

ぶどう畑の場所およびワイナリーが 赤ワインの元素プロファイルに与える影響

アプリケーションノート

食品検査・農業

著者

Helene Hopper^{1,2}, Jenny Nelson^{1,3}, Thomas S. Collins^{1,2}, Hildegard Heymann¹, and Susan E. Ebeler^{1,2}

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

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

³Agilent Technologies, Inc.



はじめに

消費者の間で、購入した食品の安全性と真正性を知りたいという要望が高まりつつあります。高価値食品への偽和物混入や低グレード品による原材料の代用は重要な問題です。安価品に高価値ブランドの偽装表示を行い、高グレード品として販売すれば、特定の原産地に関連する食材は特に、きわめて利益性が高くなる場合があります。これはワイン、チーズ、ハム、オリーブ油、ハチミツの場合によくあります。食品の真正性を立証するためのメソッドとして、種々の有機マーカーのためのDNAフィンガープリンティングや検査とともに、多元素プロファイリングが提案されています。

食品や飲料の元素の組成には、さまざまな因子が影響を及ぼします。例えば、ワインの金属プロファイルはぶどうの木が生育する土壌の組成、ぶどう栽培の慣習 (例: 農業や灌水の適用)、保存や熟成などのワイン醸造プロセスによって異なります [1]。



ワインの産地を同定できるかどうかについては、原子分光分析による標識元素のパターン認識を用いて判断してきました [2]。ICP-MS は数十年にわたりワインの元素フィンガープリンティングに用いられています [3 ~ 7]。この実験では、65 種の赤ワインサンプルへのぶどうの産地およびワイン醸造の複合的な影響について、ICP-MS を用いて調査しました。多変量解析ソフトウェアである Agilent Mass Profiler Professional (MPP) を用いて、63 種の元素の濃度で特徴付けられるワインの地理的な起源をモデル化しました。同じぶどう畑を産地とするがワイナリーでの醸造法が異なるワインを含めることによって、また、逆のケースを含めることによって、ぶどう畑の影響をワイナリーの影響から分離することができます。これは、ワインの元素プロファイルの醸造工程での変化を理解するのにも役立ちます。

実験方法

化学物質および標準試料

キャリブレーション溶液および希釈液にはすべて、超純水 (18 MWcm⁻¹, EMD Millipore 社) とエタノール (200 プルーフ, Gold Shield Distributors 社, カリフォルニア州ハイワード) を用いました。内部標準混合液は 1 % HNO₃ で 1:10 に使用前に希釈しました。SPEX CertiPrep 多元素標準溶液 (1, 2A, 3, 4) および内部標準混合液 (1 % HNO₃ 溶液中に 10 mg/L) は、SPEX 社 (メアチェン、ニュージャージー州) のものを使用しました。超高純度の硝酸は Fisher Scientific 社製、環境スパイク混合液はアジレント製のものを使用しました。

サンプルとサンプル前処理

図 1 に示すとおり、北カリフォルニアの異なるぶどう畑 5 箇所の 65 種の商用赤ワインサンプルは異なる商用ワイナリー 5 箇所で醸造されました。ワインはすべてヴィティスヴィニフェラ種のカベルネソーヴィニヨン、メルロー、ピノワールなどの単品種のぶどう品種から作られました。いずれのワイナリーでも、個別の発酵槽中で各ぶどう畑からのぶどうを発酵させました。発酵終了後に発酵後処理を追加で実施する前に、ステンレス鋼タンクから直接サンプルを採取しました。ワインはメタルフリーの 50 mL プラスチックチューブ (VWR 社、ラドナー、ペンシルベニア州) にサンプリングし、4 °C で分析まで保管しました。分析前にワインサンプルはすべて 5 % HNO₃ で 1:3 に希釈してエタノール濃度をおよそ 4 % に低下させ、各サンプルを 2 系列で分析しました。

