

近赤外分光分析法による山梨県産ワインのアルコールおよび糖の定量

恩田 匠・辻 政雄・原川 守・荻野 敏・小宮山美弘

Determination of Alcohol and Sugar Contents in Wines Produced at Yamanashi Prefecture by Near Infrared Spectroscopy

Takumi ONDA, Masao TSUJI, Mamoru HARAKAWA,
Satoshi OGINO and Yoshihiro KOMIYAMA

要 約

近赤外分光（近赤外）分析法を用いて、山梨県産ワインに含まれるアルコール、全糖および還元糖の非破壊定量を試みた。ワインの近赤外吸収スペクトルは、ワイン中の水に由来する吸収を示したが、1600～1800nmおよび2200～2400nm付近に水のみとは異なるワインに特徴的な吸収が認められた。近赤外分析によって得られた吸光度値と化学的処理により得られた分析値を用いて、重回帰分析を行い、アルコール、全糖および還元糖をそれぞれ定量する検量線を作成した。その結果、化学分析値と検量線から得られる推定値に高い相関性を持った検量線を得ることができた。アルコール、全糖および還元糖の検量線の重相関係数は、それぞれ0.94、0.97および0.99であり、標準誤差は0.34、0.30および0.18であった。

SUMMARY

Near infrared (NIR) spectrometry was studied for nondestructive determination of alcohol, total sugar and reducing sugar contents in wine. The NIR spectra of wines showed a characteristic patterns in the wavelength regions of 1600～1800nm and 2200～2400nm comparing with the data of water. Calibration curves of alcohol, total sugar and reducing sugar contents in wine were made up from NIR absorbance values and samples data by chemical methods. As a result, high relationship was obtained between chemically analyzed alcohol, total sugar and reducing sugar contents and values estimated by NIR spectroscopy, respectively. Correlation coefficients of calibration curves of alcohol, total sugar and reducing sugar were 0.94, 0.97, 0.99, and standard errors of estimation were 0.34, 0.30, 0.18, respectively.

1. 緒 言

食品製造において、原料、製造工程および製品中の各種成分を定量することは、製造工程や製品の品質を管理するうえで極めて重要である。特に最近、高品質・健康・安全志向を求める消費者ニーズの高まりから、栄養成分等の表示が重要視され、品質管理の徹底がより重要になることが考えられる。従来から食品の主要成分の分析は、抽出、分離、分画および反応などの化学的処理を複雑に経た方法により行われている。しかしながら、これらの方法は膨大な時間、労力および費用を必要とするため、これに代わる迅速・簡便な分析方法の

確立が望まれている。

近年、食品成分の非破壊測定法¹⁾²⁾に関する研究が精力的に進められている。食品分野における非破壊測定法の定義は、分析により食品試料の化学的特性が変化せず、分析後にも試料が商品として流通し得る状態にある場合とされている¹⁾。すなわち試料の外部より与えたエネルギー（力学的、光学的あるいは電気的エネルギー）に対する応答から、対象物を破壊することなく内容成分や性質を測定する方法を指す。この中で近赤外分光分析（以下、近赤外と略記）法¹⁾²⁾³⁾は、迅速・簡便性を大きな特徴とし、食品のみならず医薬品や化学

工業などの分野に 응용が拡大しつつある。特に、醤油、味噌、清酒およびワインなどの製造工程が数カ月におよぶ醸造食品は、品質管理がその製品に大きな影響を及ぼすことから、比較的早くから近赤外法の利用が期待されてきた。

ワインへの近赤外法の応用については、1976年にKaffkaとNorrisの報告⁴⁾があり、近年本邦でもワイン製造業社を中心に研究が行われている⁵⁾。しかしながら、近赤外法はワインのみならず、測定原理に未だ不明確な点が多く、特に分析に用いる試料群の性質によって異なる結果が得られることが予想された。したがって、今後も実用化に向け、さらに研究の蓄積が必要になるものと考えた。そこで今回、主に山梨県産ワインを試料とし、ワインに含まれるアルコール、全糖および還元糖の近赤外法による定量を検討した結果を報告する。

