケージに同封された svm 関数によるサポートベクターマシン (SVM) により解析した。なお、SVM はリニアカーネルのみを検討した。変数は濃度、濃度の常用対数、濃度の Mg 濃度比及び濃度の Mg 濃度比の常用対数の 4 種類について検討した。また、既報と同様に、変数に Na 及び K を含めない場合についても検討した。

3. 結果及び考察

比較サンプル (こすり洗い及び皮の除去) の標準サンプルに対する濃度比 R_w 、濃度比の標準偏差 $s(R_w)$ 及び濃度の相対標準不確かさ $u(w) / w$ を表 2 に示す。なお、比較のため、Horwitz の修正式による再現相対標準偏差の代表値 $PRSD_R$ についても掲載した。

表 2 R_w 、 s_{Rw} 及び $u(w) / w$ の値

元素	こすり洗い・国産			皮の除去・国産			皮の除去・中国産			$PRSD_R$	
	R_w	$s(R_w)$	$u(w) / w$	R_w	$s(R_w)$	$u(w) / w$	R_w	$s(R_w)$	$u(w) / w$	国産	中国産
Na	0.954	0.101	0.111	1.010	0.098	0.098	0.916	0.112	0.140	0.066	0.052
Mg	0.997	0.048	0.048	0.991	0.042	0.042	0.970	0.048	0.056	0.049	0.048
Al	0.161	0.059	0.841	0.035	0.012	0.965	0.058	0.035	0.942	0.083	0.085
P	0.998	0.043	0.043	1.057	0.025	0.062	1.076	0.047	0.089	0.047	0.048
K	0.971	0.040	0.049	0.740	0.044	0.264	0.710	0.068	0.297	0.036	0.039
Ca	0.971	0.055	0.062	0.824	0.071	0.190	0.902	0.048	0.109	0.049	0.048
Mn	0.715	0.182	0.338	0.361	0.076	0.644	0.510	0.079	0.497	0.106	0.107
Fe	0.214	0.067	0.789	0.134	0.059	0.868	0.342	0.136	0.672	0.085	0.084
Co	0.557	0.177	0.477	0.439	0.112	0.572	0.840	0.072	0.175	0.220	0.196
Ni	0.765	0.261	0.352	0.805	0.184	0.268	1.090	0.036	0.097	0.179	0.142
Zn	0.941	0.086	0.105	1.025	0.059	0.064	1.075	0.079	0.109	0.102	0.109
Cu	0.935	0.096	0.116	0.896	0.031	0.109	0.948	0.053	0.074	0.113	0.110
Rb	0.956	0.044	0.062	0.742	0.045	0.262	0.757	0.067	0.252	0.104	0.104
Sr	0.983	0.068	0.070	0.813	0.113	0.218	0.907	0.072	0.118	0.105	0.104
Cd	0.959	0.063	0.075	0.930	0.040	0.080	1.026	0.070	0.074	0.205	0.214
Ba	0.896	0.124	0.162	0.698	0.210	0.368	0.844	0.092	0.181	0.118	0.119
La	0.415	0.142	0.602	0.187	0.184	0.834	0.146	0.085	0.858	0.213	0.205
Ce	0.248	0.090	0.757	0.071	0.060	0.931	0.083	0.051	0.919	0.220	0.196
Nd	0.307	0.095	0.699	0.100	0.090	0.905	0.069	0.045	0.932	0.220	0.215
Sm	0.281	0.087	0.724	0.079	0.073	0.924	0.065	0.040	0.936	0.220	0.220
Gd	0.292	0.091	0.714	0.088	0.083	0.916	0.073	0.048	0.928	0.220	0.220
Tl	0.892	0.080	0.134	0.558	0.108	0.455	0.626	0.065	0.380	0.220	0.220

