

# シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) 果汁の 真正性評価法の設定に関する研究

武曾, 歩

<http://hdl.handle.net/2324/2236348>

---

出版情報 : Kyushu University, 2018, 博士 (農学), 論文博士  
バージョン :  
権利関係 :



シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) 果汁の  
真正性評価法の設定に関する研究

武曾 歩

2019

## 目次

第1章	緒論 .....	1
第2章	カンキツ果汁摂取がヒトの精神的ストレスに及ぼす効果 .....	13
第1節	緒言 .....	13
第2節	実験材料および方法 .....	15
第1項	試験飲料 .....	15
第2項	実験方法 .....	15
第3項	データ処理および統計解析 .....	19
第3節	結果および考察 .....	20
第1項	試験飲料の栄養成分組成および有機酸量 .....	20
第2項	抗ストレス作用 .....	20
第4節	小括 .....	25
第3章	輸入冷凍濃縮オレンジ果汁を用いた真正性評価のための分析項目の選定 .....	26
第1節	緒言 .....	26
第2節	実験材料および方法 .....	27
第1項	実験材料 .....	27
第2項	実験方法 .....	28
第3項	データ処理および統計解析 .....	32
第3節	結果および考察 .....	32
第1項	色調 .....	33
第2項	糖量 .....	33
第3項	有機酸量 .....	38
第4項	フラボノイド量 .....	39
第5項	香気成分量 .....	41
第6項	多元素濃度および重元素同位体比 .....	44

第7項	主成分分析法による真正性評価 .....	47
第4節	小括 .....	51
第4章	シークワシャー果汁の真正性評価法の設定 .....	53
第1節	緒言 .....	53
第2節	実験材料および方法 .....	59
第1項	実験材料 .....	59
第2項	実験方法 .....	60
第3項	データ処理および統計解析 .....	67
第3節	結果および考察 .....	68
第1項	官能評価法による真正性評価 .....	68
第2項	クロマトグラフ法による真正性評価 .....	73
第3項	DNA マーカーによる真正性評価 .....	87
第4節	小括 .....	96
第5章	総括 .....	98
謝辞	.....	104
参考文献	.....	105

## 第1章 緒論

カンキツ類はミカン目, ミカン科(*Rutaceae*)のミカン亜科(*Aurantioideae*)に属する植物である。田中長三郎によるとミカン亜科は8連に分類され, 35属が含まれる<sup>1)</sup>。カンキツ連は4亜連と6属からなるが, 園芸学上カンキツと称しているのは, カンキツ属 (*Citrus*), キンカン属 (*Fortunella*), カラタチ属 (*Poncirus*) と, クリメニア属 (*Clymenia*) を加えた4属である<sup>2)</sup>。このうち, 食用とされているのはカンキツ属とキンカン属の一部である(表1-1)。アジア東南部を原産地とし, 世界的にはアメリカ, オセアニア, イタリア, スペイン, ブラジルなどに分布しており, 日本ではウンシュウミカンが主要な食用カンキツであり, その収穫量は2018年において約74万t/年である<sup>3)</sup>。

我が国の果実飲料の生産は, 1971年に始まる農林水産省の補助事業「果実加工需要拡大緊急対策事業」による農協系大型果汁工場の稼動, ウンシュウミカンを主体とする原料用果汁の潤沢な供給, 消費者の自然・本物志向に支えられて順調に伸び, その生産量は2017年の調査<sup>4)</sup>では1970年と比較して7.5倍増の1,800万kLに達し, 国民1人当たり年間14Lを消費していると見積もられており, 市場における果実飲料のシェアは急成長を遂げた。しかしながら, 1992年のオレンジ果汁の輸入自由化以降, 国産の冷凍濃縮ウンシュウミカン果汁と比べて低価格の冷凍濃縮オレンジ果汁の輸入, 景気の低迷, 他の飲料との競争激化, 消費者の嗜好変化などを反映して, 現在では, 果実飲料の消費は頭打ち状態となっており, 果実飲料の中でオレンジを中心としたカンキツ類果汁の消費量が最も多い。

他方, 環太平洋地域の国々による経済の自由化を目的とした多角的な経済連携協定(EPA)である環太平洋パートナーシップ協定(Trans-Pacific

表 1-1 田中の分類に基づくカンキツ分類<sup>1)</sup>

		分類区		学術名	一般名		
Citrus	Archicitrus	Papeda	Acutifolia	<i>C. macroptera</i>	カブヤオ		
		Limnellus	Eulimonellus	<i>C. latifolia</i> <i>C. limettioides</i>	夕ヒチライム スイートライム		
	Citrophorum	Citrioides			<i>C. medica</i>	シトロン	
					<i>C. limon</i>	ユレカレモン	
					<i>C. limetta</i>	スイートレモン	
			Decumanoides		<i>C. lumia</i>	ルミー	
	Cephalocitrus	Decumana			<i>C. grandis</i> <i>C. grandis</i>	ヒラドブタン シャテンユ	
			Intermedia				
			Flavicarpa		<i>C. paradisi</i> <i>C. glaberrima</i>	マーシュグレープフルーツ キヌカワ	
			Aureocarpa		<i>C. hassaku</i>	ハッサク	
		Aurantium	Medioglobosa			<i>C. natsudaikai</i>	ナツダイダイ
				Aurantioides			
				Racemosa		<i>C. aurantium</i>	サワーオレンジ
			Sinensoides		<i>C. sinensis</i> <i>C. sinensis</i>	バレンシア ネーブル	
					<i>C. iyo</i>	イヨ	
			Osmocitroides				
		Tenuicarpa		<i>C. tamurana</i>	ヒユウガナツ		
		Paranobilis		<i>C. shunkokan</i>	シュンコウカン		
	Metacitrus	Osmocitrus	Euosmocitroides		<i>C. junos</i> <i>C. sudachi</i> <i>C. sphaerocarpa</i>	ユズ スタチ カボス	
				Acrumen	Euacrumen		<i>C. nobilis</i> <i>C. unshiu</i> <i>C. yatsushiro</i>
	Microacrumen						
		Anisodora				<i>C. keraji</i> <i>C. oto</i>	ケラジ オートー
		Citroidora					
Megacarpa			<i>C. reticulata</i> <i>C. tangerina</i> <i>C. clementia</i>		ボンカン ダンシータンゼリン クレメンティン		
			<i>C. succosa</i>		ジミカン		
Microcarpa			<i>C. tachibana</i> <i>C. kinokuni</i> <i>C. sunki</i> <i>C. depressa</i> <i>C. leiocarpa</i>	タチバナ キシユウ サンキツ シークワシャー コウジ			
	Pseudofortunella			<i>C. madurensis</i>	シキキツ (カラマンシー)		
	Fortunella			<i>F. margarita</i> <i>F. crassifolia</i>	ナガミキンカン ニンボウキンカン		

Partnership; TPP) への参加によって、大部分の農産物は相手国から安価な原料をそのまま、あるいは長期保存が可能な冷凍濃縮果汁などの加工食品として輸入されるようになり、国産農産物の価格の下落が懸念されている。そのため、生産の低コスト化が困難な中山間地域など過疎化が進む地域で生産された農産物の消費は低迷が予想され、地域経済の疲弊によって地域社会そのものが立ちゆかなくなることが危惧されていることから、地域性の高い農産物にはブランド化による生き残り戦略が求められており、ユズ、スダチ、カボス、シークワシャーなどの香酸カンキツ類は、ブランド化が成功した事例として挙げられている<sup>5-7)</sup>。

消費の伸びる食品は不正表示などの食品の偽和問題と直面している。食品の偽和とは、例えば加工食品の製造工程において、安価な異種原料の混合や水増しを行い、食品の純正性（真正性）を失わせることであり、“果実飲料の偽和”は古くから知られている食品偽装である。偽和によって、消費者は表示と品質との違いにより大きな不利益を被ることになる。適切な価格で消費者あるいは実需者が得た食品や原料の真正性は商取引の大前提であるため、食品の偽和、あるいは偽装表示は、公正な食品流通を阻害する。

欧米では、果汁の偽和は一世紀以上前から認められ、行政機関も対策を講じてきてきたが、不正は後を絶たないのが現状である。果汁の偽和は当初は“水で薄める”、“糖類や酸を添加する”などの簡単な操作であったが、偽和鑑別の技術が進むに伴い、巧妙な偽和が増えている<sup>8)</sup>。

米国の偽和製品に対する法律では、食品医薬品局（FDA）の Federal Food, Drug, and Cosmetic Act Chapter IV-Food Sec 402. Title Sec. Adulterated food の中で、いずれかの項目に該当する場合には“adulterated（偽和されている）とみなす”と規定されている<sup>9)</sup>。欧州連合の規定では、欧州委員会（The European Commission）の下部機関に欧州食品安全機関（European Food Safety Authority）

があり，“一般食品法規則（General Principles and Requirements of Food Law）”を所管している．個別的には欧州各国の法律に従うが，果汁に関する横断的機関として，欧州品質管理システム（European Quality Control System; EQCS），欧州果汁協会（Association of the Industry of Juice and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union; AIJN），欧州に拠点を置く果汁の品質と安全に関わる国際的 NPO（Sure Global Fair; SGF）および国際果汁製造者連合（International Federation of Fruits Juice Producers）などがあり，相互に機能している．AIJN の「Code of Practice」と SGF の「Database of authentic samples」は，国際的によく利用されている．

我が国では，果汁の偽和問題に対して関心が薄く，取り締まりのための法整備も遅れている．偽和と判明しても，人体に危害を加えないものであれば直接罪に問われない．2001 年 1 月の外国産牛肉の産地偽装事件では，内部告発や企業の内部調査によって食品の虚偽表示や不正が判明し，連日のように社会的責任が問われたものの，最近頻発している食品偽装・偽和事件を見ても刑事訴訟まで至らないのが現状である（表 1-2）．

我が国の規定では，加工食品の表示に関する法規として，食品衛生法に基づく諸規則，日本農林規格（Japanese Agricultural Standard; JAS 規格）に基づく加工食品品質表示基準，食品表示法および内閣府令食品表示基準等がある．また，果実飲料に関する法規としては，果実飲料品質表示基準および果実飲料の日本農林規格がある．さらに，業界団体である果汁飲料公正取引協議会が自主基準として定め，公正取引委員会が認定した「果実飲料等の表示に関する公正競争規約」もある．しかしながら，多くの場合，偽和に対する法整備は遅れており，品質表示などで問題があったとしても関係機関から注意，指導ならびに警告を受けるに留まっている<sup>10,11)</sup>．香酸カンキツのひとつであるシークワシャーは健康機能効果に関する報告を受け，今日では機能性食

品素材としての展開が志向されている<sup>12)</sup>。このため、現在ではシークワシャーは全国規模で認知され、産業規模は2001年の8,000万円から2006年には約40億円に急増している<sup>13)</sup>。シークワシャー市場の好況により、数年前までは放任栽培がほとんどであったが、現在では管理栽培へと変遷し、生産量も年々増加しつつある(図1-1)。しかしながら、シークワシャー果樹は短期間での需要急増に対応することが困難であり、2001年から数年間の年間生産量は1,000t程度と横ばいであった。このため、シークワシャーおよびシークワシャー加工品への需要が急増する一方で、慢性的な原料不足となっていた。

シークワシャーに類見するカンキツとして、台湾、フィリピン、中央アメリカ、日本、中国、ハワイ、フロリダに広く分布しているカラマンシー(*Citrus madurensis* Lour.)<sup>14)</sup>がある(図1-2)。台湾やフィリピンではカラマンシーを果汁原料とする食文化<sup>15,16)</sup>がある。年間を通じて着果、収穫できることから和名で四季橘(シキキツ)と呼ばれている。形状は図1-2に示したようにキンカンにも似ているが、田中の分類<sup>1)</sup>によるとキンカン属ではなくカンキツ属後生カンキツ亜属トウキンカン区に属する(表1-1)。シークワシャーと類見するためカラマンシーの果汁が「シークワシャー果汁」と偽称され、アジア各地から沖縄に輸入されてシークワシャー果汁として販売される事態が頻出していた。シークワシャー以外の果汁を混入した偽和果汁の流通が横行したとして、2003年には公正取引員会による商品の排除命令が下されている。

一般的な食品の偽和は、通常、本物より安価な異種原料の混合や水増しによって行われる。これらの場合、真正な食品と比べて炭水化物、タンパク質、脂質などの成分組成に違いがあるため、識別は容易である。異種のタンパク質が混入している場合は、電気泳動法によって識別可能である。偽和に用い

表 1-2 食品偽装に関する報道の一例

発生年	事例
2001	外国産牛肉の産地偽装
2003	ブランド肉「飛騨牛」の偽装表示
2007	豚肉・鶏肉等の混入挽肉販売
2007	餅菓子の消費期限表示偽装
2007	産地偽装や賞味期限偽装，食べ残し再提供問題
2007	米「コシヒカリ」の産地偽装
2008	事故米不正転売
2013	大手ホテル，百貨店レストランなどのメニュー表示における，産地や食材の種類での虚偽表示・偽装表示
2014	ブランド肉「松坂牛」偽装表示

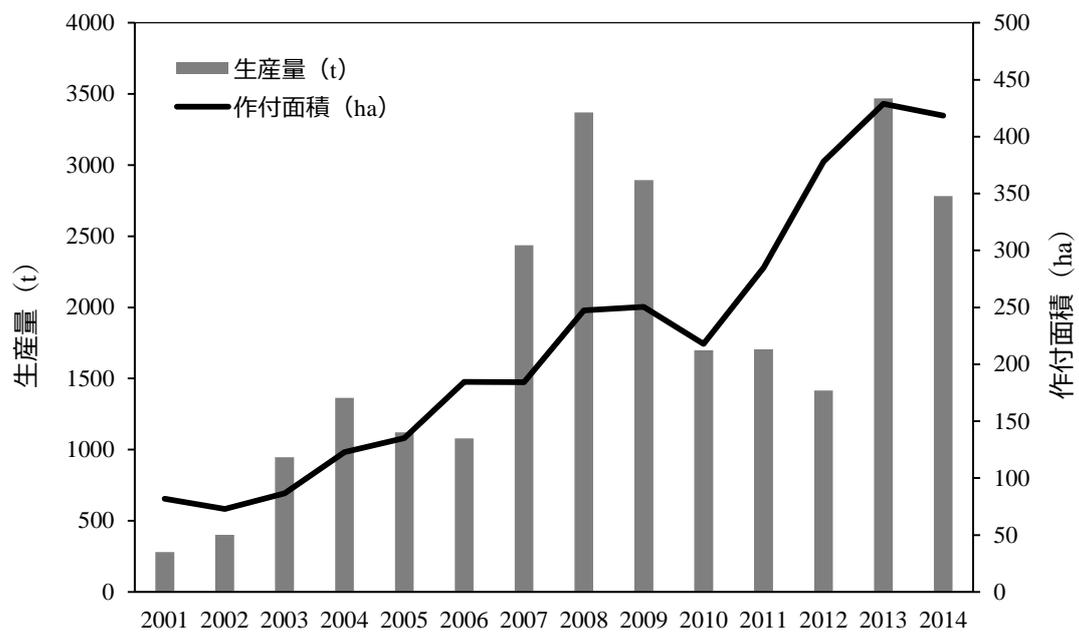


図 1-1 シークワシャー果実の生産量と作付面積の推移



図 1-2 シークワシャー果実とカラマンシー果実の外観

左, シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) 果実

右, カラマンシー (*Citrus madurensis* Lour.) 果実

た食品に特有な成分が存在する場合は、その成分を測定対象とする分析が真正性の最も決定的な確認法となる。ある成分が真正な食品には少量であり、偽和に用いる原料には多量である場合は、両者の食品中での含有範囲から偽和原料食品の混入割合が推定できる。これまでにオレンジなどのカンキツ類に関する偽和識別の方法がいくつか報告されている。Kiritらは、高速液体クロマトグラフ（HPLC）法を用いてオレンジ果汁中の有機酸類、糖類、アミノ酸類、フラボノイド類を分析し、naringin、クエン酸およびリンゴ酸がグレープフルーツ果汁、レモン果汁およびオレンジ果皮の混入による偽和を示す指標成分であることを報告している<sup>17)</sup>。また、Ježekらは、キャピラリー電気泳動法を用いて陽イオンや有機酸を分析し、D-イソクエン酸がオレンジ果汁に一定量含有されることから、真正性を示す指標成分となり得ることを報告している<sup>18)</sup>。さらに、Le Gallらは、核磁気共鳴（NMR）法を用いてオレンジ果汁中のパルプウォッシュの混入を識別する方法を提案している<sup>19)</sup>。しかしながら、果汁成分は品種、産地、収穫期、熟度などで異なるため、十分なデータベースと統計的解析法の設定が真正性評価のために不可欠となる。

他方、食品のもつ機能性を食品表示として記載できる機能性表示食品制度が施行され、当該表示食品数は年々増加している（表 1-3）。カンキツ類は、人の健康維持増進に役立つフラボノイド類、カロテノイド類ならびにテルペン類など多様な成分を含み、これらは発ガン予防研究に供されてきた。「世界ガン研究基金（WCRF）」と「米国ガン研究協会（AICR）」は2018年5月、世界各国で行われてきたガン予防に関する疫学研究報告を「食事、栄養、運動とがん：世界的展望（Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: a Global Perspective）」<sup>20)</sup>として発表しており、その中でカンキツ類の摂取は胃がんのリスクを低下させる可能性を示唆している。我が国ではカンキツ科、セン

ダン科の植物に含まれるトリテルペノイド誘導体のリモニンやノミリンなどのリモノイド成分の生理機能解明<sup>21)</sup>をはじめ、様々な研究が行われてきた。近年では、ウンシュウミカンの果皮や果肉に存在する $\beta$ -クリプトキサンチンにおいて、細胞<sup>22,23)</sup>や実験動物<sup>24)</sup>での試験によりがん予防作用や、コホート研究により骨密度低下抑制効果<sup>25)</sup>などが明らかになりつつある。また、フラボノイドの一種である nobiletin においても発がん抑制作用<sup>26-28)</sup>、炎症抑制作用<sup>29)</sup>などの機能性が報告されており、カンキツ類の中でもシークワシャーが nobiletin を高含有していることが明らかとされている<sup>30, 31)</sup>。

以上の背景を鑑み、本研究では、シークワシャー果汁の真正性評価法を設定することを目的として試験を行った。まず第2章において、カンキツ果汁摂取の有用性を訴求するため、シークワシャー果汁と同様の香気成分組成を有するユズ果汁<sup>32)</sup>を用いて精神的ストレスの緩和作用についてヒト試験を実施した。

第3章では、我が国に輸入されている冷凍濃縮オレンジ果汁の糖類、有機酸などの品質成分を分析し、海外の果汁の規格ガイドラインと比較して、輸入されているオレンジ果汁の品質評価を試みた。また、フラボノイド、香気成分、元素濃度および同位体比を分析し、それらの成分が個別に真正性を評価するための指標として用いることができるか否かを検討した。さらに多変量解析を用いることでオレンジ果汁の産地毎の特徴を明らかにし、シークワシャー果汁評価のための品質決定因子についての知見を集約した。

第4章では、シークワシャーを対象として、真正性評価のための官能ならびに品質情報を用いた偽和果汁判定に関する分析法について検討を行った。まず、官能評価による識別が可能であるかを検討するため、偽和モデル果汁を作製し、2種の官能評価を実施することで、官能評価法による識別の可能性を示した。次に、品質情報に着目して、シークワシャーには含有されない

表 1-3 機能性表示食品の一例

届出番号	届出者名	商品名	食品の区分	機能性関与成分名
A4	キュービー株式会社	ヒアロモイスチャー-240	加工食品 (サプリメント形状)	ヒアルロン酸Na
A7	株式会社ファンケル	えんきん	加工食品 (サプリメント形状)	ルテイン アスタキサンチン シアニン-3-グルコシド DHA
A38	株式会社東洋新薬	メディナチュラル	加工食品 (サプリメント形状)	サーデンペプチド (バリ ルチロシンとして)
A55	大塚製薬株式会社	ネイチャーメイド ルテイン	加工食品 (サプリメント形状)	ルテイン
A290	株式会社全日本通販	テアニン快眠粒	加工食品 (サプリメント形状)	L-テアニン
A2	キリンビバレッジ株式会社	食事の生茶	加工食品 (その他)	難消化性デキストリン
A40	株式会社伊藤園	ブルーベリー & (アンド) アサイーMix (ミックス)	加工食品 (その他)	アスタキサンチン
A47	雪印メグミルク株式会社	恵 megumi (メグミ) ガゼリ菌SP (エ スピー) 株ヨーグルト 100g	加工食品 (その他)	ガゼリ菌SP株
A69	アサヒ飲料株式会社	アサヒ めめはな茶	加工食品 (その他)	メチル化カテキン(エピガロカテキン- 3- O-(3-O-メチル)ガレートおよびガロカ テキン- 3-O-(3-O-メチル)ガレート)
A70	森永製菓株式会社	カカオフラバノールスティック	加工食品 (その他)	カカオフラバノール
A82	日清オイリオグループ株式会社	日清健康オイル アマニプラス	加工食品 (その他)	$\alpha$ -リノレン酸
A100	株式会社はくばく	大麦効果	加工食品 (その他)	大麦 $\beta$ -グルカン
A252	江崎グリコ株式会社	メンタルバランスチョコレートGABA (ギャ バ) (ミルク)スタンドパウチ	加工食品 (その他)	$\gamma$ -アミノ酪酸
B147	味の素株式会社	毎朝ヒスチジン	加工食品 (その他)	ヒスチジン
B242	株式会社Mizkan	りんご黒酢	加工食品 (その他)	酢酸
C80	不二製油株式会社	ペプチドメンテ	加工食品 (その他)	大豆由来セリルチロシン
A79	三ヶ日農業協同組合	三ヶ日みかん	生鮮食品	$\beta$ -クリプトキサンチン
A80	株式会社サラダコスモ	大豆イソフラボン子大豆もやし	生鮮食品	大豆イソフラボン
C314	マルハニチロ株式会社	よかとと 薩摩カンパチどん	生鮮食品	DHA・EPA
C385	つがる弘前農業協同組合	プライムアップル! (ふじ)	生鮮食品	リンゴ由来プロシアニン
D123	Wismettacフーズ株式会社	糖調唐辛子	生鮮食品	ルテオリン
D18	カゴメ株式会社	GABA Select (ギャバセレクト)	生鮮食品	GABA

出典： <https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc01/>

成分あるいは第 3 章で明らかにしたカンキツの品質決定因子に基づいて機器分析を行い、判別分析による評価を試みた。次いで、微量混入による偽和を識別するために、葉緑体 DNA 中の一塩基多型 (SNP) に着目し、識別用のプライマーを開発し、アレル特異的 PCR 法で DNA 配列の違いによる真正性評価について検討した。

以上、本研究によって、我が国で流通しているオレンジ果汁原料の品質成分を基にした偽和物評価に寄与する項目についての選定を行った。この結果から、最終的には真正性評価が困難とされるシークワシャーとカラマンシーについて識別方法を提案し、偽和食品に対応可能な識別法を明らかにすることが可能となった。本研究成果は、シークワシャー果汁に限定されるものではなく、他のカンキツ果汁の識別にも応用可能である。

## 第2章 カンキツ果汁摂取がヒトの精神的ストレスに及ぼす効果

### 第1節 緒言

2015年に機能性表示食品制度が施行され、食品の機能性（生体調節機能）への関心はさらに高まっている。この制度は、健康の維持および増進に役立つ機能を表示可能としたものであり、特定保健用食品（トクホ）とは異なり事業者の責任で、科学的根拠を基に商品パッケージに機能性を表示することができる。トクホは消費者庁長官による認可が必要（許可制）であり、機能性評価に臨床試験が必要であるため認可を得るまでに多くの時間と費用を要する。それに対して機能性表示食品は事業者による届出制であり、また、機能性の根拠を臨床試験あるいは最終製品または機能性関与成分に関する文献調査（システマティックレビュー）のいずれかの方法で示すことができることから、機能性表示の門戸が広がった。そのため、2015年11月までの届出件数は310件であったが、2018年11月には1,588件と3年間で約5倍にまで増加している<sup>33)</sup>。現在、カンキツに関連する機能性表示食品ではβ-クリプトキサンチンによる骨の健康<sup>34)</sup>に役立つ機能のみが表示されている。他方、カンキツの機能性と関与成分に関する研究は数多くなされており、先に述べたβ-クリプトキサンチンの他に、ポリメトキシフラボン類のひとつであるnobiletin、フラボノイドのnaringinやhesperidin、クマリン類のaurapteneなどで発がん抑制作用<sup>35)</sup>、動脈硬化抑制作用<sup>36)</sup>、脂質代謝改善作用<sup>37)</sup>、抗炎症作用<sup>26)</sup>、抗アレルギー作用<sup>38)</sup>などが報告されている。

我が国で栽培されているカンキツには生食が多いウンシュウミカンの他に、ダイダイ、ユズ、スダチ、カボス、シークワシャーなど酸味や香りを楽しむ香酸カンキツがある。これらカンキツは独特の芳香を放つ<sup>39)</sup>ものが多く、和食のアクセントなどにしばしば利用されており、その香りは経験的に

食欲増進と安らぎをもたらすと考えられている。

一方、ストレス社会と呼ばれる現代社会においてストレスを緩和する方法を見出すことは喫緊の課題である。一般にストレスは、身体的ストレスと精神的ストレスに分けられる。このうち、けがや病気などの肉体的あるいは、暑さ、寒さなどの物理的要因によって引き起こされる身体的ストレスは原因が明らかであることから対策が容易であるが、目に見えない精神的ストレスは対応が困難である。精神的ストレスは、心理面、行動面、身体面に様々な影響を及ぼし、また過度のストレスはうつ病や不安障害などの精神疾患、消化性潰瘍など重篤な疾患の引き金となる。精神疾患は、がん、脳卒中、急性心筋梗塞、糖尿病とともに厚生労働省が定める基本指針に即して都道府県が定める医療計画に記載されている 5 疾病の 1 つである。2014 年のがんの患者数は約 160 万人、脳卒中が約 104 万人、急性心筋梗塞（心疾患（約 172 万人）のうちの 1 つ）、糖尿病が約 316 万人であり、精神疾患の患者数（約 390 万人）が最も多いのが現状である<sup>40)</sup>。また、労働者健康状態調査（2012 年）では、仕事や職業生活でストレスを感じている労働者の割合が 6 割を超えている<sup>41)</sup>。

ストレスという概念を医学・生物学の領域で初めて用いたのは Cannon と Selye である<sup>42), 43)</sup>。当初、外部からの刺激をストレッサー、それに対する生体の非特異的反応をストレスと呼んでいたが、現在では両者ともストレスと呼び、厳密に区別しないことが多い<sup>44)</sup>。そのため、本研究においても外部刺激をストレス、外部刺激に対する生体反応をストレス応答（ストレス刺激を受けた後の平常状態への回復をストレス緩和）と定義して用いる。

