

無機元素組成による黒大豆「丹波黒」の産地判別

小阪英樹[§], 畠中知子*, 鈴木武志*, 杉本敏男*,
 曳野亥三夫**, 鈴木忠直***, 戸田登志也

フジッコ株式会社

* 神戸大学農学部

** 兵庫県立農林水産技術総合センター

*** 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

Determining the Geographic Origin of "Tanbaguro" Black Coated Soybeans
 (*Glycine max*) Based on their Inorganic Elemental Composition

Hideki Kosaka[§], Tomoko Hatanaka*, Takeshi Suzuki*, Toshio Sugimoto*,
 Isao Hikino**, Tadanao Suzuki*** and Toshiya Toda

Fujicco Co., Ltd., 6-13-4 Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-8558

* Faculty of Agriculture, Kobe University, 1-1, Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe 657-8501

** Hyogo Prefectural Institute of Agriculture, 1533, Minaminooka-ko, Befu-cho, Kasai, Hyogo 679-0198

*** National Food Research Institute, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

"Tanbaguro" is a local variety of Japanese soybean (*Glycine max*) that is characterized by large seed size and a black seed coat. We intended to determine a method for determining the geographic origin of Tanbaguro seeds by their inorganic element composition. Seed samples of 48 Tanbaguro varieties and eight "non-Tanbaguro" black soybean varieties cultivated in different years were collected in Japan and China. Eight inorganic elements (Al, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr and Ba) of these samples were estimated using ICP-AES (Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer). Significant differences were observed between Japanese and Chinese samples in the contents of four elements (Al, Fe, Cu and Sr). Principal component analysis samples could generally be divided into two groups: those cultivated in Japan and those cultivated in China. Various combinations of inorganic elemental contents were used to perform the linear discriminant analysis (LDA). LDA performed by eight elements classified with a confidence of 96%, and country of origin could be predicted with confidence of 100%. Even when four elements (Al, Mn, Sr and Ba) were used, it was possible to distinguish whether the country of cultivation was Japan or China. LDA performed by Al and Fe contents, selected by stepwise discriminant analysis, classified and predicted with a confidence of only 89% and 79%. However, since all samples cultivated in China could be correctly classified and predicted, this discriminant model was useful for the screening of samples. Therefore, the applicability of this method for determining the geographic origin of Tanbaguro bean varieties was demonstrated.

(Received Oct. 14, 2005 ; Accepted Mar. 30, 2006)

1995年に新食糧法, 2000年に改正JAS法が施行され, コメにおいては産地, 産年, 品種の表示が, その他全ての生鮮食品と一部加工食品については原産地表示が義務付けられた。しかし, その後も安価な品種を人気のある高価な品種として販売を行ったり, 海外産のものを日本産として販売するなどの偽装表示が相次いで摘発されている。これらの偽装表示の抑止力につながる技術として期待されている。

〒650-8558 神戸市中央区港島中町 6-13-4

* 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1

** 〒679-0198 兵庫県加西市別府町南の岡甲 1533

*** 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

§ 連絡先 (Corresponding author), h-kosaka@fujicco.co.jp

るのが, 成分分析やDNA解析などの理化学検査による識別方法の確立である。

コメの中でも日本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に関して, 信頼性の高い品種判別方法としてDNAによる判別技術が開発され, 既に判別用プライマーが販売され実用化に至っており¹⁾, 偽装表示の減少に貢献している。

一方, 産地判別については, 海外では1980年代からワインについて成分含量と味, 香りなどの官能検査結果を組み合わせ統計的に判別しようとする試みが多数行われており²⁾⁻⁷⁾, また, 茶⁸⁾, ジャガイモ⁹⁾の栽培地を無機元素組成

で判別しようとする検討がなされている。日本では、改正 JAS 法の施行、産地偽装表示の多発を受け、産地表示の信頼性を検証する技術確立が急務とされ、1990 年代後半から 2000 年にかけて玄米で無機元素の組成や同位体比を利用した産地判別研究が行われ始めた¹⁰⁾¹¹⁾。その後、無機元素組成を利用する判別手法は、ネギ^{12)~14)}、梅干し¹⁵⁾、乾しいたけ¹⁶⁾、タマネギ¹⁷⁾ など多くの農産物で検討されている。

黒大豆は従来正月のおせち料理用の季節商材であったが、近年はアントシアニンやイソフラボンなどの生理活性成分が注目され、様々な加工品に利用されて年間を通して食される食材となっており、年々その需要は増加している。しかし一方で黒大豆は栽培に手間のかかるものが多く、高価で流通量も限られている。そこで市場需要の増大に対応して安定供給を確保するため、最近では中国を主とする海外産の黒大豆が多く輸入されるに至っている。

黒大豆の中でも兵庫県と京都府にまたがる丹波地方を産祥とする「丹波黒」は、100 粒重が 80 g 前後¹⁸⁾ と他の大粒品種に比べて約 2 倍の極大粒であり、また食味が良いことから消費者の人気の高い。丹波黒についても増大する需要に対応するため、日本から持ち出されたと考えられる種子で栽培された中国を主とする海外産が輸入されている状況にある。他の作物同様、中国産の輸入黒大豆は日本産よりも低価格であることが多く、特に丹波黒は原産国の偽装表示が最も懸念される作物の一つである。

法邑らは日本産と中国産の丹波黒種子 15 点の無機元素を定量し、主成分分析、クラスター分析によりその組成が日本産と中国産で異なる傾向を示すことを報告しているが¹⁹⁾、未知試料の産地を精度高く判定できる技術はまだ確立されていない。本研究では、日本産丹波黒、および丹波黒として流通している中国産黒大豆を収集し、判別モデル作成用試料と評価用試料に分けて 8 種類の無機元素濃度を測定した。判別モデル作成用試料の分析結果をもとに、計算が簡易であり、後の産地判定に利用しやすい 2 群線形判別分析を行い、得られた線形判別関数をモデル評価用試料の結果に適用して判別精度を評価した。また、丹波黒以外の中大粒黒大豆への適用の予備的検討も行った。

実験方法

1. 実験試料

本研究に供試した黒大豆種子 (*Glycine max*) を表 1 に示す。日本産の丹波黒については栽培地域、栽培年度が偏らないよう、主な栽培地である兵庫県、京都府、岡山県の各府県内で 3 地区以上、またそれぞれの地区で栽培年度の異なるもの計 20 点 (No. 1~13, 29~35) を商社を通じて収集した。加えて各府県の農業試験場、農協等を通じて系統維持されている原種 8 点 (No. 14~18, 36, 38, 39) の分譲を受けた。中国から輸入され、丹波黒として流通している種子については商社を通じ、5 省から計 16 点 (No. 19~28,

