

## A-TEEM分子指紋を用いた赤ワインの分光学的解析

Spectroscopic Analysis of Red Wines with A-TEEM Molecular Fingerprinting

赤路 佐希子

Sakiko AKAJI

A-TEEMとはAbsorbance-Transmission and fluorescence Excitation-Emission Matrixの略で、HORIBA製 蛍光分光装置Aqualogに搭載されている技術である(US patent 8901513)。この技術を使って、水処理工程における分析、薬品分析、タンパク分析だけでなく、食品・飲料産業においても重要な様々なパラメータを取得することができる。従来Aqualogは水分析用の装置と考えていたが、ワインのような飲料の分析にも応用できることがわかった。Aqualogは完全な紫外可視吸収スペクトルを取得でき、ワイン中のフェノール類含有量評価に重要で、Hue値(ワイン独自の色合い)と強度値を求める時に必要な280, 420, 520および620 nmにおける吸光度を測定することができる。Aqualogは透過スペクトルも出力でき、CIElab色空間上での色味表示もできる。Aqualogが取得するEEM (fluorescence Excitation-Emission Matrix) 指紋は、NIST標準試料で校正されており(NISTトレーサブル)、PARAFAC (Parallel Factor Analysis) や主成分解析PCA (Principal Components Analysis) といった多変量解析を用いて評価することができる。最も重要なのは、単なる吸光データあるいは透過データの解析では決定できない、ブドウ飲料やワインの香りや色を決める成分の定性と定量値を、A-TEEM指紋から求めることができることである。

The patented (US patent 8901513) Aqualog which facilitates simultaneous Absorbance- Transmission and fluorescence Excitation-Emission Matrix (A-TEEM) technology, provides rapid access to a wide range of parameters of significance in water treatment, drug and protein analysis as well as the food and beverage industry. We think of Aqualog as an instrument for water analysis, but find that it is adept at wine analysis and more. Aqualog acquires a complete UV-VIS spectrum including the wine industry-standard Absorbance wavelength values at 280, 420, 520 and 620 nm which are important to evaluate a wine's phenolic content, and derive characteristic Hue and Intensity values. Aqualog also reports the Transmission spectrum which can be used to determine the CIElab Tri-Coordinate color descriptions. Aqualog reports a NIST-traceable EEM fingerprint which can be evaluated using multivariate statistics such as PARAFAC (Parallel Factor Analysis) and PCA (Principal Components Analysis). Most importantly, A-TEEM fingerprints yield qualitative and quantitative composition of key flavor and color determinants in grape juice and wine that are not discernible with simple Absorbance or Transmission data analysis.

### はじめに

A-TEEMの技術により、複雑な化合物の分子指紋を取得し、成分を正確迅速に同定することができる。今回、Aqualogを使いこの技術を赤ワイン分析に応用した例を詳

述する。赤ワインは、おそらく、水に次いでもっともよく研究され分析されている。安価な輸送が可能になり、バルクワイン、および瓶詰されたワインの国際取引が急増している。この国際取引の増加にともない、安価で品質の低いワインやその他の類似品への添加物混入の危険性が増加し

ている。このことから、比較的簡単に迅速にワインの産地や成分を現場で分析することが最も強く求められるようになった。

世界的なワイン業界の商業規模は3千億ドル<sup>[1]</sup>で、US単体では320億ドルとなり、そのほとんどをカリフォルニアで生産している。一方で様々な種類を含むワイン市場では様々なタイプや種類のワインが取引されているが、ブドウ醸造前後で行われる成分分析では、ほぼ赤ワインが分析されている。特に、注目されるのは赤ワインの色である。その熟成期間中の色の安定性は、同品質のワインを評価する際に、最も重要視される項目となっている。ブドウに含まれる数百種にわたる成分のうち、熟成したブドウ果実中のフェノール類含有量は、ワインの品質を決める最も重要な成分である。様々な分類されるフェノール類(アントシアニン、タンニン、フラボノール、カテキン)が、ワインの様々な色、口当たり、味や香りに影響を与えている<sup>[2]</sup>。これらのフェノール類を構成する個々の化合物が一体となって、ワインの独特な風味が作り出されている。Veraison(仏)と呼ばれる熟成開始時期と、その後およそ30日から60日の期間の育成作業(intervention)は、ワインの最終品質を決める重要な作業である。これらの育成作業として、果実への日射を変化させる葉の剪定作業(結果的にフェノール類の合成に影響を与える<sup>[3]</sup>)、収穫量をコントロールするブドウの房を取り除く作業(摘房作業)(これによって一定のブドウ粒数に果実成長するように導く)、varaison後の灌漑作業(protocol)が含まれている。よって、適切な収穫時期決定に際し、フェノール類の評価には大きな関心が向けられている。糖含有量、pHや酸度に関するバルク測定は、特別なトレーニングなしに行うことができる基本的な測定であるが、フェノール類解析に用いられる高速液体クロマトグラフ(HPLC)、ガスクロマトグラフ質量分析(GC/MS)、紫外可視分光(UV/VIS)といった装置は、詳細な情報が得られる一方で、適切なトレーニングと経験が求められる。現に、そのために多くのワイン解析サービスラボが世界的に存在しているほどである。

