

## 水溶性成分の一斉分析によるタマネギの原産地判別の可能性検討

渡邊 彩乃<sup>1</sup>, 寺田 昌市<sup>1</sup>, 岡崎 圭毅<sup>2</sup>

Ayano Watanabe, Shouichi Terada, Keiki Okazaki

### 要 約

国産及び外国産（中国産、米国産、ニュージーランド産）のタマネギを試料として、水溶性成分（糖・有機酸・アミノ酸など）の一斉分析による原産地判別の可能性を検討した。ガスクロマトグラフ質量分析装置（GC/MS）を用いた分析により得られた 53 成分のピーク面積の相対値を多変量解析に用いた。

主成分分析の結果、中国産の成分組成には国産とは異なる傾向があることが示唆された。国産－中国産の判別モデルの的中率は国産試料で 90.5 %、中国産試料で 86.7 % となり、いずれも 80 % 以上の的中率であった。これにより、品目や産地の組合せによっては、本手法が原産地判別の新たな指標となる可能性を示すことができた。

### 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を表示することが義務付けられている。

国産と外国産の間に価格差がある、国産と外国産の流通時期が明確に分かれていない、外国産の輸入量が多いなどの流通実態にある食品にあっては、外国産を国産と偽装表示されることが懸念されることから、科学的な原産地の判別技術が求められてきた。

農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、食品における原産地の判別技術として、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主に利用している<sup>1)-3)</sup>。これらの方法は、土壌や水等の生育環境の違いがそこで栽培された農産物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原産地判別法である。ただし、これらの技術は分析装置が高価であり、前処理が煩雑な上、品目により適否があるなどの問題点がある。このため、判別可能品目の拡大や判別確度の向上、分析の効率化・迅速化など、原産地判別技術の課題に対応するためには、新たな判別指標を見いだすことが重要である。

近年、「代謝物の網羅的解析」を意味するメタボロミクスという分析手法が著しく発展しており、基礎研究や医療分野などでの応用研究が多数報告されている。一方、メタボロミクスのターゲットである代謝物は、食品の味や色といった品質に関わる含有成分でもあることから、食品分野への応用も可能であり、実際に品質評価や貯蔵技術の向上などの目的に用いられている<sup>4)-6)</sup>。

メタボロミクスの手法による食品の原産地判別の可能性を検討した報告としては、キャベツの韓国産－中国産の判別<sup>7)</sup>やトマト濃縮果汁のイタリア産－中国産の判別<sup>8)</sup>などがある。また、

<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

<sup>2</sup> 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター

国産を対象としたものとして、生薬のトウキ<sup>9)</sup>及びセンキュウ<sup>10)</sup> (いずれも国産-中国産) についての報告がある。食品ではリンゴ<sup>11)</sup> (国産-ニュージーランド産) について報告があるが、現状では知見は多くない。

食品の含有成分の変動要因は、例えば農産物の場合には品種、生育環境 (栽培法、土壌の性質、気象条件、環境ストレス)、収穫後の環境 (貯蔵、輸送) など多様であり、これらの変動要因には、従来の原産地の判別技術における変動要因とは異なる部分もある。この変動要因の異なる部分が原産地により違う場合、原産地により成分組成に差が生じるため、メタボロミクスの手法が原産地判別の新たな指標となる可能性がある。

そこで本研究では、メタボロミクスの手法による食品の原産地判別の可能性を検討するため、多くの生物種に共通して含まれる一次代謝物である低分子の水溶性成分 (糖・有機酸・アミノ酸など) を対象として、GC/MS による一斉分析を行い、得られたデータを用いた多変量解析 (主成分分析及び判別分析) により、原産地による成分組成の違いについて検討した。

本研究では試料としてタマネギを用いることとした。タマネギについては、すでに元素分析による原産地判別法が確立されているものの<sup>12)</sup>、2015年時点で生鮮野菜の中で最も輸入量が多く<sup>13)</sup>原産地の偽装が懸念される品目であること、また元素分析の前段階での選別 (スクリーニング) や複数の分析法を組み合わせた判別などの様々な活用方法が考えられることから、本研究での検討対象とした。また、その活用方法によっては必ずしも100%に近い的中率が必要とは限らないことから、本研究での的中率の目標値を80%に設定した。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