ストレスは日常生活の中で生じることから、ストレスを緩和するための方法も日常生活へ容易に取り入れ可能なものが望ましく、ストレス緩和食品の摂取はその方策のひとつと考えられる。香酸カンキツの中で、ユズは生産量

が最も多く、認知度も高く我が国で消費が多いカンキツであり、さらにユズが放つ特有の芳香はストレス緩和効果を示すことが報告されている<sup>45)</sup>。しかしながら、ユズ果汁を摂取することで同様の効果を得ることができるか不明である。そこで、本章ではカンキツ摂取の有用性を明らかにすることを目的として、ユズ果汁を含む飲料についてストレス緩和効果を検証するヒト試験を実施した。

## 第2節 実験材料および方法

### 第1項 試験飲料

試験飲料としてリンゴ酢（㈱ミツカン製、リンゴ酢、栄養成分値 100 g あたり；エネルギー、27 kcal；タンパク質、0 g；脂質、0 g；炭水化物、7.9 g；ナトリウム、2 mg）を主体とし、ユズ果汁（山口食品工業㈱製、供与品）を 10%（w/w）およびハチミツ（熊手蜂蜜㈱製、供与品）を 30%（w/w）混合したユズ果汁含有飲料を用いた。本品を蒸留水で 5 倍希釈したものを試験飲料とした。試料の提供量は 100 mL、提供温度は 10°C とした。また、対照として蒸留水を用いた。

### 第2項 実験方法

#### 1. 一般成分の分析

試験飲料のエネルギー量、タンパク質量、脂質量、炭水化物量、ナトリウム量を測定した。タンパク質量、脂質量およびナトリウム量は日本食品標準成分表 2015 年版（七訂）の一般成分分析法に準じて行った<sup>46)</sup>。エネルギー量はタンパク質量および炭水化物量にそれぞれ 4 kcal/g を乗じて、炭水化物量は差引き法により算出した。

## 2. 有機酸量の測定

試験飲料の原液を超純水で 150 倍希釈し、メンブランフィルター（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ，セルロースアセテート，Advantec 東洋(株)製）でろ過し、イオンクロマトグラフ分析（DX-500，Thermo Fisher Scientific(株)製）に供した。分離カラムは IonPac AS19（250 mm  $\times$  4 mm I.D.，Thermo Fisher Scientific(株)製），ガードカラムは IonPac AG19（50 mm  $\times$  4 mm I.D.，Thermo Fisher Scientific(株)製），サプレッサは ASRS-ULTRA II（リサイクルモード，232 mA）を用い、カラム温度は 35°C，検出器は電気伝導度検出器（ED50，Thermo Fisher Scientific(株)製），移動相 A は超純水，移動相 B は 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液，流速は 1.0 mL/min とした。グラジエント条件は B 液濃度を 9 $\rightarrow$ 50%（0 $\sim$ 30 分），50%（30 $\sim$ 35 分）とした。定性は標準溶液（20 mg/mL）の保持時間との照合で行い，定量は標準溶液のピーク面積との比較により算出した。

## 3. 酸度の測定

フェノールフタレイン溶液を指示薬として，0.1 M 水酸化ナトリウム溶液で滴定し，酢酸換算で求めた。

## 4. 精神的ストレス負荷試験

### (1) 被験者

被験者は，健康な女子学生 16 名（平均年齢  $22 \pm 1$  歳，身長  $157.2 \pm 3.1$  cm，体重  $50.1 \pm 3.3$  kg）を対象とした。なお，中村学園大学倫理審査委員会の承認（倫理-11-009）およびヘルシンキ宣言に則りインフォームドコンセントを得た。

## (2) 試験スケジュール

試験飲料を毎日 200 mL ずつ（朝晩各 100 mL）3 週間連続摂取し，最初に摂取した日から 22 日目（3 週間後）にストレス負荷試験を実施した．さらにウォッシュアウト期間を設け，3 週間後に蒸留水を用いたストレス負荷試験を行った．被験者のうち半数は逆の順序で評価を行った．ストレス負荷試験は午前 9 時および午後 1 時の計 2 回実施した．なお，被験者が女性であるためストレス負荷試験の実施日は月経期間を除くようにスケジュールを設定した．

## (3) プロトコール

ストレス負荷試験のプロトコールを図 2-1 に示す．試験当日の食事は，ストレス負荷開始 2 時間前とした．被験者は試験室にて心拍変動計および脳波計の測定装置を装着して，15 分間の安静後，試験飲料または蒸留水を摂取し，さらに 30 分間安静にした．その後，精神的ストレス負荷として新ストループ検査 II（株トーヨーフィジカル製）を 4 分間，続いて内田クレペリン検査（株日本・精神技術研究所製）を 15 分間実施することで単純作業を負荷した．精神的ストレス負荷後，60 分間安静を保った．ストレス指標は，安静 15 分後（測定 1），試料摂取 30 分後（測定 2），精神的ストレス負荷直後（測定 3），ストレス負荷 30 分後（測定 4）およびストレス負荷 60 分後（測定 5）の計 5 回測定した．なお，試験は被験者に対する聴覚および室内温度等の影響を避けるため静かな実験室（室温  $25.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ，相対湿度  $48.6 \pm 2.0\%$ ）にて実施した．

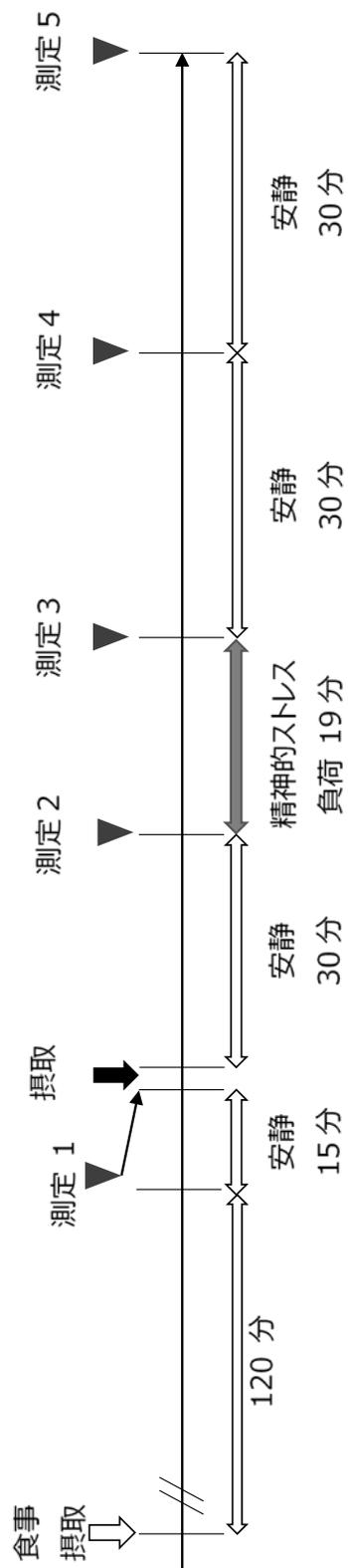


図 2-1 ストレス負荷試験プロトコール

## 5. ストレス評価指標の測定

### (1) 心拍変動

心拍変動は、Memcalc / Bonaly Light (株)GMS 製) を用いて、0.04～0.15 Hz の低周波数 (LF; Low Frequency) および 0.15～0.4 Hz の高周波数 (HF; High Frequency) を計測し、解析した。HF は副交感神経の活動指標、LF と HF の比 (LF / HF 比) は交感神経の活動指標<sup>47)</sup> として用いた。

### (2) 脳波

脳波は Brain Pro FM-929 (フューテックエレクトロニクス(株)製) を用い、前額にセンサーバンドを装着して測定した。測定部位は、国際電極配置法 (10/20 法) に基づく前頭極 (Fp1) であり、耳朶の不関電極による単極誘導法<sup>48)</sup> を用いた。8～13 Hz の脳波を  $\alpha$  波、13～30 Hz を  $\beta$  波として計測した。また、得られた計測値から  $\alpha$  波と  $\beta$  波の比 ( $\alpha/\beta$  比) を算出し、ストレス緩和の指標として用いた。

## 第3項 データ処理および統計解析

測定結果は、各測定時 (測定 2～5) の値から安静時 (測定 1) の値を引いた値 (変化量) を算出し、変化量の平均値  $\pm$  標準誤差で示した。統計解析は、SPSS statistics ver. 22.0 (IBM(株)製) を用い、対照群との平均値の差の比較は t 検定、各群内の経時的な変化は一元配置分散分析法を用いて解析した。一元配置分散分析で有意差 ( $p < 0.05$ ) が確認された場合、各群内での平均値の差の比較を Tukey 法で検定し、 $p < 0.05$  で有意差ありとした。

### 第3節 結果および考察

#### 第1項 試験飲料の栄養成分組成および有機酸量

試験飲料の栄養成分組成および有機酸量を表 2-1 に示す。試験飲料 100 mL あたり、エネルギー 33.2 kcal、タンパク質 80 mg、炭水化物 8.2 g、ナトリウム 3.2 mg、酢酸 213 mg、クエン酸 111 mg、リンゴ酸 12 mg であり、滴定酸度は 0.48% であった。試験飲料中のクエン酸は原料中のユズ果汁由来<sup>49)</sup>、<sup>50)</sup> であると考えられた。

#### 第2項 抗ストレス作用

##### 1. 心拍変動

LF/HF 比は交感神経活動の指標であり、LF/HF 値が高いほどストレスを感じている状態と評価される。LF/HF 比は試験飲料摂取群と対照群の間で有意差は認められなかったものの、試験期間を通して 1/2 程度の値を示した(図 2-2)。一方、HF 値は副交感神経活動の指標であり、HF 値が高いほどストレス緩和状態であると評価される。試験期間中、試験飲料摂取群では対照群よりも高い HF 値を示した。また、試験飲料摂取群において、ストレス負荷直後までは変化がみられなかったが、ストレス負荷 60 分後(測定 5)において、試験飲料摂取前、試験飲料摂取 30 分後およびストレス負荷直後と比較して有意に高い HF 値を示し、副交感神経活動の亢進が示唆された(図 2-2)。Matsumoto らの報告<sup>45)</sup>によると、女性の被験者にユズ精油の香気を嗅がせ、月経周期毎の自律神経活動の変化および精神状態を、感情・気分を評価する際に用いられている気分プロフィール検査(Profile of Mood States; POMS)を使用して調査し、ユズ香気を嗅ぐことによる副交感神経活動の亢進および不安や疲労などネガティブな感情スコアの減少を報告している。

表 2-1 試験飲料の栄養成分組成および有機酸量

成分	100 mLあたり
エネルギー (kcal)	33.2
タンパク質 (mg)	80
脂質 (mg)	0
炭水化物 (g)	8.2
ナトリウム (mg)	3.2
酢酸 (mg)	213
クエン酸 (mg)	111
リンゴ酸 (mg)	12
酸度 (%)	0.48

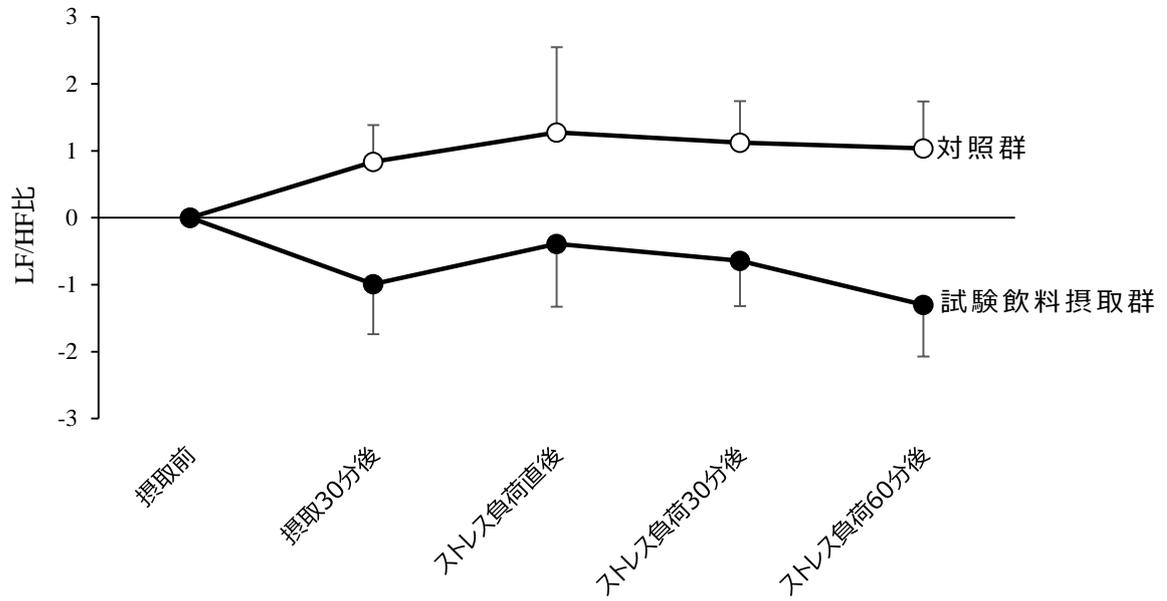
そのため、本研究で得られた心拍変動を指標にしたストレス緩和効果は、ユズ香気による副交感神経活動の挙動変化と同様であったことから、ユズ果汁の摂取による口中香でも果汁中の香気成分により同等の効果があったと推察された。

## 2. 脳波

$\alpha/\beta$  比は、試験飲料摂取群ではストレス負荷直後から正の値となり、ストレス負荷 30 分後に対照群と比較して有意に高い値を示した (図 2-3)。一方対照群では摂取前と比較して  $\alpha/\beta$  比が低下する傾向が認められた。また  $\alpha/\beta$  比は、試験飲料摂取により  $\alpha$  波が強くと現れたことを示している。 $\alpha$  波はリラックスした状態で出現し、 $\beta$  波は内的に不安定かつ、外的刺激に注意している時に出現することが報告されている<sup>51, 52)</sup>。このため、値が高いほどストレスが緩和されていると評価されている。本研究においても試験飲料摂取時に  $\alpha$  波が増加する傾向が認められ、ユズ果汁の摂取はストレス緩和効果を発現すると推察された。

以上のように、ユズやシークワシャーなどの日本固有の香酸カンキツ類は、抗ストレス効果が期待できることが判明した。しかしながら、これら香酸カンキツ類は偽和問題が大いに懸念されることから、次章以降は、ユズと同様の香気成分を含み、果汁の健康機能が期待されるシークワシャーについての真正性評価法の設定に関して検討を行った。

LF/HF 比



HF

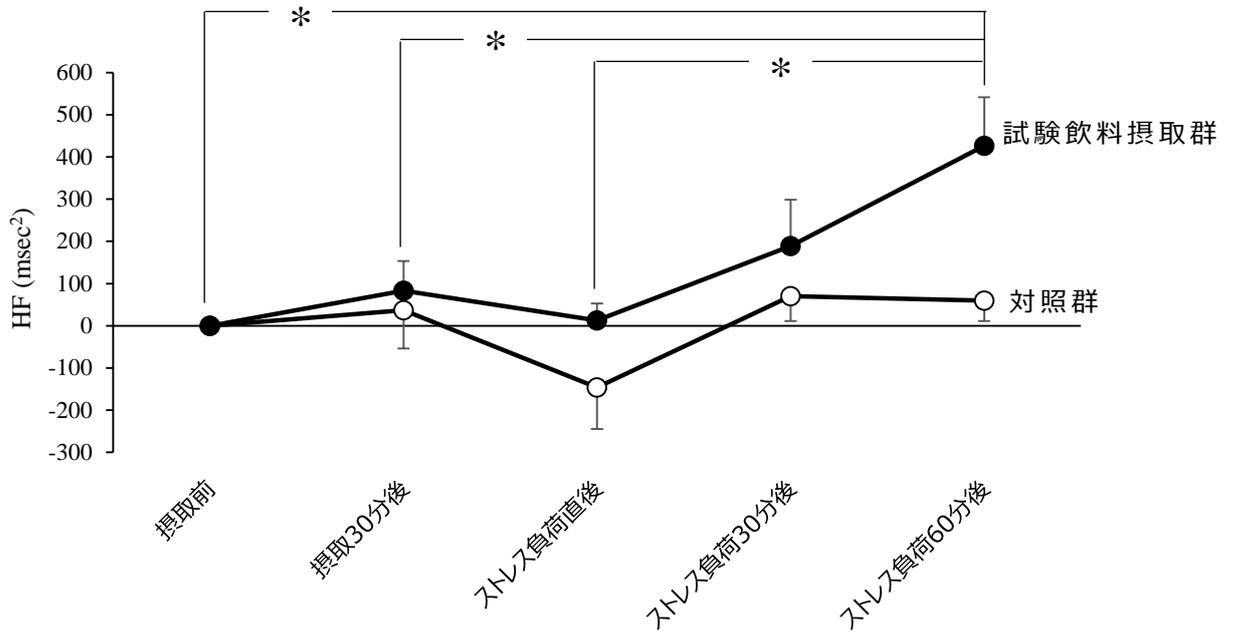


図 2-2 試験飲料摂取による心拍変動の変化

\* $p < 0.05$  vs. ストレス負荷 60 分後 (n=16, Tukey 法)

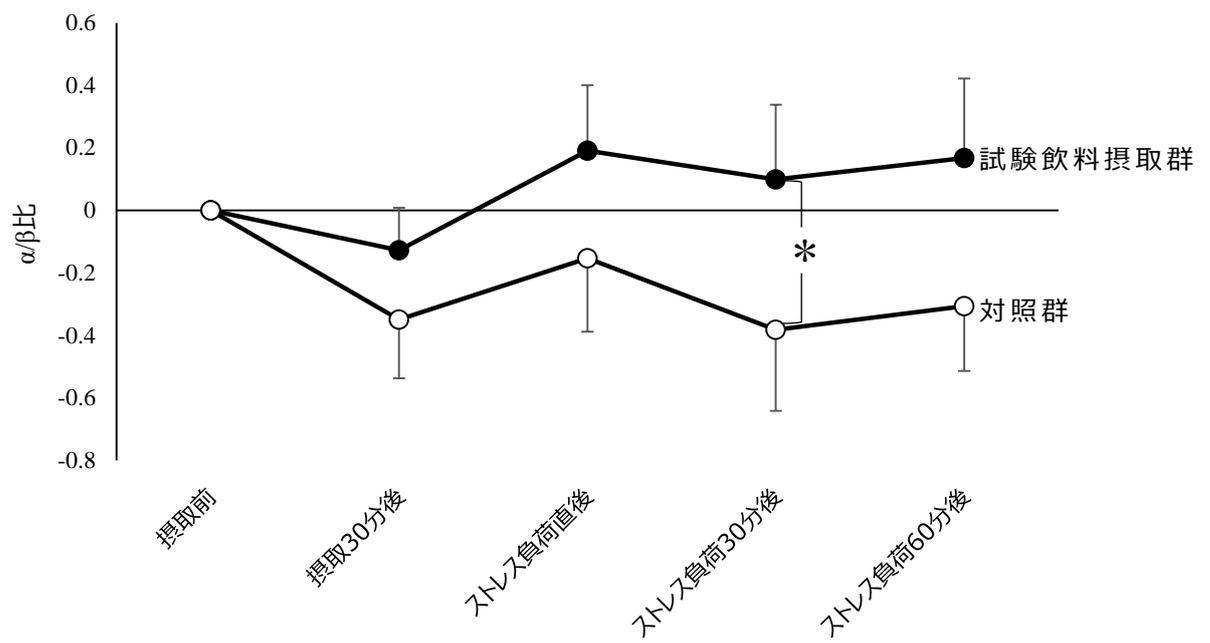


図 2-3 試験飲料摂取による脳波 (α/β 比) の変化

\* $p < 0.05$  vs. 対照群 (n = 16, t 検定)

#### 第4節 小括

The effect of consuming an apple vinegar beverage containing yuzu juice on psychological stress was investigated in 16 healthy female university students ( $22 \pm 1$  years old). Participants ingested either 100 mL of the beverage or a control drink twice a day for 3 weeks. Changes in the psychological stress indices of the group that consumed the beverage were compared against those of the control group. Heart rate variability measurements and electroencephalography were used to determine participants' psychological stress indices. Parasympathetic nerve activity index, and alpha/beta ratio of those in the beverage group were significantly higher than those in the control group. In conclusion, the ingestion of the beverage containing yuzu juice demonstrated a psychological stress-reducing effect.

### 第3章 輸入冷凍濃縮オレンジ果汁を用いた真正性評価のための分析 項目の選定

#### 第1節 緒言

オレンジ類 (*Citrus sinensis*) は、ミカン科ミカン属の常緑小高木になる果実で、*C. aurantium* に属しており、スイートオレンジ、サワーオレンジ、マンダリンオレンジに大別される。オレンジ類は国内で最も消費されている果汁のひとつであり<sup>4)</sup>、スイートオレンジのうち普通オレンジに属するカンキツの果汁が頻用されている。スイートオレンジの品種には、普通オレンジに加えてネーブルオレンジとブラッドオレンジがある。国内で栽培されているオレンジの大部分はネーブルオレンジであり、現在、日本市場で流通しているオレンジ果汁の90%以上は輸入品である。主な輸入先は、ブラジル、メキシコ、イスラエルなどであり<sup>53)</sup>、オレンジ果実そのものよりも輸送コストおよび保存性の観点から冷凍濃縮した状態 (Frozen concentrated orange juice; FCOJ) で輸入されることが多い。関税法によって、オレンジ果汁は濃縮果汁全重量中のショ糖含量が10%以上の場合には25.5%の関税率 (WTO 協定関税率) が課せられ、10%以下では21.3%の関税率となる。すなわち、濃縮果汁全重量中のショ糖含量が多いほど関税率が高くなるように定められている。したがって、ショ糖含量の低い果汁の輸入量が増加しているが、JAS規格では砂糖 (ショ糖) 類、蜂蜜等の添加が認められているため、果汁には本来含有されていない成分が混入され、真正性が疑われるケースがある<sup>8)</sup>。しかしながら、JAS規格では糖用屈折計示度などの規格が存在するのみで真正性を評価する項目はない<sup>54)</sup>。一方、欧州では果汁の消費量が増加するに伴い、果汁に安価な糖や酸を混入する果汁偽和の問題が多数発生している<sup>55)</sup>。そこで、果汁の真正性を確保するため、欧州連合では AIJN<sup>56)</sup>や SGF<sup>57)</sup>が真

正果汁の成分含量の範囲を示した規格やデータベースを作成している。AIJN の定める果汁ガイドライン<sup>56)</sup>は主に欧州で広く用いられており、糖類や有機酸ならびにミネラル成分など 50 成分以上についての上限値と下限値が詳細に設定されている。

これまでの研究により、オレンジ果汁については、糖や有機酸の含量が嗜好性と関連することが報告されている<sup>58)</sup>。また、原料であるオレンジの品種によりフラボノイドや香気成分の種類と量比が異なること<sup>59, 60)</sup>が報告されており、オレンジ果汁の品質決定因子となっている。しかしながら、我が国に輸入されている濃縮オレンジ果汁について品質成分に関する詳細な検討はなされておらず、産地による濃縮オレンジ果汁の品質決定成分の違いについては不明であった。そこで本章では、果汁の真正性評価のために有用な因子を明らかにすることを目的として、産地の異なる濃縮オレンジ果汁を用いて品質成分を分析した。特に、色調、糖、有機酸、フラボノイドおよび香気成分を品質に関連する項目・対象成分に選択するとともに、産地判別法に活用されている元素濃度および重元素同位体比についても検討を行った。

## 第2節 実験材料および方法

### 第1項 実験材料

冷凍濃縮オレンジ果汁は一般社団法人日本果汁協会より入手した。試料の内訳はブラジル産 16 種類、アメリカ合衆国産 8 種類、メキシコ産 4 種類、ベリーズ産 4 種類、イスラエル産 4 種類の合計 36 種類である。試料は-80℃で保存し、測定時には AIJN の果汁ガイドライン<sup>56)</sup>に準拠して、糖用屈折計示度が 11.2°Brix となるように蒸留水で希釈した。

## 第2項 実験方法

### 1. 色調測定

オレンジ果汁の色調は、測色式差計（Color meter ZE6000, 日本電色工業(株)製）で反射式により測定し、 $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ 値を求めた<sup>61)</sup>。

### 2. グルコース、フルクトースおよびスクロース量の測定

オレンジ果汁 5.0 mL に精製水 30 mL を加え、0.1% (w/v) 水酸化ナトリウム溶液で pH 6.8 に調整した。次いで 30 分間超音波処理（出力；200 W，発振周波数；39 kHz，UT-204，シャープ(株)製）した後に 50 mL に定容し、試料溶液とした。試料溶液 0.75 mL に等量のアセトニトリルを混合し、シリンジフィルター（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ，セルロースアセテート，Advantec 東洋(株)製）でろ過した後に、高速液体クロマトグラフ（HPLC）分析に供した。装置は Prominence LC-20(株島津製作所製)，検出器は示差屈折率検出器(RID-10A，株島津製作所製)を用いた。カラムは Shodex Asahipak NH2P-50 4E（250 × 4.6 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ，昭和電工(株)製）用い，カラム温度は 40°C，移動相は 75% (v/v)アセトニトリル，流速は 1.0 mL/min とした。定性は標準溶液(10 mg/mL)の保持時間との照合で行い，定量は標準溶液のピーク面積との比較により行った。

### 3. クエン酸およびリンゴ酸量の測定

オレンジ果汁 2.0 mL を遠心分離（3,300×g, 5 min, CFM-1300, AGC テクノグラス(株)製）し，上清をシリンジフィルター（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ，セルロースアセテート，Advantec 東洋(株)製）でろ過した後，HPLC 分析に供した。装置は LC-10ADvp (株島津製作所製)，検出器は紫外 (UV) 検出器 (SPD-10AVvp, 株島津製作所製) を用いた。カラムは LiChrospher 100RP-18（250 × 4.0 mm

I.D., 5  $\mu\text{m}$ , Merck(株製) を用い, カラム温度は 35°C, 検出波長は 210 nm, 移動相は 0.2% (w/v) メタリン酸溶液, 流速は 1.0 mL/min とした. 定性は標準溶液 (20 mg/mL) の保持時間との照合で行い, 定量は標準溶液のピーク面積との比較により行った.

#### 4. イソクエン酸量の測定

前述のクエン酸およびリンゴ酸量の測定と同様の方法で調製した試料をイオンクロマトグラフ分析に供した. 装置は DX-500(Thermo Fisher Scientific(株製)), サプレッサは ASRS-ULTRA II (リサイクルモード, 232 mA), 検出器は電気伝導度検出器 (ED50, Thermo Fisher Scientific(株製)) を用いた. 分離カラムは IonPacAS11-HC (250 mm  $\times$  4.0 mm I.D., Thermo Fisher Scientific(株製)), ガードカラムは IonPacAG11-HC (50 mm  $\times$  4.0 mm I.D., Thermo Fisher Scientific(株製)) を用い, カラム温度は 35°C, 移動相 A は超純水, 移動相 B は 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液, 流速は 1.5 mL/min とした. グラジエント条件は B 液濃度を 1% (0~8 分), 1 $\rightarrow$ 25% (8~28 分), 25 $\rightarrow$ 60% (28~38 分) とした. 定性は標準溶液 (20 mg/mL) の保持時間との照合で行い, 定量は標準溶液のピーク面積との比較により行った.