2. 近赤外法の原理と特徴

近赤外域の光線とは、可視光線と赤外線との間に位置する800~2500nmの電磁波を指す。測定対象物に近赤外線が照射されると、対象物に含まれる有機物質の官能基が近赤外線と共鳴し、振動するため、変換されたエネルギーが吸光度として現れる。この近赤外線による吸収は赤外線等の光線の吸収と比較して非常に弱く、水に由来する吸収が抑えられるため、水を多く含んだ食品試料も測定の対象となる。一般に近赤外スペクトルは、各種の構成成分のスペクトルが複雑に重なりあった形状となり、各構成成分に由来する吸収は、それらの濃度に関係する。しかし、紫外可視分光分析法や赤外分光分析法のような絶対定量分析法とは異なり、相対的定量分析法³⁾を用いる。すなわち、化学的手法により分析した標準試料 (teaching set) を用い、多重線形回帰法 (重回帰分析)⁶⁾⁷⁾によって、近赤外スペクトル値と分析値が相関のとれる検量線を得るという方法により定量を行う。

分析手順として、まず化学的手法による常法に従って試料を測定する。つぎに、試料の近赤外スペクトルを測定し、既知の濃度と多数の波長での吸光度との重回帰分析をコンピューターを用いて行い、次の検量線を作成する。

$$C (\%) = F_0 + F_1 A_1 + F_2 A_2 + \dots + F_n A_n$$

ただし、C: 目的成分の濃度、F₀: 定数、F₁~F_n: 重回帰係数、A₁~A_n: 各波長 (1~n) での

吸光度 (変数)。

この検量線が作成されると、次回からは未知試料の近赤外スペクトルを測定するのみで、自動的に検量線から成分濃度が算出できる。さらに複数の成分について検量線を作成しておけば、1つのスペクトルから同時に多成分の定量も可能である。

近赤外法は化学的手法を用いた常法にはない特徴 (Table 1)⁸⁾⁹⁾を有することから、非破壊的・迅速・同時多成分分析法として、今後様々な業界に急速に普及することが予想される。

Table 1 近赤外分光分析法の特徴

- | |
|----------------------------|
| 1. 迅速・簡便で、熟練を必要としない |
| 2. 秤量の必要がなく、化学薬品も必要としない |
| 3. 非破壊的に、同時多項目測定が可能 |
| 4. 固体、半固体、液体いずれの形態の試料も分析可能 |
| 5. 同一試料の反復分析が可能 |
| 6. 0.1~数10%オーダーの定量分析が可能 |
| 7. 現場環境で、自動分析に適する |
| 8. 化学量のみならず、物理量の測定が可能 |
| 9. 定量分析のみならず同定、判別、分類等の解析可能 |

3. 実験材料および方法

3-1 供試試料

平成4年度の第22回山梨県ワイン鑑評会に出品された白ワイン61点 (原料品種; 甲州51点, シャルドネ3点, リースリング3点, その他4点), ロゼワイン13点および赤ワイン29点 (原料品種; カベルネ・ソービニヨン8点, マスカット・ベリーA 6点, その他15点), 合計103点を試料とした。この試料は、検量線作成用84点 (白ワイン51点, ロゼワイン10点, 赤ワイン23点) と検量線検定用19点 (白ワイン10点, ロゼワイン3点, 赤ワイン6点) との二群に分けて用いた。

3-2 化学的手法による分析法 (化学分析法)

アルコールの定量は、国税庁所定分析法¹⁰⁾の浮秤法により行った。全糖の定量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC; Shodex DX-2, 株式会社昭和電工) により行い、果糖、ブドウ糖およびショ糖の合計として算出した。還元糖の定量はソモギー

