

# 無機分析によるニンニクの原因国判別法の開発

門倉雅史、有山薫

Masashi KADOKURA, Kaoru ARIYAMA

## 要 約

ニンニク (*Allium sativum* L.) の鱗片を開放系にて酸分解し、試料溶液を調製した後、誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-AES) により 10元素 (Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Zn、Sr 及び Ba) また、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) により 17元素 (Li、Al、V、Co、Ni、Cu、Rb、Y、Mo、Cd、Cs、La、Nd、Sm、Gd、W 及び Tl) を定量した。

国産品 47試料、中国産品 32試料の定量値を用いて線型判別分析を行うことで構築した原因国を判別する関数は、全72試料を正しく分類した。判別関数の精度をクロスバリデーションにより確認した結果、100%の的中率となり、ニンニクの原因国表示の信憑性を無機分析により検証できる手法が確立できた。

## 1 はじめに

JAS法により生鮮農産物には原産地表示が義務付けられているが、輸入品を国産と表示する偽装が後を絶たない。原産地表示の信頼性を高め、消費者の商品選択に資するために、科学的に農産物等の原産地を判別する技術の開発が求められている。そこで、現在、国産品に対する輸入品の割合が高く、手法開発の要望の高いニンニク (*Allium sativum* L.) の原因国を無機分析により判別する技術の開発を目的とした。前報<sup>1)</sup> では Li、Cr、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、Rb、Sr、Ag、Cs、Ba、Tl、Pb 及び Th の 15元素を定量した結果、Li、Sr、Co 及び Cs が国産 - 中国産間で含有量に差があり、無機分析により原因国が判別できる可能性が示された。本研究では、精度の高い判別、その判別手法のマニュアル化を目指し、試料数、測定元素数を増やし、線型判別分析により判別関数を構築した。

## 2 実験方法

### 2.1 装置

試料の粉碎にはセラミック刃のミキサー (B-400: 日本ビュッヒ製) を用い、乾燥には恒温乾燥機 (FC-610: アドバンテック製) を用いた。誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-AES) による測定には Thermo Fisher Scientific 製 IRIS/DUO Advantage を用い、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) による測定には Agilent Technologies 製 Agilent4500 を用いた。

---

(独) 農林水産消費安全技術センター本部

## 2.2 試薬

試料の分解には、61%高純度電子工業用硝酸（関東化学製）、61%原子吸光分析用過塩素酸（関東化学製）、50%半導体用フッ化水素酸（ダイキン工業製）を使用した。ICP-AESによる定量に用いた検量線用標準溶液には、単元素標準溶液（Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Zn、Sr、Ba 各1000mg/L：関東化学製）、ICP-MSによる定量に用いた検量線用標準溶液には、混合標準溶液（XSTC-1、XSTC-13：SPEX製）、単元素標準溶液（Al、Ni、Cu、Rb、Mo、W 各1000mg/L：関東化学製）を適宜希釈して調製した。また、Inの単元素標準溶液（1000mg/L：関東化学製）を内標準元素として希釈調製し、検量線用標準溶液及び試料溶液に添加した。水は超純水製造装置（Milli-Q Element A10：日本ミリポア製）により製造した超純水（ $>18\text{M}\ \Omega\cdot\text{cm}$ ）を用いた。

## 2.3 試料

国産ニンニク試料として、都道府県の収穫量（農林水産省統計、平成16年産）を参考にできるだけシェアを反映させて、平成17年6月～18年10月にJA、JA直売所等から購入した47件を用いた（表1）。中国産ニンニクの総輸入量に対する割合は99%以上（財務省貿易統計、平成17年度）であるため、収集する外国産試料は中国産品とした。中国産ニンニク試料として、市場に流通している商品を18年1月～18年12月の間に小売店にて購入した32件を用いた（表2）。

また、（独）農林水産消費技術センター（現（独）農林水産消費安全技術センター）・本部及び7地方センターにおいて小売店から購入し、本調査研究担当者以外の者が各場所で酸分解して調製した試料溶液を、やはり本調査研究担当者以外の者が本部と神戸センターにて機器測定した試料も、構築した判別関数に適用した。これらの試料は平成17年3月上旬又は5月末～6月上旬に原産地として国内産地及び中国の表示のある商品をそれぞれ19件ずつ小売店から購入したものである。