#### 5. 総アスコルビン酸量の測定

総アスコルビン酸量の測定は Sawamura らの方法<sup>62)</sup>に準じて行った. まず, オレンジ果汁 2.0 mL を遠心分離 (5,000 $\times$ g, 5 min, CFM-1300, AGC テクノグラス(株製)) し上清を得た. 上清 300  $\mu\text{L}$  にエタノール 600  $\mu\text{L}$  および 8% (w/v) メタリン酸溶液 300  $\mu\text{L}$  を加えて混合した後, 遠心分離 (1,800 $\times$ g, 15 min, テーブルトップ遠心機 4000, 久保田商事(株製)) を行い, 回収した上清 500  $\mu\text{L}$  に 0.3 M リン酸三ナトリウム溶液 100  $\mu\text{L}$  および 1.2% (w/v) 水硫化

ナトリウム溶液 100  $\mu$ L を混合した。混合液を 35°C で 20 分間加温した後、8% (w/v) メタリン酸溶液 300  $\mu$ L を添加して HPLC 分析に供した。装置は LC-10Avp (株島津製作所製)、検出器は UV 検出器を用いた。カラムは LiChrospher 100RP-18 (250  $\times$  4.0 mm I.D., 5  $\mu$ m, Merck(株製)) を用い、カラム温度は 40°C、検出波長は 243 nm、移動相は 0.2% (w/v) メタリン酸溶液、流速は 0.76 mL/min とした。定性は標準溶液 (10 mg/mL) の保持時間との照合で行い、定量は標準溶液のピーク面積との比較により行った。

## 6. フラボノイド量の測定

フラボノイド量の測定は Nogata らの方法<sup>63)</sup>に準じて行った。オレンジ果汁 6.0 mL を遠心分離 (4,670 $\times$ g, 5 min, テーブルトップ遠心機 4000, 久保田商事(株製)) し、上清を回収した。回収した上清を Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジ (日本ウォーターズ(株製)) に負荷し、10% (v/v) メタノールで洗浄後、メタノール : DMSO (1 : 1) 混合液 4.8 mL で溶出して 5.0 mL に定容後、HPLC 分析に供した。装置は LC-10ADvp (株島津製作所製)、検出器はフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 (SPD-M10Avp, 株島津製作所製) を用いた。カラムは LiChrospher 100RP-18 (250  $\times$  4.0 mm I.D., 5  $\mu$ m, Merck(株製)) を用い、カラム温度は 40°C、検出波長は 340 nm、移動相 A は 0.01 M リン酸溶液、溶離液 B はメタノール、流速は 0.6 mL/min とした。グラジエント条件は、B 液濃度を 30 $\rightarrow$ 45% (0 $\sim$ 55 分), 45 $\rightarrow$ 100% (55 $\sim$ 95 分), 100% (95 $\sim$ 100 分) とした。定性は標準溶液 (10 mg/mL) の保持時間との照合で行い、定量は標準溶液のピークの高さとの比較により行った。

## 7. 香気成分の測定

固相マイクロ抽出 (SPME) -ガスクロマトグラフ (GC) 法で分析した。オレンジ果汁 1.0 mL をクリンバイアル瓶に移した後、内部標準として 1% (v/v) シクロヘキサノール 10  $\mu$ L を添加し、40°C で 5 分間加温した。ヘッドスペースガス部にファイバー (Carboxen-PDMS 75  $\mu$ m タイプ, シグマアルドリッジジャパン製) を挿入し、20 分間揮発性成分を吸着させた。ファイバーに吸着した成分は 260°C に加熱したインサート部分で 10 分間脱離させた後、クライオフォーカシング GC 分析に供した。装置は、GC-14A (株島津製作所製)、検出器は水素炎イオン化検出器 (FID) を用いた。カラムは DB-WAX (60 m  $\times$  0.25 mm I.D., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent Technology(株)製)、カラム温度は 40~230°C まで 3°C/min で昇温し、230°C で 10 分間保持した。注入法はスプリットレス注入、キャリアーガスはヘリウム、流速は 1.0 mL/min とした。内標準であるシクロヘキサノール (終濃度; 1 mg/L) とのピーク面積比により成分量を求めた。成分同定は GC-質量分析 (MS) 法により行った。装置は、Varian 3400GC (株Varian 製) にイオントラップ方式の質量分析計 (Model 800, Finnigan MAT(株)製) を装着したものをを用いた。分析は SPME-GC 法と同様の条件で行った。

イオン化は電子イオン化 (Electron Ionization, EI) 法およびイソブタンによる化学イオン化 (Chemical Ionization, CI) 法を用いて行い、ピーク面積百分率は、Full Scan モード (26~300 amu/s) でのトータルイオンカウントから求めた。成分の同定は、ライブラリーサーチシステム (MAGNUM ライブラリーサーチシステム, NIST MASS SPECTRA DATABASE; 62, 235 化合物収載) による検索と Retention index (RI) 値<sup>64)</sup>から物質を推定し、標準物質との RI 値およびマススペクトルの一致もしくは RI 値の一致により行った。

## 8. 多元素濃度と重元素同位体比の測定

オレンジ果汁 20 mL に 70% (v/v) 硝酸を 10 mL および 30% (v/v) 過酸化水素水を 1 mL 添加し、120°C で酸分解した。

多元素濃度および重元素同位体比の測定は、有山らの方法<sup>65)</sup>に従って行った。すなわち、分解液 50  $\mu$ L を 1% (v/v) 硝酸で 40 倍希釈し、高分解能型誘導結合型プラズマ質量分析 (HR-ICP-MS) に供した。装置は Element 2 HR-ICP-MS (Thermo Fisher Scientific(株)製) を用い、以下の条件で測定した。Rf パワー, 1200–1300; サンプルガス流速, 1.00–1.02 L/min; 補助ガス流速, 0.97–1.02 L/min; 冷却ガス流速, 16 L/min。定量はイットリウム (Y) を標準元素とした内標準法により行った。なお、元素はナトリウム (Na), アルミニウム (Al), 鉄 (Fe), コバルト (Co), ニッケル (Ni), 銅 (Cu), 亜鉛 (Zn), ルビジウム (Rb), ストロンチウム (Sr), モリブデン (Mo) およびバリウム (Ba) の 11 元素を、同位体比は Sr ( $^{87}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Sr}$ ) および鉛 (Pb) ( $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  および  $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ ) を分析した。

## 第3項 データ処理および統計解析

各測定データは平均値  $\pm$  標準偏差 (SD) で示した。得られた結果は、SPSS ver. 22.0 (IBM(株)製) を用いて、多変量解析のうち相関行列を用いた主成分分析により解析した。

## 第3節 結果および考察

シークワシャー果汁の真正性を評価する方法を設定するために、まず 36 種類のオレンジ果汁の真正性が品質決定因子によって識別可能か否か、以下の因子について個別評価を行った。

## 第1項 色調

色調を測色色差計で測定した結果を表 3-1 に示す。イスラエル産果汁は他の産地と比較して、 $L^*$ 値（明度）および  $b^*$ 値（黄－青度）が低かった。これはイスラエル産の試料が透明果汁であるのに対して、他の4か国の試料が混濁果汁であるためと考えられた（図 3-1）。また、 $a^*$ 値（赤－緑度）については、産地間で大きな差はみられなかった。このことから、混濁果汁は色調に基づいて真正性を判断するのは困難であると考えられた。

## 第2項 糖量

表 3-2 に示したようにグルコースおよびフルクトース量は、平均値で比較するとブラジル産が最も多く、ベリーズ産が最も少なかった。一方、スクロース量は、グルコースやフルクトースとは異なり、ベリーズ産が最も多く、ブラジル産が最も少なかった。また、同一国産の果汁においても、各種糖類の含量は最大値と最小値との間に 1.1 倍～1.4 倍の差が確認された。

グルコースおよびフルクトースの AIJN の基準値は 20～35 g/L と定められている<sup>56)</sup>。この基準によると、グルコースでは、アメリカ合衆国産 6 試料、メキシコ産 4 試料およびベリーズ産 2 試料は基準値を下回っていた。フルクトースでは、ベリーズ産 4 試料のうち 1 試料が基準値を僅かに下回る値であったが (19.1 g/L)、他の試料はすべて基準値範囲内であった。スクロースの AIJN 規格は 10～50 g/L を基準値<sup>56)</sup>としており、ブラジル産は 1 試料、アメリカ合衆国産は 6 試料、メキシコ産はすべての試料、ベリーズ産は 2 試料、イスラエル産は 1 試料が基準値を上回った。

糖類の組成について、ブラジル産およびイスラエル産の果汁ではグルコース：フルクトース：スクロースの含有比率は 1：1：1.7 であり、他国産（1：1：2）と異なり、スクロースの割合が低いことが示された。Lee らもオレンジ

表 3-1 オレンジ果汁の色調

		$L^*$ 値	$a^*$ 値	$b^*$ 値
ブラジル産 (n=16)	平均値 ± SD	52.6 ± 1.5	-0.6 ± 0.9	41.8 ± 4.0
	最大値	56.2	0.7	46.7
	最小値	50.3	-2.8	29.1
アメリカ合衆国産 (n=8)	平均値 ± SD	54.0 ± 2.8	-0.3 ± 1.2	37.3 ± 3.9
	最大値	57.6	1.8	42.0
	最小値	49.2	-1.2	30.4
メキシコ産 (n=4)	平均値 ± SD	52.4 ± 0.5	-1.1 ± 0.6	40.6 ± 1.5
	最大値	52.9	-0.6	42.6
	最小値	51.8	-1.8	38.9
ベリーズ産 (n=4)	平均値 ± SD	51.5 ± 0.9	-0.5 ± 0.5	33.2 ± 1.0
	最大値	52.5	0.3	34.6
	最小値	50.4	-0.8	32.4
イスラエル産 (n=4)	平均値 ± SD	15.6 ± 0.6	-1.0 ± 0.3	8.4 ± 0.7
	最大値	16.4	-0.7	8.9
	最小値	15.0	-1.3	7.3

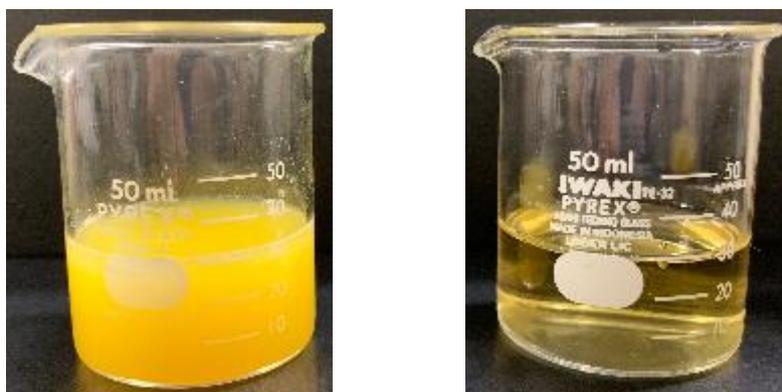


図 3-1 オレンジ果汁の外観

左, 混濁果汁 (ブラジル産)

右, 透明果汁 (イスラエル産)

ジ果汁中のこれら糖類の含有比率は 1:1:2 であることを報告している<sup>66)</sup>。そのため、ブラジル産およびイスラエル産の果汁でスクロースの割合が低い理由は、スクロースが酸性条件下での加熱によりグルコースとフルクトースに分解されることから、濃縮オレンジ果汁の殺菌や濃縮の製造工程における加熱に起因すると考えられた。また、果汁中の糖類組成は、果実の収穫時期、熟度、栽培条件などによって大きく変化することが知られている<sup>67, 68)</sup>。本研究で用いた試料は総じてスクロース量が多かったことから、収穫時期が遅く熟した果実が用いられていると推察された。以上のことから、スクロース比率が低いオレンジ果汁では、製造工程でのスクロースの加熱分解や関税率を抑えるためスクロース分解酵素添加の可能性が考えられたが、果実の熟度等による糖類含量の変動も考慮すべきであり、糖類組成のみで真正性を評価するのは困難であると判断された。

表 3-2 オレンジ果汁の糖量および有機酸量

	グルコース	フルクトース	スクロース	クエン酸	L-リンゴ酸	D-イソクエン酸	L-アスコルビン酸	
単位	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	mg/L	mg/L	
AJN規格	20-35	20-35	10-50	6.3-17	0.8-3.0	65-200	min. 200	
ブラジル産 (n=16)	平均値 ± SD	27.5 ± 2.7	25.6 ± 2.2	45.3 ± 3.5	7.7 ± 0.4	1.8 ± 0.3	59.3 ± 11.0	389.2 ± 115.9
	最大値	32.3	29.8	53.8	8.2	2.0	76.3	554.2
	最小値	23.6	21.5	40.7	7.0	0.9	34.2	191.9
アメリカ合衆国産 (n=8)	平均値 ± SD	23.2 ± 1.7	24.1 ± 1.2	47.6 ± 1.4	7.5 ± 0.3	1.8 ± 0.1	56.9 ± 12.9	451.0 ± 61.5
	最大値	26.0	26.0	49.1	7.9	1.9	86.7	548.1
	最小値	20.2	22.2	45.7	7.2	1.7	44.6	374.3
メキシコ産 (n=4)	平均値 ± SD	22.7 ± 1.0	22.4 ± 1.9	47.4 ± 2.2	6.8 ± 0.2	1.5 ± 0.1	66.8 ± 15.2	442.7 ± 9.4
	最大値	24.1	25.2	50.4	7.0	1.6	79.5	454.5
	最小値	21.7	21.4	45.0	6.6	1.4	46.5	434.2
ベリーズ産 (n=4)	平均値 ± SD	18.7 ± 1.0	20.3 ± 1.4	53.9 ± 3.9	6.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2	38.7 ± 8.4	418.6 ± 33.0
	最大値	19.7	22.3	57.3	7.1	2.0	46.1	458.7
	最小値	17.6	19.1	48.4	6.7	1.7	26.7	390.1
イスラエル産 (n=4)	平均値 ± SD	24.0 ± 4.3	25.4 ± 2.9	45.6 ± 5.3	8.4 ± 0.3	2.2 ± 0.6	71.0 ± 5.8	435.4 ± 81.5
	最大値	30.2	29.2	51.1	8.5	2.5	78.2	478.1
	最小値	20.5	22.2	39.0	7.7	1.3	65.7	313.2

### 第3項 有機酸量

オレンジ果汁中のクエン酸，L-リンゴ酸，D-イソクエン酸および総アスコルビン酸量を表 3-2 に示す．クエン酸量の平均値はブラジル産（7.7 g/L）やメキシコ産（6.8 g/L）と比べて，イスラエル産は 1.1～1.2 倍高かった（8.4 g/L）．また，L-リンゴ酸，D-イソクエン酸および総アスコルビン酸についても，イスラエル産果汁が他国産より 1.1～1.9 倍高い値を示した．一方，ベリーズ産果汁中の D-イソクエン酸量は他国産よりも低値を示し，1/2～1/3 程度であった．同一国産の果汁で比較した場合には，クエン酸，L-リンゴ酸，D-イソクエン酸および総アスコルビン酸において，それぞれ 1.0～1.2 倍，1.0～2.2 倍，1.2～2.2 倍，1.0～2.9 倍の差があることが示された．また，同一国産内での有機酸量の変動はブラジル産で大きく，イスラエル産で小さかった．

クエン酸および L-リンゴ酸の AIJN の基準値は，6.3～17 g/L および 0.8～3.0 g/L であり<sup>56)</sup>，すべての試料は基準値内であった（表 3-2）．イソクエン酸の AIJN 基準値は 65～200 mg/L であり<sup>56)</sup>，ブラジル産のうち 11 試料，アメリカ産は 7 試料，メキシコ産は 2 試料，ベリーズ産は 4 試料基準の下限値を下回っていた．アスコルビン酸（AIJN 基準値；最小値 200 mg/L<sup>56)</sup>）は，ブラジル産のうち 1 試料が基準値以下であったが，その他の試料は基準値の範囲内であった．AIJN ガイドラインではクエン酸とイソクエン酸の比率は品種により固有の値を示すとされており，基準値の最大は 130 である<sup>56)</sup>．しかしながら，本研究で用いた試料は 36 試料中 19 試料が AIJN の基準値以上であり，我が国に輸入されているオレンジ果汁は欧州のものと違う品種であることが示唆された．以上のことから，有機酸量により品種や産地の違いを評価可能であるものの，真正性を評価することは困難であると考えられた．

#### 第4項 フラボノイド量

オレンジ果汁中のフラバノン 5 種，フラボン 4 種，ポリメトキシフラボン 3 種ならびにフラボノール 3 種の計 15 種のフラボノイドを対象として HPLC 分析を行った（表 3-3）。

産地別で比較した場合，いずれの産地の果汁においても最も多く含まれるフラボノイドは hesperidin であり，次いで narirutin, neoponcirin, rutin, eriocitrin の順であることが明らかとなった（表 3-3）。また，hesperidin と narirutin は分析対象とした 15 種のフラボノイドの総量に対して，それぞれ 55%，30%程度を占めていた。他方，ポリメトキシフラボン類である sinensetin と nobiletin の含量は，メキシコ産ではそれぞれ 2.5 mg/L，3.1 mg/L，ベリーズ産ではそれぞれ 2.1 mg/L，2.8 mg/L であり，メキシコ産とベリーズ産では他の産地と比較して，約 2 倍多く含まれていた。また，いずれの産地においても quercetin や luteolin が検出限界以下の果汁が存在した。

さらに，フラボノイド総量はベリーズ産果汁で最も多く（188.0 mg/L），次いでブラジル産（178.9 mg/L），メキシコ産（159.2 mg/L），アメリカ合衆国産（158.5 mg/L），イスラエル産（146.7 mg/L）の順であり，ベリーズ産とイスラエル産で約 1.3 倍の差が認められた。一方，同一国産内での果汁中のフラボノイド量の変動は，メキシコ産とベリーズ産でその変動は小さかった。

また，カンキツ果皮に高濃度で存在しているポリメトキシフラボン類<sup>63)</sup>（sinensetin と nobiletin）は，メキシコ産果汁が他国産より比較的多いことが明らかとなった。オレンジには複数の品種が存在し，濃縮オレンジ果汁では，早生種のハムリン，中生種のパインアップルやシャムーティ，晩生種のバレンシアやペラなどが原料に用いられており<sup>69)</sup>，品種により含まれる成分や分量が異なることが報告されている<sup>70-73)</sup>。そのため，ポリメトキシフラボン類量は品種による差異を反映し易い因子であり，真正性の評価指標として

表 3-3 オレンジ果汁のフラボノイド量

(mg/L)									
	ブラジル産 (n=16)			アメリカ合衆国産 (n=8)			メキシコ産 (n=4)		
	平均値 ± SD	最大値	最小値	平均値 ± SD	最大値	最小値	平均値 ± SD	最大値	最小値
フラバノン									
eriocitrin	2.5 ± 1.6	6.0	0.0	2.5 ± 1.4	4.5	0.3	5.0 ± 0.1	5.2	4.8
narirutin	53.4 ± 13.7	100.9	41.5	53.8 ± 14.9	67.1	30.0	44.7 ± 1.3	46.5	43.6
naringin	0.1 ± 0.1	0.2	0.0	0.3 ± 0.2	0.6	0.1	0.0 ± 0.0	0.0	0.0
hesperidin	101.4 ± 8.9	118.9	86.1	84.3 ± 17.9	112.6	61.2	89.4 ± 8.1	99.8	82.8
neoponcirin	4.7 ± 0.8	7.4	4.0	6.3 ± 1.7	8.5	3.8	6.1 ± 0.3	6.4	5.8
フラボン									
isorhoifolin	0.6 ± 0.2	0.9	0.0	0.8 ± 0.1	0.8	0.6	0.9 ± 0.0	0.9	0.8
rhoifolin	1.4 ± 0.2	1.8	0.9	1.3 ± 0.2	1.6	1.0	1.4 ± 0.2	1.8	1.2
diosmin	0.9 ± 0.3	1.5	0.4	0.6 ± 0.1	0.7	0.4	0.6 ± 0.0	0.6	0.5
luteolin	0.2 ± 0.2	0.8	0.0	0.1 ± 0.2	0.3	0.0	0.1 ± 0.2	0.3	0.0
ポリメトキシフラボン									
sinensetin	1.5 ± 0.5	3.0	1.0	1.0 ± 0.2	1.5	0.8	2.5 ± 0.1	2.6	2.4
nobiletin	2.4 ± 0.4	3.6	1.9	1.8 ± 0.5	2.5	1.2	3.8 ± 0.1	4.0	3.7
tangeretin	0.5 ± 0.2	1.0	0.3	0.5 ± 0.1	0.7	0.3	0.7 ± 0.2	1.1	0.6
フラボノール									
rutin	6.7 ± 0.9	8.9	5.8	4.4 ± 1.1	5.8	2.8	3.0 ± 0.1	3.2	2.9
quercetin	0.3 ± 0.2	0.6	0.0	0.0 ± 0.1	0.2	0.0	0.0 ± 0.0	0.0	0.0
kaempferol	2.4 ± 2.0	6.6	0.7	0.8 ± 0.3	1.2	0.4	0.9 ± 0.2	1.1	0.8
ベリーズ産 (n=4)									
イスラエル産 (n=4)									
	平均値 ± SD	最大値	最小値	平均値 ± SD	最大値	最小値			
フラバノン									
eriocitrin	1.3 ± 2.2	4.5	0.0	3.8 ± 2.6	5.6	0.0			
narirutin	58.9 ± 2.4	62.1	56.4	30.1 ± 19.3	40.8	1.2			
naringin	0.1 ± 0.0	0.1	0.1	0.2 ± 0.1	0.3	0.0			
hesperidin	104.5 ± 8.5	116.3	96.1	64.7 ± 41.3	90.5	3.0			
neoponcirin	8.4 ± 0.2	8.7	8.2	2.9 ± 2.0	4.0	0.0			
フラボン									
isorhoifolin	1.0 ± 0.1	1.1	0.9	0.7 ± 0.5	1.1	0.0			
rhoifolin	1.6 ± 0.1	1.6	1.5	1.5 ± 1.0	2.2	0.0			
diosmin	0.5 ± 0.0	0.6	0.5	0.4 ± 0.3	0.7	0.0			
luteolin	0.0 ± 0.0	0.0	0.0	0.1 ± 0.2	0.3	0.0			
ポリメトキシフラボン									
sinensetin	2.1 ± 0.2	2.3	1.9	0.7 ± 0.5	1.0	0.0			
nobiletin	2.8 ± 0.2	3.0	2.5	1.3 ± 1.1	2.6	0.0			
tangeretin	0.4 ± 0.2	0.8	0.3	0.3 ± 0.2	0.5	0.0			
フラボノール									
rutin	5.3 ± 0.3	5.6	5.0	3.6 ± 2.4	4.8	0.0			
quercetin	0.1 ± 0.1	0.2	0.0	0.0 ± 0.0	0.0	0.0			
kaempferol	1.1 ± 0.2	1.3	0.8	0.9 ± 0.6	1.2	0.0			

の活用可能性が示唆された。

以上のことから、フラボノイド量により品種の違いが評価可能であるが、フラボノイド量のみで真正性を評価することは困難と考えられた。

## 第5項 香気成分量

36種類のオレンジ果汁を、SPME-GC および GC-MS 分析した結果を表 3-4 にまとめて示す。ブラジル産、アメリカ合衆国産、メキシコ産ならびにベリーズ産では、それぞれ 32 種、30 種、24 種、25 種の香気成分が同定されたが、イスラエル産果汁（4 検体）ではほとんどの香気成分は検出限界（0.0004 mg/L）以下であった。また、果汁中の香気成分の総量は、ベリーズ産（104.0 mg/L）で最も多く、次いでメキシコ産（99.4 mg/L）、ブラジル産（57.5 mg/L）、アメリカ合衆国産（37.4 mg/L）、イスラエル産（0.1 mg/L）の順であり、産地により大きな差が認められた。カンキツ類の主要な香気成分である *d*-limonene は、いずれの産地の果汁においても最も多く含まれており、次いで *myrcene*, *p*-cymene の順であった。*d*-limonene は、イスラエル産では香気成分総量の 80%であったが、ブラジル産、アメリカ合衆国産、メキシコ産ならびにベリーズ産では 93%程度とさらに高含有であった。一方、*myrcene* は、イスラエル産では 10%を占めており、他国産の割合（1.8~4.6%）より高かった。また、*p*-cymene についても同様に、イスラエル産は 10%を占めていたが、他国産は 1.0~1.9%であった。他方、含酸素テルペン類や含酸素化合物（*linalool*,  $\alpha$ -terpineol や *octanol* など）では、いずれの産地の果汁においても *linalool* が多かったが、その香気成分量は総量の 0.3~0.6%程度であった。

オレンジ果実からハンドプレス機で得た果汁を SPME 法<sup>74)</sup>で分析した場合、*d*-limonene は 865 mg/L であったことから、本研究で得られた *d*-limonene 量（0.02~117.88 mg/L）は低値であった。これは、果汁の濃縮法の違いによ

るものと考えられた。果汁の濃縮法は、加熱を伴う真空蒸発濃縮法と非加熱の凍結濃縮法、逆浸透膜濃縮法<sup>75)</sup>に大別される。果汁の香気に最も影響を与えるのが濃縮工程であり、真空蒸発濃縮法で製造される濃縮果汁の方が加熱を伴うため、香氣成分の残存量が少なくなる。したがって、本研究で供試した冷凍濃縮オレンジ果汁は、真空蒸発濃縮法で製造されたものと推察された。また、イスラエル産の果汁は他の4か国と異なり透明な果汁であり、パルプがペクチナーゼなどの酵素処理により清澄化されている可能性がある。カンキツ果汁ではパルプ含量が高いほど、吸着保持によって香氣成分が多いことが報告されている<sup>75)</sup>ことから、イスラエル産では香氣成分がほとんど検出されなかったものと推察された。一方、香氣成分が多く検出されたメキシコ産とベリーズ産は、果汁への果皮に由来する精油の溶解が他の産地の果汁より多いインライン搾汁方法により製造されたと考えられた。

以上のことから、香氣成分を識別因子とする評価は、産地や搾汁法や濃縮法の違いから産地判別の可能性が示唆されたが、単独の因子として真正性を評価することは困難であると考えられた。