こすり洗い及び皮の除去の影響を受けないと考えられる ($u(w) / w$ が $PRSD_R$ のおおむね $1/3$ 以下である) 元素は Cd のみであった。その他の元素は表面の処理又は皮の除去によって何らかの影響を受けていると考えられ、Al, Fe, La, Ce, Nd, Sm 及び Gd のように $2/3$ 以上低減してしまうという例も見られた。これらの濃度変化はいずれも皮に付着していた土壌が除去されたためと考えられる。また、一部の元素では原産地による違いも見られた。例えば、皮を除去した場合 Co では中国産よりも国産の方が低減しやすい傾向にあった ($p < 0.001$)。これは、中国から輸入される際、検疫の都合上商品から土壌が十分に除去されており、皮の除去による濃度の低減が発生しにくいためと考えられる。

本研究ではふっ化水素を使用しなかったが、この場合、Al 及び Fe において $1.5 \sim 2$ 程度定量値が異なることが事前調査で示唆されている。このため、Al 及び Fe については表 2 に示した値よりも更に相対標準不確かさが大きくなる可能性がある。ただ、その影響はこすり洗い又は皮の除去の影響と比較すると小さい。

既報¹⁾で最終的に選択した式 5 のモデル

$$Y = -2.256 \times 10^{-3}[\text{Na}] + 2.007 \times 10^{-4}[\text{K}] - 6.665 \times 10^{-4}[\text{Ca}] - 6.398[\text{Ce}] + 41.17[\text{Ti}] + 0.7135$$

… (式 5)

[E] : 元素 E の濃度 (mg/kg)

及び Horwitz の修正式から、ゴボウ表面の土壌及び皮の影響を考慮しない場合 (Horwitz の修正式のみを考慮した場合) 及びゴボウ表面の土壌及び皮の影響を考慮した場合の判別得点の標準不確かさ $u(Y)$ は図 2 のようになる。

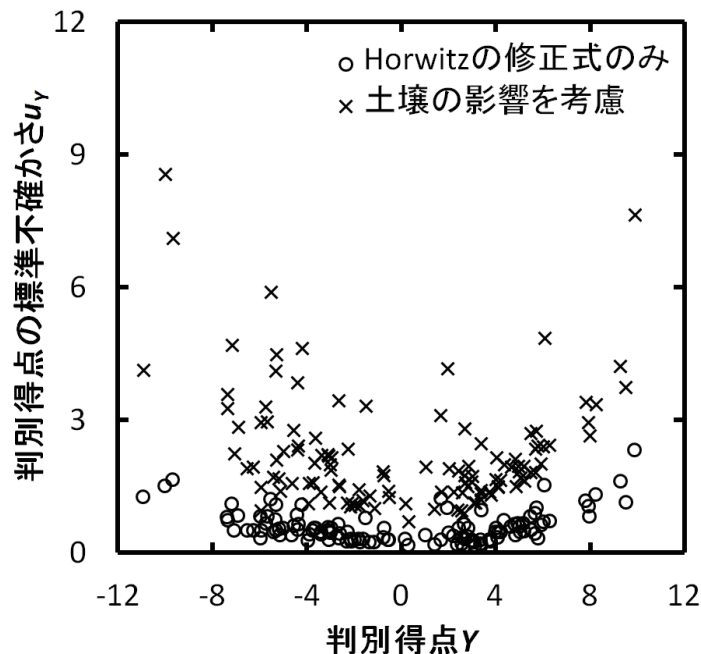


図 2 判別得点の標準不確かさ $u(Y)$

ゴボウ表面の土壌及び皮の影響を考慮すると、Horwitz の修正式のみを考慮した場合と

比較して不確かさが約4倍に増大している。なお、実際には大半の元素でゴボウの表面の土壌及び皮を除去することにより濃度が低減される傾向にあるため、判別得点に換算した場合判別得点のかたよりの一部がキャンセルされ、図2の結果より不確かさが小さくなる可能性がある。しかしながら、低減の割合は試料からあらかじめ土壌が除去されているかどうかの影響を受けるため、単に試料中濃度に濃度比を掛けて補正を行うと、逆に濃度を過小推定してしまうこともある。また、研究時の操作と比較して土壌の除去が不十分であると、本来判別法が想定していた結果よりも濃度が高くなってしまいうる。そのため、本研究では不確かさを過大評価せざるを得なかった。