認証標準物質として、National Institute of Standard & TechnologyのSpinach Leaves (SRM1570a) と Apple Leaves (SRM1515) を用いた。

## 2.4 試料の調製

1件あたり10個体を抽出し調製、均質化した。抽出した個体は外皮を剥がし、鱗片を取り出した。パウダーフリー手袋をはめ、鱗片の外皮を剥がし、セラミック刃包丁と樹脂製まな板を用い基部から上3～5mmまでを除去部位として切り取り、残りを分析対象部位とした。対象部位をミキサーにて粉碎し、分解及び水分測定用試料とした。

## 2.5 試料溶液の調製及び水分測定

分解用試料2gをテフロン製ヒータブルビーカーに量り取り、精秤した。酸分解は、基本的にネギ<sup>2)</sup>及びタマネギ<sup>3),4)</sup>の方法に則って行った。61%硝酸10mLを添加し、時計皿を被せ、ホットプレート上で穏やかに加熱した。褐色ガスが収まった後に61%過塩素酸2.5mL添加し、200℃まで加熱した。分解液が淡黄色になった後、ホットプレートから降ろし、50%フッ化水素酸を2mL加え約40分間加熱した。その後、時計皿を外し、分解液を乾固させた。乾固試料を1%硝酸にて溶解し、あらかじめICP-MS用内標準としてInを

5µg/L になるように添加しておいた 50mL 容ポリプロピレン製全量フラスコに移して定容し、試料溶液とした。分解は全て 3 点併行で行い、試料を加えないで同様の操作をする空試験も分解毎に 3 点併行で行った。

水分測定では、水分測定用試料約 5 g を常圧 70 °C で、重量がほぼ一定となる 28 時間乾燥する操作を、2 点併行で行った。

表 1 日本産ニンニク試料の詳細

No.	受領日 (年.月.日)	原産地	品種等
1	2005.06.10	徳島県三好郡	福地系ホワイト6片種
2	2005.06.16	徳島県三好郡	福地系ホワイト6片種
3	2005.06.20	香川県仲多度郡琴平町	中国江蘇省産太倉種
4	2005.06.20	香川県仲多度郡善通寺	中国江蘇省産太倉種
5	2005.06.20	香川県さぬき市大川町	中国江蘇省産太倉種
6	2005.06.23	鹿児島県日置市吹上	中国から取り寄せた品種の3~4作目(8~10片)
7	2005.06.28	岩手県大東町	福地系ホワイト6片種
8	2005.07.11	愛媛県新居浜市	
9	2005.07.21	岩手県玉山村	八幡平系
10	2005.07.21	岩手県玉山村	福地系ホワイト6片種
11	2005.08.04	宮城県	福地系ホワイト6片種
12	2005.08.09	山形県山形市平田	ホワイト6片種
13	2005.08.09	山形県山形市平田	ホワイト6片種
14	2005.08.16	熊本県	カテイ種
15	2005.08.16	熊本県	カテイ種
16	2005.08.19	秋田県大湯村	福地系ホワイト6片種
17	2005.08.19	秋田県大湯村	福地系ホワイト6片種
18	2005.09.01	北海道知内	
19	2005.09.05	青森県南津軽郡	福地系ホワイト6片種
20	2005.09.05	青森県三戸郡	福地系ホワイト6片種
21	2005.09.20	青森県十和田市	福地系ホワイト6片種
22	2005.09.28	青森県上北郡	福地系ホワイト6片種
23	2006.05.15	熊本県	
24	2006.05.15	熊本県熊本市西里	
25	2006.05.16	長崎県諫早市小野島町	
26	2006.06.17	青森県	
27	2006.06.19	青森県	
28	2006.06.26	高知県高岡郡四万十町	福地系ホワイト6片種
29	2006.06.26	宮崎県都城市	福地系ホワイト6片種
30	2006.06.27	宮城県石巻市	
31	2006.06.27	青森県	
32	2006.07.03	青森県	
33	2006.07.04	和歌山県	福地系ホワイト6片種
34	2006.07.04	和歌山県	
35	2006.07.04	京都府	
36	2006.07.04	京都府	
37	2006.07.10	兵庫県淡路島	
38	2006.07.10	青森県	十和田美人
39	2006.07.26	青森県田子町	田子にんにく
40	2006.07.28	香川県	
41	2006.07.28	香川県	
42	2006.07.28	香川県	
43	2006.09.14	青森県上北郡東北町	福地系ホワイト6片種
44	2006.09.14	青森県上北郡六戸町	福地系ホワイト6片種
45	2006.09.14	青森県十和田市	福地系ホワイト6片種
46	2006.10.04	群馬県	
47	2006.10.11	島根県雲南市加茂町	