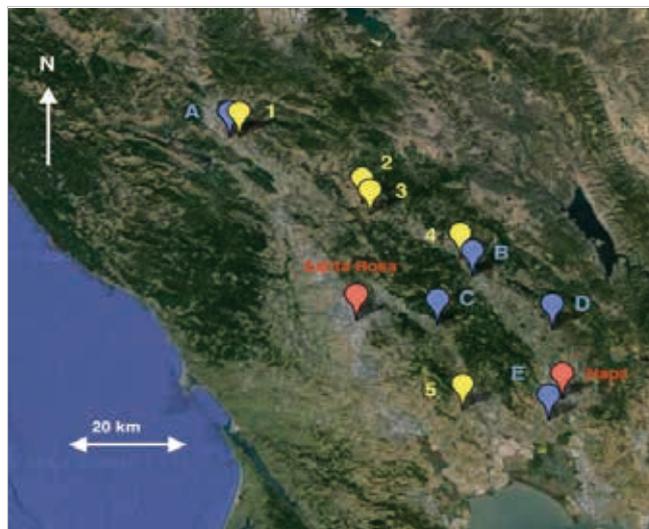


図 1. 65 種の赤ワインサンプルの産地であり醸造処理を実施した、ぶどう畑 5 箇所 (1 ~ 5) およびワイナリー 5 箇所 (A ~ E) を示すカリフォルニアの地図

使用機器と測定条件

今回の実験はオクタポールリアクションシステム (ORS³) コリジョンリアクションセルを搭載した Agilent 7700x ICP-MS で実施しました。⁶Li、Sc、Ge、Y、In、Tb、および Bi を含む内部標準 (ISTD) 溶液を 1 % 硝酸で 1 μg/L に希釈しました。ISTD 溶液はネブライザの前にミキシングティを用いてサンプルとオンラインで混合しました。ICP-MS はアジレントのチューニング混合液 (Li、Y、Ce、Tl、Co) ならびに Agilent Detector P/A Calibration solutions (Zn、Be、Cd、As、Ni、Pb、Mg、Th、Ca、Co、Sr、V、Cr、Mn、6Li、Sc、In、Lu、Bi、Y、Yb、Mo、Sb、Sn、Ge、Ru、Pd、Ti、および Ir) を用いて、毎日キャリブレーションしチューニングしました。アジレントの環境スパイク混合液標準を用いてワインサンプルを添加しました。表 1 に機器の使用条件を示します。

表 1. Agilent 7700x ICP-MS の使用条件

	ノーガス	He モード	高エネルギー (HE) He
RF 出力 (W)			1,550
ネブライザタイプ			MicroMist
キャリアガス流量 (L/min)			1.05
サンプリング深さ (mm)			10
スプレーチャンバ温度(°C)			2
セルガス流量 (mL/min)	NA	4.3	10

キャリブレーション

ワインサンプルの酸および炭素の含有量と一致するキャリブレーション溶液 (5 % HNO₃ および 4 % エタノール) を用いて、モニタリング対象元素 63 種すべてに対して、0 ~ 500 μg/L の範囲内の 6 点でのキャリブレーションを行いました。表 2 に、検出された全元素 46 種とそれらの検出限界 (LOD) をすべて記載します。より高濃度の元素 (> 500 μg/L: B、Na、Mg、Si、P、K、Ca、Mn、Cu、Rb、Sr、および Ba) については、5% HNO₃ (5 % HNO₃ 相当のキャ

リプレーション溶液マトリックス) で 1:1,000 に希釈ののち分析しました。添加されたサンプルは分析中に分析メソッドおよび定期キャリブレーションブランクの妥当性を確認するために分析され、定期キャリブレーション確認分析が 10 サンプルごとに実施されました。

表 2. 検出された元素と LOD (ppb) の一覧 (Hopfer ら、2015 年) [1]

元素	m/z	モード ^a	LOD ^b
Li	7	ノーガス	2.25E-01
Be	9	ノーガス	1.40E-02
B	11	ノーガス	1.12E-01
Na	23	ノーガス	1.79E+00
Mg	24	He	5.76E-01
Al	27	He	4.83E-01
P	31	He	5.45E+00
K	39	He	1.16E+00
Ca	43	He	8.79E-01
Ti	47	He	5.43E-01
V	51	He	2.40E-02
Cr	52	He	7.70E-02
Mn	55	He	2.30E-02
Co	59	He	9.00E-03
Ni	60	He	3.47E-01
Cu	63	He	2.30E-02
Zn	66	He	1.50E-02
Ga	69	He	5.00E-03
As	75	He	7.00E-03
Se	78	HeHe	5.20E-02
Rb	85	He	6.88E-03
Sr	88	He	1.00E-02
Mo	95	He	8.30E-02
Rh	103	He	1.00E-03
Cd	111	He	9.00E-03
Sn	118	He	2.10E-02
Sb	121	He	4.00E-03
Cs	133	He	4.60E-03
Ba	137	He	1.30E-02
La	139	He	6.00E-04
Ce	140	He	2.00E-03
Pr	141	He	3.00E-04
Nd	142	He	7.00E-04
Sm	147	He	2.00E-03
Eu	153	He	4.60E-06
Gd	157	He	1.00E-03
Dy	163	He	1.11E-03
Ho	165	He	6.00E-04