ここで、Aqualogにおける革新的な技術として、内部補正効果(Inner Filter Effect, IFE)を用いた補正機能を紹介したい。IFE補正とは、Primary Filter Effect (PIF)と

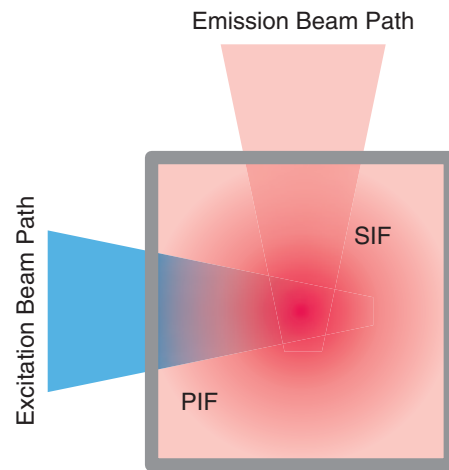


Figure 1 Inner Filter Effect (IFE)

Secondary Filter Effect(SIF)を補正する機能である。PIFとは、液体サンプル測定時において蛍光測定部に励起光が到達するまえに、サンプル自体の吸光によって励起光強度が徐々に減少していく現象で、SIFとは、同様に蛍光測定部における発光がサンプルに吸収されることによって弱められる現象である。

Figure 1に示すように青の励起光強度は、蛍光測定部に到達する前にサンプル自体の吸光により徐々に減少していく。赤の発光は、サンプル内における再吸収により弱められる。

Figure 2はIFEのスペクトル結果である。蛍光スペクトルにおける短波長域の発光強度は、蛍光の再吸収により弱められる。光学密度の高いサンプルにおけるIFEなしの蛍光スペクトルを左に、IFEありの蛍光スペクトルを右に示す。

リアルタイムにIFE効果補正を適応できるので、Aqualogは定量的な水分析の産業標準になった。

吸光度、透過度、IFE補正EEMを同時に取得することにより、ロット間、地域性や様々な特徴の評価、さらに酸化、亜硫酸処理といった処理効果を検出するなど、工業的なワイン特徴づけのツールとしてAqualogを活用することが可能となった<sup>[4]</sup>。これらの測定により、ワインに含まれるフェ

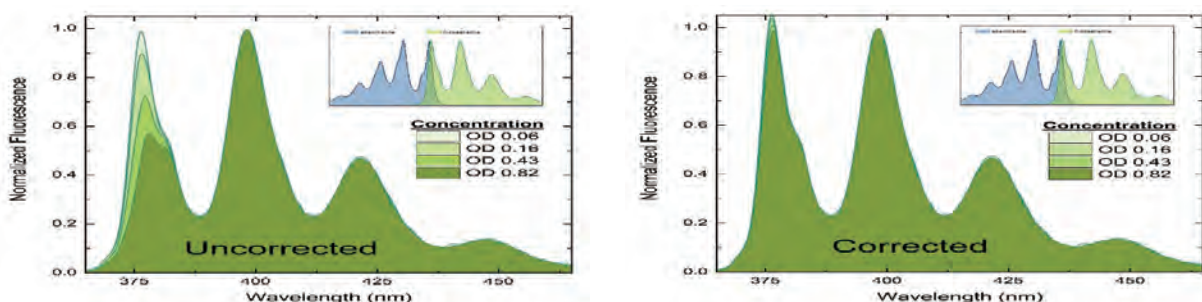


Figure 2 Spectral consequence of the inner filter effect

Table 1

Molecular groups	Main contribution	Examples of individual molecules
anthocyanins	color	cyanidin-, petunidin-, delphinidin-, malvidin (-3-glucosides)
catechins	bitterness	monomeric flavon-3-ols catechin, epicatechin, epicatechin-gallate
tannins	astringency	polymers of flavon-3-ols catechin, epicatechin
non-flavonols	antioxidants, sun screen	coumaric, caffeic, ferulic, gallic acids, resveratrol
flavonols	photoprotection	quercetin, myricetin, kaempferol, isorhamnetin, syringetin

ノール類とその変化の網羅的な解析が可能になり、ヴィンテージとSO<sub>2</sub>処理の識別、ワインの産地同定、腐敗や潜在的な問題要素を見つけ出すことに活用できるのではと考えられる。