タマネギ試料は、小売店、商社等から入手した国産21点 (北海道産11点、兵庫県産8点、佐賀県産2点)、外国産20点 (中国産15点、米国産3点、ニュージーランド産2点) を使用した。

### 2.2 水溶性成分一斉分析

#### 2.2.1 試料調製

タマネギ試料1個の上端及び基部各1cmを除去し、外皮を剥いて除去した。残りの部分を超純水で洗浄した後、縦に8等分したうちの1個を凍結させた。その後、真空凍結乾燥機により十分に乾燥させた後、粉砕機 (マルチビーズショッカー: 安井器械) で粉砕した。

#### 2.2.2 抽出・誘導体化・機器測定

抽出・誘導体化・機器測定は佐々野ら<sup>14)</sup>の方法を参考に行った。

粉砕試料約10mgを2mL容チューブに採取し、抽出溶媒 (80%アセトニトリル水溶液) 及び内部標準物質 (リビートル) を添加後に37℃で30分間攪拌した。その後、遠心分離 (20000×g、4℃、5min) を行い、上清を抽出液とした。

誘導体化は固相カートリッジ (Presh-SPE AOS: アイスティサイエンス) を用いて手動で行った。抽出液100μLを固相カートリッジに添加後、80%アセトニトリル水溶液、アセトニトリルを順に添加し、洗浄と脱水を行った。この操作により、有機酸及びアミノ酸類を固相カートリッジに保持させた。その後、アセトニトリルで20倍希釈した抽出液100μLを添加し、アセトニトリルで脱水させることで糖類を固相カートリッジに保持させた。次に、固相カートリ

ッジに 20%メトキシアミン塩酸塩ピリジン溶液 5  $\mu\text{L}$  を添加し、続いて *N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA) (GL サイエンス) 25  $\mu\text{L}$  を添加して水溶性成分をトリメチルシリル誘導体化させた。その後、固相カートリッジにヘキサンを添加して誘導体化した成分を溶出させ、測定サンプルとした。

機器測定は GC/MS (GCMS-QP2010 ultra : 島津製作所) を使用した。注入量は 1  $\mu\text{L}$  とし、導入はスプリットレスで行った。GC カラムは InertCap 5MS/NP ProGuard (35 m : GL サイエンス) を使用し、昇温条件は 80  $^{\circ}\text{C}$  で 2 min 保持後、15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で昇温、330  $^{\circ}\text{C}$  で 6 min 保持とした。マススペクトルは  $m/z$  スキャンレンジ 85-500、イベント時間 0.05 秒で記録した。保持時間の補正には *n*-アルカン標準液 (炭化水素混合試料 ヘキサン溶液 C9-C40 : GL サイエンス) を用いた。

### 2.2.3 解析

GC/MS 分析により得られた水溶性成分由来のピークは、アメリカ国立標準技術研究所 (NIST) より無料で配布されているソフトウェア AMDIS<sup>15)</sup>により同定した。また、未同定ピークのうち試料由来と考えられるもの (全ての試料で面積値の算出が可能であり、ブランクにおける面積値が一定以下のもの) についても、その後の解析に用いた。各化合物に由来するピーク面積値は、化合物ごとに適切な質量数 ( $m/z$ ) を選択し、シングルイオンクロマトグラムで算出した。得られた値は、内部標準であるリピトールの面積値で除した相対値に変換した。

### 2.3 多変量解析

主成分分析及び判別分析による判別モデル構築は、R 3.5.0 を用いて行った。判別分析は、線形カーネルのサポートベクターマシン (SVM) で行い、e1071 パッケージを使用した。解析は中村ら<sup>16)</sup>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的中率は、判別モデル構築用の試料を用いた Leave-one-out cross validation (LOOCV) により確認した。判別分析における標準不確かさは、各試料について異なる 2 日間に測定を行った計 2 回 (1 日あたり 1 回) の測定値の標準偏差を 3 倍した値を用いた。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 成分の同定

