

MALDI-TOF質量分析法 MALDI-8030  
**MALDI-8030とeMSTAT Solution™を用いた  
機械学習によるトリアシルグリセロールプ  
ロファイリング**

S. Salivo<sup>1</sup>、山崎雄三  
<sup>1</sup>KRATOS ANALYTICAL LTD.

ユーザーベネフィット

- ◆ 労働集約的な手順および過剰な溶媒使用を必要としない最小限の試料調製が可能です。
- ◆ 卓上型リニアモード専用MALDI-TOFMSの正イオンモードを用いた高速自動試料分析が可能です。
- ◆ eMSTAT SolutionソフトウェアによるPCA解析と機械学習により未知試料の容易な分類ができます。

■はじめに

エキストラバージンオリーブオイル (EVOO) は、低温条件下での機械的圧搾のみによってオリーブ果実を破碎して化学バランスと特性を保持する、そのユニークな生産プロセスによるオリーブ油の最高グレードです。また、EVOOは飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸、およびポリフェノール、トコフェロール、ステロールなどの微量成分の最適なバランスにより、栄養的および健康的な恩恵をもたらすため、栄養治療薬としても認識されています。このような健康上の利点があるため高い生産コストが価格に反映されてもなお、価値ある製品となります。このような理由のために、EVOOは、生産者や貿易業者が低品質の混ぜ物処理油（偽和油）を本物のより高価なEVOO製品として不正に販売しようとする試みにおいて、代替の安価な植物油の追加による偽和処理の脆弱なターゲットです。偽和処理されたEVOOに見られる典型的な植物油は、ヤシ、カノーラ、ヘーゼルナッツ、ポマース、ヒマワリ、トウモロコシ、ダイズ、落花生などです。経済的被害に加えて、ヘーゼルナッツ油に含まれる潜在的に危険なアレルゲンへの曝露のため、ヒトが消費する非純正EVOOsの安全性にも懸念があります。

エキストラバージンオリーブオイル詐欺と戦い、このユニークな製品のアイデンティティを保護するために、厳格で効率的な品質管理アッセイが確立されました。EC規制2568/91では、欧州連合 (EU) がオリーブオイルの品質と真正性を評価するための分析方法を規定しています。これらの中で、トリアシルグリセロール (高速液体クロマトグラフィーによる) および脂肪酸とステロール (ガスクロマトグラフィーによる) プロファイルに基づくものは、非常に一般的です。しかしながら、これらの方法は、多くの場合、

時間のかかる抽出、多量の溶媒および長い分析時間を必要とするという欠点を有します。したがって、データの品質と堅牢性を維持しながら、解析方法を単純化し、高速化することが必要なステップと考えられます。

トリアシルグリセロール (TAG) は食用油の化学成分の90%以上を占めています。脂肪酸の発現が植物特異的であるため、TAG組成物は、油の種類ごとに固有です。したがって、TAGの「フィンガープリント」は、TAGの発現および比率が脂肪酸の存在量を反映しているため、油の型別に極めて有用です。

ここでは、EVOO偽装の問題に取り組むための簡単で強力な分析方法を提案しました。ヒマワリ油を混入物の例として用いました。分析ワークフローの3つの重要なステップは以下の通りです(図1)。

- 1) 最小限の試料処理
- 2) 卓上型リニアモード専用機 MALDI-TOFMS(MALDI-8030) を用いた正イオンモードによるTAGプロファイルの高速自動LDI(マトリックスフリー)分析
- 3) eMSTAT Solutionデータ解析ソフトウェアによる未知データの分類のための多変量解析と機械学習

EVOOへの5, 10及び20%量のひまわり油のスパイクによってEVOOの混入物処理をシミュレーションしました。



図 1 偽和処理したエキストラバージンオリーブオイルの分析ワークフロー

## ■測定条件と試料

EVOOとひまわり油は食料品店から購入しました。試料調製には油サンプルをクロロホルム中に溶解するプロセスを含んでいます。偽和処理をシミュレートするために、5、10および20%のひまわり油を含むEVOOsの混合物を調製しました。質量アラインメント (Lock mass) のための内部標準 (I.S.) としてトリカブリンを用いました。ナトリウム付加TAG種 ( $[M+Na]^+$ ) の形成を促進するために、試料をMALDIターゲットにスポットする前にNaTFAでプレコートしました。次いで、油試料溶液を、プレコートされたMALDIターゲット上にスポットしました (0.5  $\mu$ L)。卓上型リニアモード専用機MALDI-8030(正負デュアル極性)を用いて、LDI (マトリックスフリー) 分析を正イオンモードで実施しました。取得した全データをeMSTAT Solutionsソフトウェアで処理し、RandomForestアルゴリズムとKfold交差検証型を用いて多変量解析 (PCA) と機械学習にかけました。