43~48) を入手した。これら計 44 点について、判別モデル作成用試料 28 点と、評価用試料 16 点に無作為に分けた。

また、中国産種子を日本で栽培した場合の無機元素濃度の変化を確認する目的で、日本産種子 1 点 (No. 37) と中国産種子 1 点 (No. 42) について、神戸大学農学部内の実験圃場 (神戸市灘区) で栽培、収穫した種子 (No. 40, 41) を供試した。これら 4 点は判別モデル評価用試料に分類した。

丹波黒以外の中大粒黒大豆品種については農業試験場および商社を通じて日本産 6 点 (No. 49~54)、中国産 2 点 (No. 55, 56) を収集した。

2. 誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-AES) を用いた無機元素分析

(1) 試薬

水は全て日本ミリポア (株) 製 Milli-Q Labo にて製造した超純水を使用した。試料調製には関東化学 (株) 製の原子吸光分析用 60% 硝酸を用いた。ICP-AES 測定の検量線作成用標準溶液については、各元素の和光純薬工業 (株) 製原子吸光分析用標準溶液を混合、調製して使用した。

(2) 試料調製

試料調製は既報¹⁹⁾ により、湿式分解法を用いた。

i) 粉碎

種子の粉碎は機器の部材からの汚染を避けるため、粉碎機を用いずポリプロピレン製の袋内で吸水させて軟化後にすり潰し、均質化する方法を用いた。すなわち、水分が 60% 程度になるよう種子と超純水を袋に入れヒートシールし、2 時間沸騰水中に入れて吸水、軟化させた。その後袋内の種子を乳棒を用いてすり潰し、混合、均質化して測定用試料とした。

ii) 分解

ペースト状の測定用試料 (約 5 g) を容量 100 mL のホウケイ酸ガラス製ビーカーにとり、硝酸 (10 mL) を添加した。ホットプレート上でおだやかに加熱を開始し、温度を徐々に 150°C まで上げ、時々かき混ぜながら蒸発分の硝酸を随時添加した。褐色のガスが出なくなり、液色が透明~淡黄色になるのを確認してから乾固寸前まで濃縮して加熱分解を終了した。残留物を 1% 硝酸で加温溶解させ、50 mL のポリメチルペンテン製全量フラスコに洗い込み、定容して測定用試料溶液とした。

(3) 測定

無機元素の測定は、ICP-AES (島津製作所製シーケンシャル型高周波プラズマ発光分析装置 ICPS-1000 III) を用いた。測定条件を表 2 に示す。測定元素は既報¹⁹⁾ で用いられているものを中心に選択し、その中で ICP-AES で測定用試料の濃度が検出限界以上であった Al, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr, Ba の 8 元素とした。

(4) 添加回収試験

表 1 の No. 42 の種子を用い、回収試験を実施した。種子粉碎後に、各元素の濃度が種子中の濃度の約 2 倍~3 倍に

なるよう標準溶液を添加した。以下の調製，測定は未添加の試料と同様に行った。

3. 統計処理

等分散検定 (F 検定)²⁰⁾，対応のない t 検定²⁰⁾，Welch の t 検定²⁰⁾，相関行列を用いた主成分分析²¹⁾，分散共分散行列の同等性検定²²⁾，2 群線形判別分析²²⁾，判別分析のステップワイズ法²²⁾ の統計処理はすべて EXCEL 多変量解析 Ver. 5.0 ((株)エスミ製) を用いた。なお，統計処理に用いた測定値は，測定用試料から 3 点を採り，調製，測定した値の平均値を用いた。また，測定値は別途 105°C にて常圧加熱乾燥法²³⁾ により試料の水分値を測定し，乾燥種子あた

りの濃度に換算した値を用いた。

実験結果

1. 標準溶液添加回収試験

表 3 に結果を示した。いずれの元素も回収率は 100% 前後 (92.8%~112.2%) となったため，本分析方法は黒大豆への適用性が高いと判断された。

2. 判別モデル作成用試料 28 点の無機元素分析

日本産丹波黒試料 18 点，丹波黒として流通している中国産黒大豆試料 10 点の計 28 点について，ICP-AES を用いて Al, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr, Ba の 8 元素を測定した。

表 1 実験試料一覧

| 判別モデル作成用試料 (28点) | | | | | 判別モデル評価用試料 (20点) | | | | |
|------------------|----|----------|------|-------|------------------|----|-------------------|------|----------|
| No | 産国 | 産地 | 栽培年度 | 系統名 | No | 産国 | 産地 | 栽培年度 | 系統名 |
| 1 | J | 兵庫県篠山市 | 1999 | | 29 | J | 兵庫県篠山市 | 2002 | |
| 2 | J | " | 2001 | | 30 | J | 京都府京丹後市 | 2002 | |
| 3 | J | 兵庫県朝来市 | 2001 | | 31 | J | 京都府和知町 | 2002 | |
| 4 | J | " | 2002 | | 32 | J | 京都府綾部市 | 2001 | |
| 5 | J | 兵庫県宍粟市 | 2001 | | 33 | J | 岡山県美作市 | 2001 | |
| 6 | J | " | 2002 | | 34 | J | 岡山県吉備中央町 | 2002 | |
| 7 | J | 京都府京丹後市 | 2001 | | 35 | J | 岡山県赤磐市 | 2001 | |
| 8 | J | 京都府園部町 | 2001 | | 36 | J | 兵庫県篠山市 | 2001 | 川北系 |
| 9 | J | 京都府夜久野町 | 2002 | | 37 | J | 兵庫県朝来市 | 2001 | 兵系黒3号 |
| 10 | J | 岡山県美作市 | 2002 | | 38 | J | " | 2001 | 朝来大黒 |
| 11 | J | 岡山県吉備中央町 | 2001 | | 39 | J | 岡山県赤磐市 | 2001 | KY系統 |
| 12 | J | 岡山県赤磐市 | 2002 | | 40 | J | 神戸市灘区 (神戸大学圃場) | 2003 | 種子元No.37 |
| 13 | J | 岡山県 | 2001 | | 41 | J | " | 2003 | 種子元No.42 |
| 14 | J | 兵庫県篠山市 | 1999 | 川北系 | 42 | C | 江蘇省 | 2001 | |
| 15 | J | " | 1999 | 波部黒系 | 43 | C | 江蘇省 | 2002 | |
| 16 | J | " | 1999 | 兵系黒3号 | 44 | C | 江蘇省 揚州 | 2001 | |
| 17 | J | 京都府亀岡市 | 2001 | 新丹波黒 | 45 | C | 安徽省 | 2001 | |
| 18 | J | 岡山県赤磐市 | 2001 | KN系統 | 46 | C | 安徽省 合肥 | 2001 | |
| 19 | C | 江蘇省 | 2001 | | 47 | C | 四川省 | 2001 | |
| 20 | C | 江蘇省 高郵 | 2001 | | 48 | C | 雲南省 宜良 | 2001 | |
| 21 | C | 江蘇省 塩城 | 2002 | | 他品種黒大豆試料 (8点) | | | | |
| 22 | C | 江蘇省 | 2001 | | No | 産国 | 産地 | 栽培年度 | 品種系統名 |
| 23 | C | 江蘇省 | 2002 | | 49 | J | 兵庫県 | 2003 | 在来種 |
| 24 | C | 安徽省 | 2001 | | 50 | J | 京都府 | 2001 | 紫ずきん |
| 25 | C | 安徽省 | 2002 | | 51 | J | 北海道 | 2001 | 中生光黒 |
| 26 | C | 四川省 徳陽 | 2001 | | 52 | J | 兵庫県朝来市 | 2001 | 早生系統 |
| 27 | C | 山東省 済寧 | 2001 | | 53 | J | " | 2001 | " |
| 28 | C | 中国 | 2003 | | 54 | J | 滋賀県 | 2002 | " |
| | | | | | 55 | C | 山東省 | 2003 | 在来種 |
| | | | | | 56 | C | 中国 | 2003 | 青仁黒大豆 |