図2に示した判別得点の標準不確かさ $u(Y)$ を用いて ROC 曲線を描いた結果は図3のとおりとなった。

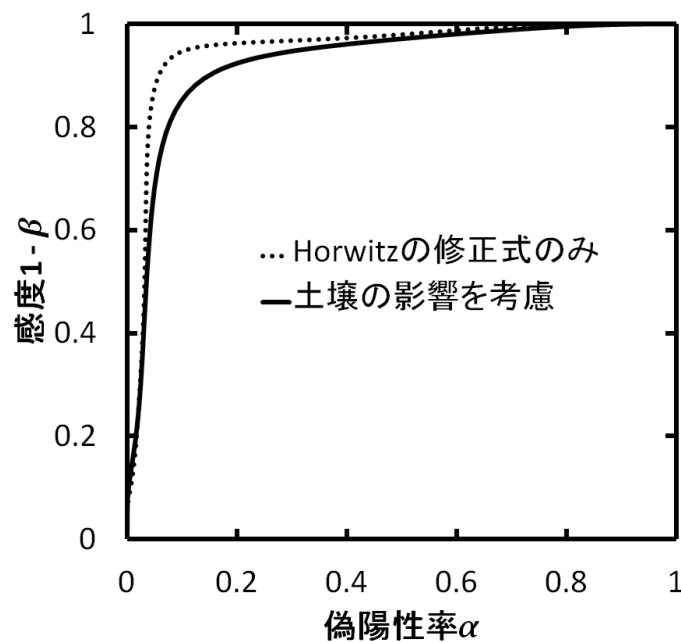


図3 既報の判別モデルのROC曲線

Horwitz の修正式のみを考慮した場合、(判別得点) = 0 を基準とすれば $(\alpha, 1 - \beta) = (0.072, 0.926)$ という結果、すなわち国産試料を国産と正しく判別する確率は 92.8 %、中国産試料を中国産と正しく判別する確率は 92.6 % という結果であった。この値は既報の値（それぞれ 93 % 及び 95 %）とおおむね一致しており、ゴボウ表面の土壌の影響を考慮しなければ分析法の不確かさの影響は小さいと言える。ところが、ゴボウ表面の土壌の影響を考慮すると、 $(\alpha, 1 - \beta) = (0.110, 0.867)$ まで判別能力が低下することになる。このため、既報の判別モデルを皮を除去した試料に適用することは不可能であり、また、皮を除去しない場合でもゴボウ表面の土壌の影響を受けてしまっていることが確実である。

本研究における解析の結果、ゴボウ表面の土壌及び皮の影響を比較的受けにくい判別モデルが得られた。Na 及び K を含めた場合の判別得点の式 Y_1 から Y_3 を式6から式8に、ROC 曲線を図4に示す。

$$\begin{aligned}
 Y_1 = & 3.973 \log_{10}([\text{K}] / [\text{Mg}]) - 1.248 \log_{10}([\text{Ni}] / [\text{Mg}]) \\
 & + 2.573 \log_{10}([\text{Zn}] / [\text{Mg}]) + 1.069 \log_{10}([\text{Rb}] / [\text{Mg}]) \\
 & - 1.017 \log_{10}([\text{Ba}] / [\text{Mg}]) - 1.968 \quad \dots (\text{式 } 6)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Y_2 = & -1.261 \log_{10}[\text{Na}] - 1.570 \log_{10}[\text{Mg}] + 2.206 \log_{10}[\text{P}] - 3.766 \log_{10}[\text{Ca}] \\
 & - 2.502 \log_{10}[\text{Ni}] + 2.569 \log_{10}[\text{Cd}] + 1.250 \log_{10}[\text{Tl}] + 18.406 \quad \dots (\text{式 } 7)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Y_3 = & -1.213 \log_{10}[\text{Na}] - 4.256 \log_{10}[\text{Ca}] - 2.547 \log_{10}[\text{Ni}] + 1.613 \log_{10}[\text{Zn}] \\
 & + 3.141 \log_{10}[\text{Cd}] - 0.434 \log_{10}[\text{Ba}] + 0.829 \log_{10}[\text{Tl}] + 20.467 \quad \dots (\text{式 } 8)
 \end{aligned}$$