表2 中国産ニンニク試料の詳細

No.	受領日 (年.月.日)	原産地	買上店の場所
1	2006.01.23	中国	埼玉県さいたま市
2	2006.01.23	中国	埼玉県さいたま市
3	2006.01.23	中国山東省	埼玉県さいたま市大宮区
4	2006.01.23	中国山東省	東京都新宿区
5	2006.01.23	中国山東省	東京都
6	2006.04.16	中国山東省済寧市金郷	埼玉県さいたま市
7	2006.04.16	中国	埼玉県さいたま市大宮区
8	2006.04.22	中国山東省金郷県	埼玉県さいたま市浦和区
9	2006.07.16	中国山東省金郷県	埼玉県さいたま市
10	2006.07.20	中国	愛知県名古屋市中村区
11	2006.07.24	中国	北海道札幌市中央区
12	2006.07.26	中国山東省金郷県	兵庫県神戸市中央区
13	2006.07.26	中国山東省金郷県	宮城県仙台市太白区
14	2006.07.27	中国山東省維坊市	神奈川県横浜市
15	2006.07.28	中国	香川県坂出市
16	2006.07.28	中国江蘇省	福岡県北九州市
17	2006.09.11	中国	埼玉県さいたま市桜区
18	2006.09.19	中国山東省	宮城県仙台市青葉区
19	2006.09.20	中国	岡山県美作市
20	2006.09.21	中国	北海道札幌市西区
21	2006.09.19	中国山東省	愛知県名古屋市中区
22	2006.09.27	中国山東省金郷県	千葉県市原市
23	2006.09.28	中国	兵庫県神戸市東灘区
24	2006.09.29	中国山東省	山口県下関市
25	2006.11.14	中国山東省	岩手県釜石市
26	2006.11.16	中国山東省金郷県魚山鎮葛村	神奈川県横浜市
27	2006.11.20	中国山東省金郷県	福井県鯖江市
28	2006.11.20	中国	福岡県北九州市
29	2006.11.20	中国	島根県松江市
30	2006.11.18	中国山東省	埼玉県さいたま市大宮区
31	2006.11.22	中国山東省	北海道砂川市
32	2006.11.29	中国	兵庫県西宮市

## 2.6 ICP-AES及びICP-MSによる測定

試料溶液はICP-AESによる検量線法でNa、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Zn、Sr及びBaの10元素を、ICP-MSによる内標準法でLi、Al、V、Co、Ni、Cu、Rb、Y、Mo、Cd、Cs、La、Nd、Sm、Gd、W及びTlの17元素を測定した。検量線用混合標準溶液として、各元素の試料溶液濃度を挟むように、高濃度、その1/10濃度及びゼロ濃度の3点を調製した。測定時には、これら混合標準を用いて検量線を作成し、相関係数が0.998以上あり、直線性が良好であることを確認してから、試料の測定を行った。ICP-AESとICP-MSの測定条件及び元素の検出限界をそれぞれ表3と表4に示す。なお、検出限界は空試験値10点の標準偏差の3倍とし、乾燥試料中濃度の検出限界に換算して表記した。

表3 ICP-AESでの測定条件と元素の検出限界

プラズマ条件		
RF パワー		1.15 kW
補助ガス		0.5 L/min
ネブライザガス		1.973 kg/cm <sup>2</sup>
プラズマガス		14 L/min
ペリポンプ回転速度		130 rpm
元素	波長(nm)	検出限界( µg/g )
Na	589.592	3
Mg	279.553	0.5
P	213.618	2
K	766.490	14
Ca	184.006	1
Mn	257.610	0.04
Fe	238.204	1
Zn	213.856	0.09
Sr	407.771	0.03
Ba	455.403	0.05