Table 1に、ワインの特徴である芳香、長期安定性および色に影響するごく一般的なフェノール類を示す。

収穫後のブドウおよびブドウ果汁におけるタンニン(tannins)とアントシアニン(anthocyanins)のモニタリングによって、ワイン製造者は適切な発酵期間を決定し、果実の皮や種から抽出されるこれらの化学成分の量を知ることができる。ブレンド工程においてこれらの成分量を調整することによって色や芳香を修正し、求められる最終製品のワインに仕上げることができる。

アントシアニンとタンニンの含有量及び抽出量はブドウの果実熟成期間に増加する。熟成期間6週以降においてカテキンから渋味を出すタンニンへの急激な成分変化が起こり、アントシアニン含有量は4倍に増加する。文献<sup>[5]</sup>にみられるような深みのある色を提示することになる。

現在、吸光度と蛍光指紋(fluorescence excitation-emission matrix, EEM)を同時に取得する特許技術を持つAqualogがワイン研究に使用されている。研究の主な目的はA-TEEMとワインの色味や含有成分といった統計的に特長のある項目を関連付けることである。280, 420, 520および620 nmにおける吸光度と透過度およびCIE色度図は、ワイン業界において、そのプロセス評価、品質管理における許容誤差の設定に使われる重要な指標である。IFE補正済みEEMを用いてPARAFACやPCAといった多変量解析することにより、ワインの色を決定づける成分のスペクトル情報と濃度情報を取得することができる。このようにして得られる情報を用いて、ワインのロット間、種類、数多くのワイン製造プロセスによる色味成分解析に有用な考察ができると思われる。

## 試料と実験方法

測定には以下の7タイプの赤ワインを使用した。各ワインの生産地およびブドウ種をTable 2に示す。サンプルを脱イオン水で希釈し、1 cm光路長の石英セルにて278 nmに

Table 2

Production region	Grape cultivar
Italy (Italy)	50% Cabernet Sauvignon 50% Merlot
Italy (Italy N/A)	ND
Chile	Merlot
California (CA)	Merlot
Argentina (Arg)	Malbec
France (France)	55% Cabernet Sauvignon 40% Merlot 5% Petit Verdot
Spain (Spain)	50% Tempranillo 50% Gamacha

おける光学密度(OD)が0.6になるように調整し、室温で測定した。各サンプルのEEMと吸光スペクトルは3回測定した。サンプルはそれぞれ、ボトルを開封して1時間以内の新鮮な状態、および大気に1週間さらした状態において測定を行った。

測定後、すべてのEEMにおいて水ラマン散乱を用いた正規化を行い、発光状態を均一化した。またEEMはすべてNISTトレーサブルである。その後、IFE補正およびレイリー光マスキングを行い、Eigenvector社のSOLOパッケージをPARAFAC、およびPCA解析に使用した。

## 結果と考察

Figure 3に示すように、EEM測定の結果、開封後の赤ワインにおける吸光度および透過率に変化が見られた。EEMでは、複数成分の励起および発光の重なりが観察されるため、等高線から主要成分の定性定量的な解釈は限られる。しかし、このEEMからはっきりとわかるのは、励起・発光(Ex/Em)ピークが275/309 nm付近にあるUV域で励起発光する成分が主要成分であることだ。大気にさらす前後における吸光度(および透過度)スペクトルから、主要な吸収ピークが275 nmであること、320 nmおよび520 nm付近にも弱いながらも吸収があることがわかる。275 nmのピークは通常フェノール類と関連があり、520 nmのピークはアントシアニン成分と関連付けることができる。520 nmの吸収における発光は弱く、Figure 3に示す発光スケールでは表示されていない。EEM中の500-600 nm付近のピークは主要成分として分離成分に含まれる(Figure 6参照)。