国産 21 点、外国産 20 点 (中国産 15 点、米国産 3 点、ニュージーランド産 2 点) のタマネギ試料について、固相カートリッジを用いた誘導体化後に GC/MS 分析を行った。31 成分の同定を行うとともに、未同定ピークのうち試料由来と考えられるもの 22 成分を選出し、計 53 成分をその後の解析に用いた。成分の内訳を表 1 に示す。

表1 GC/MS分析で検出した53成分の内訳

分類	アミノ酸など		有機酸など	糖など	未同定
成分数	21		5	5	22
成分名	L-アラニン	L-セリン	クエン酸	フルクトース	
	L-アスパラギン	L-トレオニン	フマル酸	グルコース	
	L-アスパラギン酸	L-トリプトファン	リンゴ酸	myo-イノシトール	
	L-グルタミン酸	L-チロシン	ピペコリン酸	ラフィノース	
	L-グルタミン	L-バリン	リン酸	スクロース	
	L-ヒスチジン	4-アミノ酪酸			
	L-イソロイシン	β-アラニン			
	L-ロイシン	グリシン			
	L-リジン	ピログルタミン酸			
	L-フェニルアラニン	スベリルグリシン			
	L-プロリン				

### 3.2 主成分分析

53成分のピーク面積の相対値を説明変数として主成分分析を行った。第1主成分と第2主成分のスコアプロットを図1に示す。第1主成分（寄与率31.8%）では国産と外国産の間の差異は見られなかった。第2主成分（寄与率11.8%）のスコアは、中国産の大部分で国産よりも低い値を示す傾向があり、中国産タマネギの成分組成には国産とは異なる傾向があることが示唆された。ただし、中国産のうち1点は国産側の高い値を示し、中国国内でのばらつきが大きい結果となった。また、米国産及びニュージーランド産は国産の範囲内のスコアであった。