J; 日本 C; 中国

各試料の測定結果を表4に示す。各元素について日本産、中国産濃度の等分散検定(F検定)を行い、等分散とみなせるAl, Fe, Baは対応のないt検定、等分散とみなせなかったMn, Ni, Cu, Zn, SrはWelchのt検定を実施した²⁰⁾。日本産と中国産の間で統計的な有意差が認められたのはAl($p < 0.001$), Fe($p < 0.05$), Cu($p < 0.01$), Sr($p < 0.05$)の4元素であり、Al, Cu, Srは中国産の濃度が高

く、Feは日本産の濃度が高かった。

3. 主成分分析

判別モデル作成用試料28点のICP-AESによる8元素の無機元素分析の結果から、主成分分析を実施した。なお、測定元素間で測定値に10倍以上の差があったため、分析には相関行列を用いた²¹⁾。表5に第3主成分までの固有値、寄与率、因子負荷量を示した。累積寄与率は80%に満

表2 ICP-AES分析条件

| 使用装置 | 島津シーケンシャル型高周波プラズマ発光分析装置 ICPS-1000III | |
|---------|---|----------------------|
| 高周波出力 | 1.2 kW | |
| クーラントガス | 14 L/min | |
| プラズマガス | 1.2 L/min | |
| キャリアーガス | 1.0 L/min | |
| ページガス | 3.5 L/min | |
| 積分時間 | 5.0 sec | |
| トーチ高さ | 15 mm | |
| 分光器 | 真空ツェルニターナー型 | |
| 回析格子 | 3,600 本/min | |
| 逆線分散 | 0.22 nm/mm | |
| | 測定波長(nm) | 検出限界 (乾燥種子あたりppm) |
| Al | 396.263 | 2.500 |
| Mn | 257.693 | 0.050 |
| Fe | 260.014 | 0.500 |
| Ni | 231.675 | 0.500 |
| Cu | 327.491 | 0.250 |
| Zn | 213.923 | 0.125 |
| Sr | 407.887 | 0.250 |
| Ba | 455.512 | 0.050 |

表3 標準添加回収試験

| | 未添加濃度 | 添加濃度 | 添加後濃度 | 回収率(%) |
|----|----------|------|-----------|--------|
| Al | 19.0±1.3 | 20.0 | 41.5±2.8 | 106.3 |
| Mn | 29.4±0.3 | 27.8 | 55.7±1.4 | 97.4 |
| Fe | 91.2±5.2 | 85.7 | 164.1±0.5 | 92.8 |
| Ni | 6.3±0.3 | 11.1 | 17.0±1.4 | 97.2 |
| Cu | 17.7±0.5 | 17.8 | 36.7±1.0 | 103.4 |
| Zn | 48.4±0.5 | 44.5 | 90.9±1.4 | 97.9 |
| Sr | 5.4±0.6 | 5.0 | 11.7±0.5 | 112.2 |
| Ba | 4.4±0.2 | 3.3 | 7.5±0.4 | 97.4 |

濃度はすべて乾燥種子あたりppm
添加前濃度と添加後濃度は3点併行の平均値±標準偏差

たなかったが、固有値が1より大きく、カイザー基準²⁴⁾を満たしていた第1主成分-第2主成分の得点プロットとその因子負荷量を図1に示す。一部重なっている試料は存在するが、日本産18点と中国産10点はそれぞれでグループを形成し、2群に大別された。また、因子負荷量からCu含量により、中国産と日本産が大まかには分類され、Fe, Znが日本産の一部(試料No. 3, 11, 15, 16)に多いこと、その他の元素が一部の中国産(試料No. 20, 25)に多いことが示された。

4. 判別モデル関数の作成

2群の判別関数を求める場合、2群間の分散共分散行列が等しい場合は線形、等しくない場合は2次の判別関数を

選択する必要がある²²⁾。全8元素の濃度測定結果をもとに判別モデル作成用試料28点について日本産、中国産両群の分散共分散行列の同源性検定を実施したところ、自由度36, $x^2=47.4$, 上側確率9.6%より両群の分散共分散行列は等しいと判断されたため、2群の線形判別関数を求めた(LDA-1, 表7脚注)。この線形判別関数に28点の各分析試料の元データを代入し、それぞれの判別得点を求めたところ、中国産の1点が日本産と誤判別されたが、残り27点が正しく判別され、その分類的中率は96%であった(表7)。