表 3-4 オレンジ果汁の香気成分量

香気成分	分類	ブツル産 (n=16)		アヲ功産 (n=8)		メキヲ産 (n=4)		ベリノズ産 (n=4)		イスラエル産 (n=4)	
		平均値 ± SD	最大値	最小値	平均値 ± SD	最大値	最小値	平均値 ± SD	最大値	平均値 ± SD	最大値
<i>α</i> -pinene		0.03 ± 0.01	0.05	n.d.	0.02 ± 0.01	0.03	n.d.	n.d.	—	—	n.d.
<i>α</i> -thujene		0.02 ± 0.00	0.02	0.04	0.03 ± 0.02	0.04	0.04 ± 0.00	0.04	0.04 ± 0.01	0.05	0.03
<i>β</i> -pinene		0.09 ± 0.05	0.19	0.03	0.05 ± 0.02	0.09	0.02 ± 0.02	0.16	0.12 ± 0.10 ± 0.01	0.11	0.08
myrcene		1.07 ± 0.62	1.89	0.14	1.73 ± 1.05	2.84	3.22 ± 0.19	3.43	3.01 ± 4.09 ± 1.09	5.22	3.13
<i>α</i> -terpinene		0.05 ± 0.02	0.09	n.d.	0.06 ± 0.01	0.08	n.d.	0.07 ± 0.02	n.d.	0.11 ± 0.00	n.d.
<i>d</i> -limonene		53.88 ± 25.29	83.31	10.86	34.91 ± 37.29	84.73	0.09 ± 93.05 ± 2.64	95.62	90.68 ± 96.96 ± 19.83	117.88	79.58
<i>γ</i> -terpinene	炭化水素類	0.08 ± 0.03	0.14	0.02	0.07 ± 0.04	0.11	n.d.	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.10 ± 0.03	0.14	0.08
<i>p</i> -cymene		1.08 ± 0.53	1.79	0.22	0.47 ± 0.48	1.10	0.01 ± 1.10 ± 0.05	1.16	1.05 ± 1.02 ± 0.20	1.27	0.82
terpinolene		0.09 ± 0.04	0.15	0.02	0.12 ± 0.02	0.14	n.d.	0.16 ± 0.00	0.15 ± 0.16 ± 0.03	0.20	0.13
octyl acetate		0.04 ± 0.04	0.14	n.d.	0.20 ± 0.27	0.51	n.d.	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.03 ± 0.01	0.04	0.02
<i>β</i> -caryophyllene		n.d. <sup>a)</sup>	— <sup>b)</sup>	—	0.03 ± 0.00	0.03	n.d.	n.d.	—	n.d.	—
<i>α</i> -caryophyllene		0.02 ± 0.01	0.02	n.d.	0.02 ± 0.00	0.02	n.d.	0.02 ± 0.00	n.d.	—	—
germacrene D		0.21 ± 0.08	0.37	0.06	0.25 ± 0.22	0.49	n.d.	0.47 ± 0.07	0.40 ± 0.37 ± 0.13	0.54	0.26
<i>β</i> -bisabolene		0.06 ± 0.03	0.09	n.d.	0.05 ± 0.04	0.09	n.d.	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.05 ± 0.01	0.07	0.04
ethanol		0.20 ± 0.31	0.82	n.d.	0.01 ± 0.00	0.01	n.d.	n.d.	—	n.d.	—
1-penten-3-ol		0.08 ± 0.05	0.14	n.d.	0.01 ± 0.00	0.01	n.d.	n.d.	—	0.02 ± 0.00	0.02
nonanal		0.03 ± 0.01	0.03	n.d.	0.03 ± 0.01	0.04	n.d.	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.05 ± 0.01	0.06	0.04
linalool		0.37 ± 0.16	0.66	0.14	0.26 ± 0.07	0.36	n.d.	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.32 ± 0.05	0.36	0.28
1-octanol		0.08 ± 0.04	0.13	n.d.	0.09 ± 0.02	0.12	n.d.	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.22 ± 0.03	0.25	n.d.
terpinene-4-ol	アルコール類	0.06 ± 0.03	0.11	n.d.	0.08 ± 0.02	0.10	n.d.	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.10 ± 0.02	0.12	0.09
<i>p</i> -mentha-( <i>E</i> )-2,8-dien-1-ol		0.02 ± 0.01	0.03	0.01	n.d.	—	—	n.d.	—	0.07 ± —	0.07
<i>α</i> -terpineol		0.04 ± 0.02	0.07	0.01	0.13 ± 0.03	0.17	n.d.	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.04 ± 0.01	0.05	0.03
citronellol		0.03 ± 0.03	0.08	n.d.	0.02 ± 0.00	0.03	n.d.	0.03 ± 0.00	n.d.	0.03 ± —	0.03
thymol		0.01 ± 0.00	0.01	0.01	0.01 ± 0.00	0.01	n.d.	n.d.	—	n.d.	—
hexanal		0.06 ± 0.00	0.06	n.d.	0.02 ± 0.00	0.02	n.d.	n.d.	—	n.d.	—
heptanal		n.d.	—	—	n.d.	—	—	0.03 ± 0.00	n.d.	0.02 ± 0.00	0.02
octanal		0.04 ± 0.02	0.08	0.01	0.04 ± 0.01	0.05	n.d.	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.05 ± 0.01	0.07	0.04
heptyl acetate		0.01 ± 0.00	0.01	n.d.	0.01 ± 0.00	0.01	n.d.	n.d.	—	0.02 ± 0.00	0.02
<i>d</i> -elemene	アルテルピド類	0.05 ± 0.00	0.05	n.d.	n.d.	—	—	n.d.	—	n.d.	—
<i>α</i> -copaene		0.02 ± 0.02	0.05	n.d.	0.01 ± 0.00	0.01	n.d.	0.02 ± 0.00	n.d.	—	—
decanal		0.04 ± 0.03	0.09	n.d.	0.04 ± 0.02	0.07	n.d.	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.08 ± 0.01	0.10	0.07
( <i>E</i> )-2-decenal		0.08 ± 0.06	0.12	n.d.	n.d.	—	—	n.d.	—	n.d.	—
ethyl acetate	エステル類	0.07 ± 0.04	0.12	n.d.	0.09 ± 0.00	0.09	n.d.	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.10 ± 0.02	0.12	0.08
<i>d</i> -carvone	クトン類	0.01 ± 0.01	0.02	n.d.	0.03 ± 0.01	0.04	n.d.	0.03 ± 0.00	0.02 ± —	0.02	n.d.

a) n.d. ; 検出されず, b) — ; データなし

## 第6項 多元素濃度および重元素同位体比

ICP-MS 分析によるオレンジ果汁 36 種類の多元素濃度および重元素同位体比の測定結果を表 3-5 に示す。その結果、ブラジル産は Al 濃度がアメリカ産より 1.1 倍高く、メキシコ産、ベリーズ産およびイスラエル産より 6~89 倍高値であった。Sr 濃度はアメリカ産では、他国産より 3.5~4.0 倍高かった。メキシコ産は Mo と Co 濃度が高い傾向にあった。ベリーズ産は Rb 濃度が他国産より 1.3~2.0 倍高い値を示した。イスラエル産は Na 濃度が最も高く、Al および Zn が含まれない果汁試料が認められた。重元素同位体比においては、ベリーズ産のみ Pb 同位体比の組成が異なっており、 $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  比および  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  比が他国産と比較して低い傾向を示した。

Sr 濃度および Rb 濃度に対する  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  比の二次元プロット結果を図 3-2 に示す。Sr 濃度対  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  比のプロットではアメリカ産の一部とメキシコ産を、Rb 濃度対  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  比のプロットではアメリカ産の一部、メキシコ産およびベリーズ産を識別することが可能であった。有山によると、Sr は農作物が土壌から吸収し易いため、Pb は農作物中の濃度は低いが人間活動由来の大気粉塵を反映するため、これら元素のプロットは農産物の産地の特徴が表れやすいとされている<sup>65)</sup>。そのため、本研究においても一部の産地に限ると、Sr 濃度対  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  比および Rb 濃度対  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  比は産地別果汁評価に適用できることが判明した。しかしながら、同一産地では本法の適用は不可能であったため、次に主成分分析法を用いてこれまで得られた成分因子についてさらに検討を加えた。

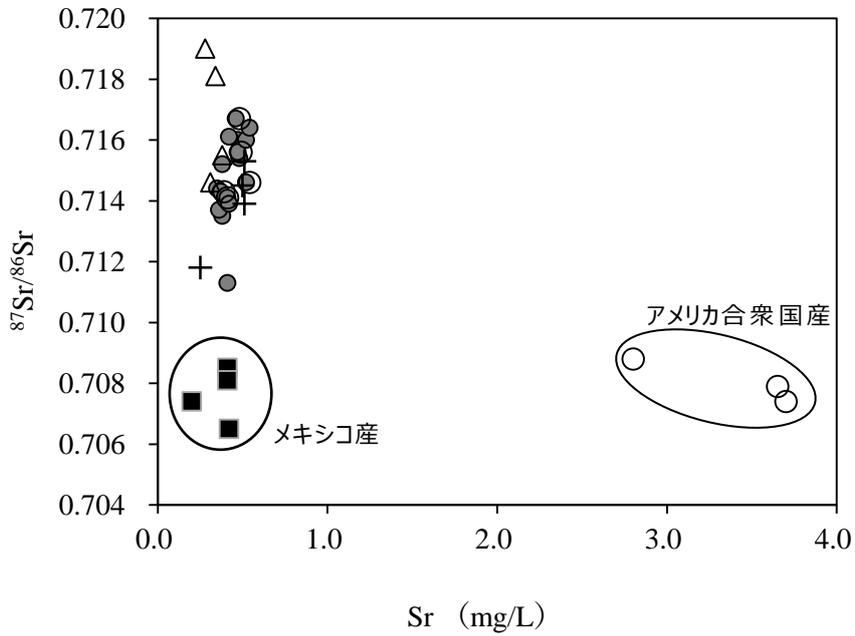
表 3-5 オレンジ果汁の多元素濃度および重元素同位体比

元素	濃度 (mg/L)									
	ブラジル産 (n=16)			アメリカ産 (n=8)			メキシコ産 (n=4)			
	平均値 ± SD	最大値	最小値	平均値 ± SD	最大値	最小値	平均値 ± SD	最大値	最小値	
Na	5.181 ± 2.335	11.000	1.600	8.225 ± 6.731	21.100	1.600	4.200 ± 1.543	5.500	2.100	
Rb	1.806 ± 0.197	2.140	1.350	1.258 ± 0.746	1.970	0.320	2.358 ± 0.692	2.720	1.320	
Sr	0.435 ± 0.061	0.540	0.350	1.558 ± 1.537	3.700	0.390	0.360 ± 0.107	0.420	0.200	
Mo	0.009 ± 0.004	0.019	0.005	0.008 ± 0.002	0.010	0.006	0.012 ± 0.005	0.019	0.008	
Ba	0.336 ± 0.102	0.520	0.210	0.255 ± 0.184	0.550	0.040	0.273 ± 0.082	0.320	0.150	
Al	0.089 ± 0.076	0.290	0.020	0.075 ± 0.092	0.290	0.000	0.015 ± 0.013	0.030	0.000	
Fe	0.758 ± 0.081	0.970	0.650	0.848 ± 0.200	1.290	0.670	0.538 ± 0.159	0.630	0.300	
Co	0.002 ± 0.001	0.003	0.001	0.001 ± 0.001	0.002	0.001	0.005 ± 0.006	0.013	0.001	
Ni	0.011 ± 0.002	0.016	0.008	0.013 ± 0.004	0.021	0.008	0.012 ± 0.004	0.014	0.006	
Cu	0.290 ± 0.020	0.310	0.250	0.309 ± 0.036	0.360	0.270	0.175 ± 0.057	0.210	0.090	
Zn	0.284 ± 0.059	0.350	0.140	0.295 ± 0.034	0.340	0.240	0.140 ± 0.110	0.250	0.000	
<sup>87</sup> Sr/ <sup>86</sup> Sr	0.715 ± 0.001	0.717	0.711	0.712 ± 0.004	0.717	0.707	0.708 ± 0.001	0.709	0.707	
<sup>208</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	2.109 ± 0.005	2.117	2.099	2.105 ± 0.012	2.117	2.084	2.100 ± 0.018	2.123	2.084	
<sup>207</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0.866 ± 0.003	0.871	0.861	0.864 ± 0.006	0.871	0.852	0.860 ± 0.008	0.870	0.852	
<sup>204</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0.056 ± 0.000	0.056	0.055	0.055 ± 0.000	0.056	0.055	0.055 ± 0.001	0.055	0.054	

元素	バリーズ産 (n=4)			イスラエル産 (n=4)		
	平均値 ± SD	最大値	最小値	平均値 ± SD	最大値	最小値
Na	5.400 ± 1.058	6.800	4.400	13.125 ± 6.085	22.100	9.300
Rb	3.145 ± 0.545	3.600	2.370	1.565 ± 0.170	1.690	1.320
Sr	0.328 ± 0.043	0.380	0.280	0.443 ± 0.128	0.510	0.250
Mo	0.007 ± 0.001	0.007	0.006	0.008 ± 0.004	0.012	0.003
Ba	0.375 ± 0.079	0.440	0.270	0.288 ± 0.082	0.410	0.240
Al	0.003 ± 0.005	0.010	0.000	0.000 ± 0.000	0.000	0.000
Fe	0.773 ± 0.015	0.780	0.750	0.565 ± 0.232	0.700	0.220
Co	0.001 ± 0.001	0.001	0.000	0.002 ± 0.001	0.002	0.001
Ni	0.012 ± 0.005	0.018	0.007	0.016 ± 0.004	0.022	0.013
Cu	0.228 ± 0.010	0.240	0.220	0.213 ± 0.102	0.270	0.060
Zn	0.178 ± 0.038	0.230	0.140	0.038 ± 0.025	0.050	0.000
<sup>87</sup> Sr/ <sup>86</sup> Sr	0.717 ± 0.002	0.719	0.715	0.714 ± 0.001	0.715	0.712
<sup>208</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	2.087 ± 0.007	2.094	2.078	2.102 ± 0.002	2.104	2.100
<sup>207</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0.854 ± 0.004	0.859	0.850	0.861 ± 0.002	0.864	0.858
<sup>204</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb	0.055 ± 0.000	0.055	0.054	0.055 ± 0.000	0.055	0.055

Sr vs  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$



Rb vs  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$

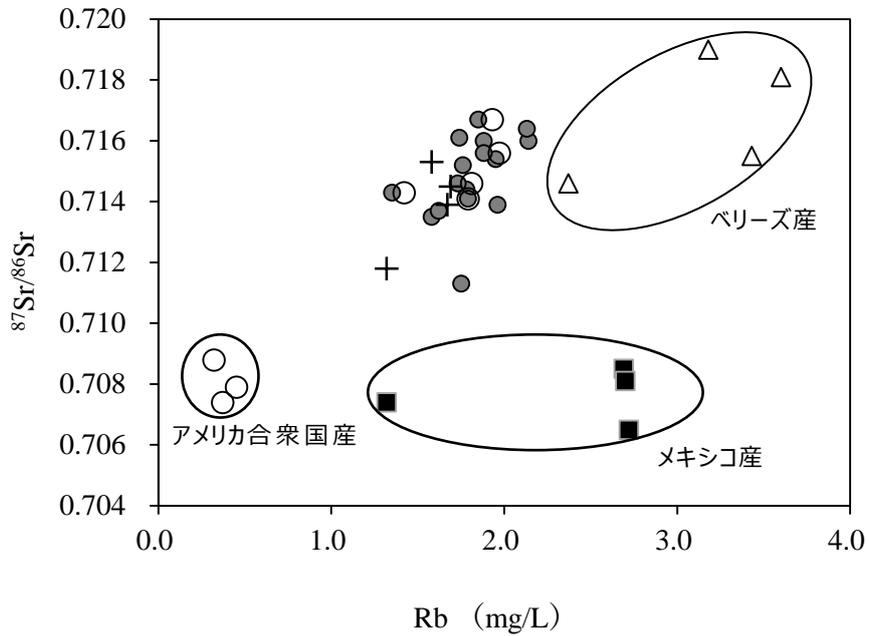


図 3-2 オレンジ果汁の Sr および Rb 濃度に対する  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  の二次元プロット

●, ブラジル産; ○, アメリカ合衆国産; ■, メキシコ産,  
△, ベリーズ産; +, イスラエル産

## 第7項 主成分分析法による真正性評価

これまでの個別解析による真正性評価の結果から単独の成分因子では評価できないことが判明したため、次に、多変量解析による主成分分析法について検討した。すなわち、オレンジ果汁（36 検体）の色調（測色値）、糖類、有機酸、フラボノイドおよび香気成分の分析結果（59 項目）を用いて主成分分析を行った。第 1 主成分（寄与率 29.27%）および第 2 主成分（寄与率 10.93%）の主成分得点を 2 次元プロットした結果（図 3-3）、第 1 象限にブラジル産の 11 検体、第 2 象限にブラジル産の 5 検体、第 3 象限にアメリカ合衆国産の 4 検体およびイスラエル産の 4 検体、第 4 象限にアメリカ合衆国産の 4 検体、メキシコ産の 4 検体およびベリーズ産の 4 検体が分布することが示された。

第 1 主成分および第 2 主成分の主成分負荷量の絶対値が大きい成分は、第 1 主成分では *d*-limonene, terpinolene,  $\gamma$ -terpinene, germacrene D などの炭化水素系テルペン類であった。一方、第 2 主成分ではグルコース、フルクトースなどの糖類や, quercetin, rutin, diosmin などのフラボノイドであった（表 3-6）。

ブラジル産のうち第 1 象限に位置していた果汁は、香気成分総量の平均値が 72 mg/L であったのに対して、第 2 象限の果汁では 23 mg/L であり、約 3 倍の差異が認められた。また、アメリカ合衆国産でもブラジル産と同様に第 4 象限の果汁では 74 mg/L であったのに対して、第 3 象限の果汁では、ほとんど香気成分は検出されなかったことから、ブラジル産とアメリカ合衆国産の果汁が 2 つのグループに分かれたのは、香気成分量の差異に基づいていると考えられた。また、AIJN ガイドライン<sup>56)</sup>によるとクエン酸とイソクエン酸の濃度比はシャムーティやバレンシアは平均 80、ハムリンやペラは平均 110 と品種毎に固有であるとされている。第 1 主成分のブラジル産の象限毎

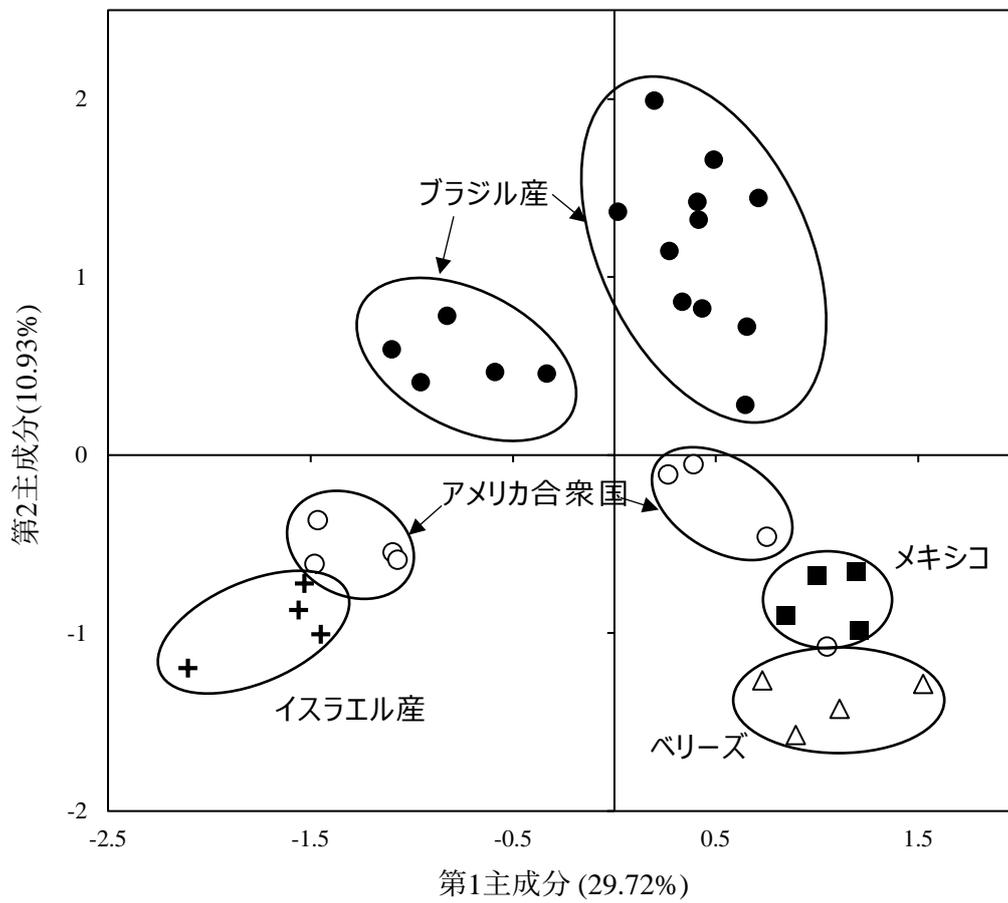


図 3-3 オレンジ果汁の品質因子に基づく主成分分析結果

●, ブラジル産; ○, アメリカ合衆国産; ■, メキシコ産,  
 △, ベリーズ産; +, イスラエル産

表 3-6 オレンジ果汁の品質因子に基づく主成分分析での主成分負荷量

	第1主成分	第2主成分		第1主成分	第2主成分	
色調	<i>L</i> *値	0.587	0.278	$\alpha$ -pinene	0.192	0.673
	<i>a</i> *値	-0.243	0.112	$\alpha$ -thujene	0.578	-0.389
	<i>b</i> *値	0.489	0.489	$\beta$ -pinene	0.751	0.171
糖	グルコース	-0.295	0.724	myrcene	0.853	-0.339
	フルクトース	-0.464	0.522	$\alpha$ -terpinene	0.656	0.396
	スクロース	0.163	-0.500	<i>d</i> -limonene	0.947	0.016
有機酸	クエン酸	-0.679	0.345	$\gamma$ -terpinene	0.927	0.228
	L-リンゴ酸	-0.435	-0.011	<i>p</i> -cymene	0.803	0.449
	D-イソクエン酸	-0.490	0.084	terpinolene	0.927	-0.018
	L-アスコルビン酸	0.215	-0.201	octylacetate	0.312	-0.053
	eriocitrin	-0.001	-0.127	$\beta$ -caryophyllene	0.180	-0.184
	narirutin	0.536	0.073	$\alpha$ -caryophyllene	0.256	0.062
フラボノ イド類	naringin	-0.500	-0.159	germacreneD	0.910	-0.148
	hesperidin	0.495	0.292	$\beta$ -bisabolene	0.883	0.200
	neoponcirin	0.602	-0.436	ethanol	0.038	0.419
	isorhoifolin	0.325	-0.426	penten	0.099	0.391
	rhoifolin	0.334	-0.042	nonanal	0.822	-0.380
	diosmin	0.197	0.564	linalool	0.751	0.427
	luteolin	0.050	0.422	octanal	0.879	0.319
	sinensetin	0.744	-0.021	tripinene-4-ol	0.879	-0.080
	nobiletin	0.771	0.057	<i>p</i> -mentha-( <i>E</i> )-2,8-dien-1-ol	0.257	-0.053
	tangeretin	0.452	0.271	$\alpha$ -terpineol	0.657	0.027
	rutin	0.046	0.627	citronellol	0.304	-0.003
	quercetin	0.144	0.678	thymol	0.151	0.013
	kaempferol	0.166	0.453	hexanal	-0.049	0.306
				heptanal	0.261	-0.294
			octanal	0.879	0.319	
			heptylacetate	0.438	-0.333	
			<i>d</i> -elemene	0.071	0.227	
			$\alpha$ -copaene	0.220	0.326	
			decanal	0.816	-0.325	
			( <i>E</i> )-2-decenal	0.028	0.258	
			ethylacetate	0.786	-0.088	
			<i>d</i> -Carvone	0.366	-0.269	

の平均値を比較すると、第1象限の平均値は142であったのに対して、第2象限の平均値は116と低値であったことから、第1象限と第2象限の果汁はそれぞれ異なる品種であることが示唆された。一方、メキシコ産とベリーズ産の果汁は、第4象限において近傍に位置しており、産地が異なっても類似した成分特性を示すことが主成分分析によって明らかとなった。なお、この2か国間の果汁には色調および糖類で僅かな差異が確認され、色調ではメキシコ産の  $b^*$  値がベリーズ産より高いこと（黄色が強い）、単糖類（グルコースとフルクトース）ではメキシコ産がベリーズ産よりも含量が多いこと、スクロースではメキシコ産の含量が低値であることが明らかとなった。

以上のことから、果汁の品質因子を基に主成分分析を行うことによって、果汁の産地判定が可能であることが明らかとなった。すなわち、本章で選定された項目（色調、フラボノイド、香気成分）を用いることによって、シークワシャーにおいても真正性が評価される可能性が示唆された。

#### 第4節 小括

The qualitative properties of frozen orange juice concentrate imported from foreign countries to Japan were investigated. We analyzed colorimetric value; soluble sugars such as glucose, fructose, and sucrose; organic acids such as citric acid, L-malic acid, D-isocitric acid, and L-ascorbic acid; flavonoids; headspace volatile flavor components; multi-element heavy metal and isotope ratio of heavy metals. Principal component analysis was used to evaluate these attributes.

The main characteristic that varied based on country of origin tended to be the ratio of  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  vs. the concentration of Sr or Rb. Principal component analysis using 59 items of analytical data showed that the flavor components strongly contribute to the first principal component, and that soluble sugars and flavonoids contribute to the second principal component. A scatter plot of the principal component scores was used to investigate products from Brazil and America to divide them into two groups based mainly on country of origin. Some concentrated orange juice samples did not meet the standards set by the AIJN (Association of the Industry of Juice and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union), but most samples met these criteria. These results demonstrated that the concentrated orange juice analyzed in the present study contained similar components when they shared the same country of origin, suggesting that there were differences in components depending on each country of origin. From these data, it was suggested that the analytical values of frozen orange juice concentrate were based on different industry manufacturing processes. Using principal component analysis, it was possible to classify more orange fruit juice based on their analytical properties, indicating that the characteristics of orange fruit juice vary based on country of origin.

It was difficult to ensure the authenticity of orange juice by only analytical results. However, the analytical data in this study could be used as basic data for evaluating the authenticity of orange fruit juice imported into Japan.