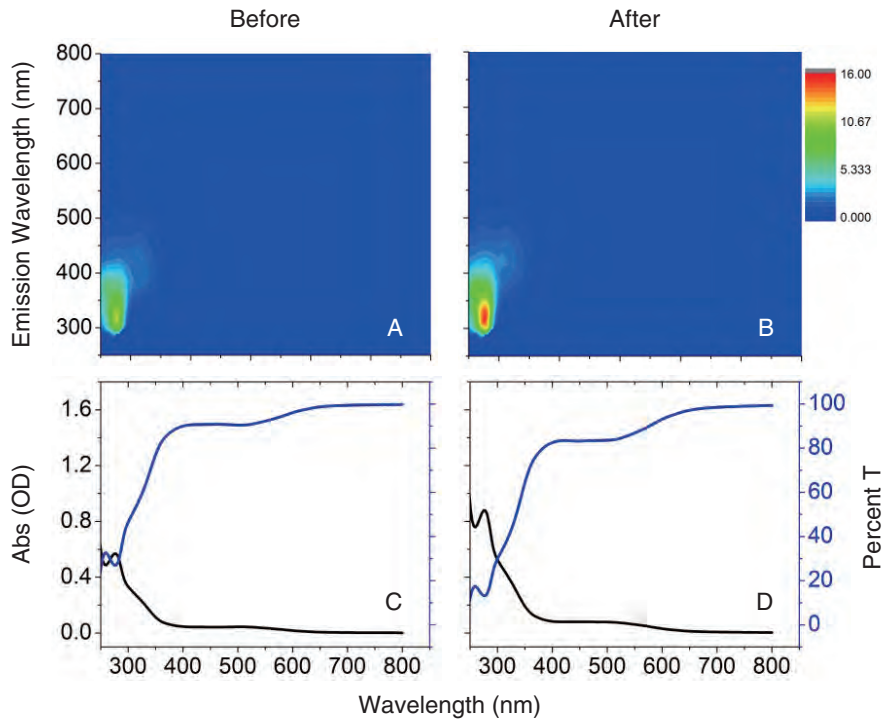


Figure 3 Simultaneously recorded EEMs (A and B) and Absorbance and percent Transmission spectra (C and D) for a typical Italian red wine from a freshly opened bottle Before (A and C) and After a one week exposure to air (B and D).

大気にさらす前後(Figure 3C, 3D)を比較すると、酸化により吸光度スペクトルが増加していることがわかる。同様に、大気にさらした後のEEM(Figure 3B)ではさらす前のEEM(Figure 3A)よりも発光強度が増加している様子が示されている。

### 吸光度、透過度およびCIE色度図解析

ワイン業界は、従来3つの波長における吸光度を用いた解析を採用しており、それぞれA420、A520、A620と呼ばれている。これらの指標は、ワインの色味(赤、茶色、黄色)の特徴づけ、HUE(色調)やIntensity(強度)を示す際に使われる。AqualogではUV-VIS領域の吸光スペクトルを測定するので、これらの3波長の吸光度を用いた解析が可能である。HUEは以下の式で表される。

$$Hue = A420/A520$$

またIntensityは以下の式にて計算される。

$$Intensity = (A420+A520+A620)$$

また、A280の値は通常フェノール類が存在するかどうかの測定基準として使われる。しかしながら、A280は他の成分の吸光度も含まれていると思われる。

Figure 4AおよびBにおけるデータは、左から右に向かってIntensityの平均値(Figure 4B)が大きい順にサンプルを並べたものである。Italy N/Aサンプルが最も高い強度を示

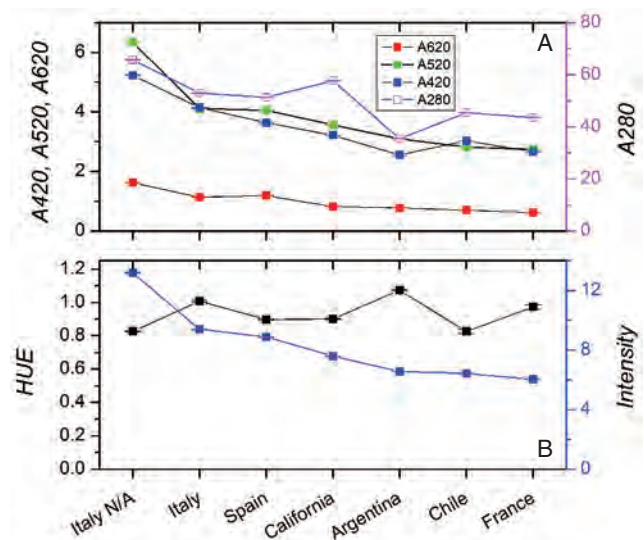


Figure 4 Comparison of the Absorbance parameters (A) and Hue and Intensity parameters (B) defined above, measured with Aqualog for a series of freshly opened red wines from various countries.

し、Franceサンプルが最も弱い。強度のパラメータであるA420、A520、A620をFigure 4Aに示すが、これらの値は、いずれのワインにおいても高い吸光度を示したA280とは相関を示さなかった。同様に、HUEは、Figure 4Bにおいて、0.82から1.07の間に分布し若干ランダムな様子を示しており、強度パラメータとの相関はあまり見られなかった。