さらに実用性を高めるため、より少ない元素数で判別精度が高い関数を検討した。LDA-1の判別式で、係数が大きく寄与が大きい元素から順に判別式に加えたところ、Al,

表4 判別モデル作成用試料28点のICP-AES分析結果一覧

| 試料No | 産国 | Al | Mn | Fe | Ni | Cu | Zn | Sr | Ba |
|---------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 1 | J | 9.20 | 26.48 | 82.55 | 5.91 | 16.63 | 42.57 | 2.54 | 3.70 |
| 2 | J | 9.02 | 24.40 | 87.84 | 9.72 | 16.00 | 42.23 | 2.29 | 1.75 |
| 3 | J | 6.83 | 24.18 | 74.33 | 4.50 | 13.16 | 49.24 | 2.87 | 1.59 |
| 4 | J | 6.69 | 26.03 | 71.88 | 7.08 | 16.02 | 53.93 | 3.93 | 4.52 |
| 5 | J | 11.84 | 27.30 | 82.14 | 10.14 | 18.77 | 45.41 | 3.14 | 2.79 |
| 6 | J | 8.88 | 27.48 | 77.71 | 7.57 | 16.22 | 49.74 | 2.19 | 1.82 |
| 7 | J | 6.31 | 22.33 | 62.50 | 12.25 | 12.87 | 50.10 | 1.44 | 1.28 |
| 8 | J | 10.06 | 24.43 | 91.85 | 8.29 | 18.74 | 56.54 | 2.03 | 2.81 |
| 9 | J | 7.41 | 23.39 | 89.95 | 4.28 | 19.62 | 50.87 | 4.07 | 4.63 |
| 10 | J | 7.41 | 25.00 | 92.19 | 8.05 | 19.06 | 54.67 | 5.52 | 5.95 |
| 11 | J | 14.66 | 18.53 | 83.77 | 4.71 | 6.90 | 60.16 | 1.64 | 2.80 |
| 12 | J | 17.66 | 22.78 | 80.23 | 7.07 | 17.13 | 51.39 | 2.97 | 3.39 |
| 13 | J | 6.53 | 22.24 | 78.56 | 4.98 | 17.38 | 46.15 | 2.95 | 1.99 |
| 14 | J | 7.80 | 21.06 | 49.34 | 4.29 | 18.76 | 46.81 | 3.14 | 2.25 |
| 15 | J | 7.53 | 21.37 | 89.99 | 3.94 | 11.37 | 61.83 | 2.01 | 1.34 |
| 16 | J | 8.69 | 15.56 | 84.29 | 5.42 | 15.78 | 61.80 | 1.68 | 2.33 |
| 17 | J | 3.99 | 14.60 | 84.43 | 2.82 | 9.12 | 55.47 | 1.35 | 0.00 |
| 18 | J | 5.26 | 23.36 | 72.76 | 2.04 | 17.52 | 45.26 | 0.79 | 0.33 |
| 19 | C | 18.55 | 25.28 | 85.29 | 9.97 | 18.83 | 51.52 | 4.05 | 1.51 |
| 20 | C | 18.91 | 29.52 | 86.93 | 12.60 | 20.01 | 50.39 | 5.71 | 3.48 |
| 21 | C | 15.52 | 24.18 | 69.76 | 6.36 | 19.30 | 51.57 | 5.74 | 2.13 |
| 22 | C | 10.83 | 20.25 | 68.31 | 6.63 | 20.42 | 42.21 | 2.96 | 1.05 |
| 23 | C | 10.89 | 10.66 | 51.79 | 3.03 | 16.24 | 43.98 | 1.64 | 1.28 |
| 24 | C | 11.55 | 30.41 | 57.64 | 15.04 | 19.02 | 47.99 | 6.72 | 3.86 |
| 25 | C | 18.95 | 32.99 | 74.52 | 19.27 | 19.65 | 49.82 | 10.11 | 8.51 |
| 26 | C | 11.73 | 22.21 | 70.81 | 5.96 | 18.35 | 48.09 | 2.27 | 1.69 |
| 27 | C | 14.77 | 10.23 | 57.88 | 4.70 | 16.77 | 50.56 | 2.77 | 1.27 |
| 28 | C | 12.28 | 16.29 | 77.29 | 8.21 | 18.20 | 49.29 | 5.29 | 1.82 |
| 日本産平均値 | | 8.65 | 22.81 | 79.80 | 6.28 | 15.61 | 51.34 | 2.58 | 2.51 |
| 中国産平均値 | | 14.40 | 22.20 | 70.02 | 9.18 | 18.68 | 48.54 | 4.73 | 2.66 |
| 日本産標準偏差 | | 3.30 | 3.62 | 10.89 | 2.70 | 3.58 | 6.17 | 1.14 | 1.52 |
| 中国産標準偏差 | | 3.41 | 7.93 | 11.68 | 5.08 | 1.34 | 3.15 | 2.54 | 2.26 |
| t検定 | | *** | | * | | ** | | * | |

各分析値はn=3の平均値、単位は乾燥種子あたりppm

J; 日本 C; 中国

*; p<0.05 **; p<0.01 ***; p<0.001

Mn, Sr, Ba の 4 元素で求めた線形判別関数 (LDA-2; 自由度 10, $x^2=14.4$, 上側確率 15.7%, 表 7 脚注) を利用した判別結果が 8 元素の判別結果と同じになり, 判別モデルとして良好であった (表 7).

また, 判別分析のステップワイズ法を実施したところ, Al, Fe の 2 元素のみが選択された. この 2 元素を用いた 2 群の線形判別分析では (LDA-3; 自由度 3, $x^2=2.2$, 上側確率 53.0%, 表 7 脚注) 全体で分類の中率が 89% と減少したが, 誤判別はすべて日本産であり, 中国産 10 点は全て正しく分類された (表 7).

表 5 判別モデル作成用試料 28 点の無機元素濃度結果を用いた主成分分析の固有値, 寄与率, 因子負荷量

| | 第1主成分 | 第2主成分 | 第3主成分 |
|----------|--------|--------|--------|
| 固有値 | 3.59 | 1.66 | 0.94 |
| 寄与率(%) | 44.84 | 20.78 | 11.78 |
| 累積寄与率(%) | 44.84 | 65.62 | 77.40 |
| ----- | | | |
| 因子負荷量 | | | |
| Al | 0.601 | 0.002 | -0.631 |
| Mn | 0.762 | 0.145 | 0.477 |
| Fe | 0.078 | 0.780 | 0.371 |
| Ni | 0.858 | 0.043 | -0.071 |
| Cu | 0.641 | -0.479 | 0.167 |
| Zn | -0.182 | 0.846 | -0.337 |
| Sr | 0.902 | 0.017 | -0.175 |
| Ba | 0.803 | 0.293 | 0.046 |

5. 判別モデル関数の評価

(1) 判別モデル評価用試料 20 点

判別モデル評価用試料計 20 点の無機元素分析結果を用いて, 先に求めた判別モデル LDA-1~3 の判別精度を評価した. 試料 20 点の無機元素分析結果を表 6 に示す. 各試料の元素濃度を LDA-1~3 に代入し, その予測的中率を求めた (表 7). LDA-1 については全 20 点とも正しく判別された. 一方 LDA-2 も中国産の 1 点のみで誤判別があったが, 良好な予測的中率を示した. LDA-3 については LDA-1, 2 と異なり, 日本産での誤判別が生じていたが (2 点), 中国産は全て正しく判別された.

