

Agilent 4200 MP-AES による マルベックワインの原産地判別のための 元素プロファイリング

アプリケーションノート

食品テスト

著者

Jenny Nelson^{1~3}、
Helene Hopper^{1~2}、
Greg Gilleland³、
Daniel Cuthbertson³、
Roger Boulton¹、
Susan E. Ebeler^{1~2}

1 Department of Viticulture and
Enology, University of California,
Davis CA, USA

2 Food Safety and Measurement
Facility, University of California
Davis CA, USA

3 Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara CA, USA



概要

米国では、マルベック種のぶどうから作られる赤ワインの人気が高まっています。しかし、米国のワイン生産者はアルゼンチンに比べるとかなり小規模であり、一方でアルゼンチン国内ではかなり広範囲に多種のぶどうが植えられています。アルゼンチンから米国への輸入の増加に伴い、マルベックワインの原産地のバリデーションについての関心が高まっています。

通常、原産地が異なるワインを分類するために、ICP-MS を使用して、原産地の土壌組成の特性を示す鉱物元素の相対濃度を比較します。この研究ではマイクロ波プラズマ原子発光分光分析装置 (MP-AES) を使用したコストパフォーマンスの高い手法によって、6 種類の元素 (Sr, Rb, Ca, K, Na, Mg) を測定しました。アジレントの Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアと他のデータ解析パッケージを使用して、MP-AES の解析結果をモデル化し、アルゼンチンと米国で生産された 41 のマルベックワインのサンプルの原産地を分類しました。



実験手法

サンプル

41 の地理的に異なる場所の 2011 年産のマルベック種のぶどうを入手しました。そのうち 26 はアルゼンチンのメンドーサ地方のもの、15 は米国、カリフォルニアのもので、ワインの製造プロセスがそれぞれのワインの元素組成に与える影響を抑え、原産地に由来する元素の違いを保つために、ワインの製造には 2 つの中心的な施設のみを使用しました。表 1 はすべてのサンプルを詳細な原産地とともに示しています。ワインの製造手順の詳細については、参考文献中の研究論文に記載されています [1]。

標準溶液と試薬

単元素標準溶液 (10,000 mg/L の Ca、K、Mg、Na、1,000 mg/L の Sr) を VHG Labs 社 (マンチェスター、ニューハンプシャー州、米国) から、1,000 mg/L の Rb を SPEX CertiPrep 社 (メアチエン、ニュージャージー州、米国) から購入し、濃硝酸を JT Baker 社 (Instra-Analyzed グレード、センターバレー、ペンシルベニア州、米国) から入手しました。イオン化緩衝液 (100,000 mg/L Cs、アジレント、サンタクララ、カリフォルニア州、米国) は使用前に 2,000 mg/L に 1% HNO₃ 溶液で希釈しました。標準溶液および希釈には、超純水 (18 MΩcm、EMD Millipore 社、ベルリカ、マサチューセッツ州、米国) と Merck 社 (ホワイトハウスステーション、ニュージャージー州、米国) の Uvasol 分光分析グレードのエタノールを使用しました。

使用機器と測定条件

Agilent 4200 MP-AES は MicroMist 同軸ネブライザおよびバッフル付サイクロニクスプレーチャンバを搭載しており、この研究全体を通して使用されました。外部ガス制御モジュール (EGCM) を使用して空気を窒素プラズマに注入し、ワインサンプル中に存在する炭素のトーチへの蓄積を防ぎました。これにより、分析の間を通して安定した測定結果を確保でき、サンプル中の有機種に起因するバックグラウンド発光を抑制できました。2,000 mg/L のセシウム (Cs) イオン化緩衝液は、簡単なミキシングティを使用して、スプレーチャンバに入る直前にサンプルと絶えず混合されました。

干渉を受けない検出を確実にするために、各元素 (Sr、Rb、Ca、K、Na、Mg) は特定の波長でモニタリングされました。EGCM および読み取り時間の設定は各元素に合わせて最適化しました。機器はアジレントの波長標準溶液を用いて日々校正しチューニングしています。