Figure 5にCIE1931色度図における各ワインサンプルの分布を示す。CIE1931をフルスケールで示したFigure 5Aに

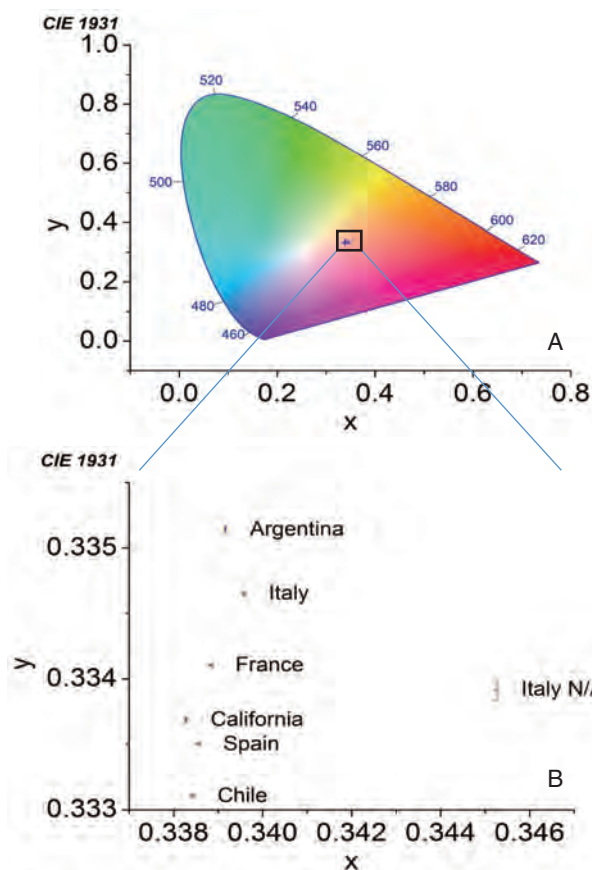


Figure 5 CIE 1931 x and y coordinates for each of the wine samples from Figure 4.

おいては、赤ワイン分布はほぼ1カ所に集中していた。**Figure 5B**は、**Figure 5A**で四角に囲った部分の拡大図で、すべてのサンプルは非常に狭い範囲( $x=0.337-0.347$ ,  $y=0.333-0.335$ )に分布していたことがわかる。 $x$ ,  $y$ の各データポイントには、標準誤差バーも示している。**Table 3**に、**Figure 3**に示したItalyワインサンプルの吸光度、色度、およびCIE色度図パラメータ値を示す。開栓前から開栓後の値を差し引いた差 $\Delta$ はマイナスの値を示しており、明らかにすべての吸光度パラメータおよび強度にて有意な増加( $p < 0.05$ )を示した。これは**Figure 3**で示したEEMおよび吸光度・透過度のデータと一致した。色度パラメータも顕著に増加していた。よってCIE色度図に関わるパラメータも酸化により有意な変化( $p < 0.05$ )を示した。

### EEM PARAFAC解析

PARAFACとは、3次元マトリックス分解の手法で、以下に述べるように、各推定モデルコンポーネントの①励起スペクトルのローディング形状、②発光スペクトルのローディング形状、③濃度ローディングスコアを得るために使用した。PARAFAC結果は最小自乗フィッティングの性能指数( $r^2$ )により評価され、core consistency, および交差検証によりモデルの適切さとパラメータの冗長性を評価する。今回評価したPARAFACモデルは、すべてのローディングおよびスコアにおいて非負拘束の条件で解析を行った。今回測定したすべてのサンプルについて開栓直後と酸化後について複数回測定したデータをPARAFACで解析した。分離されたローディング結果として5つの励起-発

Table 3 Absorbance, Hue, Intensity and CIE Lab color index parameters for the Italy wine sample shown in Figure 3 Before and After oxidation.

Absorbance	Before	$\sigma$	After	$\sigma$	$\Delta$	$\sigma$
A620	1.14E+00	1.09E-02	2.11E+00	1.17E-02	-9.78E-01	1.60E-02
A520	4.12E+00	1.50E-02	7.15E+00	1.70E-02	-3.03E+00	2.27E-02
A420	4.14E+00	1.86E-02	7.60E+00	1.14E-02	-3.46E+00	2.18E-02
A280	5.30E+01	1.38E-01	8.21E+01	1.36E-01	-2.92E+01	1.93E-01
HUE	1.01E+00	5.82E-03	1.06E+00	2.99E-03	-5.69E-02	6.54E-03
Intensity	9.39E+00	2.63E-02	1.69E+01	2.36E-02	-7.47E+00	3.53E-02
CIE Lab						
X	1.10E+02	3.00E-02	1.06E+02	3.39E-02	4.79E+00	4.53E-02
Y	1.09E+02	3.29E-02	1.03E+02	3.85E-02	5.69E+00	5.07E-02
Z	1.06E+02	5.09E-02	9.72E+01	2.14E-02	8.57E+00	5.52E-02
x	3.40E-01	2.71E-05	3.45E-01	2.25E-05	-5.50E-03	3.52E-05
y	3.35E-01	1.59E-05	3.37E-01	3.30E-05	-2.25E-03	3.66E-05
X+Y+Z	3.25E+02	1.14E-01	3.06E+02	8.89E-02	1.91E+01	1.44E-01
L*	1.03E+02	1.21E-02	1.01E+02	1.46E-02	2.12E+00	1.89E-02
a*	1.18E+01	4.74E-03	1.32E+01	7.58E-03	-1.40E+00	8.94E-03
b*	6.57E+00	1.12E-02	8.45E+00	1.80E-02	-1.88E+00	2.12E-02
C*ab	1.35E+01	9.48E-03	1.57E+01	7.02E-03	-2.17E+00	1.18E-02
h*ab	5.09E-01	5.68E-04	5.70E-01	1.16E-03	-6.11E-02	1.29E-03
S*	1.31E-01	1.07E-04	1.55E-01	6.70E-05	-2.42E-02	1.26E-04
Q*	1.33E+02	1.08E-02	1.31E+02	1.31E-02	1.91E+00	1.70E-02