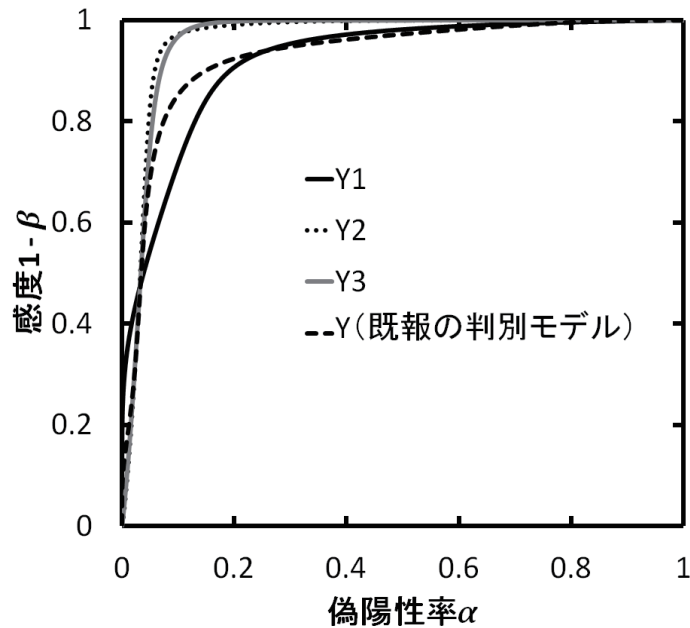


図4 本研究で得られた判別モデルのROC曲線

図4を見ると、どのようなROC曲線の接線の傾きに対しても、既報の判別モデルより接線が左上になる判別モデルが存在している。言い換えると、より良好な判別モデルが存在するということになる。式6から式8までの判別モデルは、使用目的に応じて使い分けることとなる。すなわち、国産ゴボウを誤って中国産ゴボウと判定しないようにするには式6の判別モデルを、中国産ゴボウを誤って国産ゴボウと判定しないようにするには式8の判別モデルを、その中間としては式7の判別モデルを用いるということになる。式7では、判別得点-0.2を基準としたとき $(\alpha, 1 - \beta) = (0.083, 0.961)$ 、すなわち国産試料を国産と正しく判別する確率は91.7%、中国産試料を中国産と正しく判別する確率は96.1%という結果であった。

Na及びKを使用しない場合の判別得点の式 Y_4 から Y_5 を式9から式11に、ROC曲線を図5に示す。

$$\begin{aligned}
 Y_4 = & -5.072 \times 10^{-4} [\text{Mg}] - 1.831 \times 10^{-4} [\text{Ca}] + 1.824 \times 10^{-4} [\text{P}] \\
 & - 0.4559 [\text{Ni}] + 0.05820 [\text{Zn}] + 7.456 [\text{Cd}] + 0.024 \quad \dots (\text{式 } 9)
 \end{aligned}$$

$$Y_5 = -3.613 \log_{10}[\text{Mg}] - 3.012 \log_{10}[\text{Ca}] - 2.694 \log_{10}[\text{Ni}]$$