すべてのワインサンプルが 5 % の HNO₃ で 1:50 に希釈された後、3 回分析されました。各元素についてマトリックスに合わせて調整された溶液 (5 % の HNO₃ および 0.2 % の エタノール) で 0 ~ 500 mg/L 間の 6 ポイントで校正し、エタノール性ワイン溶液のマトリックス干渉を考慮しました。

表 2 および表 3 それぞれに、使用した測定条件および検量線パラメータを示します。

統計データ解析

各マルベックワインでモニタリング対象となる 6 つの元素の濃度のデータを RStudio (バージョン 0.98.501、ボストン、マサチューセッツ州) とアジレントの Mass Profiler Professional (MPP、バージョン 12.61) で分析しました。各元素について多変量分散解析 (MANOVA) と個別の単変量分散解析 (ANOVA) を RStudio で実行しました。さらにワイン間で大きく異なる元素について MPP ソフトウェアで非ターゲットの主成分分析 (PCA) を実行しサンプルの相違を表示して確認します。最終分析として、PLS 判別分析 (PLS-DA) を使用し、国とその地域別にワインを原産地ごとに分類します。

表 1. 研究に使用したサンプル。ワインサンプル別に、地域、地区、GPS ロケーション、標高が示されています。

*認定されたアメリカぶどう栽培地域 (AVA) 外にある唯一の米国の地域、ヨーロッパ地域のサンプルを示しています。出典: Nelson ほか [1]

サンプルコード	地域	地区/AVA または郡	標高 (m、海拔)	サンプルコード	地域	地区/AVA または郡	標高 (m、海拔)
M1	ラコンスルタ	サンカルロス	999	M22	エルペラル	トゥブングート	1235
M2	ベドリエル	ルハン	964	M23	エルペラル	トゥブングート	1235
M3	ラコンスルタ	サンカルロス	999	M24	エルペラル	トゥブングート	1241
M4	ラコンスルタ	サンカルロス	999	M25	グアルタジャリー	トゥブングート	1354
M5	ラコンスルタ	サンカルロス	999	M26	グアルタジャリー	トゥブングート	1353
M6	ラスコンプエルタス	ルハン	1022	C1	ヨントヴィル	ナバ	不明
M7	ラスコンプエルタス	ルハン	1022	C2	マウントビーダー	ナバ	315
M8	ラスコンプエルタス	ルハン	1022	C3	マウントビーダー	ナバ	510
M9	アルタミラ	サンカルロス	1024	C4	マウントビーダー	ナバ	497
M10	アルタミラ	サンカルロス	1043	C5	オークノール地域	ナバ	25
M11	アルタミラ	サンカルロス	1096	C6	アレキサンダーバレー	ソノマ	58
M12	アルタミラ	サンカルロス	1047	C7	アレキサンダーバレー	ソノマ	68
M13	アルタミラ	サンカルロス	1043	C8	アレキサンダーバレー	ソノマ	53
M14	アルタミラ	サンカルロス	1024	C9	ヘイムズバレー	モンレー	214
M15	グアルタジャリー	トゥブングート	1342	C10	モンレー郡	モンレー	154
M16	アルタミラ	サンカルロス	1052	C11	ローダイ	サンホアキン	61
M17	エルペラル	トゥブングート	1235	C12	ウィンターズ*	ヨロー	88
M18	ルンルンタ	マイブ	931	C13	ウィンターズ*	ヨロー	77
M19	ルンルンタ	マイブ	930	C14	ウィンターズ*	ヨロー	70
M20	エルペラル	トゥブングート	1235	C17	レッドヒルズ	レイク	648
M21	エルペラル	トゥブングート	1235				

表 2. 4200 MP-AES 測定条件。出典: Nelson ほか [1]

パラメータ	値					
元素	Sr	Rb	Mg	Ca	Na	K
モニタ波長 (nm)	407.771	780.027	279.553	396.847	589.592	769.897
EGCM 設定	低	低	中	高		
ポンプレート (rpm)	10					
サンプルチューブ	オレンジ-緑					
イオン化バフファチューブ	オレンジ-緑					
廃液チューブ	青-青					
読み取り時間 (秒)	5		2			
測定回数	3					
サンプル取り込み遅延 (秒)	50					
安定化遅延 (秒)	20					
取り込み中の高速ポンプ	あり					
バックグラウンド補正	自動					