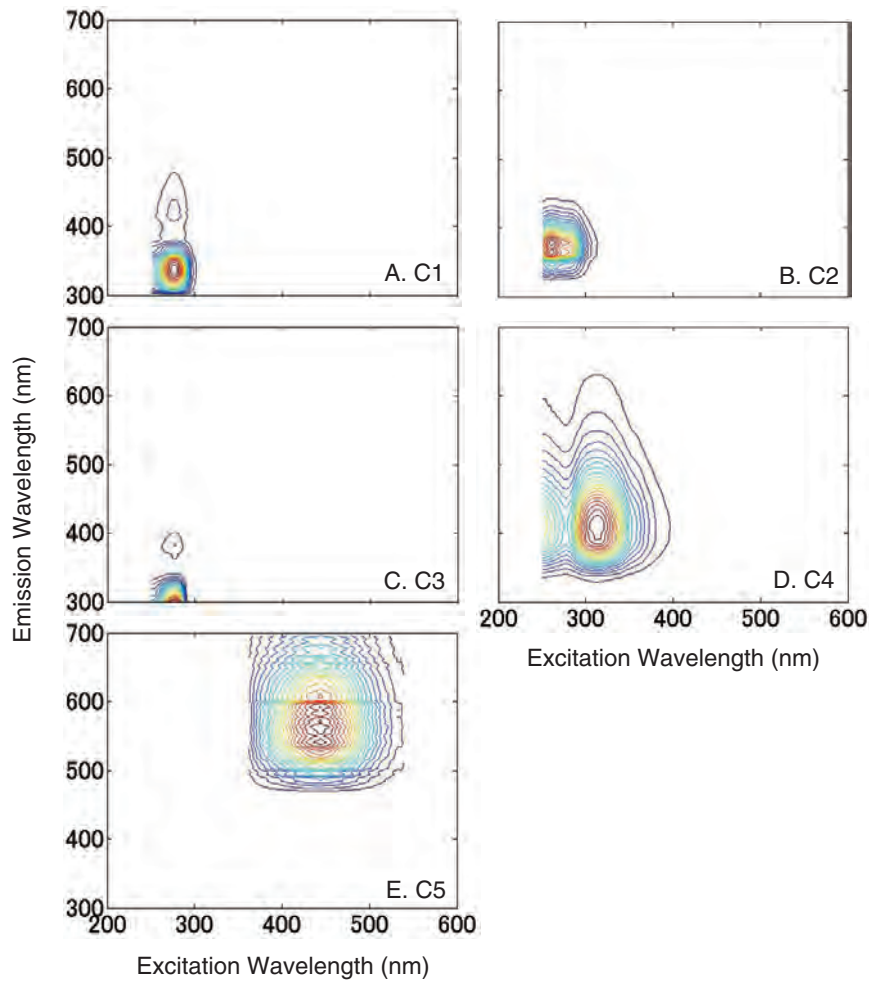


Figure 6 IFE corrected excitation and emission spectral contour loadings for the five component model evaluated for all wine sample replicates before and after oxidation. The PARAFAC model (n=84) was described with an  $r^2=0.997$  and a split half validation score  $r^2=0.906$  (where the model is tested with two halves of the dataset separately).

光等高線の結果をFigure 6に示す。コンポーネント1には、主要成分(275/330 nm)とマイナー成分(275/425 nm)のEx/Em等高線が認められた。コンポーネント2は、単一成分の等高線(260/370 nm)を示している。コンポーネント3は、UV域における主要成分(275/300 nm)と非常にマイナーな成分(275/370 nm)の等高線を示している。コンポーネント4は、広範な発光であり、励起波長に二峰性を持つ主要成分(Ex/Em=325/410 nm)の等高線を示している。ただし、より短波長側の励起波長域におけるバンドは本解析で使用した250 nm以上の範囲からはずれており、十分に分離できていない可能性がある。コンポーネント5は広範な等高線(430/560 nm)を描いており、最も存在量が少ない

と思われる。Ex/Em座標に基づき分解したこれらのコンポーネントを文献値と比較し、暫定的に同定した結果をTable 4<sup>[6]</sup>に示す。

Italyワインにおけるボトル開栓後の酸化による変化をFigure 7に示す。コンポーネント1は、酸化前後いずれにお

Table 4 Qualitative assignment of PARAFAC components

PARAFAC Component	Excitation Max, nm	Emission Max, nm	Name
C1	278	340	Caffeic Acid
C2	263	380	Flavonol Like
C3	280	300	Epicatechin
C4	315	405	Gentisic Acid
C5	445	568	Anthocyanin