$$\begin{aligned}
 &+ 2.492 \log_{10}[\text{Zn}] + 3.419 \log_{10}[\text{Cd}] + 0.985 \log_{10}[\text{Tl}] + 24.268 && \dots (\text{式 } 10) \\
 Y_6 = &-2.975 \log_{10}([\text{Ni}] / [\text{Mg}]) + 2.647 \log_{10}([\text{Zn}] / [\text{Mg}]) \\
 &- 1.226 \log_{10}([\text{Sr}] / [\text{Mg}]) + 4.380 \log_{10}([\text{Cd}] / [\text{Mg}]) \\
 &+ 0.962 \log_{10}([\text{Tl}] / [\text{Mg}]) + 16.599 && \dots (\text{式 } 11)
 \end{aligned}$$

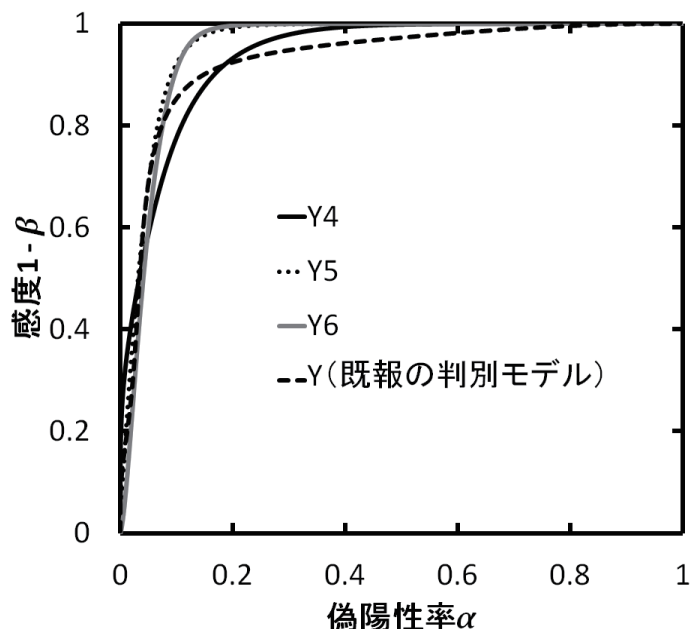


図5 Na及びKを使用しない判別モデルのROC曲線

これらの Na 及び K を使用しない判別モデルは、使用した場合と比較して判別能力が低くなるが、それでも既報の判別モデルよりは高い結果となった。

4. まとめ

本研究により、ゴボウ表面の洗浄度合いの違いによって元素濃度が変動してしまい、その影響で既報の判別モデルでは判別能力が低くなってしまうことが示された。また、再解析を行うことにより、既報よりもゴボウ表面の土壌の影響を受けにくく、かつ判別能力の高い判別モデルを複数得ることができた。本研究では既報のデータを用いた都合上、ゴボウ表面の土壌の影響を過大評価せざるを得なかったため、今後皮を除去して新たに判別モデルを構築することが強く望まれる。

5. 文献

- 1) 船木紀夫, 服部賢志, 木村康晴, 佐藤耕一, 塚田政範, 津村明宏, 佐野雅敏, 豊田正俊, 小塚健志, 門倉雅史, 法邑雄司, 無機元素分析によるゴボウの原産国判別, 日本食品科学工学会誌, **57**, 70-77 (2010)
- 2) 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)

- 3) 一色摩耶, 中村哲, 高嶋康晴, 安定同位体比分析による豚肉の産地判別法の検討, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **36**, 13-18(2012)
- 4) JCGM 100:2008, Evaluation of Measurement Data — Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, Joint Committee for Guides in Metrology (2008)
- 5) Silverman, B. W., Density Estimation for Statistics and Data Analysis, Chapman and Hall, London, pp.43-61(1986)
- 6) Zweig, M. H. and Campbell, G., Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots: A Fundamental Evaluation Tool in Clinical Medicine. *Clin. Chem.*, **39**, 561-577(1993)