表 3. ワインサンプル分析用に使用した検量線パラメータ

出典: Nelson ほか [1]

元素	λ (nm)	検量線範囲 (mg/L)	バックグラウンド補正	検量線タイプ	相関係数
Sr	407.771	0 ~ 5	自動	直線	0.9999
Rb	780.027	0 ~ 5	自動	直線	0.9997
Mg	279.553	0 ~ 5	自動	直線	0.9998
Ca	396.847	0 ~ 5	自動	直線	0.9999
Na	589.592	0 ~ 5	自動	直線	0.9999
K	769.897	0 ~ 20	自動	直線	0.99999

結果と考察

10 個のサンプルブランクを分析することによって 3 シグマ検出下限を決めました。表 4 に示すように、モニタリング対象の 6 つの元素すべてが検出下限 (LOD) を上回る濃度で 41 の異なるワインサンプルから検出されました。また、多変量分散解析と単変量分散解析において 5 % の α 水準でワインサンプル間ですべての元素がはっきりと異なりました。このように、6 つの元素すべてがその後の PCA および PLS-DA 分析にも含まれました。

図 1a は、2 つの米国産ワインがわずかにオーバーラップするだけで、原産国によってワインが明らかに 2 分されることを示しています。成分負荷量プロット (図 1a) は Na と Sr の元素の違いが原産国を分ける主な要因であることを示しています。

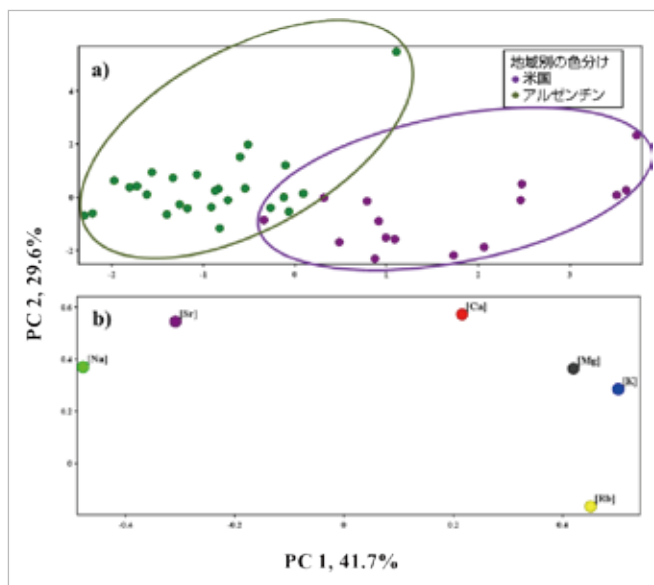


図 1. ワインサンプル間で異なる 6 つの元素を使用した 2D PCA バイプロット。
(a) 生産量プロットは原産国別に色分けされたワインのサンプルを示しています。
(b) 6 つの元素 (Sr, Rb, Ca, K, Na, Mg) による負荷量プロットです。出典: Nelson ほか [1]

しかし、PLS-DA を使用するとほぼ 100 % 正しく、ワインを原産国別に分類できます (図 2)。クロスバリデーションを使用した場合、予測精度は米国産ワインが 93.3 %、アルゼンチン産ワインが 96.2 % で、PLS-DA モデルの全体の精度は 95.1 % となります (表 5)。誤って分類されるワイン (アルゼンチン産ワインの M1 および米国産ワインの C12) は、同じ原産国の他のワインにくらべて Na、Mg、K のレベルが高すぎたり低すぎたりする (M1 は Na、Mg、K が低く、C12 は Mg が高い) ことが一番大きな要因です。優れた分類を実現できました。より多くのサンプルが利用できたとすれば、完全に未知のサンプルでモデルがどのように機能するかを見極めるテストができたはずでした。