日本産種子 (No. 37) と中国産種子 (No. 42) を兵庫県神戸大学農学部実験圃場で栽培して得られた種子 (各々 No. 40, 41) について, LDA-1~3 で判別するといずれの方法でも No. 42 のみ中国産, No. 37, 40, 41 は日本産として判定された.

(2) 他品種黒大豆 8 点

丹波黒ではない中・大粒黒大豆品種 8 点 (日本産 6, 中国産 2) についても ICP-AES で 8 種類の無機元素濃度を測定した (表 6). その結果を LDA-1~3 に代入し, 判別得点を求めた. その結果, LDA-1, 2 については 8 点いずれも日本産, 中国産が正しく判別され, 予測的中率は 100% であったのに対し, LDA-3 の判別精度は低く, 産地が正しく判別されたのは半分にとどまった (表 7).

考 察

本研究では, 丹波黒の産地判別方法の確立を目的として, 無機元素濃度を測定した. 試料は栽培年度, 栽培地に偏りがないよう選択して収集し, また一部を除き, これら

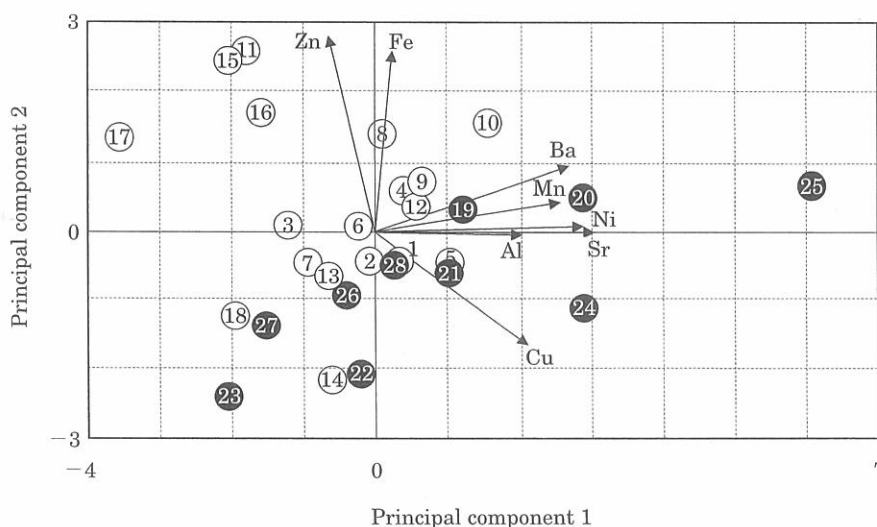


図 1 丹波黒試料 28 点の第 1-第 2 主成分プロットと因子負荷量

○; 日本産, ●; 中国産
 数字は表 1 の試料 No.
 図中の矢印は因子負荷量を示す

を無作為に判別モデル関数作成用試料と評価用試料とに分類した。判別モデル関数作成用試料 28 点での Al, Cu, Sr 濃度において中国産が日本産よりも有意に高く, Fe 濃度は日本産が中国産よりも有意に高い値を示し, 無機元素濃度の相違がみられた。他の農産物で日本産と中国産の無機元素濃度を比較した報告では, タマネギでは Sr 含有量が中国産で有意に高いことが報告されており¹⁶⁾, ニンニクでは Li, Sr, Co, Cs の 4 元素, ショウガでは Li, Co 濃度において中国産は日本産に比べて高い傾向があることが報告されている²⁵⁾。また, 梅干しでは種の仁に含まれる Sr, Pb の濃度が中国産は日本産よりも有意に高いことが示されている¹⁴⁾。農産物によって日本産と中国産で濃度に差が認めら

れる元素の種類は多様であるが, Sr は多くの農産物で中国産の濃度が日本産よりも高くなる傾向が強く, 今回検討した丹波黒においてもその傾向が認められた。法邑らは丹波黒 15 点の ICP-MS による無機元素測定を行っている。その結果によると, 本研究で測定した元素のうち, 中国産が日本産よりも有意に高いことが示されているのは Al, Ni, Cu, Sr, Ba であり, Ni, Ba を除いては我々と同様の結果となっている¹⁹⁾。今回の測定では, Ni, Ba は日本産, 中国産ともばらつきが大きく, 有意な差は認められなかった (Ni ; $p=0.120$, Ba ; $p=0.840$)。