Er	166	He	2.00E-03
Tm	169	He	7.30E-03
Yb	172	He	1.00E-03
W	182	He	1.90E-02
Re	185	He	5.00E-04
Tl	205	He	1.40E-02
Pb	208	He	5.00E-03
U	238	He	6.60E-06

Mass Profiler Professional ソフトウェアを用いたデータ解析

Agilent ICP-MS MassHunter ソフトウェアを用いて、データを取得し分析しました。分析後、ワインすべての元素濃度をアジレントの MPP 多変量解析ソフトウェアにインポートし、大量で複雑なデータセットの統計解析を実施しました (ワインサンプル 65 種 × 検出元素 46 種 × 3 回繰り返し)。また、MPP では多次元データセット内の関係 (この場合、5 箇所の異なるぶどう畑およびワイナリーの組み合わせからの 65 種のワインおよび元素濃度 46 種) を調査し測定するための簡便な方法として、データ視覚化ツールを用いました。MPP で log2 スケール濃度データの分散分析 (ANOVA) を実施し、ワイナリーおよびぶどう畑の影響ならびに、ワイナリーとぶどう畑の相関を評価しました。統計的有意性は 5 % に設定しました。正準変量分析 (CVA) を分類法として選択し、多変量 ANOVA モデルを用いて、ワイナリー別、ぶどう畑別、およびワイナリーとぶどう畑の組み合わせ別に互い

結果と考察

元素プロファイリング

モニタリング対象元素 63 種のうち 46 種が検出され、後続のデータ分析の対象となりました。回収率は 93 % (Ba) ~ 103 % (Ca) の範囲内であり、シーケンス全体にわたって分析されたスパイクサンプルで測定されました。検出元素はいずれも、異なるワイン栽培品種に伴う有意差を示しませんでした。しかし、元素コンテンツの有意差は、異なるワイナリー 5 箇所 (有意に異なる元素 33 種) と異なるぶどう畑 5 箇所 (有意に異なる元素 26 種) および異なるワイナリーとぶどう畑の組み合わせ 15 種 (有意に異なる元素 17 種: Be, Na, P, Ti, Zn, As, Rb, Cd, Sb, Cs, La, Pr, Dy, Er, Tm, Yb, および Tl) の間に認められました。これらの所見により、ぶどうの生育地およびワイン醸造の両方がワインの元素組成に影響を及ぼすことが示されます。ワイン内のより多くの元素が、ぶどう畑の場所の違いと比較して、醸造法が異なるワイナリーごとに有意に異なりました。これは、ワイン醸造がワインの元素コンテンツに対して、ぶどう畑の場所よりも大きな影響を及ぼすと解釈することができます。ぶどう畑とワイナリーの影響に関するデータについて詳しくは、Hopfer らの論文 (2015 年) [1] で参照することができます。

ワイナリーとぶどう畑の相関

上述の 17 種の元素について、MPP ソフトウェアでサンプルの CVA グラフを出力しました (図 2)。ワイナリー A および B のワインの明瞭なクラスターが認められます。ぶどう畑 1 (A1, C1 および D1) で育てられたぶどうは、ワインが生産されたワイナリーに関係なくグループ化されます。類似したパターンはぶどう畑 5 で育てられたぶどうにも認められます。ぶどう畑 2 と 3 は、地理的に互いに接近しているため、土壌条件が類似している可能性があります。これは、グラフ右側にある A2 と B2 のワインとグラフ左側の A3 と B3 のワインのスコアプロットに反映されています (図 2)。2 サンプル (B4 と E4) のみがぶどう畑 4 で育てられたぶどうを用いて調製されており、元素組成に対するワイナリーからの影響によって、ぶどう畑からの影響が不明瞭になることを結果は示唆しています。