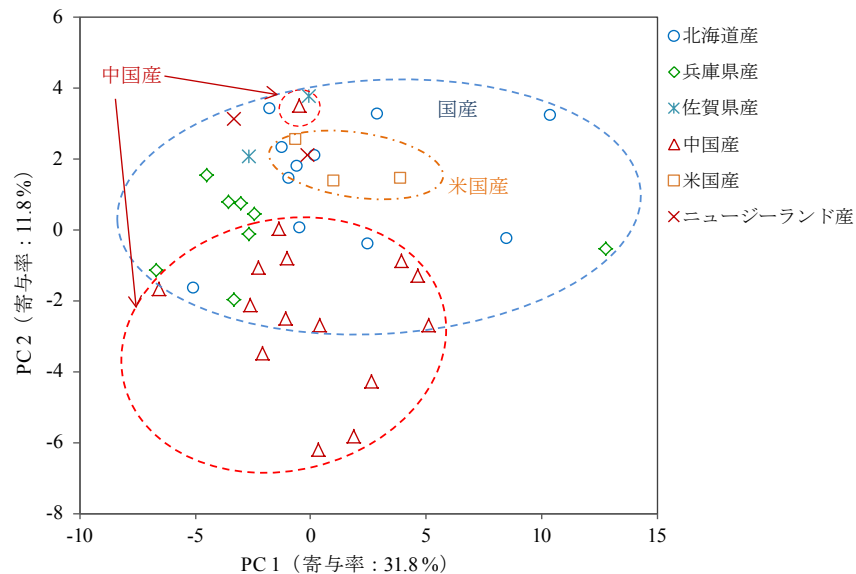


図1 主成分分析のスコアプロット  
横軸：第1主成分 縦軸：第2主成分

タマネギは、主な作型として春まき栽培と秋まき栽培があり、日本では大きく分けて北海道では春まき栽培、本州や九州などでは秋まき栽培が行われており、それぞれの作型にあった品種を生産している<sup>17)</sup>。同様に、中国国内においても地域によって作型が異なり、甘粛省では春まき栽培、山東省では秋まき栽培が主に行われている<sup>18)</sup>。そこで、中国産の第2主成分スコアのばらつきは作型の違いによるものではないかと予想した。図1のうち中国産のスコアを生産された省別（甘粛省産11点、山東省産3点、省不明1点）にプロットしたものを図2に示す。予想に反して、第2主成分スコアの最大値と最小値はともに甘粛省産であり、中国国内でのばらつきの要因は生産された省及び作型の違いによるものではなく、甘粛省内でのばらつきによ

るものであった。

一方、タマネギの保管期間に着目して、甘粛省産の試料の入手時期と第2主成分スコアとの関連を調べた結果、甘粛省産タマネギの主な収穫時期である9月～10月に入手した試料は、それ以降に入手した試料と比較して第2主成分のスコアが高い傾向があった(図2)。このことから、中国国内(甘粛省内)での成分組成のばらつきは、収穫後の貯蔵・保管の期間やその状態の違いと関連している可能性が示唆された。また、今後、本手法により生鮮野菜の産地判別の可能性を検討する際には、作型(収穫時期)や貯蔵などの生産及び流通の実態を十分に考慮して試料を入手することが重要であると考えられる。

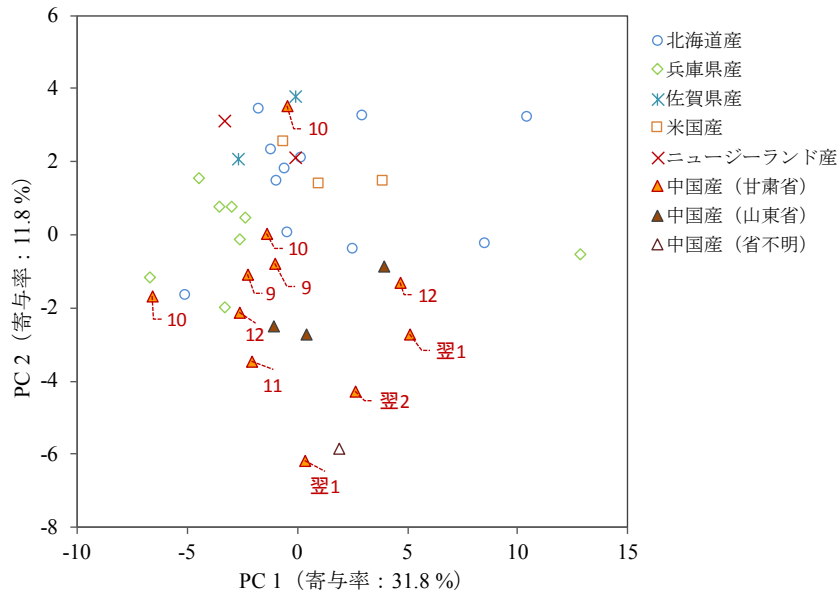


図2 主成分分析のスコアプロット(中国産の省別)

横軸：第1主成分 縦軸：第2主成分

中国産(甘粛省)に付した数字は、試料を入手した月を表す  
(数字のみの試料は2013年、「翌」が付してある試料は2014年)

### 3.3 判別分析

国産21点、外国産20点(中国産15点、米国産3点、ニュージーランド産2点)の全試料を用いて国産-外国産の判別モデルを構築した結果、最適な判別モデルとして、4成分(L-セリン、L-アスパラギン酸、4-アミノ酪酸、未同定1成分)を説明変数とする判別モデルが得られた。この判別モデルにおいて、判別得点が正の場合には国産と判別し、判別得点が負の場合には外国産と判別した場合、国産試料21点のうち19点(90.5%)を国産と正しく判別し、外国産試料20点のうち15点(75.0%)を外国産と正しく判別した。なお、外国産の誤判別(計5点)の国別の内訳は、中国産4点、ニュージーランド産1点であった。この判別モデルでは、外国産試料の的中率が80%未満となり、目標値に届かなかった。特に、2017年時点で輸入量全体の87.9%を占める<sup>19)</sup>中国産試料の的中率は73.3%(11/15)であり、中国産の誤判別が多い結果であった。