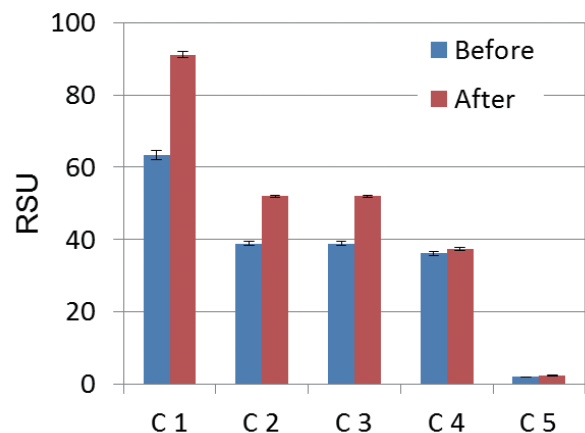


Figure 7 Comparison of the five PARAFAC component scores in the Italy wine samples (n= 3 replicates per sample) before and after oxidation. Component scores are reported normalized water Raman scattering units (RSU).

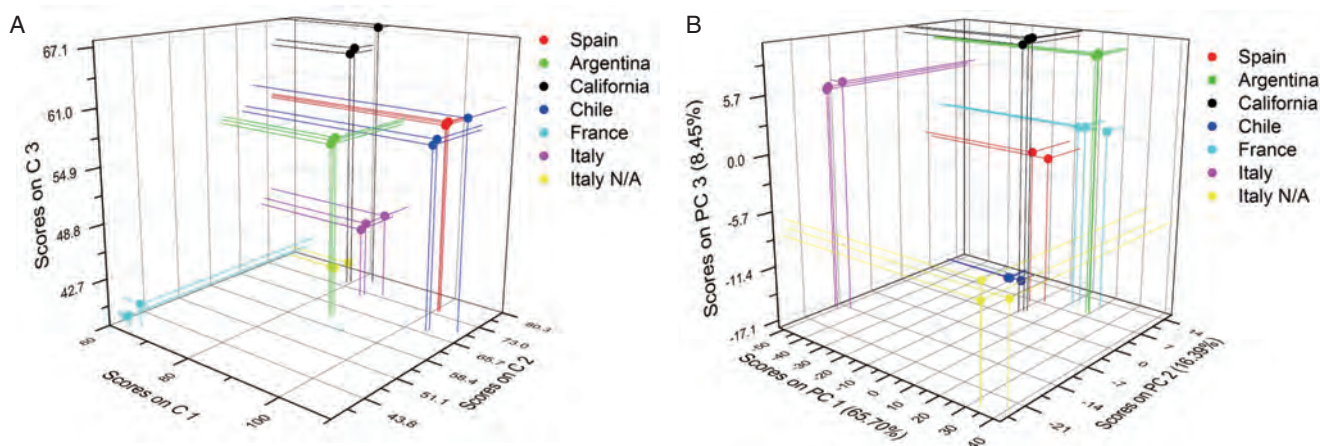


Figure 8 Comparison of the three major component cluster plots for PARAFAC (A) and PCA (B) analyses of the freshly opened wine samples ( $n=3$  replicates per sample).