図 3A および 3B のスコアのボックスプロットおよび合計の構造係数を見ると、図 2 に示されるワインサンプルの分離に貢献する元素を調査できる可能性があります。図 3A では、水平な第 1 次元である CV1 に沿って、ワインはぶどう畑の強い影響 (ぶどう畑 1 および 5 については CV1 スケールの反対側に表示される) か、ワイナリーとぶどう畑間の複合的な影響 (ワイナリー A と B およびぶどう畑 2 と 4 の場合) のいずれかを受けて分離することが示されています。ワインの水平分離の原因である元素は図 3B に示されます。右側のワインには高位レベルの Be, Rb, Cs, Tl、および一部の混合希土類元素が示され、左側のワインには Na, P, Ti, Zn, As とわずかな Cd および Sb が示されています。

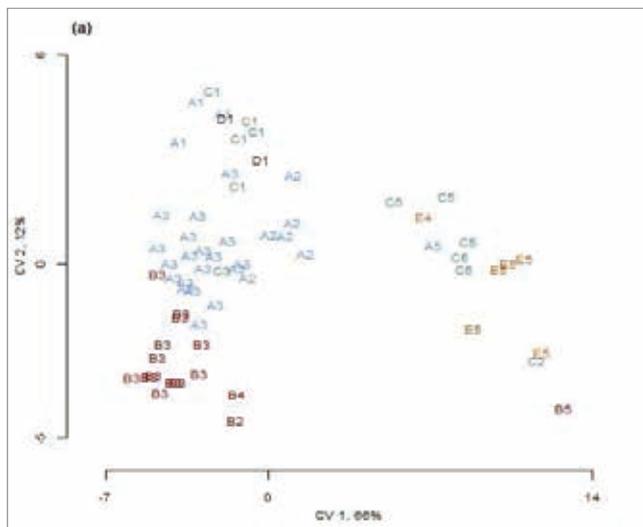


図 2. 分類指標としてワイナリーとぶどう畑の相関を用いた多変量分析。各ワインサンプルはワイナリーによって色分けされて示されます。No.1 ~ 5 は 5 箇所の異なるぶどう畑を示します。出典: Hopfer, H.; Nelson, J.; Collins, T. S.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. The combined impact of vineyard origin and processing winery on the elemental profile of red wines. Food Chemistry 2015, 172, pp. 11, with permission from Elsevier.

垂直の第 2 次元 (CV2) に沿って、ワイナリー B で醸造されたワインは、プロット底部にグループ化されます (図 3C)。図 3D では、ワイナリー B で醸造されたワインでは P と Ti を除くすべての元素が高位レベルであったことが示されています。

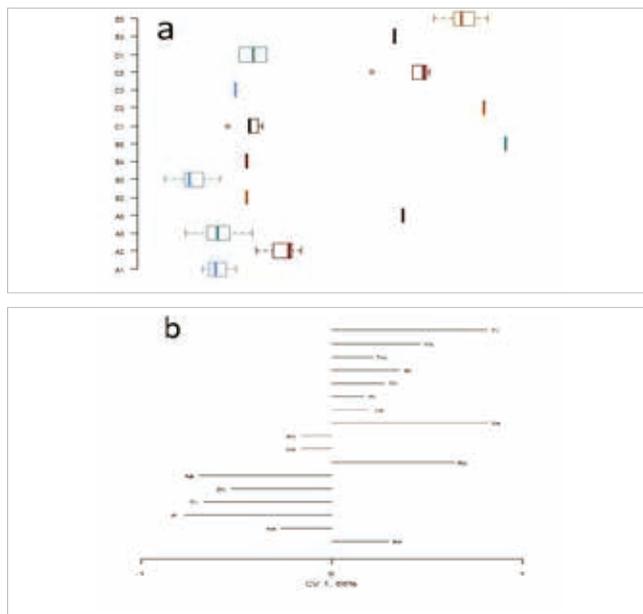


図 3a. 分類指標としてワイナリーとぶどう畑の相関を用いた多変量分析。CV1 ボックスプロット (A) および構造係数プロット (B)。出典: Hopfer, H.; Nelson, J.; Collins, T. S.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. The combined impact of vineyard origin and processing winery on the elemental profile of red wines. Food Chemistry 2015, 172, pp. 11, with permission from Elsevier.