そこで、主成分分析において中国産の成分組成が国産と異なる傾向が見られたことをふまえて、外国産試料のうち米国産及びニュージーランド産の試料を除き、国産21点、中国産15点の試料を用いて国産-中国産判別モデルを構築することにより、中国産試料の的中率の向上を

試みた。その結果、最適な判別モデルとして、4成分（ピペコリン酸、L-アスパラギン酸、4-アミノ酪酸、フルクトース）を説明変数とする判別モデルが得られた。この4成分のうち、L-アスパラギン酸及び4-アミノ酪酸は国産－外国産判別モデルと共通して選択された成分であり、残りの2成分は国産－外国産判別モデルとは異なる成分であった。LOOCVにより得られた国産－中国産判別モデルの判別得点のヒストグラムを図3に示す。また、この判別モデルの説明変数として使用された4成分の箱ひげ図を図4に示す。この判別モデルにおいて、判別得点が正の場合には国産と判別し、判別得点が負の場合には中国産と判別した場合、国産試料21点のうち19点（90.5%）を国産と正しく判別し、中国産試料15点のうち13点（86.7%）を中国産と正しく判別した。なお、国産－中国産判別モデルに米国産及びニュージーランド産試料をあてはめた場合の判別得点は全5点（米国産3点、ニュージーランド産2点）で正の値となり、全試料で国産と判別された。

構築した2種類の判別モデルの的中率は、国産試料については同等であったが、外国産試料については、国産－外国産判別モデルでの的中率75.0%（15/20）に対し、外国産を中国産のみに限定した国産－中国産判別モデルでは86.7%（13/15）と向上した。以上より、判別の対象を外国産全体にするのではなく中国産のみに限定することで、国産及び中国産の両方での的中率が80%以上となり、判別の可能性が見いだされた。中国産は米国産及びニュージーランド産に比べて輸入量が非常に多いことから、外国産を中国産のみに限定しても実用性は高いと考えられる。

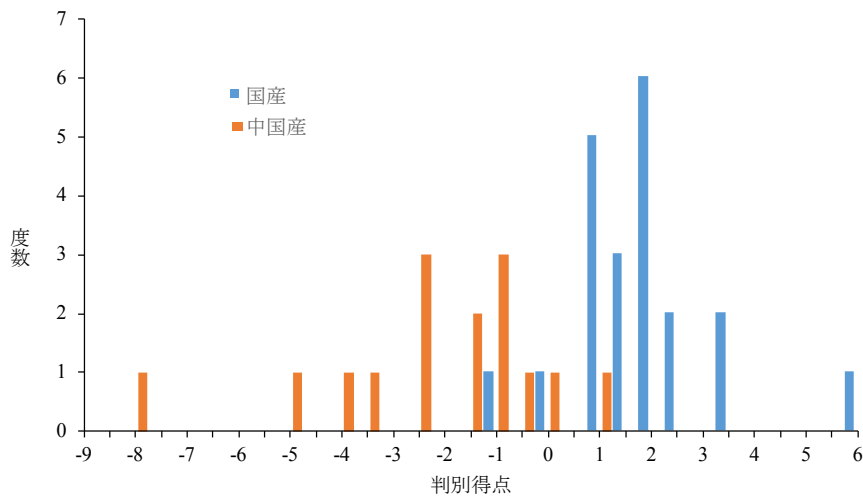


図3 国産－中国産の判別モデルの判別得点のヒストグラム

#### 4. まとめ

国産21点、外国産20点（中国産15点、米国産3点、ニュージーランド産2点）のタマネギ試料を用いて水溶性成分の一斉分析を行い、原産地判別の可能性を検討した。GC/MSの分析により得られた53成分のピーク面積の相対値を多変量解析に用いた。