検出限界は空試験値 10点の標準偏差の3倍とし、乾燥試料中濃度に換算した。

表4 ICP-MSでの測定条件と元素の検出限界

プラズマ条件		
RF パワー		1.3 kW
補助ガス		1.00 L/min
キャリアガス		1.20 L/min
プラズマガス		14.80 L/min
ペリポンプ回転速度		6 rpm
データ採取条件		
データポイント		3点ノピーク
積分時間		0.10 秒ノ点
繰り返し数		3回
元素	m/z	検出限界( µg/g )
Li	7	0.01
Al	27	0.3
V	51	0.06
Co	59	0.01
Ni	60	0.8
Cu	63	0.2
Rb	85	0.1
Y	89	0.008
Mo	98	0.01
Cd	111	0.009
In (内標準)	115	
Cs	133	0.008
La	139	0.004
Nd	146	0.004
Sm	147	0.004
Gd	157	0.003
W	182	0.005
Tl	205	0.008

検出限界は空試験値 10点の標準偏差の3倍とし、乾燥試料中濃度に換算した。

## 2.7 統計処理

統計処理及び線型判別分析には STATISTICA Pro 06J ( スタットソフトジャパン製 ) を用いた。有意差を判定するための検定は、Welch の *t* 検定 ( 両側 ) により行った。線型判別分析ではステップワイズ法により、できるだけ少ない元素数で判別精度が高くなるように元素を絞り込み、判別関数を構築した。

## 3 結果及び考察

定量の結果、Al、V、Co、Ni、Y、Cs、La、Nd、Sm、Gd、W 及び Tl の 12元素濃度は両国産品において 1/3以上の試料で検出限界未満であった。Li については国産品のみ全試料で検出限界 ( 0.013mg/kg ) 未満であった。両国の試料において 1/3以上の試料で検出限界未満であった元素を除く 15元素の内、Li、Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Cu、Sr、Mo 及び Cd の 12元素は国産 - 中国産間で有意差が認められた (*p*値 < 0.05、表 5 ) 原産国判別に有用な元素であることが示唆された。前報では Li と Sr が判別に有用な元素であると報告されていたが、本研究でも両元素が原産国判別に有用であることが示された。また、前報では Co と Cs も有用な元素と報告されていたが、今回の研究では両元素とも検出限界未満となった。これは、検出限界の算出法が異なるためであり、空試験値を用いた今回の算出法は、装置の検出限界から求めた前報より検出限界は高く算出された。

両国の試料において 1/3以上の試料で検出限界未満であった元素を除いた 15元素を用いて線型判別分析を行い Li、Na、Mn、Cu 及び Zn の 5元素濃度から成る判別関数を構築した。これら判別関数は各元素の濃度を独立変数とする一次関数であり、未知試料の元素濃度を代入し、得られた判別関数のスコアが大きい産地を未知試料の産地と判定する。各元素の係数及び定数を表 6 に示す。この判別関数により、79試料全てが 100%正しく分類され、この判別関数の判別精度を 10-fold cross validation ( 1/10の試料のデータを除いて新たに判別モデルを構築し、除いた試料について予測する操作を 10回を行い、全試料を予測することで判別精度を得る ) により確認した結果、100%の的中率であった。このことから、ニンニク の原産国判別法として、今回構築した 5元素濃度から成る判別関数を用いた手法が確立できた。

なお、原産地として国内産地及び中国の表示のある商品をそれぞれ 19件ずつ小売店から購入し、本調査研究担当者以外の者が分析して得た定量結果を本研究で構築した判別関数に適用し、原産国を予測したところ、判別結果は全38件で表示と一致した。