変法¹⁰⁾により行い、果糖として算出した。

3-3 近赤外装置と測定条件

近赤外装置として、インフラライザー500型 (InfraAlyzer 500; ブランルーベ株式会社) を用いた (Fig. 1)。このインフラライザー500型は、IDAS (InfraAlyzer Data Analysis Software) プログラムソフトウェア (データ収集, データ操作, データ分析プログラム) を装備したコンピューターにより制御した。測定セルにはウィンドロワー (液体用ドロワー) を用いた。このウィンドロワーに、 $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に設定した精密循環恒温槽を連結して、 20°C に調製した試料を注入した。試料注入後、IDASプログラムソフトウェアのデータ収集プログラムにより、1100~2500nm領域の吸光度を2nm毎に走査測定した。



Fig. 1 InfraAlyzer 500 System

3-4 重回帰分析による検量線の作成

検量線作成用試料の近赤外スペクトルについて、化学分析法による測定値を用いて、IDASプログラムソフトウェアのデータ分析プログラムによる重回帰分析を行った。重回帰分析による検量線作成の波長選択方法は、変数 (各波長の吸光度) 増加法および変数総組み合わせ法により行った。変数増加法の変数の数は、1または2から (試料数) /10以下までとした。

3-5 検量線の検定

検量線検定試料の近赤外スペクトルを用いて、IDASプログラムソフトウェアのデータ分析プログラムにより検量線の検定を行った。

3-6 検量線に採用された波長の帰属性の検討

アルコールおよび糖の検量線に採用された波長

の帰属性について検討するため、アルコール溶液および糖の近赤外スペクトルを調べた。アルコールについては、エタノール (試薬特級, 和光純薬) を供試し、濃度99, 50, 25, 10および0%の水溶液を試料とした。糖については、モデルワインとして果糖, ブドウ糖, ショ糖 (すべて試薬特級, 和光純薬) の比2:1:0.5とし、糖濃度70, 35, 8.8, 1.35および0%の水溶液と同組成の糖粉末を試料とした。

4. 実験結果および考察

4-1 ワインの近赤外スペクトル

ワインの近赤外スペクトルは、1450nmおよび1940nm付近に水分に由来する吸収を含み、飲料の典型的な形状を示した (Fig. 2)。また水分のみの近赤外スペクトルと異なる形状が1600~1800nmおよび2200~2400nm付近に存在し、ワインに特徴的な吸収であると考えた。白ワイン, ロゼワインおよび赤ワインの近赤外スペクトルは、互によく一致した。

4-2 アルコールの検量線の作成と検定

全ワイン (白ワイン, ロゼワインおよび赤ワイン) の検量線と白ワインのみの検量線を個別に作成した

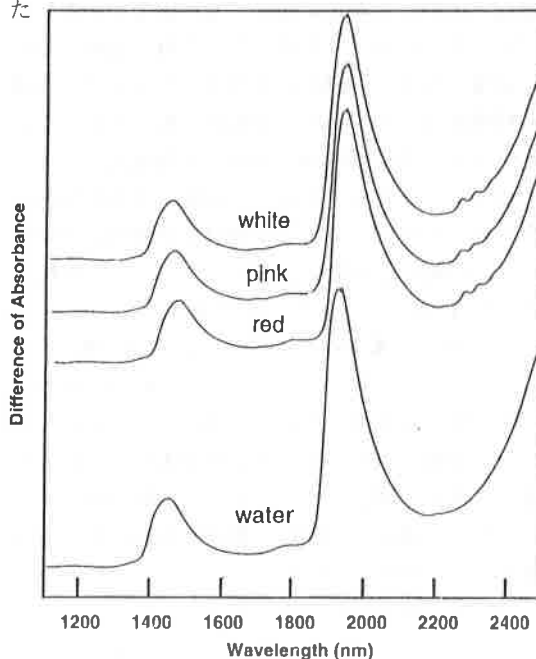


Fig. 2 Near InfraRed Spectra of White, Pink and Red Wines

4-2-1 全ワインのアルコール検量線

まず変数増加法(波長数1から7まで)により検量線の作成を行った。その結果として7種の検量線を作成し、それぞれの検量線の重回帰分析による統計値、すなわち重相関係数(R)、標準誤差(SEE)および分散分析のF値(F値)を比較した(Table 2)。検量線はいずれもRが比較的低い値であり、波長を増すごとにF値が小さくなった。したがって変数増加法では、精度の高い検量線を得ることができなかった。また変数総組み合わせ法(波長数2から4まで)による検量線の作成を行った場合も同様であった(Table 3)。