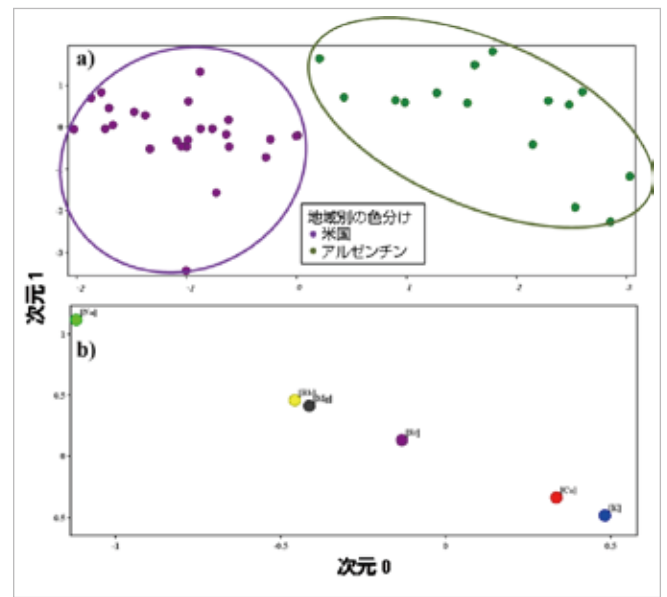


図 2. ワインサンプル間で大幅に異なる 6 つの元素を使用した 2D PLS プロット。
(a) 原産地別に分かれ、オーバーラップすることのないワインの分布を示すサンプルプロット。(b) 元素負荷量プロット。出典: Nelson ほか [1]

表 4. 検出限界 (DL) とアルゼンチンおよび米国を原産国とするワインと元素濃度。濃度の平均 \bar{x} 、平均値の標準誤差 $\sigma_{\bar{x}}$ 、最小 (min)、最大 (max) を示しています。元素の濃度 (mg/L) は 5 つのワイナリー間ではっきりと異なっています ($P \leq 0.05$)。出典: Nelson ほか [1]

	DL	カリフォルニア、米国原産のワイン		アルゼンチン、メンドーサ原産のワイン	
		$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$	最小 ~ 最大	$\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$	最小 ~ 最大
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Sr	0.0018	0.45 ± 0.02	0.24 ~ 0.83	0.77 ± 0.04	0.23 ~ 1.59
Rb	0.0004	3.37 ± 0.03	0.57 ~ 7.83	0.99 ± 0.02	0.55 ~ 2.19
Mg	0.0012	80.87 ± 0.42	61.75 ~ 144.86	72.87 ± 0.54	53.55 ~ 116.29
Ca	0.0016	51.78 ± 0.19	43.26 ~ 74.01	50.46 ± 0.25	33.22 ~ 95.08
Na	0.0007	4.90 ± 0.09	3.38 ~ 8.46	37.48 ± 0.48	13.71 ~ 121.87
K	0.0020	1444.42 ± 10.53	1120.94 ~ 2219.84	1181.22 ± 15.45	976.85 ~ 1989.12

表 5. 2つの原産国で PLS-DA を実行した場合のクロスバリデーション (Leave-one-out アルゴリズム) の結果。出典: Nelson ほか [1]

	米国 (予測)	アルゼンチン (予測)	精度
アルゼンチン (真)	1 (= M1)	25	96.2 %
米国 (真)	14	1 (= C12)	93.3 %
総合的な真度			95.1 %

結論

Agilent 4200 MP-AES は使いやすく経済的な機器で、アジレントの Mass Profiler Professional (MPP) のようなデータ解析パッケージを組み合わせるとワインサンプルの原産国解析に最適です。Sr、Rb、Mg、Ca、Na、K の 6 つの元素は、アルゼンチンと米国を原産地とするマルベックワインの広大な原産地の分類に有用で 15 の米国産のサンプルのうち 14 が正しく分類され、一方 26 のアルゼンチン産のワインで誤って分類されたのは 1 つのみでした。

参考文献

1. Jenny Nelson, Helene Hopfer, Greg Gilleland, Daniel Cuthbertson, Roger Boulton, Susan E Ebeler. Elemental Profiling of Malbec Wines Made Under Controlled Conditions by Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy. Am. J. Enol. Vitic. Published ahead of print April 2015

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的
または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様などは予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Published September 2, 2015

5991-5922JAJP



Agilent Technologies