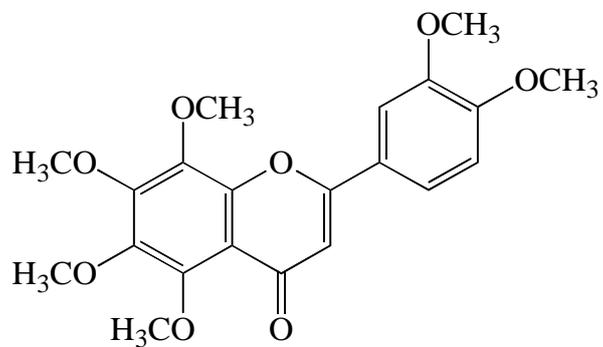
## 第4章 シークワシャー果汁の真正性評価法の設定

### 第1節 緒言

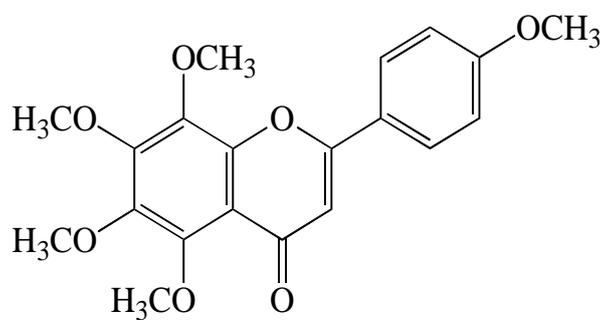
シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) は別名をヒラミレモンともいい、タチバナと並ぶ日本カンキツの原種のひとつである<sup>76)</sup>。南西諸島から台湾の山地に分布し、沖縄では大宜味村や名護市屋部、勝山、伊豆味などの本島北部地域で栽培されている特産カンキツである。耐寒性はあまり強くないものの、乾湿の変化や暑さに対する抵抗力は非常に強い<sup>77)</sup>。果実の大きさは約3~4 cm、果重 25 g 前後である。酸味が強く、沖縄では古くから芭蕉布の洗濯に使われるだけでなく、スタチやカボスのように料理の風味付けや生食としても利用されるが、ほとんどは果汁飲料として加工されている。シークワシャーは果実が小さく果皮が薄いという果実特性に加えて、耐病害虫性に優れているため農薬散布が少ないことから、果実を丸ごと搾汁する全果搾汁方式により果汁加工されている。このため、ウンシュウミカンでのチョッパーパルパー搾汁方式の果汁加工と比べて、果皮の成分やパルプなどが果汁中に多く含まれることも特徴のひとつである。

近年、シークワシャーの果実や葉にポリメトキシフラボン (PMF) である nobiletin, tangeretin が他の香酸カンキツ類 (果皮 100 g 中にタヒチライム 1.6 mg, 1.0 mg; スイートレモン 0 mg, 0 mg; ユズ 0 mg, 0.2 mg; カラマンシー 13.3 mg, 7.7 mg) と比べて、高濃度 (シークワシャー 85.2 mg, 51.1 mg) で含まれることが明らかになっている<sup>30, 31)</sup>。nobiletin はフラボン骨格構造に対してメトキシ基が 6 個、tangeretin は 5 個結合した化合物である (図 4-1)。nobiletin は、活性酸素産生抑制による酸化ストレス緩和作用<sup>78, 79)</sup>、マウス皮膚<sup>26)</sup>、胃<sup>27)</sup>やラット大腸<sup>28)</sup>において発がん抑制作用を示すこと、さらにはシクロオキシゲナーゼ誘導抑制による炎症抑制作用<sup>29)</sup>、抗肥満作用

nobiletin



tangeretin



sinensetin

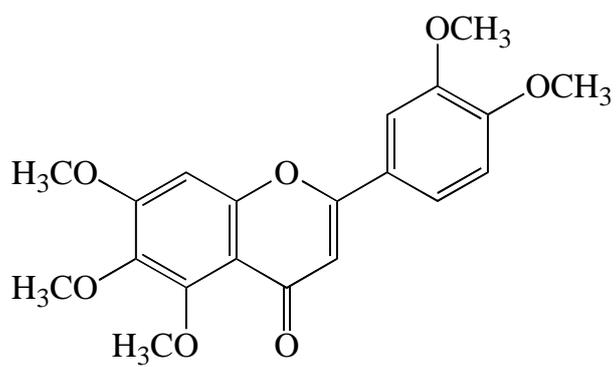


図 4-1 ポリメトキシフラボン類の化学構造

80), D-ガラクトサミン誘発性肝障害に対する肝保護作用<sup>81)</sup>, 老化関連疾患の原因のひとつであるマトリックスメタロプロテアーゼ産生抑制作用<sup>82, 83)</sup>があり, 疾病の予防・改善が大いに期待される成分である。その一方で, 需要の急増により需給バランスが崩れ, シークワシャーの代わりに安価なカラマンシー果汁を混入する原材料偽装の問題が発生している。しかしながら, シークワシャーとカラマンシーの果汁は類似した性状を呈する(図 4-2)ため, カラマンシー果汁が混入したシークワシャー果汁を外観のみでの識別は困難である。

シークワシャーとカラマンシーの識別へ最も簡易に適用できる識別法としては, 官能評価法であると考えられる。官能評価とは, 人間の感覚器官を使って行う検査であり, 食品だけでなく, 幅広い分野で用いられている手法である。理化学機器の発展によって, 成分の個別分析が可能となっているが, 官能評価は感度が高く, 迅速であり, 低コストであるなどの点で現在においても, なお品質評価法の主流である。

食品の分野で広く用いられている官能評価として, 3点識別法およびシェッフエの対比較法がある。3点識別法とは, AとBの2つの試料を比較するとき, AAB, ABBのようにどちらか一方を1個, 他を2個加えた3個を提示して, 異なる1つを判断する方法である<sup>84)</sup>。また, シェッフエの対比較法とは, 対にした2つの試料の官能(質や強度)の程度を尺度化して評価する方法で, 試料の組み合わせや試食順序などの影響を要因として捉えることができる<sup>85)</sup>。

その他の識別法として, 対象食品に本来含まれない(あるいは量比が異なる)成分を分析する成分分析法がある。3', 5'-di-C- $\beta$ -glucopyranosylphloretin (フロレチン配糖体)<sup>86)</sup>(図 4-3)はシークワシャーに存在しないカラマンシー固有成分として報告されており, さらにシークワシャーとカラマンシー



図 4-2 シークワシャー果汁とカラマンシー果汁の外観  
左, *Citrus depressa* Hayata (シークワシャー) 果汁  
右, *Citrus madurensis* Lour. (カラマンシー) 果汁

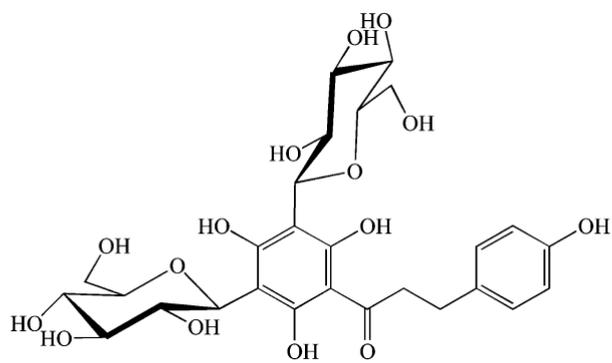


図 4-3 3', 5'-di-C- $\beta$ -glucopyranosylphloretin (フロレチン配糖体) の化学構造

ではポリメトキシフラボン類量や香気成分量<sup>87)</sup>に差異があることが知られている。

他方、食品識別の JAS 分析試験として遺伝子の塩基配列の違いを基にした遺伝子組み換え食品検査の分析マニュアルがある<sup>88)</sup>。また、2003 年 1 月には、DNA 品種識別技術検討会において、DNA 品種識別についての技術開発と利用のガイドラインがまとめられており<sup>89)</sup>、モモ、ナシ、イグサ等の作物での品種識別法として利用が開始され、現在ではイネ、イチゴ、インゲンマメ等の作物での利用にまで拡大している。

今日では、生物に内在する短い塩基の繰り返し配列(マイクロサテライト)を検出する Simple Sequence Repeat (SSR) 法、制限酵素処理により配列差を検出する Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) 法、一塩基の配列の違いを検出する Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 法等が提案され、DNA マーカーを用いて、クリ、ナシ、リンゴ、モモ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズ、ビワ、カンキツ類などの主要果樹において品種識別が可能となっている<sup>90)</sup>。

開発された DNA 識別技術は、一般には植物登録品種に対する育成者権の侵害を立証するために利用されることが多いが、新食糧法と改正 JAS 法で品種の表示を義務付けられた米については、表示品種の真正性を評価するために DNA 品種識別技術が利用されている。中でも我が国で作付面積が最も多く、高価格で流通するために偽装表示が後を絶たなかったコシヒカリの DNA 品種識別技術は、偽装表示の抑止に貢献している<sup>91)</sup>。また、米、オリーブ油、果実、ワイン、オレンジジュースなどの様々な食品の識別にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法も用いられている<sup>91-94)</sup>。

そこで本章では、官能評価法、成分分析法および DNA 識別法を用いて、シークワシャー果汁の真正性について検討した。なお、第 3 章において果汁

に含まれるフラボノイドや香気成分が真正性評価に有用な識別因子であることが判明したため、ポリメトシキフラボン類および香気成分の判別因子としての適用可能性についても検討を加えた。

## 第2節 実験材料および方法

### 第1項 実験材料

#### 1. 試料

試料は日本と台湾の企業から入手した工業的にベルトプレス搾汁されたシークワシャーおよびカラマンシー果実飲料用の原料果汁（シークワシャー原料果汁およびカラマンシー原料果汁）、沖縄県農業研究センター名護支所および台湾行政院農業委員会高雄區農業改良場を通じて収集したシークワシャー果実（沖縄県産および台湾産）およびカラマンシー果実（沖縄県産および台湾産）を用いた。原料果汁は、 $^{\circ}\text{Brix}$  が  $9.0 \pm 0.2$  となるように蒸留水を用いて希釈した。果実試料はハンドプレス式のジューサー（内径 84 mm, 深さ 32 mm, ヒロシヨウ(株)製）を用いて搾汁し、分析試料とした。

モデル偽和果汁として、 $^{\circ}\text{Brix}$  を  $9.0 \pm 0.2$  に調整したシークワシャー果汁およびカラマンシー果汁を混合し、シークワシャー25%果汁（カラマンシー75%混合果汁）、50%果汁（カラマンシー50%混合果汁）、75%果汁（カラマンシー25%混合果汁）を調製した。

また、沖縄県で市販されているシークワシャー果汁飲料（市販果汁飲料）10品を分析に供した。

#### 2. 試薬

nobiletin, sinensetin, tangeretin は Extrasynthase 製（Lyon, France）を購入

した。3', 5'-di-C- $\beta$ -glucopyranosylphloretin (フロレチン配糖体) は、ナガミキンカン (*Fortunella margarita*) より以下の方法で単離されたものを用いた<sup>85)</sup>。すなわち、ナガミキンカンの果実 225 g からエタノールを用いてフロレチン配糖体を抽出した。次いでエタノールを減圧下で除去した後、*n*-ブタノールと水を用いた液-液分配で、*n*-ブタノール層にフロレチン配糖体を抽出した。*n*-ブタノール層を減圧下で濃縮乾固した後、水に再溶解し、合成吸着剤 (ダイヤイオン HP-20, 三菱ケミカル(株)製) を添加してフロレチン配糖体を吸着させた。合成吸着剤からエタノールを用いてフロレチン配糖体を脱着させた後、減圧下でエタノールを除去し、乾固物 (600 mg) を得た。乾固物からのフロレチン配糖体の単離は分取 HPLC で行い、フロレチン配糖体 (220 mg) を得た。なお、分取 HPLC の条件は以下の通りである。カラムに Tosoh ODS-Prep (250 × 22 mm I.D., 10  $\mu$ m, 東ソー(株)製) を用い、移動相 A はメタノール、移動相 B は 0.2% (v/v) 酢酸溶液、流速は 5.0 mL/min とした。グラジエント条件は、B 液濃度を 60→30% (0~90 分) とした。

## 第2項 実験方法

### 1. パネリスト

中村学園大学学生 20 名 (平均年齢 21.8 歳) とした。パネリストは事前に 2 ヶ月間試料を摂取し、同一試料に対する評価の尺度がパネルで統一されるように訓練した後、官能評価に参加した。

### 2. 官能評価法

試料 20 mL を透明のガラスコップに入れ、3 桁のランダムに振った数値を付して提供した。例えば、657, 454, 340 などである。評価には、3 点識別法およびシェッフエの対比較法を用いた。

3点識別法では、同じ試料（A）2点とそれとは異なる試料（B）1点を同時にパネリストに提供し、1つだけ異なるものおよびシークワシャー100%であると判断されるものをそれぞれ選ばせた。試料の提供は、各パネリストに1回のみとした。

シェッフェの対比較法のうち、順序による効果およびパネルによる効果を考慮する浦の変法を用いた<sup>85)</sup>。果汁試料の色合い（橙色－黄色）、香り（シークワシャーとは異なる香り－シークワシャーの香り）および酸味（弱い－強い）の3項目について、変化なしを0とした $\pm 3$ 点の7段階で評価させた。各パネリストにすべての組み合わせおよびすべての順序で試料を提供した。

### 3. 色調測定

果汁の色調は測色式差計（Color meter ZE6000, 日本電色工業(株)製）で反射式により測定し、 $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ 値を求めた。

### 4. 薄層クロマトグラフ（TLC）法によるフロレチン配糖体の検出

メタノール 2 mL および超純水 3 mL で前処理した固相カートリッジ（Sep-pak C18 カートリッジ, 日本ウォーターズ(株)製）に果汁 2 mL を負荷した。その後、超純水 2 mL で洗浄し、メタノール 1 mL で溶出したものを分析試料とした。

TLC プレート（silica gel 60 F<sub>254</sub>, 20 × 20 cm, Merck(株)製）は、100°C で 1 時間加熱し、使用直前までシリカゲルを入れたデシケーターで保管した。分析試料を毛細管で 25 回スポットし、クロロホルム：メタノール：1%（v/v）リン酸溶液（65：35：5）混合液で展開して、10%（v/v）硫酸溶液を噴霧後、ガスバーナーで加熱し検出した。

## 5. HPLC 法によるフロレチン配糖体およびポリメトキシフラボン類の定量

果汁 3 mL にエタノールを 7 mL 添加し、30 分間超音波（出力；200 W，発振周波数；39 kHz，UT-204，シャープ(株)製）抽出を行い，メンブレンフィルター（0.45  $\mu\text{m}$ ，セルロースアセテート，Advantec 東洋(株)製）でろ過したものを HPLC 分析（LC-10A，(株)島津製作所製）に供した。

フロレチン配糖体の分析条件は以下の通りである。カラムは LiChrospher100RP-18（250  $\times$  4.0 mm I.D.，5  $\mu\text{m}$ ，Merck(株)製），検出器はフォトダイオードアレイ（PDA）検出器を用い，カラム温度は 40°C，検出波長は 286 nm，移動相 A 液は 20 mM リン酸水溶液，B 液はメタノール，流速は 0.9 mL/min とした。グラジエント溶出条件は B 液濃度を 55%（0～5 分），55→80%（5～45 分）とした。

ポリメトキシフラボン類の分析条件は以下の通りである。カラムは HypersilODS（150  $\times$  4.0 mm I.D.，5  $\mu\text{m}$ ，Agilent Technology(株)製），検出器は PDA 検出器を用い，カラム温度は 40°C，検出波長は 340 nm，移動相はメタノール：10 mM リン酸（6：4）混合溶液（イソクラティック溶出），流速は 1.0 mL/min とした。

## 6. SPME-GC 法による香気成分分析

果汁 1.0 mL をクリンパバイアル瓶に移した後，内部標準として 1% (v/v) シクロヘキサノール 10  $\mu\text{L}$  を添加し，40°C で 5 分間加温した。ヘッドスペースガス部にファイバー（Carboxen-PDMS 75  $\mu\text{m}$  タイプ，シグマアルドリッジジャパン製）を挿入し，20 分間揮発性成分を吸着させた。ファイバーに吸着した成分は 260°C に加熱したインサート部分で 10 分間脱離させた後，クライオフォーカシング GC 分析に供した。装置は，GC-14A（(株)島津製作所製），検出器は水素炎イオン化検出器（FID）を用いた。カラムは DB-WAX

(60 m × 0.25 mm I.D., 膜厚 0.25 μm, Agilent Technology(株)製), カラム温度は 40~230°Cまで 3°C/min で昇温し, 230°C で 10 分間保持した. 注入法はスプリットレス注入, キャリアーガスはヘリウム, 流速は 1.0 mL/min とした. 内部標準であるシクロヘキサナール (終濃度; 1 mg/L) とのピーク面積比により成分量を求めた. 成分同定は GC-質量分析 (MS) 法によって行った. 装置は, Varian 3400GC(株)Varian 製)にイオントラップ方式の質量分析計(Model 800, Finnigan MAT(株)製)を装着したものをを用いた. 分析は SPME-GC 法と同様の条件で行った.

イオン化は電子イオン化 (Electron Ionization, EI) 法およびイソブタンによる化学イオン化 (Chemical Ionization, CI) 法を用いて行い, ピーク面積百分率は, Full Scan モード (26~300 amu/s) でのトータルイオンカウントから求めた. 成分の同定は, ライブラリーサーチシステム (MAGNUM ライブラリーサーチシステム, NIST MASS SPECTRA DATABASE; 62, 235 化合物収載) による検索と Retention index (RI) 値から物質を推定し, 標準物質との RI 値およびマススペクトルの一致もしくは RI 値の一致により行った.

## 7. 識別用 DNA マーカーの作製

### (1) DNA 抽出

果実を剥皮して得た果皮部を凍結乾燥後, ホモジナイザーペッスル (アズワン(株)製)を用いて粉碎したものから, DNeasy Plant Mini kit(株)QIAGEN 製)を用いて, 全 DNA を抽出した.

### (2) *trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域の増幅確認

*trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域の増幅は Taberlet ら<sup>95)</sup>が開発したプライマー (*trnL-trnF* 領域 フォワードプライマー, 5'-GGTTC AAGTCCCTCTATCCC-3';

リバースプライマー, 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'; *trnT-trnL* 領域フォワードプライマー, 5'-TCTACCGATTTTCGCCATATC-3'; リバースプライマー, 5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3') を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で行った。まず, 鋳型 DNA 溶液 (5 ng/μL) に以下の試薬溶液を氷上で混合して, 全量を 25 μL とした。滅菌水, 14.5 μL; 10× Ex Taq バッファー, 2.5 μL; 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 μL; 2.5 mM dNTP mixture, 2 μL; 10 pmol/μL フォワードプライマー, 0.5 μL; 10 pmol/μL リバースプライマー, 0.5 μL; Ex Taq (5 U/μL), 3 μL。Ex Taq DNA ポリメラーゼ, バッファーおよび dNTP mix はタカラバイオ(株)製を用いた。鋳型 DNA 溶液の代わりに精製水を加えたものをネガティブコントロールとした。PCR 反応に基づく DNA 増幅はサーマルサイクラー (株)アステック製)を用いて以下の条件で行った。すなわち, 95°C-5 分間を 1 サイクル後, 92°C-1 分間, 55°C-1 分間, 72°C-1 分間の工程を 35 サイクル, 最後に 72°C-5 分間を 1 サイクルとした。

次に, PCR 増幅産物を確認するため PCR 反応液にローディングバッファー (株)ニッポンジーン製)を 1/5 量加え, 1× TAE バッファー (ナカライテスク(株)製)に浸漬させたアガロースゲル (ナカライテスク(株)製, 2% (w/v)) に注入し, サブマリン型電気泳動装置 (Mupid-2plus, タカラバイオ(株)製)を用いて 100V で 30~40 分間泳動した。DNA 分子量マーカーは 100 bp DNA Ladder (東洋紡(株)製)を用いた。泳動終了後, アガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液 (1 μg/mL) に約 15 分浸漬して DNA を染色し, UV サンプル撮影装置 (株)アステック製)で PCR 増幅産物の検出と確認後, 撮影を行った。

### (3) ダイレクトシーケンスとアライメントの作成

*trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域の PCR 増幅産物の精製は QIAquick PCR

purification kit (株QIAGEN 製) を用いて行った。精製 PCR 増幅産物の塩基配列の確認は、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Kit with AmpliTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific(株)製) を用いた PCR ダイレクトシーケンス法で行った。なお、*trnL-trnF* 領域のシーケンスには第 2 項 7. (2) と同一のプライマーを用い、*trnT-trnL* 領域のシーケンス用プライマーは、DNA データバンク DDBJ に登録されている *Citrus sinensis* (Accession No.DQ864733.1) の配列から設計したもの (フォワードプライマー, 5'-GTCTAAATCGAATATTATATTCGATTC-3'; リバースプライマー, 5'-GAATACTTCGAACGGTCGATT-3') を用いた。*trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域の PCR 増幅産物の塩基配列の確認には ABI 3100 DNA Sequencer (Thermo Fisher Scientific(株)製) を用いた。

DNA の塩基配列決定は BioEdit (Windows 用フリーソフト, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) を用いて行い、アライメントはゲノムネットの計算ツール (CLUSTALW, <http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて作成した。

#### (4) 識別用プライマーの設計

*trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域のアライメントから見出された種特異的 SNP を検出するための識別用プライマーとして、Okayama ら<sup>96)</sup>が開発したアレル特異的 PCR 増幅法に従い、3'末端が塩基置換部位に対応するプライマーを設計した。また、バックグラウンド増幅を抑制するため、3'末端から 3 番目の位置にミスマッチ塩基を導入した<sup>97)</sup>。

#### (5) 果実 DNA を鋳型とした識別用プライマーによる増幅確認

果実 DNA を鋳型として設計した識別用プライマーによる増幅確認を行っ

た。まず、鋳型 DNA 溶液 (5 ng/μL) に以下の試薬溶液を氷上で混合して、全量を 10 μL とした。滅菌水, 1.4 μL; 2× PCR バッファー, 5 μL; 2 mM dNTP mixture, 2 μL; 10 pmol/μL フォワードプライマー, 0.2 μL; 10 pmol/μL リバースプライマー, 0.2 μL; KOD FX (1 U/μL), 1.2 μL。KOD FX DNA ポリメラーゼ, バッファーおよび dNTP mix は東洋紡(株)製を用いた。鋳型 DNA 溶液の代わりに精製水を加えたものをネガティブコントロールとした。DNA 増幅はサーマルサイクラー(株)アステック製を用いて以下の条件で行った。すなわち, 94°C-2 分間を 1 サイクル後, 98°C-10 秒間, 58°C (プライマー CiMaTL) または 61°C (プライマー CiDeLF) -30 秒間, 68°C-30 秒間の工程を 35 サイクル, 最後に 68°C-10 分間を 1 サイクルとした。

## 8. 識別用 DNA マーカーを用いた原料果汁の識別試験

### (1) DNA 抽出

試料を凍結乾燥後, DNeasy Plant Mini kit (株)QIAGEN 製)を用いて, 全 DNA を抽出した。

### (2) DNA の増幅

試料から抽出した DNA を GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE ヘルスケア・ジャパン(株)製)を用いて増幅し, 得られた増幅産物を以下の実験の鋳型 DNA 溶液として使用した。

### (3) 識別用プライマーによる果汁加工品の識別

(2) で調製した鋳型 DNA 溶液 (5 ng/μL) に, 以下の試薬溶液を氷上で混合して, 全量を 10 μL とした。滅菌水, 1.4 μL; 2× PCR バッファー, 5 μL; 2 mM dNTP mixture, 2 μL; 10 pmol/μL フォワードプライマー, 0.2 μL; 10

pmol/ $\mu$ L リバースプライマー, 0.2  $\mu$ L ; KOD FX (1 U/ $\mu$ L), 1.2  $\mu$ L. KOD FX DNA ポリメラーゼ, バッファーおよび dNTP mix は東洋紡(株)製を用いた. 鋳型 DNA 溶液の代わりに精製水を加えたものをネガティブコントロールとした. DNA 増幅をはサーマルサイクラー (株)アステック製)を用いて以下の条件で行った. すなわち, 94°C-2 分間を 1 サイクル後, 98°C-10 秒間, 58°C (プライマー-CiMaTL) もしくは 61°C (プライマー-CiDeLF) -30 秒間, 68°C-30 秒間の工程を 35 サイクル, 最後に 68°C-10 分間を 1 サイクルとした.

### 第3項 データ処理および統計解析

3 点識別法の結果は Roessler の検定表<sup>98)</sup>を用いて検定を行った. また, シェッフエの一対比較法の結果は Excel 統計 (株)エスミ製)を用いて, 多重比較のうちシェッフエ法 (浦の変法) により解析し,  $p < 0.05$  で有意差ありとした.

ポリメトキシフラボン類および香気成分分析の結果は SPSS ver. 19.0 (IBM (株)製)を用いて, 正準判別による判別分析を行った. 判別関数は, 得られた変数に判別係数を乗じた積の和に定数項を加えることにより求めた. 判別得点は, 判別関数に各試料の分析値を代入して求めた. ポリメトキシフラボン類量比を変数とした判別式では, 判別得点が正の場合はカラマンシー果汁, 負の場合はシークワシャー果汁と判定した.  $\gamma$ -terpinene 組成比を変数とした判別式では正の場合はシークワシャー果汁, 負の場合はカラマンシー果汁と判定した.