Table 2 Wavelength Selected and Statical Summary of Calibration of Alcohol Content in Wine

wavelength	R ^{a)}	SEE ^{b)}	F ^{c)}
1804	0.84	0.51	225.6
2320 2312	0.92	0.37	258.8
2320 2312 1184	0.93	0.35	188.4
2320 2312 1184 1264	0.94	0.34	155.8
2320 2312 1184 1264 1276	0.94	0.33	130.2
2320 2312 1184 1264 1276 1548	0.94	0.33	114.2
2320 1792 1184 1264 2488 1756 2352	0.95	0.30	116.0

^{a)}R; correlation of coefficient, ^{b)}SEE; standard error of estimation, ^{c)}F; F value.

Table 3 Wavelength Selected and Statical Summary of Calibration of Alcohol Content in Wine

wavelength	R ^{a)}	SEE ^{b)}	F ^{c)}
2220 2304	0.92	0.37	25.32
1184 2234 2304	0.93	0.34	197.1
1184 1758 1814 1884	0.94	0.33	161.2

^{a)}R; correlation of coefficient, ^{b)}SEE; standard error of estimation, ^{c)}F; F value.

そこで、アルコールに由来する特異的な吸収をもつ波長域を選択して、変数総当たり法を行うため、アルコール(エタノール)が近赤外領域にもつ吸収を調べた。各種濃度のアルコール水溶液の近赤外スペクトルを比較した結果、1600~1800nmと2200~2400nmに水分のみとは異なる特異的な吸収が認められた(Fig. 3)。ワインの近赤外スペ

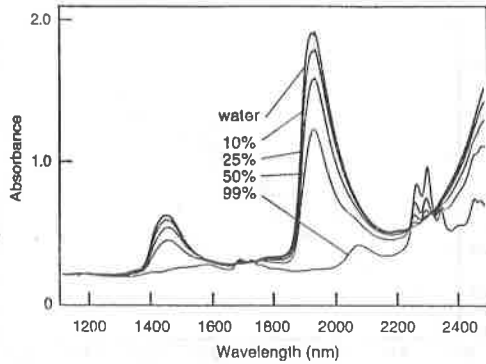


Fig. 3 NIR Spectra of Alcohol Solutions*

*The concentration of alcohol solutions were changed from 0% to 99%

クトルの特異的な吸収も同じ領域に存在したことは前述のとおりであり、ワインに特徴的な吸収は10%以上含まれるアルコールの吸収に由来することが分かった。そこで、2つの波長域の波長のみを用いた変数当たり法(波長数2から4まで)を行い、4波長を用いた検量線で比較的精度の高い結果を得た(Table 4)。この検量線を以下に示す。

$$\begin{aligned} \text{アルコール}(\%) = & -85.34 - 2015.73A_{1160\text{nm}} \\ & + 2644.95A_{1695\text{nm}} - 938.70A_{2320\text{nm}} \\ & + 736.84A_{2340\text{nm}} \end{aligned}$$

この検量線を用いて検量線検定用の試料を測定した結果、推定標準誤差(SEP)は0.22%であった。また近赤外法による測定値と化学分析値の関係をFig. 4に示した。

今回作成した検量線の精度は、これまでに報告のあるワインのアルコールの検量線の精度⁵⁾よりも若干ではあるが低い結果であった。このことは、分析に用いた試料群が適当ではなかったこと、あるいは浮秤法による測定の精度が悪かったことなどが考えられた。