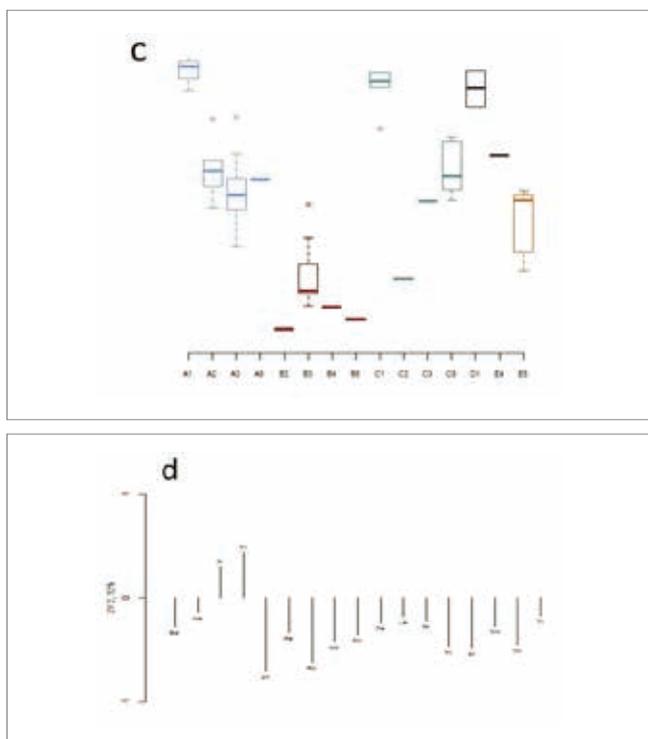


図 3b. CV 2 ボックスプロット (C) および構造係数プロット (D)。長いラインによって表される元素は、CVA で認められた分離に対してより大きく貢献しています。
出典: Hopfer, H.; Nelson, J.; Collins, T. S.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. The combined impact of vineyard origin and processing winery on the elemental profile of red wines. *Food Chemistry* 2015, 172, pp. 11, with permission from Elsevier.

結論

元素プロファイリングはワインなどの食品や飲料の地理的な出所を特性分析するために用いられることが多くなっています。ぶどう産地とワイン醸造の複合的な影響をより良く理解するために、65種の赤ワインの元素コンテンツを Agilent 7700x/7800 ICP-MS と Agilent Mass Profiler Professional 計量化学ソフトウェアを組み合わせ分析しました。本実験により、元素プロファイルではぶどうタイプ (ぶどうの栽培品種) 別に識別できないことが実証されました。しかし、元素フィンガープリンティングにより、ぶどう産地、ワイン醸造、および両因子の組み合わせによってワインサンプルを分類することができました。17種の元素によってワイナリーとぶどう畑との間の重要な相関が示されました。すなわち、これらの17種の元素の元素濃度はぶどうの生育とワイン醸造からの影響を受けており、ワイナリーとぶどう畑の15種の組み合わせによってその程度は異なります。こうした複合的な影響を検討することで、多元素フィンガープリント法を用いて、赤ワインの原産地の決定のための知見を深めることが可能です。

参考文献

1. Hopfer, H.; Nelson, J.; Collins, T. S.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. The combined impact of vineyard origin and processing winery on the elemental profile of red wines. *Food Chem.* **2015**, 172 (1), 486-496.
2. Baxter, M. J.; Crews, H. M.; Dennis, M. J.; Goodall, I.; Anderson, D. The determination of the authenticity of wine from its trace element composition. *Food Chem.* **1997**, 60 (3), 443-450.
3. Almeida, C. M. R.; Vasconcelos, M. T. S. D.; Barbaste, M.; Medina, B. ICP-MS multi-element analysis of wine samples - A comparative study of the methodologies used in two laboratories. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 374 (2), 314-322.
4. Augagneur, S.; Médina, B.; Szpunar, J.; Lobiński, R. Determination of rare earth elements in wine by inductively coupled plasma mass spectrometry using a microconcentric nebulizer. *J. Anal. At. Spectrom.* **1996**, 11, 713-721.
5. Greenough, J. D.; Longerich, H. P.; Jackson, S. E. Element fingerprinting of Okanagan Valley wines using ICP-MS: Relationships between wine composition, vineyard and wine colour. *Aust. J. Grape Wine R.* **1997**, 3, 75-83.
6. Taylor, V. F.; Longerich, H. P.; Greenough, J. D. Multielement analysis of Canadian wines by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and multivariate statistics. *J. of Ag. Food Chem.* **2003**, 51, 856-860.
7. Sperkova, J.; Suchanek, M. Multivariate classification of wines from different Bohemian regions (Czech Republic). *Food Chem.* **2005**, 93, 659-663.



ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等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. 2017

Printed in Japan, July 4, 2017

5991-6111JAJP