本調査研究の酸分解では、一般の植物体中に普通に存在することが知られているケイ酸成分の影響を除去するためフッ化水素酸を使用して酸分解を行った。ケイ酸は一般的な酸への溶解度が低いため、ケイ酸成分が多く存在すると加熱中は溶解していても、酸分解後希酸で定容する際に溶解しきらない事がある。このような場合、Al や Fe などケイ酸と親和性が高い元素は酸分解中に取り込まれ、正確な定量値が得られないことになる。フッ化水素酸を用いれば、 $\text{SiF}_4$  として揮散させることができる。しかし、フッ化水素酸は危険な試薬であるため使用には十分な注意が必要であると共に、フッ化水素酸を処理できるシステムを備えたドラフトチャンバー内で使用する必要がある。操作の簡便・迅速化のためにも、可能であればフッ化水素酸を使用しない判別法の開発が求められる。そこで、認証標準物質 Spinach Leaves と Apple Leaves 及び国産ニンニク 1件と中国産ニンニク 1件について、それぞれ 4点併行でフッ化水素酸処理と未処理の比較を行った。判別関数を構成する Li、Na、Mn、Cu 及び Zn の 5元素については、中国産ニンニクの Zn でのみ 5%水準で有意差が認められた ( $p$ 値 = 0.027、個別のデータは示していない)。これは、フッ化水素酸処理と未処理の相対標準偏差がそれぞれ 0.48%及び 0.48%と、繰り返し精度が非常に高かったためと考えられた。ニンニク中のケイ酸含有量は Spinach Leaves 及び Apple Leaves に比べて小さいと想定されることから、この判別法はフッ化水素酸処理無しでも適用可能であると考えられた。

#### 4 まとめ

- 1) 国産試料 47件、中国産試料 32件中の 27元素を定量分析した結果、国産 - 中国産間で Li、Na、Mg、P、K、Ca、Mn、Fe、Cu、Sr、Mo 及び Cd の 12元素において有意差 ( $p$ 値 < 0.05) が認められた。
- 2) 線型判別分析を行なった結果、Li、Na、Mn、Cu 及び Zn の 5元素濃度から成る判別関数が構築できた。この判別関数により、79試料全て の原産国が正しく分類され、判別精度を 10-fold cross validation により確認した結果、100%の的中率であった。
- 3) ニンニク の原産国判別法として、5元素濃度から成る判別関数を用いた手法が確立できた。

表5 両国試料において検出限界未満であった元素を除く 15元素濃度 (  $\mu\text{g/g}$  ) の平均と Welch の  $t$  検定の結果

元素	国産 ( n=47 )	中国産 ( n=32 )	$p$ 値
Ba	1.14 $\pm$ 0.98	1.05 $\pm$ 0.35	0.215
Ca	268 $\pm$ 75	371 $\pm$ 44	0.000
Fe	16 $\pm$ 9	32 $\pm$ 9	0.000
K	13.2 $\times 10^3$ $\pm$ 1.9 $\times 10^3$	15.6 $\times 10^3$ $\pm$ 2.3 $\times 10^3$	0.000
Mg	573 $\pm$ 95	877 $\pm$ 134	0.000
Mn	5.68 $\pm$ 1.32	8.86 $\pm$ 1.23	0.000
Na	51 $\pm$ 25	270 $\pm$ 103	0.000
P	3.91 $\times 10^3$ $\pm$ 0.78 $\times 10^3$	4.27 $\times 10^3$ $\pm$ 0.48 $\times 10^3$	0.026
Sr	0.75 $\pm$ 0.39	3.22 $\pm$ 0.97	0.000
Zn	20.6 $\pm$ 9.1	19.3 $\pm$ 2.5	0.183
Li	0.00 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	0.000
Cu	2.7 $\pm$ 1.0	4.9 $\pm$ 0.7	0.000
Rb	3.7 $\pm$ 2.3	4.6 $\pm$ 2.1	0.177
Mo	0.93 $\pm$ 0.91	0.11 $\pm$ 0.04	0.000
Cd	0.088 $\pm$ 0.082	0.053 $\pm$ 0.032	0.001

測定値は乾燥重量あたり、平均値  $\pm$  標準偏差で表示

表6 判別関数の係数と定数

元素	国産品	中国産品
係数		
Li	-259.7	697.1
Na	0.03108	0.09799
Mn	4.875	8.521
Cu	4.659	8.173
Zn	-0.2245	-0.8071
定数		
	-19.42	-70.65

## 5 文 献

- 1) 法邑雄司：農林水産消費技術センター調査研究報告、No.27、37 ( 2004 )
- 2) 有山薫、堀田博、安井明美：分析化学、52、969-978 ( 2003 )
- 3) Ariyama, K., Nishida, T., Noda, T., Kadokura, M., Yasui, A., J. Agric. Food Chem., 54, 3341-3350 (2006).
- 4) Ariyama, K., Aoyama, Y., Mochizuki, T., Homura, Y., Kadokura, M., Yasui, A., J. Agric. Food Chem., 55, 347-3540 (2007).