### 第3節 結果および考察

#### 第1項 官能評価法による真正性評価

##### 1. 官能評価

真正なシークワシャー果汁を簡易的に識別するため、3点識別法およびシェッフエの一対比較法の2種類の官能評価を行った。3点識別法は、モデル偽和果汁（シークワシャー0、25、50もしくは75%果汁）とシークワシャー100%果汁の組み合わせで試料を提示し、20名のパネリストに各組み合わせについて1回ずつ評価させた。表4-1に示すように、シークワシャー100%果汁と、シークワシャー0%、25%および50%のモデル偽和果汁を有意水準1%で識別できた。一方、シークワシャー果汁の割合の高いモデル偽和果汁（シークワシャー75%果汁）は、識別が困難であった。シェッフエの一対比較法は、真正なシークワシャー果汁と偽和果汁の官能的な相違の尺度を求めするために実施した。表4-2に示すように、シークワシャー100%果汁とすべてのモデル偽和果汁との間に、色合い、香りおよび酸味の項目で有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。さらに、カラマンシー果汁の添加割合が同一の場合、色合いと香りは、酸味の項目よりも評点の差が大きいことが示された。そのため、色合いと香りは真正なシークワシャー果汁と偽和果汁を識別する上で有用な項目であると考えられた。Pérez-Lópezらは、100人の消費者に官能評価を実施し、真正なオレンジ果汁とマンダリン果汁は色によって区別できることを報告している<sup>99)</sup>。また、Ayhanらは、オレンジ果汁の官能評価を行い、カンキツ果汁の官能評価では果汁の色と香りが識別因子となり得る<sup>100)</sup>ことを示している。したがって、官能評価法では50%以上カラマンシー果汁が混入された果汁を偽和果汁であると識別可能であったが、25%以下の混入では識別できないことが明らかとなった。また、シークワシャー果汁と偽和果汁

表 4-1 3点識別法によるシークワシャー果汁とモデル偽和果汁<sup>a)</sup>の  
識別結果

シークワシャー 果汁割合	3点識別法 <sup>b)</sup>			<sup>b)</sup> で正解したパネル中でのシークワ シャー100%果汁の識別結果	
	パネル数	正解数	不正解数	正解数	不正解数
100% × 75%	20	5	15	3	2
100% × 50%	20	15 (**)	5	15 (**)	0
100% × 25%	20	18 (**)	2	18 (**)	0
100% × 0%	20	19 (**)	1	19 (**)	0

\*\*  $p < 0.01$

<sup>a)</sup> モデル偽和果汁, カラマンシー添加果汁

表 4-2 シェッフエの対比較法によるシークワシャー果汁とモデル偽和果汁<sup>a)</sup>の識別結果

項目	シークワシャー果汁割合				
	0%	25%	50%	75%	100%
色合い	-1.56**	-0.61**	0.38**	0.76**	1.03
香り	-1.83**	-0.53**	0.49**	0.85**	1.02
酸味	-0.94**	-0.44**	0.26*	0.57*	0.54

\*\*  $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs. シークワシャー100%果汁

a) モデル偽和果汁, カラマンシー添加果汁

の識別には酸味より果汁の色調および香りが識別因子として有用であることが判明した。

## 2. 色調

各果汁の  $L^*$  値,  $a^*$  値,  $b^*$  値および色差を比較した (表 4-3)。シークワシャー100%果汁とすべてのモデル偽和果汁との間に有意差が認められた。明度 ( $L^*$  値) と青黄色度 ( $b^*$  値) は, シークワシャー75%果汁以外でカラマンシー果汁の割合が高くなると減少した。一方, 赤緑度 ( $a^*$  値) はカラマンシー果汁の割合が高くなるにつれて増加した。色差は, カラマンシー果汁の割合が高くなるほど増加し, シークワシャー100%果汁とすべてのモデル偽和果汁との間に有意差が認められた。Meléndez-Martínez らは, 色がカンキツ製品の品質管理に有用であることを示している<sup>101)</sup>。Tiwari らは, オレンジ果汁の品質構成因子として色調 ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) が有用であると報告している<sup>102)</sup>。したがって, 果汁の色は真正なシークワシャー果汁を識別する上で有用な指標であると考えられた。

以上のことから, 官能評価法による識別は色調および香りが有用な識別因子であり, またカラマンシーの混入割合が50%以上の場合, 真正性を識別可能であることが明示された。

表 4-3 シークワシャー果汁およびモデル偽和果汁<sup>a)</sup>の色調

シークワシャー果汁 割合	$L^*$ 値	$a^*$ 値	$b^*$ 値	色差
100%	60.30	-12.48	50.50	-
75%	62.94*	-10.65*	57.44*	7.65*
50%	52.14*	-9.88*	43.22*	11.23*
25%	44.57*	-8.56*	35.19*	22.30*
0%	30.60*	-6.07*	20.19*	42.91*

\* $p < 0.05$  vs. シークワシャー100%果汁

<sup>a)</sup> モデル偽和果汁, カラマンシー添加果汁

## 第2項 クロマトグラフ法による真正性評価

### 1. フロレチン配糖体の TLC 分析

図 4-4 に各果汁飲料に含まれるフロレチン配糖体の TLC 分析結果を示す。フロレチン配糖体のスポットは Rf 値 0.35 に出現し、カラマンシーのハンドプレス搾汁果汁および原料果汁にも同一 Rf 値のスポットが検出された。なお、フロレチン配糖体の検出限界は 1.0 mg であった。シークワシャーのハンドプレス搾汁果汁および原料果汁からは、Rf 値 0.35 のスポットは検出されなかった。フロレチン配糖体はシークワシャーには存在せず、カラマンシーの果皮、砂じょう、葉に含まれることが報告されており<sup>86)</sup>、フロレチン配糖体はカラマンシー混入を識別する指標成分になることが確認された。本研究で用いた市販の果汁試料 A-C から Rf 値 0.35 のスポットが検出されたため、これらの果汁は少なくともシークワシャー100%果汁ではなく、カラマンシー果汁の混入が強く疑われた。一方、試料 D-J からは Rf 値 0.35 のスポットは検出されなかったことから、カラマンシー果汁の混入はないと推定された。

### 2. HPLC 分析および香気成分分析

図 4-5 にフロレチン配糖体の標準品、ハンドプレス搾汁シークワシャー果汁およびハンドプレス搾汁カラマンシー果汁の HPLC 分析によるクロマトグラムを示す。フロレチン配糖体のピークは保持時間 33.9 分に検出され、同一保持時間のピークがカラマンシー果汁からも検出された。また、シークワシャー果汁とカラマンシー果汁から検出された保持時間 39.1 分のピークは、標準品との保持時間の一致から hesperidin と同定された。表 4-4 に各果汁のフロレチン配糖体の分析結果を示した。ハンドプレス搾汁カラマンシー果汁のフロレチン配糖体は 24.4 mg/100 mL であり、原料果汁のカラマンシ

果汁では 25.5 mg/100 mL, 同様に試料 A-C では 37.2-59.2 mg/100 mL であった。また, その他の試料 (ハンドプレス搾汁および原料シークワシャー果汁, 試料 D-J) からはフロレチン配糖体は検出されず, HPLC 分析と TLC 分析 (図 4-4) では同様の結果が得られることが明示された。

以上のことから, 市販の果汁試料 A-C はカラマンシー果汁混入品であると考えられ, シークワシャー果汁の真正性評価にはフロレチン配糖体の TLC 分析法あるいは HPLC 分析法が妥当であると判断された。しかしながら, フロレチン配糖体はカラマンシーに特異的な成分であるものの, 標準物質が市販されていないため, フロレチン配糖体を識別因子とする真正性評価法は汎用性に劣る。そこで第 3 章で識別因子として有用であると判断されたポリメトキシフラボン類による真正性評価について検討した。

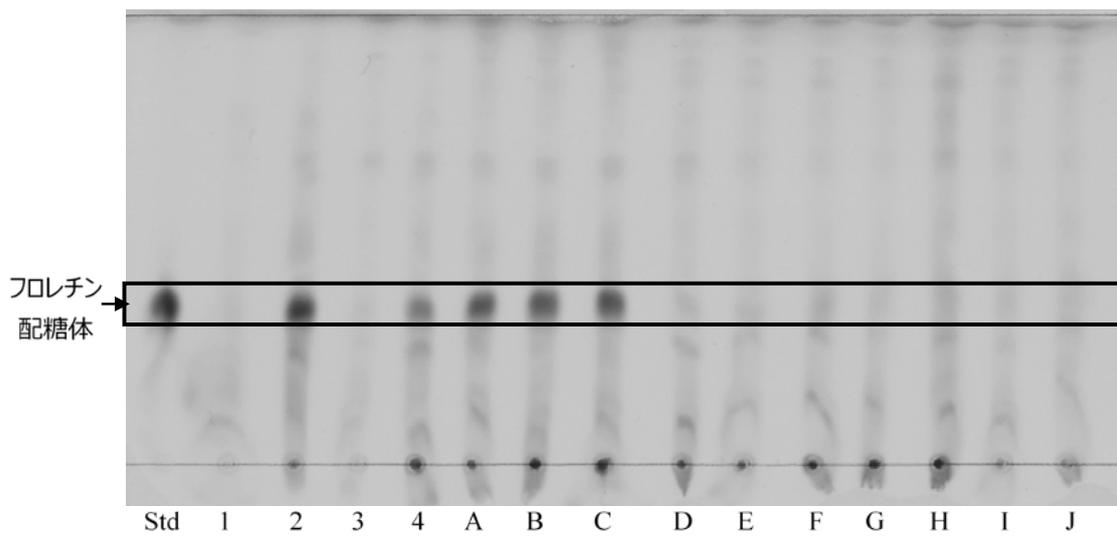


図 4-4 TLC 分析による各種果汁中のフロレチン配糖体の検出

Std, フロレチン配糖体

1, ハンドプレス搾汁シークワシャー果汁

2, ハンドプレス搾汁カラマンシー果汁

3, シークワシャー原料果汁

4, カラマンシー原料果汁

A-J, 市販果汁

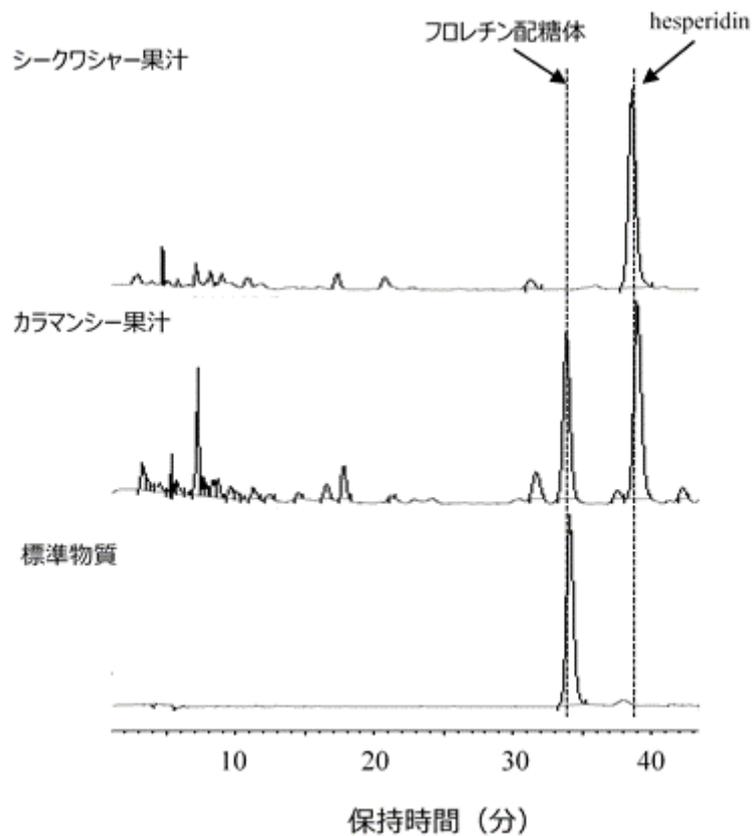


図 4-5 HPLC 分析によるシークワシャー果汁およびカラマンシー果汁中のフロレチン配糖体の検出

**【HPLC 条件】**

カラム；LiChrospher100RP-18 (250 × 4.0 mm I.D., 5 μm, Merck(株)製)

カラム温度；40°C

検出器；PDA 検出器

検出波長；286 nm

移動相；A 液 20 mM リン酸水溶液, B 液メタノール

流速；0.9 mL/min

グラジエント溶出条件；B 液濃度を 55% (0~5 分), 55→80% (5~45 分)

ポリメトキシフラボン類の HPLC 分析の結果 (図 4-6), sinensetin は保持時間 6.5 分, nobiletin は保持時間 9.0 分, tangeretin は保持時間 13.1 分にピークが検出された. ポリメトキシフラボン類の分析結果は, 表 4-4 に示したように, シークワシャー果汁は nobiletin, tangeretin および sinensetin 量がカラマンシー果汁より多く, ハンドプレス搾汁では, それぞれ 8.4 倍, 13.5 倍および 5 倍多く含有されていた. この結果は Kawaii ら<sup>30)</sup> 報告 (10.5 倍, 8.8 倍および 6 倍) と同様の傾向であった. また, 原料果汁ではポリメトキシフラボン類量の差はさらに大きかった. Pan ら<sup>103)</sup> は, ポリメトキシフラボン類の 5 つのピーク割合 (sinensetin/heptamethoxyflavone, sinensetin /tangeretin, nobiletin/sinensetin, tetramethyl-*O*-scutellarein/heptamethoxyflavone および tetramethyl-*O*-scutellarein/nobiletin) を用いた判別分析により, タンゼロ果汁が混入したオレンジ果汁の識別に成功している. そこで, ポリメトキシフラボン類量および nobiletin/tangeretin 量比を用いてシークワシャー果汁の偽和の判別分析を行った結果 (表 4-4), 判別分析により得られた判別係数を用いると, 12 試料中 11 試料がフロレチン配糖体の有無による真正性の評価と同一の結果となり, 判別率は 91.7%であった. したがって, ポリメトキシフラボン類量比を説明変数とする判別分析によりカラマンシー混入果汁を識別可能であり, 本法はシークワシャー果汁の真正性評価へ適用できると判断された.

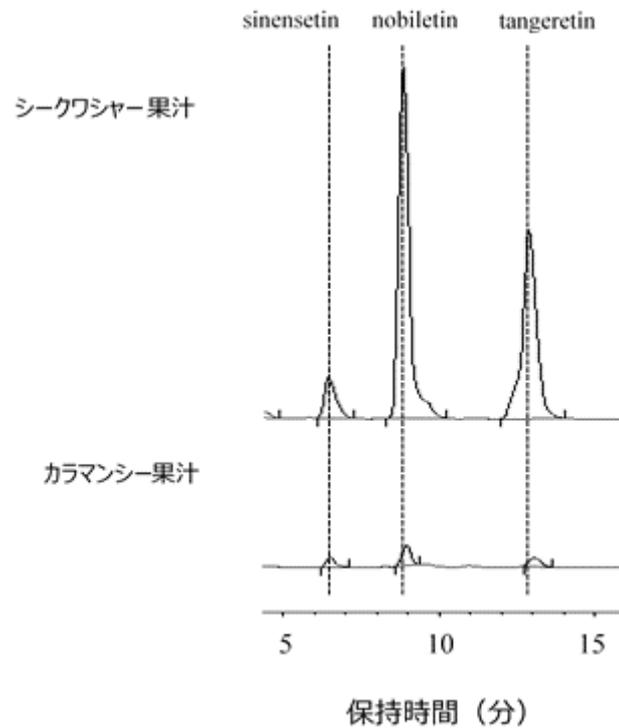


図 4-6 HPLC 分析によるシークワシャー果汁およびカラマンシー果汁中の  
ポリメトキシフラボノイドの検出

**【HPLC 条件】**

カラム；HypersilODS (150 × 4.0 mm I.D., 5 $\mu$ m, Agilent Technology(株)製)

カラム温度；40 $^{\circ}$ C

検出器；PDA 検出器

検出波長；340 nm

移動相；メタノール：10 mM リン酸 (6：4) 混合溶液  
(イソクラティック溶出)

流速；1.0 mL/min

表 4-4 シークワシャー果汁，カラマンシー果汁および市販果汁中のフロレチン配糖体とポリメトキシフラボン類量ならびにポリメトキシフラボン類の量比による判別得点

試料	TLC <sup>a)</sup>	フロレチン <sup>b)</sup>	PMF (mg/100mL) <sup>b)</sup>			nobiletin / tangeretin	判別得点 <sup>c)</sup>	
		配糖体 (mg/100mL)	nobiletin	tangeretin	sinensetin			
1	ハンドプレス搾汁 シークワシャー果汁	-	n. d. <sup>d)</sup>	5.9 ± 0.0	2.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0	2.2	
2	ハンドプレス搾汁 カラマンシー果汁	+	24.4 ± 0.5	0.7 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	4.1	
3	原料果汁 シークワシャー果汁	-	n. d.	48.8 ± 1.6	25.4 ± 0.2	2.3 ± 0.0	1.9	-1.36
4	原料果汁 カラマンシー果汁	+	25.5 ± 0.5	2.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.4 ± 0.0	2.4	0.45
A	市販果汁	+	44.1 ± 1.1	5.8 ± 0.0	2.1 ± 0.0	0.5 ± 0.0	2.7	0.69
B		+	59.2 ± 2.4	5.7 ± 0.0	1.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0	3.6	1.95
C		+	37.2 ± 0.8	5.1 ± 0.0	1.5 ± 0.0	0.2 ± 0.0	3.4	1.43
D		-	n. d.	14.4 ± 0.1	5.1 ± 0.0	0.7 ± 0.0	2.8	-0.01
E		-	n. d.	20.0 ± 0.1	7.3 ± 0.0	1.5 ± 0.0	2.7	1.39
F		-	n. d.	14.3 ± 0.0	4.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	3.0	-1.51
G		-	n. d.	11.1 ± 0.0	3.9 ± 0.0	0.5 ± 0.0	2.9	-0.12
H		-	n. d.	143.3 ± 1.5	50.1 ± 0.0	7.4 ± 0.0	2.9	-2.10
I		-	n. d.	34.8 ± 0.4	12.4 ± 0.0	1.6 ± 0.0	2.8	-0.71
J		-	n. d.	38.7 ± 0.4	12.9 ± 0.0	1.9 ± 0.0	3.0	-0.32

a) + ; スポットが検出されたもの， - ; 検出されなかったもの

b) 平均値 ± SD (n = 3)

c) 判別得点 =  $-0.269 \times \text{nobiletin} + 0.234 \times \text{tangeretin} + 3.229 \times \text{sinensetin} + 2.281 \times \text{nobiletin} / \text{tangeretin} - 6.030$

(SPSS ver. 19.0 を用いて nobiletin, tangeretin, sinensetin 含量および nobiletin/tangeretin 量比を説明変数とした判別分析を行った。判別得点は判別式に試料ごとの含量を代入し算出した。判別得点が正の場合はカラマンシー果汁，負の場合はシークワシャー果汁と判定した。)

d) 検出されず

### 3. SPME-GC 法による香気成分分析

第 3 章において、香気成分が真正性評価に有用な因子であることが判明したこと、さらに本章での官能評価においても香りが識別因子として有用であることが明示されたことから、香気成分に着目した真正性評価について検討した。

まず、SPME-GC 法によりシークワシャー果汁から 31 成分、カラマンシー果汁から 29 成分の香気成分を同定した (図 4-7, 表 4-5)。シークワシャー果汁の主な香気成分は、*d*-limonene, *p*-cymene,  $\gamma$ -terpinene および linalool であった。カラマンシー果汁では、*d*-limonene, *p*-cymene, myrcene であった。シークワシャー果汁に含まれる主な香気成分をカラマンシー果汁と比較すると、 $\gamma$ -terpinene は 26.6 倍、*p*-cymene は 5.3 倍、linalool は 2.6 倍組成比が高く、*d*-limonene は 0.5 倍、myrcene は 0.7 倍であった。このことから、シークワシャー果汁とカラマンシー果汁で組成比の差が最も大である  $\gamma$ -terpinene は、両者を識別する香気成分指標になると推察された。

そこで、 $\gamma$ -terpinene 組成比による判別分析を行った結果、表 4-6 に示したように、ポリメトキシフラボン類量による判別分析結果 (表 4-4) と同様に、12 試料中 11 試料がフロレチン配糖体の有無による真正性の評価と同一の結果となり、判別率は 91.7% であった。

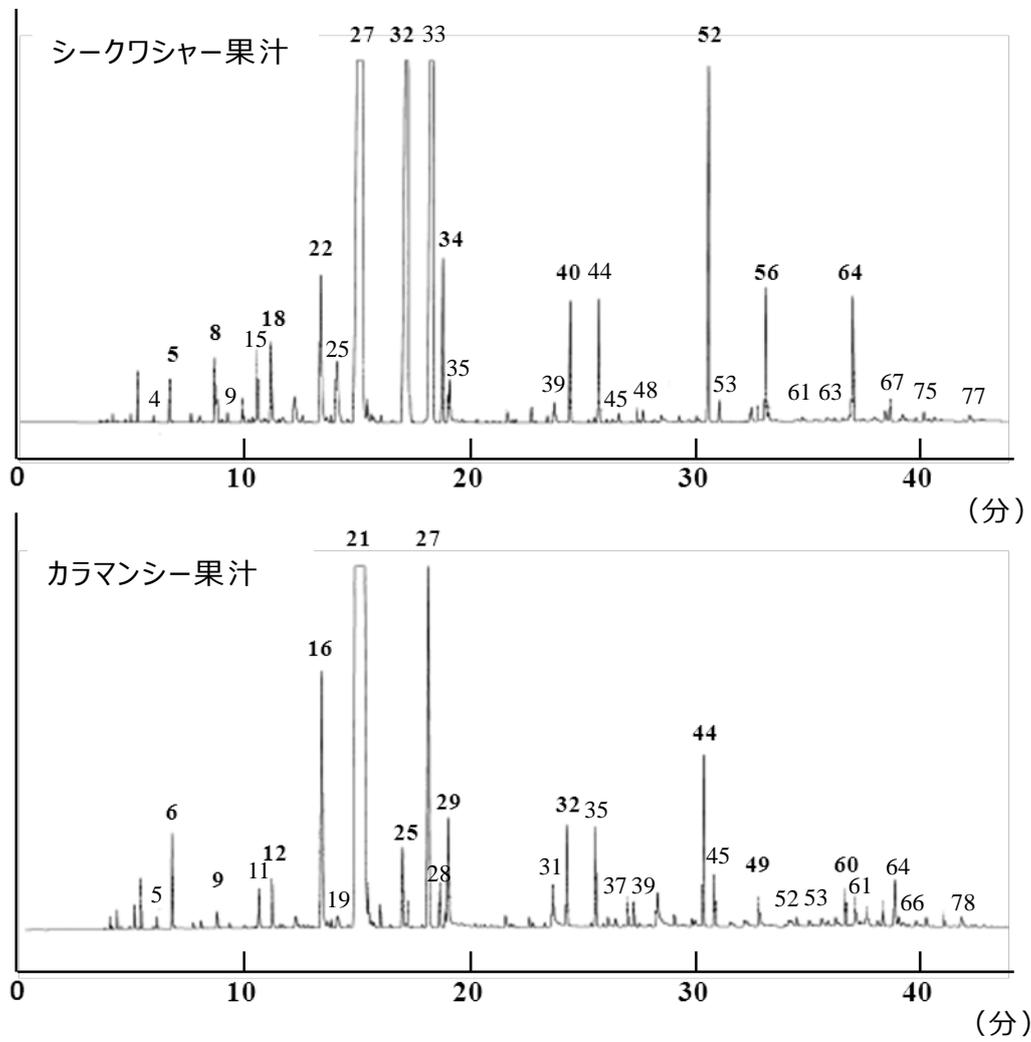


図 4-7 SPME-GC 法によるシークワシャー果汁およびカラマンシー果汁の  
 香気成分の検出

表 4-5 SPME-GC 法によるシークワシャー果汁およびカラマンシー果汁中の香気成分組成比

ピーク No. <sup>a)</sup>	香気成分	RI	シークワシャー果汁 <sup>b)</sup>	カラマンシー果汁 <sup>b)</sup>
4/5	ethyl acetate	886	0.05	0.06
5/6	ethanol	933	0.26	0.45
8/9	$\alpha$ -pinene	1025	0.45	0.15
9/-	$\alpha$ -thujene	1029	0.16	n. d. <sup>c)</sup>
15/11	hexanal	1081	0.64	0.29
18/12	$\beta$ -pinene	1114	0.88	0.38
22/16	myrcene	1168	1.99	2.72
25/19	$\alpha$ -terpinene	1182	1.23	0.18
26/20	heptanal	1185	0.07	0.04
27/21	<i>d</i> -limonene	1205	39.6	77.8
32/25	$\gamma$ -terpinene	1255	17.27	0.65
33/27	<i>p</i> -cymene	1277	20.27	3.81
34/28	terpinolene	1291	1.52	0.29
35/29	octanal	1290	0.70	1.3
39/31	nonanal	1395	0.24	0.62
44/35	1-heptanol	1458	0.09	0.1
45/37	octyl acetate	1477	0.11	0.18
47/-	$\alpha$ -copaene	1502	0.06	n. d.
48/39	decanal	1501	0.13	0.68
52/44	linalool	1550	3.54	1.34
53/45	1-octanol	1560	0.21	0.41
55/-	$\beta$ -caryophyllene	1616	0.21	n. d.
56/49	terpinene-4-ol	1608	1.41	0.30
-/52	myrtenal	1638	n. d.	0.10
61/53	$\alpha$ -caryophyllene	1685	0.08	0.14
63/56	<i>p</i> -mentha-( <i>E</i> )-2,8-dien-1-ol	1633	0.06	0.12
64/60	$\alpha$ -terpineol	1702	1.39	0.34
65/61	germacrene D	1724	0.06	0.36
-/62	<i>d</i> -carvone	1742	n. d.	0.06
67/64	$\beta$ -bisabolene	1748	0.16	0.09
-/66	$\beta$ -elemol	2086	n. d.	0.05
75/-	$\tau$ -cadinol	2180	0.13	n. d.
76/-	thymol	2185	0.14	n. d.
77/78	iso thymol	2215	0.27	0.07

a) ピーク No., 図 4-7 のシークワシャー果汁/カラマンシー果汁のピーク番号を示す

b) 果汁, ハンドプレス搾汁

c) n.d., not detected

表 4-6 シークワシャー果汁，カラマンシー果汁および市販果汁中の  
 $\gamma$ -terpinene 組成比ならびに判別得点

	試料	$\gamma$ -Terpinene <sup>a)</sup>		判別得点 <sup>b)</sup>
		組成比 (%)	(mg/L)	
1	ハンドプレス搾汁 シークワシャー果汁	17.3 ± 0.1	15.6 ± 1.1	
2	ハンドプレス搾汁 カラマンシー果汁	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.1	
3	原料果汁 シークワシャー果汁	12.3 ± 0.1	4.1 ± 0.3	1.02
4	原料果汁 カラマンシー果汁	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.1	-2.02
A	市販果汁	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.1	-2.16
B		0.1 ± 0.0	1.2 ± 0.1	-2.16
C		0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1	-2.17
D		3.4 ± 0.0	8.1 ± 0.6	-1.32
E		14.7 ± 0.1	88.4 ± 5.9	1.64
F		12.2 ± 0.1	38.4 ± 2.6	0.98
G		11.0 ± 0.1	27.7 ± 1.9	0.66
H		11.5 ± 0.1	130.3 ± 8.7	0.81
I		15.9 ± 0.1	140.4 ± 9.4	1.94
J		19.1 ± 0.1	238.7 ± 16.0	2.79

a) 平均値 ± SD

b) 判別得点 =  $0.260 \times \gamma\text{-terpinene} - 2.245$

(SPSS ver. 19.0 を用いて  $\gamma$ -terpinene 組成比を説明変数とした判別分析を行った。判別得点は判別式に試料ごとの組成比を代入し算出した。判別得点が正の場合はシークワシャー果汁，負の場合はカラマンシー果汁と判定した。)

#### 4. ポリメトキシフラボン類の量比および $\gamma$ -terpinene 組成比に基づく判別得点による真正性評価

ポリメトキシフラボン類の量比の判別得点を x 軸,  $\gamma$ -terpinene 組成比の判別得点を y 軸として散布図を作成した (図 4-8). 各シンボルを I から III の 3 つのグループに分類すると, 第 2 象限に位置するグループ I にはシークワシャー原料果汁 (試料 3) とフロレチン配糖体が存在せずシークワシャー果汁と判断された試料 F, H, I および J が属した. 第 4 象限に位置するグループ II にはカラマンシー原料果汁 (試料 4) とフロレチン配糖体が存在しカラマンシー混入果汁と判断された試料 A, B および C が属した. また, グループ III にはフロレチン配糖体が存在せずシークワシャー果汁と判断された試料 D, E および G が属しており, それらは原点付近もしくは第 1 象限にプロットされた. これら試料はシークワシャー原料果汁と比較すると, ポリメトキシフラボン類量 (表 4-4) が少なく,  $\gamma$ -terpinene 組成比 (表 4-6) が低いという特徴があった. したがって, 2 種の判別得点による散布図では第 4 象限に位置する試料はカラマンシー混入果汁であり, 第 2 象限に位置する試料はシークワシャー果汁と識別できると推察された. また, グループ III に属する試料はフロレチン配糖体が検出されなかったため, シークワシャー果汁と推定され, ポリメトキシフラボン類量比もしくは  $\gamma$ -terpinene 組成比のいずれか一方の判別係数に基づく真正性評価において誤識別の可能性が示唆された. なお, 混入される果汁がカラマンシー果汁に限定されない場合, 他のカンキツ類の混入も想定される. 沖縄県在来カンキツであるカーブチー (*Citrus keraji hort. ex Tanaka*) あるいはオートー (*Citrus oto hort. ex Yu. Tanaka*) は, シークワシャー果汁と比較するとポリメトキシフラボン類量が少ない<sup>104)</sup>ため, これら在来カンキツ果汁の混入を疑うことができる. しかしながら, これらの栽培量は非常に少ないため, シークワシャー偽和の原料