また, 法邑らは丹波黒 15 点の主成分分析から無機元素組成が産地判別に有効であることを示唆している¹⁹⁾。試料

表 6 判別モデル評価用試料 20 点と他品種黒大豆 8 点の ICP-AES 分析結果一覧

| 判別モデル評価用試料20点 | | | | | | | | | |
|---------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 試料No | 産国 | Al | Mn | Fe | Ni | Cu | Zn | Sr | Ba |
| 29 | J | 7.63 | 32.96 | 89.56 | 10.95 | 16.63 | 52.47 | 3.61 | 3.96 |
| 30 | J | 9.20 | 26.43 | 75.05 | 8.79 | 15.09 | 52.00 | 2.89 | 3.83 |
| 31 | J | 8.60 | 25.06 | 82.52 | 6.46 | 18.77 | 36.08 | 2.26 | 2.11 |
| 32 | J | 13.19 | 20.63 | 70.81 | 9.42 | 15.97 | 43.40 | 2.37 | 2.77 |
| 33 | J | 7.16 | 22.50 | 79.00 | 8.10 | 18.85 | 52.97 | 3.25 | 3.78 |
| 34 | J | 16.24 | 27.82 | 63.10 | 4.62 | 15.20 | 48.17 | 2.99 | 2.42 |
| 35 | J | 8.29 | 24.90 | 76.20 | 7.62 | 17.06 | 53.24 | 4.41 | 2.99 |
| 36 | J | 9.09 | 18.99 | 82.85 | 6.16 | 15.95 | 45.64 | 3.09 | 4.87 |
| 37 | J | 7.92 | 15.21 | 91.81 | 1.93 | 10.31 | 65.63 | 1.21 | 1.15 |
| 38 | J | 6.43 | 20.49 | 86.06 | 4.13 | 10.35 | 43.00 | 1.25 | 0.48 |
| 39 | J | 6.15 | 25.04 | 86.38 | 1.44 | 12.42 | 33.42 | 1.16 | 0.36 |
| 40 | J | 5.80 | 24.67 | 73.55 | 3.79 | 20.92 | 47.21 | 1.90 | 0.57 |
| 41 | J | 7.00 | 25.97 | 97.05 | 4.05 | 20.25 | 48.37 | 1.27 | 0.41 |
| ----- | | | | | | | | | |
| 42 | C | 18.55 | 25.28 | 85.29 | 9.97 | 18.83 | 51.52 | 4.05 | 1.51 |
| 43 | C | 21.00 | 26.52 | 87.39 | 8.83 | 17.17 | 45.27 | 4.48 | 2.71 |
| 44 | C | 20.64 | 25.42 | 92.61 | 8.71 | 19.28 | 51.08 | 4.33 | 1.59 |
| 45 | C | 10.59 | 24.77 | 69.11 | 14.41 | 20.51 | 46.32 | 6.51 | 3.52 |
| 46 | C | 21.32 | 36.32 | 95.93 | 23.20 | 22.76 | 56.42 | 8.60 | 4.81 |
| 47 | C | 16.94 | 25.94 | 78.90 | 5.66 | 18.92 | 52.40 | 3.03 | 1.46 |
| 48 | C | 15.62 | 14.06 | 71.13 | 5.26 | 15.83 | 54.74 | 0.78 | 1.43 |
| ----- | | | | | | | | | |
| 日本産平均値 | | 8.67 | 23.90 | 81.07 | 5.96 | 15.98 | 47.82 | 2.44 | 2.28 |
| 中国産平均値 | | 17.81 | 25.47 | 82.91 | 10.86 | 19.04 | 51.11 | 4.54 | 2.43 |
| 日本産標準偏差 | | 2.95 | 4.44 | 9.36 | 2.93 | 3.39 | 8.19 | 1.05 | 1.57 |
| 中国産標準偏差 | | 3.85 | 6.45 | 10.29 | 6.23 | 2.23 | 4.09 | 2.49 | 1.32 |
| ----- | | | | | | | | | |
| 他品種黒大豆8点 | | | | | | | | | |
| 49 | J | 11.59 | 25.47 | 67.87 | 7.21 | 13.92 | 47.70 | 3.45 | 3.02 |
| 50 | J | 14.04 | 26.18 | 81.80 | 12.49 | 16.23 | 47.69 | 4.04 | 6.48 |
| 51 | J | 13.49 | 21.42 | 66.24 | 3.32 | 8.65 | 28.02 | 2.26 | 2.22 |
| 52 | J | 7.64 | 25.43 | 76.54 | 0.88 | 5.60 | 40.02 | 3.15 | 1.43 |
| 53 | J | 6.20 | 20.42 | 72.20 | 1.55 | 7.28 | 44.34 | 2.27 | 1.11 |
| 54 | J | 13.70 | 33.22 | 73.92 | 10.16 | 23.47 | 52.76 | 4.80 | 6.28 |
| ----- | | | | | | | | | |
| 55 | C | 22.07 | 28.33 | 88.14 | 24.38 | 19.38 | 55.10 | 10.22 | 7.20 |
| 56 | C | 25.36 | 33.94 | 60.28 | 19.28 | 14.29 | 44.29 | 8.29 | 4.29 |

各分析値はn=3の平均値, 単位は乾燥種子あたりppm

J ; 日本産 C ; 中国産

表 7 2 群線形判別分析結果

| | LDA-1 (Al, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr, Ba) | | LDA-2 (Al, Mn, Sr, Ba) | | LDA-3 (Al, Fe) | |
|-------------------------------|---|--------------|---------------------------|--------------|-------------------------|--------------|
| 分類的中率 (No.1~28) | 日本産 | 100% (18/18) | 日本産 | 100% (18/18) | 日本産 | 83% (15/18) |
| | 中国産 | 90% (9/10) | 中国産 | 90% (9/10) | 中国産 | 100% (10/10) |
| | 96% (27/28) | | 96% (27/28) | | 89% (25/28) | |
| | (誤判別試料: No.26) | | (誤判別試料: No.26) | | (誤判別試料: No.11,12,14) | |
| 予測的中率 (No.29~48) | 日本産 | 100% (13/13) | 日本産 | 100% (13/13) | 日本産 | 85% (11/13) |
| | 中国産 | 100% (7/7) | 中国産 | 86% (6/7) | 中国産 | 100% (7/7) |
| | 100% (20/20) | | 95% (19/20) | | 90% (18/20) | |
| | | | (誤判別試料: No.48) | | (誤判別試料: No.32,34) | |
| 他品種黒大豆 予測的中率 (No.49~56) | 100% (8/8) | | 100% (8/8) | | 50% (4/8) | |
| | | | | | (誤判別試料: No.49,50,51,54) | |

LDA-1 ; DF1 = -0.97630 Al + 0.66800 Mn + 0.12503 Fe - 0.33317 Ni - 0.59671 Cu

+ 0.10092 Zn - 3.7955 Sr + 3.26828 Ba + 0.04118

LDA-2 ; DF2 = -0.75677 Al + 0.41206 Mn - 3.72603 Sr + 2.91623 Ba + 5.52641

LDA-3 ; DF3 = -0.70768 Al + 0.15621 Fe - 3.54440

DF > 0 ; 日本産 DF < 0 ; 中国産 と判定

数を 28 点に増やした本研究の第 1-第 2 主成分プロット結果においても日本産と中国産は 2 群に大別された。よって、日本産と中国産の違いが無機元素組成に影響しており、無機元素組成が丹波黒の産地判別に应用可能であることが本研究においても示唆された。ただ、日本産は兵庫県、岡山県、京都府と比較的狭い範囲の産地であったのに対し、中国産は産地が江蘇省、安徽省、四川省、山東省と広範囲にわたっており、中国産のプロットが散在したため、日本産と中国産で一部重複する部分もみられたものと考えられる。