Table 4 Wavelength Selected and Statistical Summary of Calibration of Alcohol Content in Wine

wavelength	R ^{a)}	SEE ^{b)}	F ^{c)}
2265 2280	0.93	0.36	276.7
2335 2350 2390	0.93	0.34	202.0
1660 1695 2320 2340	0.94	0.33	162.7

^{a)}R; correlation of coefficient, ^{b)}SEE; standard error of estimation, ^{c)}F; F value

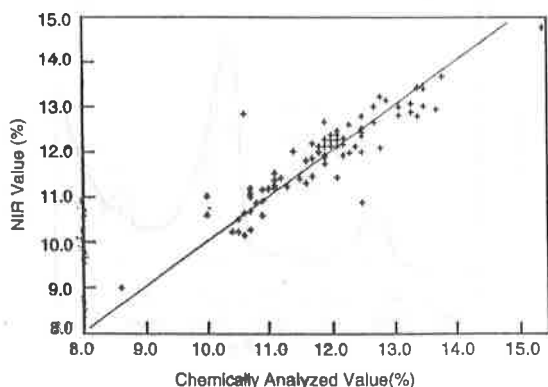


Fig. 4 Correlation between NIR and Chemically Analyzed Alcohol Content

4-2-2 白ワインのアルコール検量線

まず全ワインの場合と同様に、変数増加法（波長1から5まで、また2から5まで）により検量線の作成を行った。その結果、変数増加法（波長数2から5まで）により最も精度の高い、4波長を採用して用いる検量線を得た。

$$\begin{aligned} \text{アルコール (\%)} = & 180.57 + 10370.97A_{1184\text{nm}} \\ & - 7502.93A_{1264\text{nm}} - 156.01A_{2276\text{nm}} \\ & - 3198.81A_{1168\text{nm}} \end{aligned}$$

この検量線の精度は、R0.94, SEE0.43, F値108.9, SEP0.70であった。

4-3 白ワインの糖の検量線の作成と検定

HPLCにより得た化学分析値（全糖、果糖、ブドウ糖およびショ糖）とソモギー変法により得た化学分析値（還元糖）を用いてそれぞれ検量線を作成し、その比較、検討を行った。

4-3-1 HPLCによる化学分析値を用いた検量線作成

全糖の検量線を変数増加法（波長数1から5まで）により作成した（Table 5）。その結果、F値およびRが最も高く、SEEが小さい、3波長を選択して用いる検量線を最も精度の高い検量線として得た。

$$\begin{aligned} \text{全糖 (\%)} = & 201.64 - 528.28A_{2240\text{nm}} \\ & - 585.16A_{1536\text{nm}} + 516.64A_{2120\text{nm}} \end{aligned}$$

この検量線を用いて近赤外法により得た測定値と化学分析値の関係をFig. 5に示した。検定用の試料を用いたSEPは0.22%であった。

Table 5 Wavelength Selected and Statistical Summary of Calibration of Total Sugar Content in White Wine

wavelength	R ^{a)}	SEE ^{b)}	F ^{c)}
1612	0.87	0.64	151.3
1612 1552	0.91	0.53	123.1
2240 1536 2120	0.97	0.30	280.3
2236 1544 2104 1764	0.98	0.28	242.4
2236 1544 2200 1764 1104	0.98	0.28	202.9

^{a)} R; correlation of coefficient, ^{b)} SEE; standard error of estimation, ^{c)} F; F value.