主成分分析の結果、第2主成分のスコアが中国産の大部分で国産よりも低い値を示す傾向があり、中国産の成分組成には国産とは異なる傾向があることが示唆された。外国産試料を中国産に限定して構築した国産－中国産の判別モデルの的中率は、国産試料で90.5%（19/21）、中

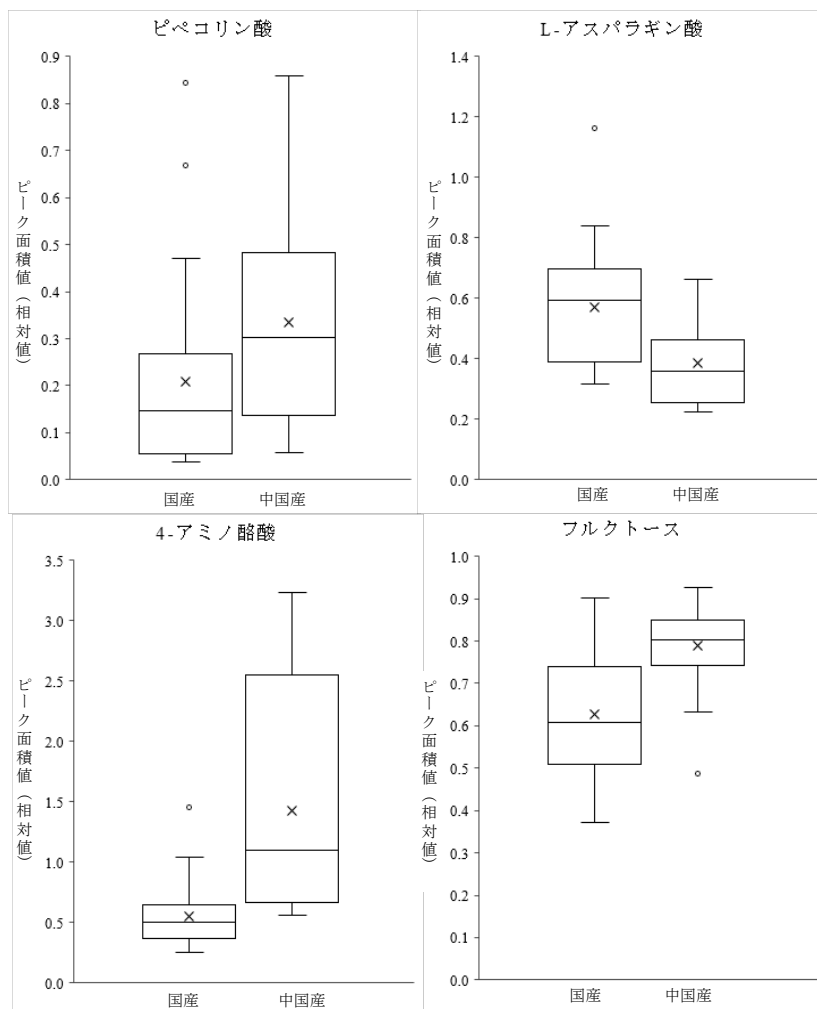


図4 国産－中国産判別モデルに使用された4成分の箱ひげ図  
 国産：n=21 中国産：n=15, 図中の×印は平均値を表す

国産試料で86.7% (13/15) となった。

これにより、品目や産地の組合せによっては、本手法が原産地判別の新たな指標となる可能性を示すことができた。今後、本手法が原産地判別のより有効な指標となる品目や産地が見いだされることに期待する。ただし、本手法の実用化に向けて確認及び改善すべき事項は、国産・外国産それぞれの中での成分組成の多様性が大きいと予想されること、産地以外の要因（一例として、試料の鮮度や保管状態など）による変動の影響があると予想されること、分析法の不確かさについて品質管理試料による補正等が必要と考えられることなど、多数あることから、これらについても慎重に検討する必要があると考えられる。