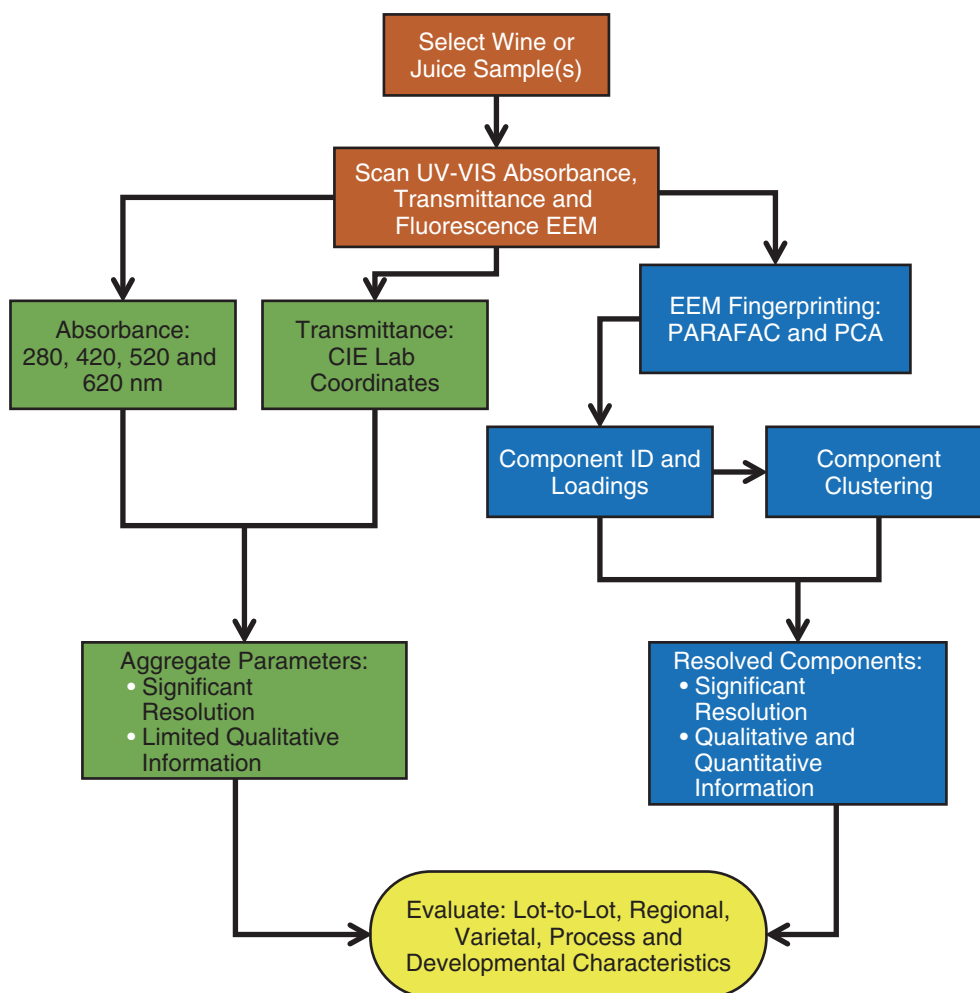


Figure 9 Schematic of the relationships among the simultaneous Absorbance and EEM data acquisition and analysis with respect to the significance of wine sample and component resolution pertaining to this study.

いても主要な成分であった。5つすべてのコンポーネントにおいて酸化後の強度ローディングが有意( $p < 0.05$ )に増加しており、UV域に発光を持つコンポーネント1-3は、長波長域に発光を持つコンポーネント4,5と比較して、より増加していた。

### PARAFACおよびPCAによるクラスター解析

PARAFACおよびPCA (two-way Principal Component Analysis)により分離された3つの蛍光主要成分のモデルコンポーネントローディングを用いて、開封直後のワインのクラスター解析を行った結果をFigure 8に示す。PCAは2

次元解析(two-way analysis)手法で、得られるコンポーネントスコアが負の値を示すこともあり、化学成分のスペクトルとしては物理的に現実的でないこともある。しかし、PCAはサンプルのスペクトル成分の定性/定量的な変化を示す方法として以前から用いられている方法である。クラスター解析の結果、PARAFAC (Figure 8A)およびPCA (Figure 8B)のいずれにおいても、各ワインが異なるクラスターを示している。これはそれぞれ独自の色味を持つことを表しており、CIE1931色度図(Figure 5)におけるワインの色味分布が異なっていることと矛盾しない。各データセットにおける統計的優位性は、各3つのスコアパラメータを比較することで判断した。PARAFACモデルは、すべてのデータセットにおいて $p < 0.05$ の優位確率を、PCA解析では $p < 0.1$ の優位確率を示した。

## おわりに

以上のデータは、Aqualogによる吸光度とEEMの同時測定および解析がワインの評価に活用できることを示している。また吸光度からHue(色調)やIntensity(強度)を、透過度からCIE1976(L\*, a\*, b\*)を算出することで、従来の評価項目もカバーすることができる。Figure 9に、これらの関係図を示す。特に、吸光度や透過度による情報は、処理シグナルに寄与する多成分のスペクトルが集約された情報である。それゆえ、EEM解析によって、ワイン中に含まれる個別の色成分に関連させて、定性定量的情報を得ることができる点は特筆すべき点である。以上述べた解析結果は、産業的なワイン評価への有効性を示すだけでなく、他の多くのアプリケーションに応用できる可能性を示している。

(本記事は、文献<sup>[7]</sup>に基づき、新たに邦文にて書き起こしたものです。)

## 参考文献

- [1] <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/wine-market> [accessed 21<sup>st</sup>, October 2017]
- [2] A. L. Waterhouse et al. Understanding Wine Chemistry, ed. Wiley and Sons 2016.
- [3] M. Sternad Lemut et al., *J Sci Food Agric.*, 2013, **93**, 3670–3681.
- [4] C. Coelho et al., *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 8132–8137.
- [5] <https://www.etslabs.com/library/44> [accessed 21<sup>st</sup>, October 2017]
- [6] D. Airado-Rodriguez et al., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, **24**, 257–264.
- [7] A. Gilmore, A. Akaji, K. Castorday, "Spectroscopic Analysis of Red Wines with A-TEEM Molecular Fingerprinting", *Readout English Edition*, 2017, **49**, 41-48.



赤路 佐希子

Sakiko AKAJI

株式会社 堀場製作所  
開発本部 先行開発センター  
Advanced R&D Center  
HORIBA, LTD.