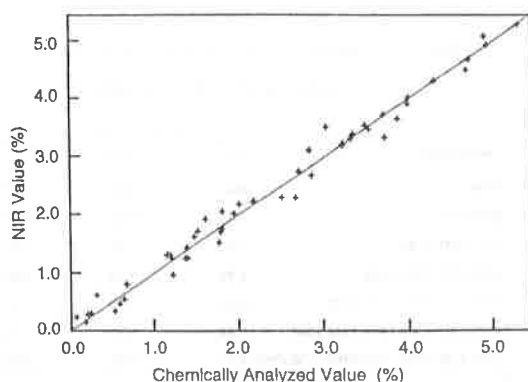


Fig. 5 Correlation between NIR and Chemically Analyzed Total Sugar Content

同様にして、果糖、ブドウ糖およびショ糖の検量線の作成を変数増加法（波長数1から5まで）により作成し、以下の検量線を得た。

$$\begin{aligned} \text{果糖 (\%)} = & 384.87 + 1981.96A_{2156\text{nm}} \\ & - 1260.11A_{2124\text{nm}} - 2270.64A_{1756\text{nm}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ブドウ糖 (\%)} = & -186.19 - 72.26A_{1980\text{nm}} - 960.29 \\ & A_{2240\text{nm}} + 1064.85A_{2332\text{nm}} + 2261.16A_{1676\text{nm}} \\ & - 1840.11A_{1740\text{nm}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{ショ糖 (\%)} = & -1.69 + 1582.64A_{2132\text{nm}} - 2176.74 \\ & A_{2176\text{nm}} - 1993.04A_{1604\text{nm}} + 5220.09A_{1740\text{nm}} \\ & - 2459.96A_{1736\text{nm}} \end{aligned}$$

それぞれの検量線の精度は、果糖検量線R0.93, SEE0.31, F値107.29, SEP0.18, ブドウ糖検量線R0.96, SEE0.21, F値120.04, SEP0.28, ショ糖検量線R0.78, SEE0.16, F値14.39, SEP0.45であった。果糖およびブドウ糖の検量線の精度は比較的高く、ショ糖検量線の精度は低かった。

4-3-2 ソモギー変法による化学分析値を用いた検量線作成

還元糖値の検量線の作成を変数増加法(波長数1から5まで)により行った(Table 6)。その結果、最も精度の高い、4波長を選択して用いる検量線を得た。

$$\text{還元糖(\%)} = -141.79 - 1754.82A_{2056\text{nm}} + 500.80A_{1504\text{nm}} - 1402.81A_{2084\text{nm}} + 329.30A_{2012\text{nm}}$$

この検量線を用いて近赤外法により得た測定値と化学分析値の関係をFig. 6に示した。検定の結果、SEP0.17であった。

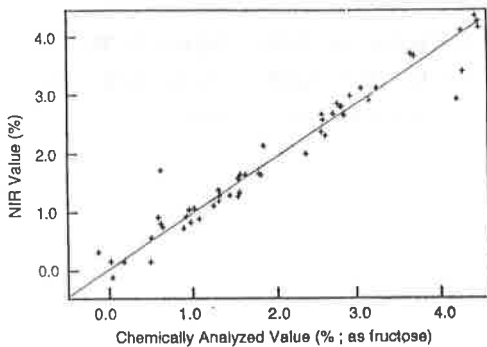


Fig. 6 Correlation between NIR and Chemically Analyzed Reducing Sugar Content

この還元糖検量線の精度は非常に高く、ソモギー変法により得た還元糖値と近赤外スペクトルは高い相関性があることが推察された。HPLCから得られた分析値でもショ糖検量線よりも還元糖(果糖およびブドウ糖)検量線のほうが精度が高かった。これは、単にショ糖含量が還元糖に比べて低いことに起因するものとも考えられた。しかしながら、特に果糖およびブドウ糖の還元性を利用した定量法であるソモギー変法による還元糖値のほうが、HPLCによる還元糖値(果糖およびブドウ糖値)よりも近赤外スペクトルとの相関性が高いという結果を得た。このことは、“還元糖量”よりも“還元性を示す性質”の情報が近赤外スペクトルに反映され易いことに起因することも推察された。