果汁としての利用することは商業上、合理的ではないため、その可能性は極めて低いと推測されるが、図 4-8 において第 2 象限あるいは第 4 象限に属さない試料はカラマンシー以外の果汁が混入している可能性も否定できない。

以上より、クロマトグラフ法を用いると、フロレチン配糖体の有無やポリメトキシフラボン類量比および  $\gamma$ -terpinene 組成比を用いた判別分析によってシークワシャー果汁の真正性を評価可能であることが明示された。しかしながら、これまでの識別法では実用的ではあるが検出感度が低く、僅少量のカラマンシー果汁の混入を識別できないという問題点が残っているため、次に DNA マーカーによる真正性評価法を検討した。

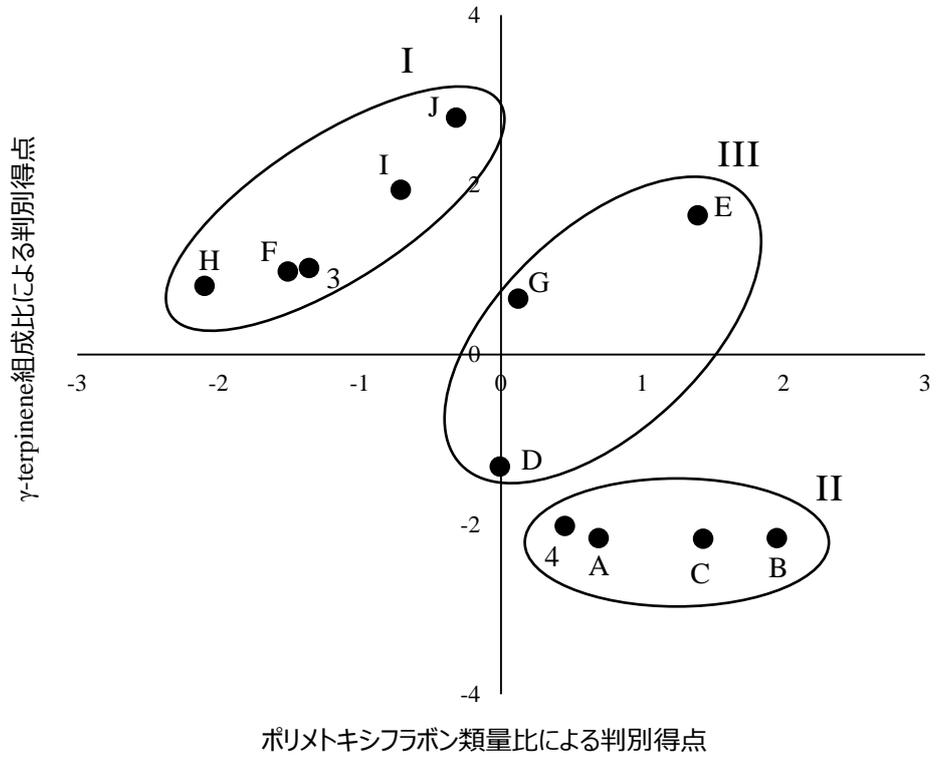


図 4-8 ポリメトキシフラボン類量比および  $\gamma$ -terpinene 組成比による判別得点を用いた散布図

- 3, シークワシャー原料果汁
- 4, カラマンシー原料果汁
- A-J, 市販果汁

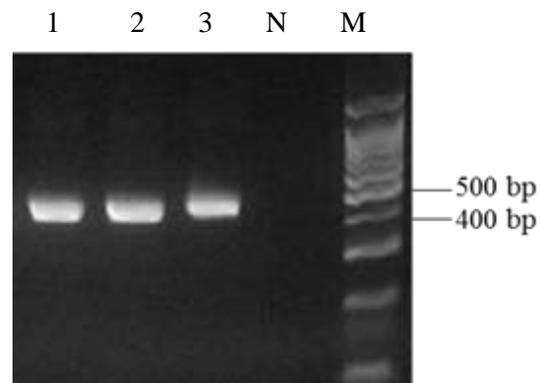
### 第3項 DNA マーカーによる真正性評価

#### 1. *trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域の増幅

*trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域は *trnL* (tRNA-Leu), *trnF* (tRNA-Phe) および *trnT* (tRNA-Thr) 遺伝子の遺伝子間スペーサー領域 (IGS 領域) である。IGS 領域などの非コード領域は、コード領域に比べて分子進化の速度が比較的速く、一塩基多型が起り易いことから、本研究で対象領域として選定した。

シークワシャーおよびカラマンシーの果皮中の DNA について *trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域を増幅した結果を図 4-9 に示す。*trnL-trnF* 領域では、すべての試料において約 450 bp の位置に DNA 断片のバンドが確認された。*trnL-trnF* 領域で増幅させた塩基鎖長は 437 bp であることから、増幅 DNA 断片が当該領域であると推察された。また、*trnT-trnL* 領域においては、すべての試料において約 1,100 bp の位置に DNA 断片のバンドが認められた。*trnT-trnL* 領域で増幅させた塩基鎖長は 1,121 bp であることから、増幅 DNA 断片が当該領域であると推察された。

*trnL-trnF*



*trnT-trnL*

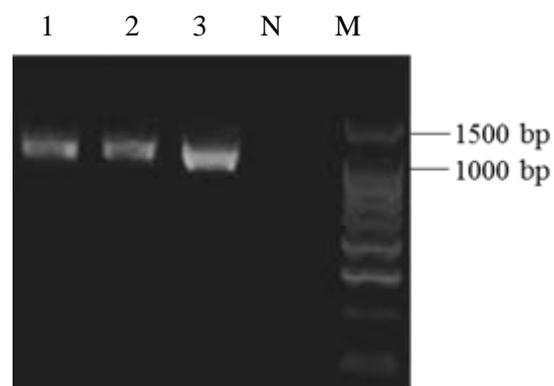


図 4-9 *trnL-trnF* および *trnT-trnL* 領域特異的プライマーによる果皮から調製した DNA を鋳型とした増幅結果

M, 100 bp DNA ladder

1, 沖縄産シークワシャー果皮

2, 沖縄産カラマンシー果皮

3, 台湾産カラマンシー果皮

N, ネガティブコントロール

## 2. *trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域のアライメントの作成

得られた *trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域の PCR 増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定した (DDBJ 登録番号: *trnL-trnF*, シークワシャー, LC377852~LC377858; カラマンシー, LC377859, LC377860; *trnT-trnL*, シークワシャー, LC377861~LC377867; カラマンシー, LC377868, LC377869). 決定された配列長は *trnL-trnF* においては 294~321 bp の範囲であり, *trnT-trnL* においては 473~481 bp の範囲であった. *trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域の塩基配列は DNA データバンク DDBJ に登録されている *Citrus sinensis* (登録番号; DQ864733) の塩基配列との比較により, アライメントを作成した (図 4-10). その結果, 第 3 項 1 で増幅した *trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域の DNA 断片は目的の領域を増幅したものであることが確認された. また, この配列はシークワシャーとカラマンシーとの間でかなり保存されていたが, *trnL-trnF* 領域では *Citrus sinensis trnL-trnF* 領域の 51,403 番目の位置に, *trnT-trnL* 領域では *Citrus sinensis trnT-trnL* 領域の 50,268 番目の位置に, カラマンシーに特異的な SNP が検出された. そこで識別用プライマーは, 3'末端の塩基を *trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域のアライメントから見出された種特異的 SNP に対応させた. また, バックグラウンド増幅抑制のため, 3'末端から 3 番目の位置に mismatches 塩基を導入した. 以上より, シークワシャーとカラマンシーを識別するプライマーを表 4-7 に示すように設計した.

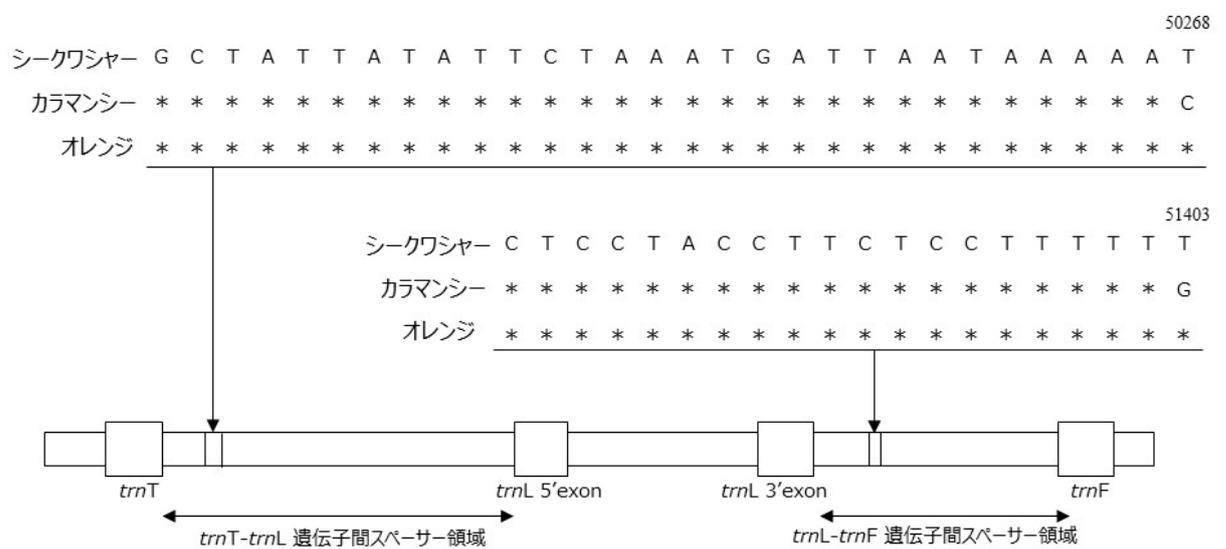


図 4-10 *trnL-trnF* および *trnT-trnL* 領域における SNP の位置関係

図中の数値は *Citrus sinensis* (オレンジ) (DQ864733.1) と対応する位置を示している。アスタリスクはシークワシャーと同じ塩基であることを示す。

表 4-7 シークワシャーとカラマンシーとの識別用プライマー

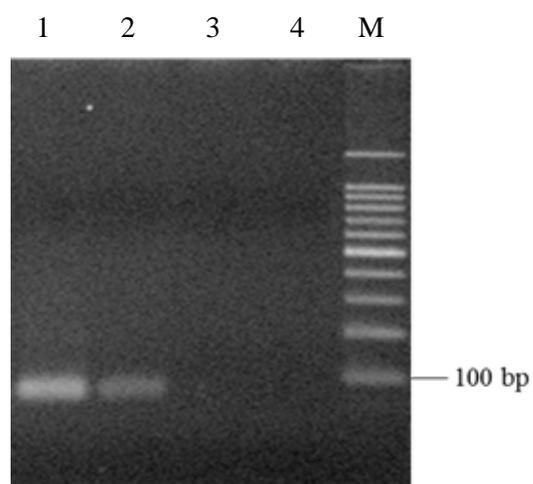
位置	増幅サイズ	プライマー名	配列
シークワシャー <i>trnL-trnF</i>	76 bp	CiDeLF-F	5'-CTCCTACCTTCTCCTTTT <u>aT</u> -3'
		CiDeLF-R	5'-GGAAATGGAAAAGAGTAGGATAG-3'
カラマンシー <i>trnT-trnL</i>	105 bp	CiMaTL-F	5'-GCTATTATATTCTAAATGATTAATAAA <u>tA</u> C-3'
		CiMaTL-R	5'-CCTTAAGGAAGAACCTATAT-3'

下線の箇所が SNP の塩基，小文字の塩基はミスマッチ塩基を示す。

### 3. アリル特異的 PCR 法を用いた果実の識別

設計した識別用プライマーの有用性を確認するため、シークワシャーおよびカラマンシー果皮中の DNA へ適用し、識別用プライマーを用いた DNA 増幅を行った。図 4-11 に DNA 増幅断片の電気泳動結果を示した。シークワシャー識別用マーカの CiDeLF を用いると、シークワシャー試料である 1, 2 レーンで約 80 bp (理論鎖長 76 bp) の位置に DNA 増幅断片のバンドが検出され、カラマンシー試料である 3, 4 レーンではバンドは検出されなかった。一方、カラマンシー検出用マーカの CiMaTL を用いると、シークワシャー試料である 1, 2 レーンでバンドは認められず、カラマンシー試料である 3, 4 レーンでのみ約 100 bp (理論鎖長 105 bp) の位置に DNA 増幅断片のバンドが検出された。以上のことから、設計した識別用プライマーの CiDeLF ではシークワシャーのみを、CiMaTL ではカラマンシーのみを検出することが確認され、両者の識別に有用であることが示された。

CiDeLF



CiMaTL

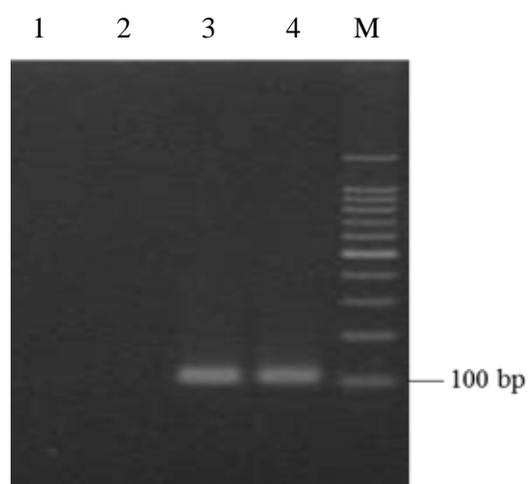


図 4-11 識別用プライマーによる果皮から抽出した  
DNA を鋳型とした増幅結果

M, 100 bp DNA ladder

- 1, 沖縄産シークワシャー果皮
- 2, 台湾産シークワシャー果皮
- 3, 沖縄産カラマンシー果皮
- 4, 台湾産カラマンシー果皮

#### 4. アリル特異的 PCR 法による原料果汁の識別

本研究で設計した識別用プライマーの有効性が果皮において確認されたことから、原料果汁への適用を試みた結果、DNA 増幅断片は検出されなかった（データは示さない）。一般に、果汁から加工した製品中の DNA は、搾汁や加熱などの製造過程における物理的刺激や化学反応により分解することが多い<sup>105)</sup>。そのため、果皮と同様の方法では、DNA の断片化や果汁中の夾雑成分による阻害などの要因で目的とする DNA 断片の増幅は困難であると考えられた<sup>106)</sup>。このことを解決するため、糖類やタンパク質等の夾雑成分を酵素処理した後に DNA を抽出する方法が知られているが<sup>107)</sup>、前処理に時間を要することが欠点として挙げられる。そこで、微量に存在する DNA から高分子量 DNA を増幅し、本研究で設計した識別用プライマーを用いたアリル特異的 PCR 法により原料果汁の識別を試みた。その結果、図 4-12 に示すように、識別用プライマーである CiDeLF を用いた場合、シークワシャー原料果汁では約 80 bp の DNA 増幅断片が検出され（レーン 1）、一方、カラマンシー原料果汁ではバンドは検知されなかった（レーン 2）。CiDeLF では増幅される DNA 鎖長の理論値が 76 bp であることから、シークワシャー特異的な DNA 断片が増幅可能であることが原料果汁においても明示された。CiMaTL を用いた場合、カラマンシー原料果汁では約 110 bp の DNA 増幅断片が検出されたが（レーン 6）、シークワシャー原料果汁では検知されなかった（レーン 5）。CiMaTL では増幅される DNA 鎖長の理論値が 105 bp であることから、カラマンシー特異的な DNA 断片が増幅可能であることが原料果汁においても明示された。これらの結果から、識別用プライマーを用いることによりシークワシャー果汁飲料の真正性が評価可能であることが示唆された。

CiDeLF

CiMaTL

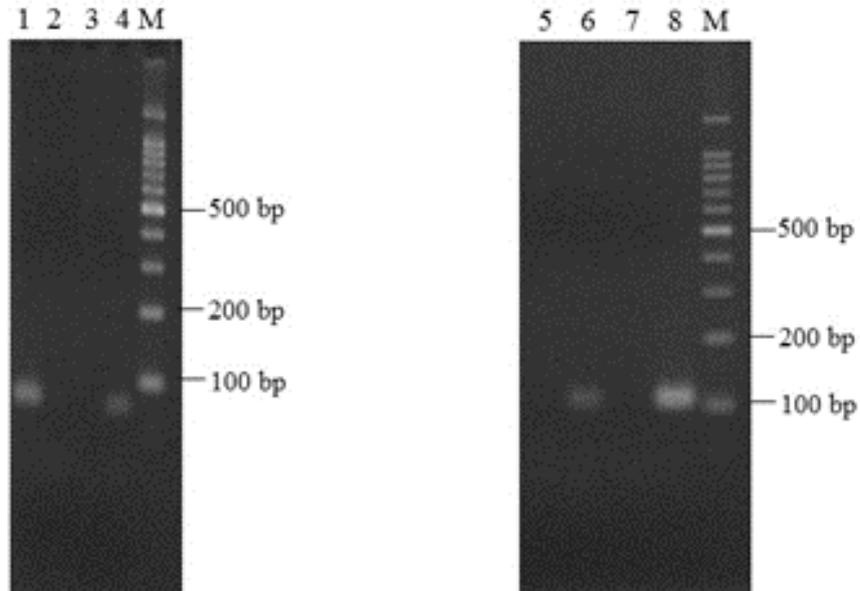


図 4-12 識別用プライマーによる原料果汁から調製した DNA を鋳型とした増幅結果

M, 100 bp DNA ladder

- 1, シークワシャー原料果汁
- 2, カラマンシー原料果汁
- 3, ネガティブコントロール (カラマンシー果皮)
- 4, ポジティブコントロール (シークワシャー果皮)
- 5, シークワシャー原料果汁
- 6, カラマンシー原料果汁
- 7, ネガティブコントロール (シークワシャー果皮)
- 8, ポジティブコントロール (カラマンシー果皮)

#### 第4節 小括

We attempted to develop a method using chemical markers to evaluate authenticity of shiikuwasha juice. First, we aimed to determine a range that could identify the shiikuwasha juice and calamondin juice using a scale based on sensory evaluation. Model fruit juice with different concentrations of shiikuwasha juice was prepared and sensory evaluation was used to distinguish between 100% shiikuwasha juice and model juice mixed with more than 50% calamondin juice. Sensory evaluation and colorimetric value were considered to be important in helping consumers to determine fruit juice quality and whether the juice was authentic shiikuwasha juice. In addition, calamondin juice mixed with a small amount of shiikuwasha juice has been sold. To determine whether it contains actual shiikuwasha juice, its volatile components were measured. As a result,  $\gamma$ -terpinene and linalool were newly identified as possible chemical indicators that could detect a small amount of shiikuwasha juice in calamondin juice.

To detect phloretin dihydrochalcone glycosides that are normally not found in shiikuwasha juice, methods using thin layer chromatographic analysis and high-performance liquid chromatographic analysis were applied. Discriminant analysis was carried out by examining the difference in polymethoxylated flavone content and the composition ratio of  $\gamma$ -terpinene, a characteristic volatile component of shiikuwasha juice to obtain a discriminant predictive value of 90% or more. Applications using commercially available fruit juice were confirmed and it was considered that two different discrimination scores could more accurately identify calamondin juice contamination.

Further, partial regions of chloroplast DNA are widely used to classify plants based on genus and species. Nucleotide sequences of the *trnL-trnF* and *trnT-trnL*

regions, which are noncoding regions of chloroplast DNA, were determined. Additionally, specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected between shiikuwasha and calamondin from the prepared alignment. Based on the SNP found, we designed a primer (DNA marker) which is specifically amplified only when it coincides with the SNP, and developed an allele-specific PCR method for distinguishing shiikuwasha from calamondin. A general observation is that amplification of DNA from fruit juice products is difficult because the template DNA is fragmented under the influence of heating during the manufacturing process. DNA markers designed for these purposes target chloroplast DNA in relatively high abundance so that fruit juice products can be tested, and the amplification sizes set for CiDeLF and CiMaTL were relatively small at 76 bp and 105 bp, respectively. It was suggested that an allele-specific PCR method using prepared primers could clearly distinguish between shiikuwasha and calamondin.

In conclusion, the sensory evaluation and instrument analysis methods for flavonoids and aroma components as indicators were able to easily evaluate the authenticity of shiikuwasha juice. In addition, using the DNA discrimination method, it was shown that it is possible to perform an authenticity evaluation for a small amount of contaminated juice.

## 第5章 総括

食関連業界にとって信頼性の確保は不可欠であり，原材料の異種混合や産地および期限表示の偽装はその根幹を揺るがす極めて重大な問題である．特に，オレンジなどのカンキツ類は種類が多く，意図的にあるいは偶発的に偽和が懸念される食品素材である．中でも，シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) は抗がん作用や抗炎症作用などの健康機能をもつことが報告されていることから需要が急増する一方で，慢性的な原料不足となっていた．そのため供給不足を補うためにシークワシャーの代わりにカラマンシー (*Citrus madurensis* Lour.) をシークワシャーと偽称して輸入し，シークワシャー果汁に混入して販売する原材料を偽装した偽和果汁の流通が横行していた．シークワシャーとカラマンシーの果汁は類似した性状を示すため，カラマンシー果汁が混入したシークワシャー果汁を外観から識別することは困難である．そのため本研究では，シークワシャー果汁の真正性を評価することを目的として，果汁の官能特性ならびに品質成分に着目したシークワシャー果汁とカラマンシー果汁の識別および偽和果汁の判定に関する分析法の開発を試みた．

まず，第2章ではシークワシャーを含むカンキツ摂取の有用性を明らかにすることを目的として，カンキツ果汁の摂取によるストレス緩和効果をヒト試験で検証した．試験飲料にはシークワシャーと同様の香気成分組成を示す日本固有の香酸カンキツであるユズの果汁入り飲料を用いた．被験者に試験飲料を摂取させた後，単純作業による精神的ストレスを負荷する試験を実施した．ストレス負荷試験では，評価指標として心拍変動および脳波を測定した．その結果，ユズ果汁入り飲料を摂取することでストレス緩和を示す副交感神経活動の亢進および $\alpha$ 波の増加が確認されたことから，カンキツ果汁の

摂取は香気成分の鼻孔からの吸引と同様にストレス緩和効果を示すと推測された。

次に第3章では、最も消費量が多い輸入オレンジ果汁を対象として、果汁の真正性を評価可能な品質因子を明らかとするため、色調、糖、有機酸、フラボノイドおよび香気成分を分析し、個別の指標が真正性評価に適用できるかを考察するとともに、産地判別手法として用いられている元素濃度および重元素同位体比について検討を加えた。試料は産地の異なる5か国合計36種類の冷凍濃縮オレンジ果汁を用い、欧州の果汁ガイドラインであるAIJNに準拠し、糖用屈折計示度が11.2°Birxとなるように希釈して分析に供した。各種の項目・成分の測定結果から、色調は産地間で大きな差は確認されず、色調だけで真正性を判断するのは困難であると考えられた。糖類組成比は真正性の評価指標の候補であったが、一次代謝産物である糖類は果実の栽培条件や熟度などによる変動が危惧されたため、糖類組成比のみで真正性を評価するのは困難であると判断した。有機酸量は産地間での差異が確認されたことから、産地判別に用いることが可能と推察されたが、糖類と同様な理由により真正性評価には適さないと考えられた。糖類や有機酸類と比較してフラボノイドや香気成分などの二次代謝産物は、カンキツの種類により組成や含量の差異が大きい一方、それら同一産地内ではその含量の変動が小さいことから、産地判別に利用できる可能性が示唆されたが、単一の成分を因子として真正性を識別することは困難であると考えられた。産地判別に利用されている元素濃度および重元素同位体比では、Srの同位体比とSrおよびRb濃度を用いることで一部の産地に限ると産地判別できることが判明した。個別解析による真正性評価の結果から、単一の成分因子では評価が困難であると判断されたため、次に主成分分析法を用いてさらなる検討を行った。59項目の品質成分値による主成分分析を行った結果、産地の違いが第1主成分

(寄与率 29.72%) および第 2 主成分 (寄与率 10.93%) によって説明可能となった。第 1 主成分で寄与度の高い成分は, *d*-limonene(主成分負荷量, 0.947) などの香気成分や nobiletin (0.771) などのフラボノイドであり, 第 2 主成分では糖類であった。しかしながら, 糖類は果実の栽培条件や熟度などの影響を受け易いため, 変動が小さい香気成分やフラボノイドなどの二次代謝産物が, 判別因子として有用であると判断し, シークワシャーの真正性を評価するための指標として選定した。

第 4 章では, シークワシャー果汁の真正性の評価法を設定するために, 官能評価法, クロマトグラフ法および DNA 識別法について検討した。官能評価法では, シークワシャー果汁にカラマンシー果汁を混合したモデル偽和果汁を調製し, 3 点識別法およびシェッフエの対比較法を実施した。3 点識別法ではカラマンシー果汁の 50%以上の混入は有意水準 1%で識別可能であった。また, シェッフエの対比較法により, 官能評価では色調と香りが有用な識別因子であることが示された。しかしながら, 官能評価法では 50%未満のカラマンシー混入は識別困難なため, 次に分析機器による評価法を検討した。果汁の真正性を評価する上で最も確実性が高い方法は, その果汁に固有な成分もしくは両果汁で含量が異なる成分に着目した分析法である。カラマンシーに固有な成分である 3', 5'-di-C- $\beta$ -glucopyranosylphloretin (フロレチン配糖体) を識別指標として, 簡易分析可能な薄層クロマトグラフ (TLC) 法により混入識別可能なことを示した。TLC 法では, 1.0 mg 以上のフロレチン配糖体がスポットできれば偽和果汁が識別可能であることを示した。さらに, 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法においても TLC 法と同様にフロレチン配糖体の識別成分因子としての有用性が示された。次いで, 第 3 章でフラボノイドや香気成分が真正性の識別因子となり得ることが示唆されたことから, 3 種のポリメトキシフラボン類(nobiletin, tangeretin および sinensetin)