## 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(2)**,70-77 (2010)
- 2) 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)
- 3) Aoyama, K.; Nakano, T.; Shin, K. C.; Izawa, A.; Morita, S.: Variation of strontium stable isotope ratios and origins of strontium in Japanese vegetables and comparison with Chinese vegetables, *Food Chem.*, **237**,1186-1195 (2017)
  - 4) Pongsuwan, W.; Fukusaki, E.; Bamba, T.; Yonetani, T.; Yamahara, T.; Kobayashi, A.: Prediction of Japanese Green Tea Ranking by Gas Chromatography/Mass Spectrometry-Based Hydrophilic Metabolite Fingerprinting. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 231–236 (2007)
  - 5) Okazaki, K.; Kimura, Y.; Sugiyama, K.; Kami, D.; Nakamura, T.; Oka, N.: Discovering metabolic indices for early detection of squash (*Cucurbita maxima*) storage quality using GC-MS-based metabolite profiling. *Food Chem.*, **196**, 1150–1155 (2016)
  - 6) 及川 彰: メタボロミクスの農業・食品分野への応用, 化学と生物, **51**(9), 615-621 (2013)
  - 7) Kim, J.; Jung, Y.; Song, B.; Bong, Y.; Ryu, D.H.; Lee, K.; Hwang, G.: Discrimination of cabbage (*Brassica rapa ssp. pekinensis*) cultivars grown in different geographical areas using <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics. *Food Chem.*, **137**, 68–75 (2013)
  - 8) Consonni, R.; Cagliani, L. R.; Stocchero, M.; Porretta, S.: Triple Concentrated Tomato Paste: Discrimination between Italian and Chinese Products. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4506–4513 (2009)
  - 9) Kobayashi, S.; Putri, S. P.; Yamamoto, Y.; Donghyo, K.; Bamba, T.; Fukusaki, E.: Gas chromatography–mass spectrometry based metabolic profiling for the identification of discrimination markers of *Angelicae Radix* and its application to gas chromatography–flame ionization detector system. *J. Biosci. Bioeng.*, **114**(2), 232-236(2012)
  - 10) Kobayashi, S.; Nagasawa, S.; Yamamoto, Y.; Donghyo, K.; Bamba, T.; Fukusaki, E.: Metabolic profiling and identification of the genetic varieties and agricultural origin of *Cnidium officinale* and *Ligusticum chuanxiong*. *J. Biosci. Bioeng.*, **114**(1), 86-91 (2012).
  - 11) Tomita, S.; Nemoto, T.; Matsuo, Y.; Shoji, T.; Tanaka, F.; Nakagawa, H.; Ono, H.; Kikuchi, J.; Ohnishi-Kameyama, M.; Sekiyama, Y.: A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed L-rhamnitol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins. *Food Chem.*, **174**, 163-172(2015)
  - 12) 有山薫, 門倉雅史: 無機分析によるタマネギの原産国(日本ー外国)判別法の開発, 農林水産消費安全技術センター調査研究報告, **32**, 1-5 (2008)
  - 13) 野菜の生産量の推移・生鮮野菜の輸入量の推移(野菜ブック), 独立行政法人農畜産業振興機構, 2018-9-7, <<https://www.alic.go.jp/content/000138418.pdf>>
  - 14) 佐々野僚一, 大崎秀介, 古野正浩, 福崎英一郎: 固相誘導体化を用いた低濃度のアミノ酸および有機酸と高濃度の糖類を含む試料の一斉分析法の開発, つくば, 第 65 回質量分析総合討論会講演要旨集, p. 63 (2017)
  - 15) AMDIS Download Page : 2018-08-10 <<https://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/downloads/>>
  - 16) 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)
  - 17) 大西忠男, 田中静幸: 「タマネギの作業便利帳」, 一般社団法人農山漁村文化協会 (2012)
  - 18) 主要国の野菜の生産動向等(月報野菜情報 2015年6月), 独立行政法人農畜産業振興機構, 2018-10-5, <<https://vegetable.alic.go.jp/yasaijoho/kaigaijoho/1506/kaigaijoho01.html>>



19) 財務省 貿易統計