つぎに、糖の検量線に採用された波長の帰属性を検討するため、糖溶液の近赤外領域における吸収を調べた(Fig. 7)。

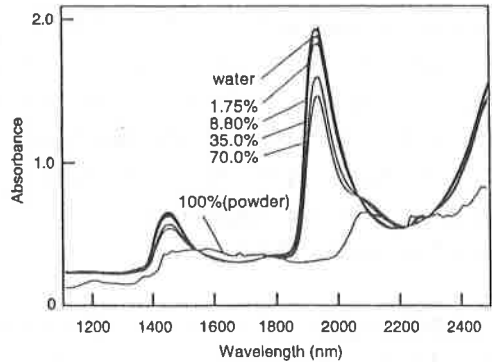


Fig 7 NIR Spectra of Sugar Solutions

*Composition of sugar solutions was fructose, glucose and sucrose in the ratio 2:1:0.5. The concentrations were changed 0% to 100%

糖溶液の近赤外スペクトルは、非常にブロードで、明確なピークは存在しなかった。検量線に採用された波長は1500nm付近、2000nm付近および2100nm付近の波長が多かったが、スペクトル上では弱い吸収のみが認められた。そこで、糖粉末試料の2次微分スペクトルを調べたところ、1500nm付近では1522nm、2000nm付近では2010nm、2100nm付近では2070nmに吸収が認められた(Fig. 8)。還元糖検量線に採用された2012nmは、糖の吸収に帰属するものと考えられた。

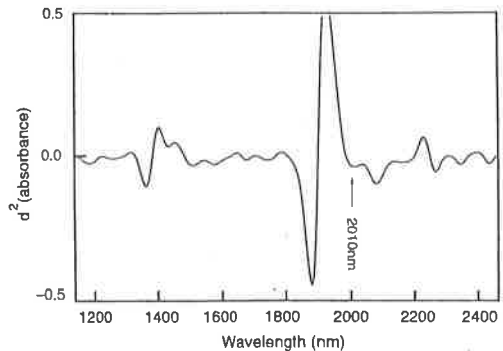


Fig. 8 Second Derivative Spectra of Sugar Powder*

*Composition of sugar powder was fructose, glucose and sucrose in the ratio 2:1:0.5.

以上、山梨県産ワインを用いてアルコールおよび糖の近赤外法による定量を行い、比較的高い精度の検量線を作成することができた。今後さらに多くの試料を用いた分析を行い、実験データを蓄積し、さらに採用波長の帰属性および安定性を明らかにすることで、より精度が高い検量線が得られるものと考えた。また、特に近赤外法を用いた、山梨県内におけるワイン鑑評会の出品ワイン等の標準分析法の確立が望まれる。

なお本研究の概要は、ブドウ・ワイン学アメリカ学会日本部会（ASEV JAPAN）1992年度大会（1992年11月20日、於甲府市紫玉苑）において発表した。

文 献

- 1) 岩元睦夫：日食工誌, 27 (9), 464-472 (1980)
- 2) 岩元睦夫・魚住 純：日食工誌, 32 (9), 685-

695 (1985)

- 3) 三浦 剛・尾崎幸洋：化学工業, 54 (6), 506-514 (1990)
- 4) Kaffka, K.J. and Norris K.H.:
Acta Alimentaria, 5 (3), 269-279 (1976)
- 5) 峯 孝則：非破壊評価シンポジウム講演要旨集, 27-29 (1991)
- 6) 相島鐵郎：日食工誌, 38 (2), 166-174 (1991)
- 7) 日本消化器病学会編：医学統計Q&A, 135-142 (1991)
- 8) 橋本彦亮・飯塚佳子・小林邦男：醸協, 87 (10), 1990
- 9) 金子恵一・館 博・菊池修平・伊藤 寛・田中秀夫：醬研, 18 (2), 1992
- 10) 日本醸造協会編：国税庁所定分析法注解 (1993)
- 11) 小原哲二郎・鈴木隆男・岩尾裕之編集：食品分析ハンドブック, 212-213 (1969)