実用的な判別技術の開発と評価を行うため、判別モデル作成用試料 28 点の分析結果から 2 群線形判別関数を求め、判別モデル評価用試料 20 点の結果を得られた判別関数に適用して評価した。全 8 元素での線形判別関数 (LDA-1) と、その中で寄与の大きい元素から選択した Al, Mn, Sr, Ba の 4 元素での線形判別関数 (LDA-2) はそれぞれ予測的中率が 100%, 95% と良好な結果を示し、日本産と中国産を高い精度で判別できるモデルを構築できた。ネギの産地判別の報告では、全 101 点の 13 元素濃度をもとに行った線形判別分析で、日本産と中国産の分類的中率が 96% であり、この判別関数を用いて別の 39 点を判別すると予測的中率が 95% であったことから²⁶⁾、本判別は他の作物の産地判別と比較しても、同等の高い精度で判別できるものと考えられる。一方で、判別分析のステップワイズ法で選択された Al, Fe の 2 元素での線形判別関数 (LDA-3) は、分類的中率 89%, 予測的中率 90% と先の 2 つに比べると

的中率は減少した。

大豆成分を網羅的に分析した平の報告では、大豆に含まれる灰分含量の変動寄与率は、栽培地 66.5%, 品種 19.6% であった²⁷⁾。今回の結果からも大豆の無機元素組成は栽培地の影響を受けやすいことが示唆されているが、品種によって変動する可能性も考えられる。よって明らかに丹波黒とは遺伝的に異なる中・大粒黒大豆品種にもこの判別技術が適用できるか予備的検討を行った。先に得られた線形判別関数をもとに他品種黒大豆 8 点の判別得点をもとめたところ、LDA-1, 2 については全て正確に原産国を判別できたが、LDA-3 については半分しか正しく判別できなかった。以上の予備的検討からは、丹波黒とは別品種の黒大豆に本判別技術を適用する場合、精度よく日本産、中国産を判別するためには少なくとも Al, Mn, Sr, Ba の 4 元素を測定する必要があると考えられた。

中国産種子 (No. 42) から日本で栽培して得られた種子 (No. 41) について、LDA-1~3 全てにおいて No. 42 は中国産、No. 41 は日本産と判別された。1 検体での結果であり、更に精査は必要であるが、以上の結果は種子の無機元素組成はもとの種子の影響を受けることなく、栽培地の影響を大きく受けることを示している。

Al, Fe の 2 元素の結果だけを用いた LDA-3 について、日本産の誤判別は多くみられたが、予測的中率が低かった他品種黒大豆も含め、今回分析した中国産試料 19 点は全て正しく中国産と判別された。つまり、中国産を日本産と誤判別した例がなく、LDA-3 で日本産と判定された場合、

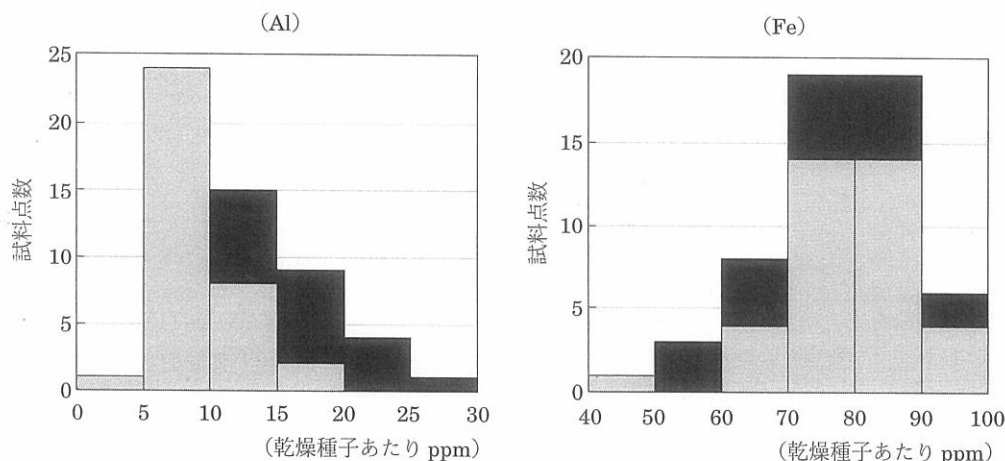


図 2 分析試料全 56 点の Al, Fe 濃度のヒストグラム

□; 日本産 ■; 中国産

その試料はかなりの高い確率で日本産と判定できることになる。本研究の分析試料全 56 点の Al, Fe 濃度のヒストグラムを作成すると (図 2), Fe 濃度は日本産, 中国産で分布に差はみられなかったが, Al 濃度については, 中国産で乾燥種子あたり 10 ppm 未満の試料は存在せず, 逆に日本産は大部分が 10 ppm 未満であった。よって, より簡易にかつ精度よく日本産と中国産を判別できるモデルとして, まず未知試料に含まれる Al, Fe 濃度を測定し, 線形判別関数 LDA-3 に測定値を代入して判別得点 DF を求め, $DF > 0$ であればその未知試料は日本産と判定し, $DF < 0$ の試料のみ他元素を追加分析するという手法で分析のスクリーニングが可能になる。また, スクリーニング精度をさらに高めるには, $DF > 0$ かつ $Al < 10$ ppm の両方を満たす試料だけを日本産と判定すればよい。多元素を同時定量できる ICP-AES, ICP-MS の装置で測定する場合は 4 元素, もしくは 8 元素を測定し, LDA-1, LDA-2 を用いて判定を行えばよいが, これらの装置は非常に高価で分析できる施設に限られる。しかしこのスクリーニング法は 2 元素を測定すればよいので, 原子吸光分析計などの同時定量できない装置でも充分対応可能であり, 本判別技術は実用性が高い。

以上, 本研究の結果から, 産地の影響を大きく受ける無機元素組成を利用すれば, 日本産の丹波黒, 丹波黒として流通している中国産黒大豆を高い精度で判別でき, また Al, Fe の 2 元素測定でスクリーニングも可能であることから, 本研究によって得られた産地判別技術は実用性が高く, 原産国表示の真偽判別に広く適用できることが示唆された。

要 約

極大粒黒大豆「丹波黒」種子の無機元素組成による産地判別の可能性について検討した。

日本産丹波黒 18 点, 丹波黒として流通している中国産

黒大豆 10 点で ICP-AES 分析を行い, Al, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr, Ba の 8 元素を測定した結果, Al, Fe, Cu, Sr の 4 元素で日本産と中国産の濃度に有意差が認められ, 産地による無機元素組成の相違がみられた。得られた結果をもとに主成分分析を行ったところ, 日本産と中国産は 2 群に大別され, 産地の差が無機元素組成に影響を及ぼしていることが示唆された。