量およびシークワシャーに特徴的な香気成分である  $\gamma$ -terpinene を指標とした判別分析を試みた。ポリメトキシフラボン類量比による判別分析と、 $\gamma$ -terpinene 組成比を用いた判別分析では、原料果汁および市販果汁の 12 試料中 11 試料（判別率 91.7%）において、フロレチン配糖体の有無による真正性の評価と同一の結果が得られ、ポリメトキシフラボン類量比および  $\gamma$ -terpinene 組成比に基づき、カラマンシーの混入が識別可能であることが示された。

さらに、シークワシャー果汁へのカラマンシー果汁の微量混入および栽培気候や品種、熟度などによる成分の変動により識別が困難になることが懸念されるため、変化が小さいと想定される葉緑体 DNA を識別指標とする DNA 識別法の検討を行った。品種識別に多用されている葉緑体 DNA の遺伝子間スペーサー領域である *trnL-trnF*, *trnT-trnL* 領域を目的領域として、シークワシャーとカラマンシーの塩基配列を比較した。果汁製造過程での加熱処理による DNA 断片化を勘案して短鎖配列で識別可能となるように、両者の一塩基多型 (SNP) を見出し、各 SNP をターゲットに含む 2 種類の識別用プライマー (CiDeLF および CiMaTL) を新たに設計した。プライマーの有用性を確認するために果皮から精製した DNA を鋳型として、アレル特異的 PCR 法で検討した結果、CiDeLF ではシークワシャーに対して、CiMaTL ではカラマンシーに対して特異的な DNA 断片の増幅が確認され、両者は明確に識別できることが示された。また、少量の DNA しか含まれない原料果汁においても、あらかじめ DNA を増幅させる操作を加えることで果皮と同様に識別可能であることを明示した。

以下に本研究で設定したシークワシャーの真正性評価法の特徴をまとめる。

1. 官能評価法は機器が不要なため最も低コスト、かつ容易な手法である。

色調と香りを評価項目とすることでカラマンシー果汁が50%以上混入している場合は真正性を識別できた。しかしながら、50%以下の混入に対しては対応不可能であり、パネリストの育成が不可欠な点に留意する必要がある。

2. クロマトグラフ法のうち TLC 法は高額な機器が不要であり、果汁製造現場で利用可能な手法である。カラマンシー固有成分であるフロレチン配糖体を分析することで、カラマンシーの混入を判断可能であった。HPLC 法は装置が高額であるが TLC 法より検出感度が高いため、より微量な混入が識別可能であった。しかしながら、フロレチン配糖体の標準物質は市販されていない点に留意する必要がある。
3. フロレチン配糖体が入手不可の場合、HPLC 法と GC 法による識別が可能であった。それぞれポリメトキシフラボン類量比と  $\gamma$ -terpinene 組成比による判別分析で真正性が評価可能であった。保有する分析機器に応じてポリメトキシフラボン類または  $\gamma$ -terpinene を判別因子として識別可能であるが、両者の値を用いることで識別の精度は高まった。
4. DNA 識別法は僅微量な混入に対応できた。DNA 識別法では両者の識別用プライマーを用いることで他の手法と大きく異なりシークワシャー100%果汁、カラマンシー100%果汁あるいはカラマンシー混入果汁として識別可能であった。しかしながら、混入されたカラマンシー果汁の割合は求めることができず、特殊な機器や技術を要する点に留意する必要がある。

以上、本研究では果汁製造の現場で簡易に利用可能である官能評価法や TLC 法ならびに研究施設で利用可能な高感度な分析機器を用いた真正評価法を提示した (図 5-1)。そのため、これら評価法は生産・加工・流通に至る幅広い現場において活用されることが期待される。また、提示した方法はシ

ークワシャー果汁とカラマンシー果汁に限定されるものではなく、フロレチン配糖体などの固有成分やポリメトシキフラボン類や  $\gamma$ -terpinene など含量の差異が大である成分を見出すことで、他のカンキツ類の識別にも応用可能であることから、果実飲料分野での展開が大いに期待できる。

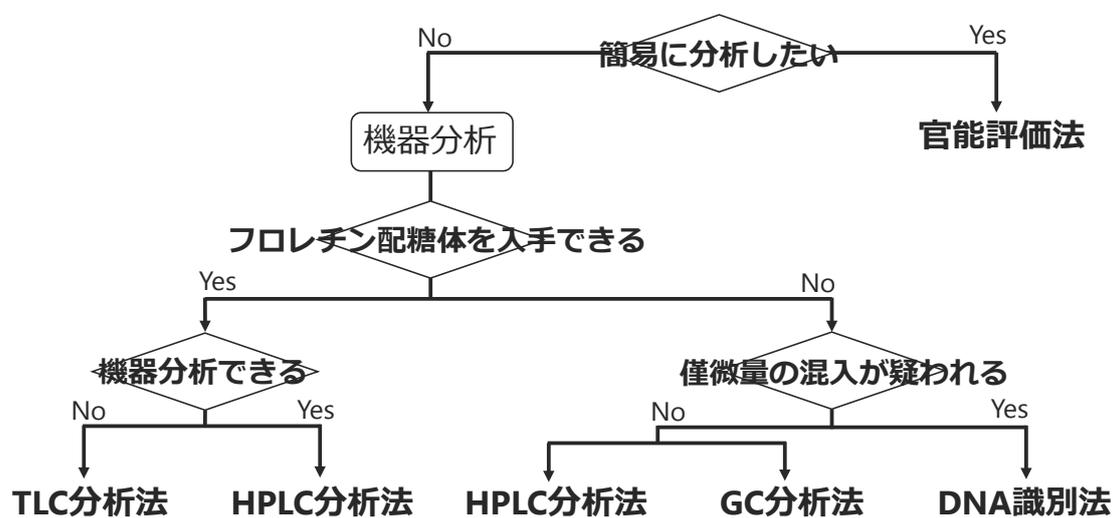


図 5-1 シークワシャー果汁の真正性評価法の選択基準

## 謝辞

本学位論文を作成するにあたり、終始変わらぬ御懇意な御指導、御鞭撻を賜りました九州大学大学院農学研究院教授 松井利郎先生に衷心より感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、御校閲の労をお取りくださいました九州大学大学院農学研究院教授 宮本敬久先生ならびに同准教授 本城賢一先生に厚く御礼申し上げます。

また、本論文の取りまとめに際し、貴重な御助言を賜りました中村学園大学名誉教授 太田英明先生ならびに同教授 沖智之先生に心より感謝いたします。

また、本研究にあたり多大なる御鞭撻を下さいました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹茶業研究部門 小川一紀先生、テクノ・サイエンスローカル事務所 小宮山美弘先生、広島国際大学医療栄養学部教授 坂本宏司先生、日本大学生物資源科学部教授 松藤寛先生をはじめ中村学園大学食品加工学研究室の皆様心より感謝申し上げます。

さらに、試料を提供し、研究に御協力下さいました沖縄県農業研究センターおよび一般社団法人日本果汁協会の関係者の皆様に深甚なる謝意を表します。

## 参考文献

- 1) Tanaka, T. (1969). Taxonomic problem of Citrus fruits in the Orient. *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B*, **21**, 139-145.
- 2) 果樹園芸大辞典, 第 2 次訂正追補 (1991). 果樹園芸大辞典編集委員会編, pp.1055-1063.
- 3) 農林水産省, 平成 29 年産果樹生産出荷統計.  
[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_kazyu/index.html#r](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kazyu/index.html#r) (2018).
- 4) 一般社団法人全国清涼飲料工業会編 (2017). 「2017 年版清涼飲料水関係統計資料」, 大應, pp.56-59.
- 5) 川久保篤志 (2014). 山間地域における果樹・加工品開発と地域存続力の構築. *東洋法学*, **57**, 33-206.
- 6) 内田純一 (2008). 地域ブランド創造の戦略. *大交流時代における観光創造*, **70**, 119-138.
- 7) 大芝周子 (2016). 特産品の地域ブランド戦略: 広島レモンの事例から. *経済学論集*, **87**, 23-40.
- 8) 藤田哲 (2003). 「新訂版食品のうそと真正評価～消費者と公正な業者を守るために～」, (株)エヌ・ティー・エス, pp.77-106.
- 9) Federal Food, Drug, and Cosmetic Act Chapter IV: Food.  
<http://uscode.house.gov/view.xhtml?req=granuleid:USC-prelim-title21-section342&num=0&edition=prelim> (2018).
- 10) 木村容子 (2016). 特集 食品表示に関する法: 最近の改正法を中心に. *Libra: The Tokyo Bar Association Journal*, **16**, 2-25.
- 11) 古野三喜生, 岩村高廣 (2008). 偽和果汁へいざなう現行関税率表等の諸問題. *果汁協会報*, **601**, 1-15.

- 12) 太田英明 (2003). 長寿・沖縄における食と伝統的食材—スローフードとシークワシャー. *都市科学(URC)*, **56**, 33–37.
- 13) 矢野昌充 (2006). カラマンシー混入果汁の簡易識別法. *今月の農業*, **3**, 72–75.
- 14) Moshonas, M. G. and Shaw, P. E. (1996). Volatile components of calamondin peel oil. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1105–1107.
- 15) Shie, P. H., Huang, R. L. and Lay, H. L. (2013). The flavonoids in *Citrus madurensis* Lour and their anti-hepatitis B virus activity. *Pharm. Anal. Acta.*, **4**, 239.
- 16) Takeuchi, H., Ubukata, Y., Hanafusa, M., Hayashi, S. and Hashimoto, S. (2005). Volatile constituents of calamondin peel and juice (*Citrus madurensis* Lour.) cultivated in the Philippines. *J. Essent. Oil Res.*, **17**, 23–26.
- 17) Kirit, A. B. and Özdemir, Y. (2007). Organic acids, sugars, amino acids and flavonoids in Turkish orange juices and characterization for adulteration. *Adv. Food Sci.*, **29**, 35–41.
- 18) Ježek, J. and Suhaj, M. (2001). Application of capillary isotachopheresis for fruit juice authentication. *J. Chromatogr. A*, **916**, 185–189.
- 19) Le Gall, G., Puaud, M. and Colquhoun, I. J. (2001). Discrimination between orange juice and pulp wash by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy: Identification of marker compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 580–588.
- 20) Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: a Global Perspective  
The Third Expert Report. <https://www.wcrf.org/dietandcancer/summary-third-expert-report> (2018).
- 21) Lam, L. K. T., Li, Y. and Hasegawa, S. (1989). Effects of citrus limonoids on glutathione S-transferase activity in mice, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 878–

880.

- 22) Tsushima, M., Maoka, T., Katsuyama, M., Kozuka, M., Matsuno, T., Tokuda, H. and Iwashima, A. (1995). Inhibitory effect of natural carotenoids on Epstein-Barr virus activation activity of a tumor promoter in Raji cells. A screening study for anti-tumor promoters. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 227–233.
- 23) Nishino, H., Murakoshi, M., Ii, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M. and Yogosawa, S. (2002). Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.*, **21**, 257–264.
- 24) Tanaka, T., Kohno, H., Murakami, M., Shimada, R., Kagami, S., Sumida, T., Azuma, Y. and Ogawa, H. (2000). Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by mandarin juices rich in  $\beta$ -cryptoxanthin and hesperidin. *Int. J. Cancer*, **88**, 146–150.
- 25) Sugiura, M., Nakamura, M., Ogawa, K., Ikoma, Y. and Yano, M. (2012). High serum carotenoids associated with lower risk for bone loss and osteoporosis in post-menopausal Japanese female subjects: prospective cohort study. *PLoS One*, **7**, e52643.
- 26) Murakami, A., Nakamura, Y., Torikai, K., Tanaka, T., Koshiba, T., Koshimizu, K., Kuwahara, S., Takahashi, Y., Ogawa, K., Yano, M., Tokuda, H., Nishino, H., Mimaki, Y., Sashida, Y., Kitanaka, S. and Ohigashi, H. (2000). Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Res.*, **60**, 5059–5066.
- 27) Minagawa, A., Otani, Y., Kubota, T., Wada, N., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Okada, Y., Fujii, M., Yano, M., Sato, T., Ito, A. and Masaki, K. (2001). The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**, 1322–

1328.

- 28) Suzuki, R., Kohno, H., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Yano, M., Tokuda, H., Nishino, H. and Tanaka, T. (2004). Citrus nobiletin inhibits azoxymethane induced large bowel carcinogenesis in rats, *Biofactors*, **22**, 111–114.
- 29) Li, S., Sang, S., Pan, M. H., Lai, C. S., Lo, C. Y., Yang, C. S. and Ho, C. T. (2007). Anti-inflammatory property of the urinary metabolites of nobiletin in mouse. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 5177–5181.
- 30) Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. and Yano, M. (1999). Quantitation of flavonoid constituents in *Citrus* fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3565–3571.
- 31) Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., Koizumi, M., Ito, C. and Furukawa, H. (2000). Quantitative study of flavonoids in leaves of *Citrus* plants. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3865–3871.
- 32) Kamiyama, S. (1970). Studies on leaf oils of *Citrus* species: Part IV Composition of leaf oils from Funadoko-mikan, Sanbokan, Kawabata-mikan, Shiikuwasha, Yuzu and Otaheite-orange. *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1561–1568.
- 33) 消費者庁, 機能性表示食品制度届出データベース.  
[http://www.caa.go.jp/policies/policy/food\\_labeling/foods\\_with\\_function\\_claims/](http://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_with_function_claims/) (2018).
- 34) Yamaguchi, M., Igarashi, A., Uchiyama, S., Sugawara, K., Sumida, T., Morita, S., Ogawa, H., Nishitani, M. and Kajimoto, Y. (2006). Effect of  $\beta$ -cryptoxanthin on circulating bone metabolic markers: intake of juice (*Citrus unshiu*) supplemented with  $\beta$ -cryptoxanthin has an effect in menopausal women. *J. Health Sci.*, **52**, 758–768.

- 35) Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Tanaka, T. and Ogawa, H. (1997). Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*, **18**, 957–965.
- 36) Mulvihill, E. E., Burke, A. C. and Huff, M. W. (2016). Citrus flavonoids as regulators of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Annu. Rev. Nutr.*, **36**, 275–299.
- 37) Assini, J. M., Mulvihill, E. E. and Huff, M. W. (2013). Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.*, **24**, 34–40.
- 38) Kobayashi, S. and Tanabe, S. (2006). Evaluation of the anti-allergic activity of *Citrus unshiu* using rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells as well as basophils of patients with seasonal allergic rhinitis to pollen. *Int. J. Mol. Med.*, **17**, 511–515.
- 39) 楊栄華, 杉沢博, 中谷洋行, 田村啓敏, 高木信雄 (1992). 香酸柑橘類の果皮精油の匂い特性の比較. *日食工誌*, **39**, 16–24.
- 40) 厚生労働省, 平成 26 年患者調査の概況.  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/index.html> (2018).
- 41) 厚生労働省, 平成 24 年労働者健康状況調査.  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/h24-46-50.html> (2018).
- 42) Cannon, W. B. (1914). The interrelations of emotions as suggested by recent physiological researches. *Am. J. Psychol.*, **25**, 256–282.
- 43) Selye, H. (1951). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Am. J. Med.*, **10**, 549–555.
- 44) 横越英彦監修 (2006). 「抗ストレス食品の開発と展望」, (株)シーエムシー出版, pp.1–6.

- 45) Matsumoto, T., Kimura, T. and Hayashi, T. (2016). Aromatic effects of a Japanese citrus fruit—yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka)—on psychoemotional states and autonomic nervous system activity during the menstrual cycle: a single-blind randomized controlled crossover study. *Biopsychosoc. Med.* **10**, doi:10.1186/s13030-016-0063-7.
- 46) 文部科学省科学技術・学術政策局政策課資源室監修 (2016). 日本食品標準成分表 2015 年版 (七訂) 分析マニュアル・解説 (建帛社), pp.25–48, pp.71–74.
- 47) 後藤幸生 (2011).「心身自律神経バランス学」, 真興交易(株)医書出版部, pp.58–64.
- 48) 人見健文, 池田昭夫 (2014). 脳波の基礎知識. *臨床神経生理学*, **42**, 365–370.
- 49) Caligiani, A., Acquotti, D., Palla, G. and Bocchi, V. (2007). Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Anal. Chim. Acta.*, **585**, 110–119.
- 50) 沢村正義, 楠瀬博三 (1979). 酸用カンキツの有機酸および糖について. *日食工誌*, **26**, 503–507.
- 51) Ray, W. J. and Cole, H. W. (1985). EEG alpha activity reflects attentional demands, and beta activity reflects emotional and cognitive processes. *Science*, **10**, 750–752.
- 52) Murrufu, M., Vaquero, E., Cardoso, M. J. and Gomez, M. (2001). Temporal evolution of  $\alpha$  and  $\beta$  bands during visual spatial attention. *Brain Res. Cogn. Res.*, **12**, 315–320.
- 53) 財務省通関統計. <http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm> (2018).
- 54) 農林水産省JAS規格飲食料品, 26果実飲料.

[http://www.maff.go.jp/j/jas/jas\\_kikaku/kikaku\\_itiran2.html](http://www.maff.go.jp/j/jas/jas_kikaku/kikaku_itiran2.html) (2018).

- 55) Widmer, W. W., Cancalon, P. F. and Nagy, S. (1992). Methods for determining the adulteration of citrus juices. *Trends Food Sci. Technol.*, **3**, 278–286.
- 56) AIJN. <http://www.aijn.org/> (2018).
- 57) SGF. <https://www.sgf.org/index.php?id=29> (2018).
- 58) Stampanoni, C. R. (1993). Influence of acid and sugar content on sweetness, sourness and the flavour profile of beverages and sherbets. *Food Qual. Prefer.*, **4**, 169–176.
- 59) Ghasemi, K., Ghasemi, Y. and Ebrahimzadeh, M. A. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.*, **22**, 277–281.
- 60) Arena, E., Guarrera, N., Campisi, S. and Asmundo, C. N. (2006). Comparison of odour active compounds detected by gas-chromatography-olfactometry between hand-squeezed juices from different orange varieties. *Food Chem.*, **98**, 59–63.
- 61) 太田英明, 殿原慶三, 幸野憲二, 伊福靖 (1983). ユズ果汁の搾汁と品質特性に及ぼす搾汁機の影響. *日食工誌*, **30**, 629–635.
- 62) Sawamura, M., Ooishi, S. and Li, Z. F. (1990). Reduction of dehydroascorbic acid by sodium hydrosulphide and liquid chromatographic determination of vitamin C in citrus juices. *J. Sci. Food Agric.*, **53**, 279–281.
- 63) Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M. and Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 178–192.
- 64) Van den Dool, H. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition

- chromatography. *J. Chromatogr. A*, **11**, 463–471.
- 65) 有山薫 (2014). 元素及び重元素同位体組成による農産物の産地判別技術. *分析化学*, **52**, 969–978.
- 66) Lee, H. S. and Coates, G. A. (2000). Quantitative study of free sugars and myo-inositol in citrus juices by HPLC and a literature compilation. *Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **14**, 2123–2141.
- 67) 高木敏彦, 向井啓雄, 市川珠世, 鈴木鐵男 (1994). ウンシュウミカンの着色に及ぼす温度と果実の糖集積の影響. *園芸雑*, **62**, 725–731.
- 68) Albertini, M. V., Carcouet, E., Pailly, O., Gambotti, C., Luro, F. and Berti, L. (2006). Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8335–8339.
- 69) 社団法人国際農林業協力協会編 (2001). 「果汁の生産と流通」, 創造社, pp.181–190.
- 70) Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B. and Holden, J. M. (2006). Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food Compost. Anal.*, **19**, S66–S73.
- 71) Bai, J., Manthey, J. A., Ford, B. L., Luzio, G., Cameron, R. G., Narciso, J. and Baldwin, E. A. (2013). Effect of extraction, pasteurization and cold storage on flavonoids and other secondary metabolites in fresh orange juice. *J. Sci. Food Agric.*, **93**, 2771–2781.
- 72) Dhuique-Mayer, C., Caris-Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F. and Amiot, M. J. (2005). Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2140–2145.

- 73) Pupin, A. M., Dennis, M. J. and Toledo, M. C. F. (1998). Polymethoxylated flavones in Brazilian orange juice. *Food Chem.*, **63**, 513–518.
- 74) Moshonas, M. G. and Shaw, P. E. (1994). Quantitative determination of 46 volatile constituents in fresh, unpasteurized orange juices using dynamic headspace gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1525–1528.
- 75) 社団法人日本果汁協会監修，三浦洋編（1997）。「最新果汁・果実飲料事典」，朝倉書店，pp.83–95.
- 76) 国際柑橘学会日本支部編（1999）。「カンキツ用語集，第2版」，国際柑橘学会日本支部，p.127.
- 77) 広瀬直人（2012）. シークワーサーの特性と新規用途開発. *日食科工*, **59**, 363–368.
- 78) Murakami, A., Nakamura, Y., Ohto, Y., Yano, M., Koshihara, T., Koshimizu, K., Tokuda, H., Nishino, H. and Ohigashi, H. (2000). Suppressive effects of citrus fruits on free radical generation and nobiletin, an anti-inflammatory polymethoxyflavonoid. *Biofactors*, **12**, 187–192.
- 79) Murakami, A. and Ohigashi, H. (2006). Cancer-preventive antioxidants that attenuate free radical generation by inflammatory cells. *Biol. Chem.*, **387**, 387–392.
- 80) Lee, Y. S., Cha, B. Y., Saito, K., Choi, S. S., Wang, X. X., Choi, B. K., Yonezawa, T., Teruya, T., Nagai, K. and Woo, J. T. (2011). Effects of a *Citrus depressa* Hayata (shiikuwasa) extract on obesity in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine*, **18**, 648–654.
- 81) Akachi, T., Shiina, Y., Ohishi, Y., Kawaguchi, T., Kawagishi, H., Morita, T., Mori, M. and Sugiyama, K. (2010). Hepatoprotective effects of flavonoids from shekwasha (*Citrus depressa*) against D-galactosamine-induced liver

- injury in rats. *J. Nutr. Vitaminol.*, **56**, 60–67.
- 82) Ishiwa, J., Sato, T., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M. and Ito, A. (2000). A citrus flavonoid, nobiletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B in rabbit synovial fibroblasts. *J. Rheuma.*, **27**, 20–25.
- 83) Sato, T., Koike, L., Miyata, Y., Hirata, M., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M. and Ito, A. (2002). Inhibition of activator protein-1 binding activity and phosphatidylinositol 3-kinase pathway by nobiletin, a polymethoxy flavonoid, results in augmentation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production and suppression of production of matrix metalloproteinase-1 and 9 in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Cancer Res.*, **62**, 1025–1029.
- 84) 日本フードスペシャリスト協会編 (2006). 「新版食品の官能評価・鑑別演習」, 建帛社, pp.32–38.
- 85) 古川秀子 (2001). 「おいしさを測る 食品官能検査の実際」, 幸書房, pp.55–61.
- 86) Ogawa, K., Kawasaki, A., Omura, M., Yoshida, T., Ikoma, Y. and Yano, M. (2001). 3', 5'-Di-C- $\beta$ -glucopyranosylphloretin, a flavonoid characteristic of the genus *Fortunella*. *Phytochemistry*, **57**, 737–742.
- 87) Inafuku-Teramoto, S., Suwa, R., Fukuzawa, Y. and Kawamitsu, Y. (2011). Polymethoxyflavones, synephrine and volatile constitution of peels of citrus fruit grown in Okinawa. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, **80**, 214–224.
- 88) (独) 農林水産消費安全技術センター「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 第3版」,  
[http://www.famic.go.jp/technical\\_information/jashandbook/gmo/manual\\_3.pdf](http://www.famic.go.jp/technical_information/jashandbook/gmo/manual_3.pdf) (2018).

- 89) DNA 品種識別技術検討会 「植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項—技術開発と利用のガイドライン—」,  
[http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna\\_manual/guideline.pdf](http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/guideline.pdf) (2018).
- 90) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 「DNA マーカーによる果樹・果実の品種判別」,  
[http://www.naro.affrc.go.jp/publicity\\_report/publication/files/DNA\\_marker.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/DNA_marker.pdf) (2018).
- 91) 大坪研一, 中村澄子, 雲聡, 川上宏智, 宮村毅 (2005). PCR 法による米の DNA 品種判別のためのプライマーセットの開発. *日食科工*, **52**, 102–106.
- 92) Breton, C., Claux, D., Metton, I., Skorski, G. and Bervillé, A. (2004). Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 531–537.
- 93) Siret, R., Boursiquot, J. M., Merle, M. H., Cabanis, J. C. and This, P. (2000). Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5035–5040.
- 94) Aldeguer, M., López-Andreo, M., Gabaldón, J. A. and Puyet, A. (2014). Detection of mandarin in orange juice by single-nucleotide polymorphism qPCR assay. *Food Chem.*, **145**, 1086–1091.
- 95) Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 1105–1109.
- 96) Okayama, H., Curiel, D. T., Brantly, M. L., Holmes, M. D. and Crystal, R. G.

- (1989). Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. *J. Lab. Clin. Med.*, **114**, 105–113.
- 97) Hayashi, K., Hashimoto, N., Daigen, M. and Ashikawa, I. (2004). Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor. Appl. Genet.*, **108**, 1212–1220.
- 98) Roessler, E. B., Pangborn, R. M., Sidel, J. L. and Stone, H. (1978). Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, paired-difference, duo-trio and triangle tests. *J. Food Sci.*, **43**, 940–943.
- 99) Pérez-López, A. J., Beltran, F., Serrano-Megías, M., López, D. S. and Carbonell-Barrachina, Á. A. (2006). Changes in orange juice color by addition of mandarin juice. *Eur. Food Res. Technol.*, **222**, 516–520.
- 100) Ayhan, Z., Yeom, H. W., Zhang, Q. H. and Min, D. B. (2001). Flavor, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 669–674.
- 101) Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M. and Heredia, F. J. (2003). Application of tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juice. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7266–7270.
- 102) Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'donnell, C. P. and Cullen, P. J. (2008). Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT-Food Sci. Technol.*, **41**, 1876–1883.
- 103) Pan, G. G., Kilmartin, P. A., Smith, B. G. and Melton, L. D. (2002). Detection of orange juice adulteration by tangelo juice using multivariate analysis of polymethoxylated flavones and carotenoids. *J. Sci. Food Agric.*, **82**, 421–427.
- 104) 寺本（稲福）さゆり，山本雅史，金城秀安，北島宣，和田浩二，川満芳信（2010）. 沖縄本島北部のカンキツ遺伝資源およびそのポリメトキシフ

ラボン含量. *園芸学研究*, **9**, 263–271.

- 105) 野村和希 (2006). カンキツ乾燥果皮及び果汁からの DNA 抽出法の改良と Taqman プローブによる品種判別. *園学雑*, **75**, 293.
- 106) Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acid. Res.*, **8**, 4321–4326.
- 107) Nakamura, S., Haraguchi, K., Mitani, N. and Ohtsubo, K. I. (2007). Novel preparation method of template DNAs from wine for PCR to differentiate grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 10388–10395.