これら 28 点の結果から 2 群線形判別関数を求め, 別の試料 20 点でその予測的中率を評価した。全 8 元素では予測的中率 100%, 4 元素 (Al, Mn, Sr, Ba) では 95% と, 高い精度で日本産と中国産の判別が可能であることが明らかになった。また判別分析のステップワイズ法で選択された Al, Fe の 2 元素だけでも予測的中率 90% と比較的高い精度で判別できた。この Al, Fe の 2 元素での 2 群線形判別では中国産が日本産と誤判別された例がなかったため, 多元素同時定量装置がない場合などにスクリーニング法として応用可能であることが示唆された。他品種黒大豆への適用の予備的検討では, 全 8 元素, 4 元素での線形判別分析は予測的中率 100% であったのに比べ, Al, Fe の 2 元素線形判別分析は予測的中率が 50% と低かったため, 他品種黒大豆へ適用する場合は 4 元素以上の測定が必要であると考えられた。

本研究にあたり, 趣旨に賛同いただいで種子を提供いただいた京都府農業総合研究所, 岡山県農業総合センター農業試験場, 篠山市丹波黒大豆優良種子生産協議会, JA たじま, 北海道立植物遺伝資源センター, ならびに各商社の方々に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 大坪研一, 中村澄子, 今村次郎, 米の PCR 品種判別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発, 農化, 76,

- 388-397 (2002).
- 2) Maarse, H., Slump, P., Tas, A.C. and Schaefer J., Classification of wines according to type and region based on their composition, *Z. Lebensm—Unters—Forsch A.*, **184**, 198-203 (1987).
 - 3) Larrechi, M.S. and Rius, F.X., Multivariate data analysis applied to the definition of two Catalan viticultural regions. I. Cluster analysis, *Z. Lebensm—Unters—Forsch A.*, **185**, 181-184 (1987).
 - 4) Martin, G.J., Guillou, C., Martin, M.L., Cabanis, M.T., Tep, Y. and Aerny, J., Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines, *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 316-322 (1988).
 - 5) Etievant, P., Schlich, P., Bertrand, A., Symonds, P. and Bouvier, J.C., Varietal and geographic classification of French red wines in terms of pigments and flavonoid compounds, *J. Sci. Food Agric.*, **42**, 39-54 (1988).
 - 6) Latorre, M.J., Garia-Jares, C., Medina, B. and Herrero, C., Pattern recognition analysis applied to classification of wines from Galicia (Northwestern Spain) with certified brand of origin, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1452-1455 (1994).
 - 7) Day, M.P., Zhang, B. and Martin, G.J., Determination of the Geographical origin of wine using joint analysis of elemental and isotope composition. II-Differentiation of the principal production zones in France for the 1990 vintage, *J. Sci. Food Agric.*, **67**, 113-123 (1995).
 - 8) Fernandez-Caceres, P.L., Martin, M.J., Pablos, F. and Gonzalez, A.G., Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4775-4779 (2001).
 - 9) Anderson, K.A., Magnuson, B.A., Tschirgi, M.L. and Smith B., Determining the geographic origin of potatoes with trace metal analysis using statistical and neural network classifiers, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1568-1575 (1999).
 - 10) 安井明美, 進藤久美子, 玄米中の無機元素組成による産地判別, *分析化学*, **49**, 405-410 (2000).
 - 11) Kawasaki, A., Oda, H. and Hirata, T., Determination of strontium isotope ratio of brown rice for estimating its provenance, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **48**, 635-640 (2002).
 - 12) 有山 薫, 堀田 博, 安井明美, ネギの産地判別のための無機元素測定法の確立と予備的検討, *分析化学*, **52**, 969-978 (2003).
 - 13) Ariyama, K., Horita, H. and Yasui, A., Application of inorganic element ratios to chemometrics for determination of the geographic origin of welsh onions, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5803-5809 (2004).
 - 14) Ariyama, K., Horita, H. and Yasui, A., Chemometric techniques on inorganic elements composition for the determination of the geographic origin of welsh onions, *Anal. Sci.*, **20**, 871-877 (2004).
 - 15) 塚田政範, 藤原 守, 山崎行宏, 宮武 信, 小林 孝, ICP-MS 元素分析による梅干し等の産地判別, *農林水産消費技術センター調査研究報告*, **28**, 10-16 (2004).
 - 16) 奥崎政美, 食品の鑑別的研究—化学的成分組成の多変量解析によるキノコ類の原産地および栽培法の判別について—, *女子栄養大学栄養科学研究所年報*, **9**, 173-207 (2001).
 - 17) 田口陽嗣, 無機元素組成・含有量調査による青果物の産地判別—ICP-MS による青果物中の無機元素分析及びタマネギの産地推定—, *農林水産消費技術センター調査研究報告*, **26**, 1-8 (2002).
 - 18) 農林水産省生産局農産振興課, 農林水産技術会議事務局技術政策課, 国産大豆品種の事典 2002, pp. 69-70 (2003).
 - 19) 法邑雄司, 鈴木忠直, 條 照雄, 安井明美, 日本産と中国産の黒大豆「丹波黒」における無機元素組成の差異, *日作紀*, **74**, 36-40 (2005).
 - 20) 市原清志, 「バイオサイエンスの統計学」, (南江堂, 東京), pp. 72-75 (1990).
 - 21) 田中 豊, 脇本和昌, 「多変量解析法」, (現代数学社, 東京), pp. 53-87 (1983).
 - 22) 田中 豊, 垂水共之, 「統計解析ハンドブック for Win—多変量解析—」, (共立出版, 東京), pp. 57-67 (1995).
 - 23) 日本食品科学工学会, 「新・食品分析法」, (光琳, 東京), pp. 6-9 (1998).
 - 24) 山口和範, 高橋淳一, 竹内光悦, 「多変量解析の基本と仕組み」, (秀和システム, 東京), pp. 82-103 (2004).
 - 25) 法邑雄司, 青果物の産地判別のための誘導結合プラズマ質量分析法による多元素定量分析—ショウガ, ニンニクの産地判別—, *農林水産消費技術センター調査研究報告*, **27**, 37-43 (2003).
 - 26) 有山 薫, 無機元素組成によるネギの原産国判別, *食糧その科学と技術*, **42**, 37-54 (2004).
 - 27) 平 春枝, 国産大豆の品質特性とその変動要因の解明, *日食工誌*, **39**, 122-133 (1992).
- (平成 17 年 10 月 14 日受付, 平成 18 年 3 月 30 日受理)