## ■結果-質量分析

TAGプロファイルは、正イオンモードでのLDI 分析により、純粋および偽和 (シミュレート) 油から得ました。図2A)は、EVOO、偽和処理EVOO (10%) およびひまわり油(それぞれ青、緑、黄のトレース)のTAGプロファイル間の比較を示します。パルミチン酸 (P) とオレイン酸 (O) が天然に豊富なEVOOにおいて、 $m/z$  881と907のTAG、すなわち最も可能性の高いOPO/POOとOOOがいかに顕著に検出されるかを見ることができます。リノール酸 (L) が高度に豊富なひまわり油では、 $m/z$  877、901、903および905のTAGが最も代表的です (それぞれ、PLL/LPL/POLn、LLL、LLO/LOL、OLO/OOLと考えられる)。一見すると偽和処理EVOOのTAG領域のプロファイルが本物のEVOOに非常に類似していると判断することができます。しかし、マススペクトルを詳しく調べると、純正EVOOに特徴的なTAG比 (例: $m/z$  877/907、881/907、903/907 および905/907) が、偽和処理した油の量が増えるにつれて次第に変化することがわかりました (図2 B))。興味深いことに、ひまわり油の特徴であるがEVOOでは通常発見しない  $m/z$  901 (LLL) のTAGが、試験した最も低い偽和処理レベルでもEVOO/ひまわり混合物で明らかになりました (図2 B))。

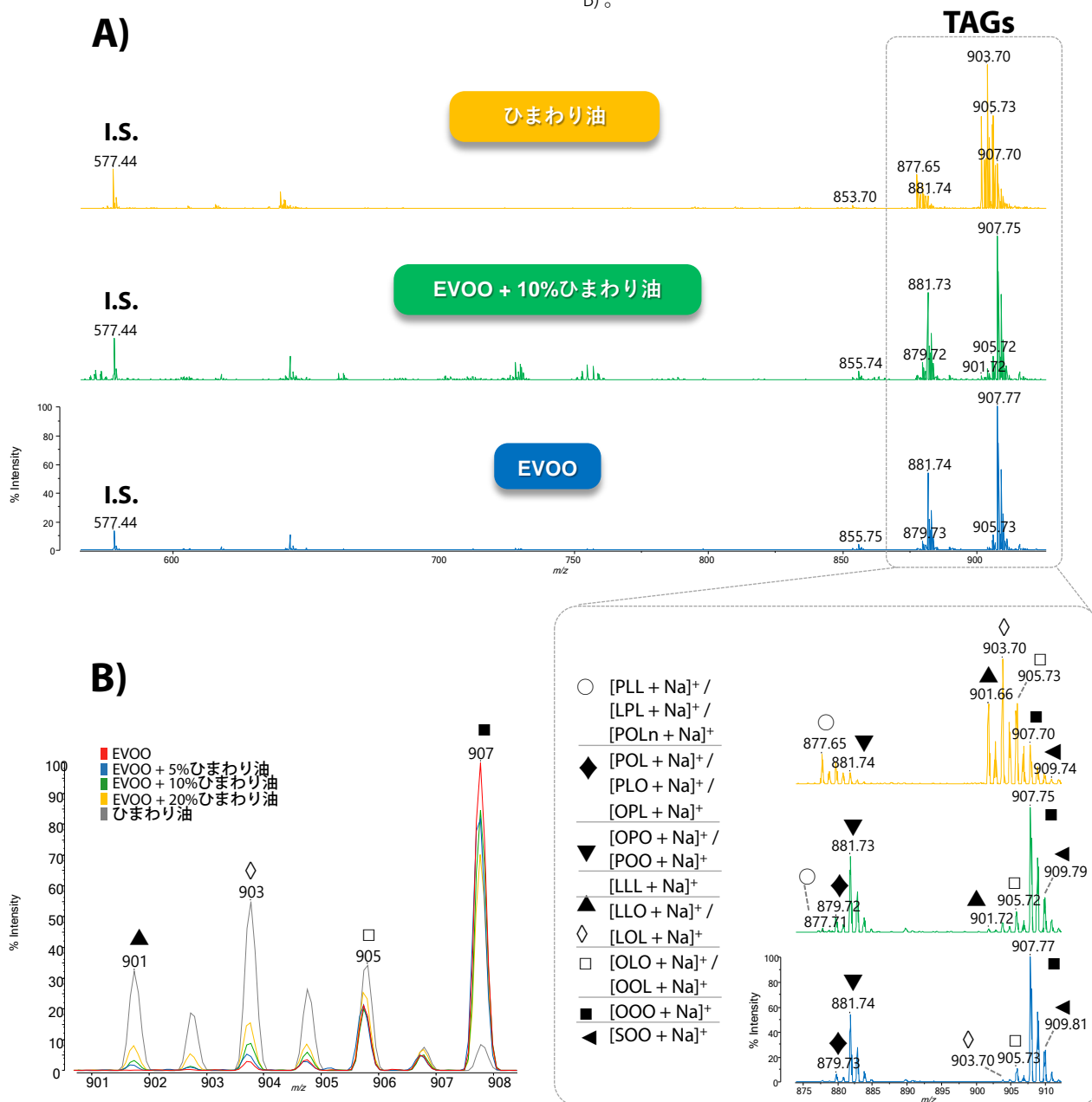


図 2

A) EVOO (青)、偽和処理EVOO (10%;緑)及びひまわり油(黄)のTAGプロファイル。右下はTAGIDの帰属を示すTAG領域の拡大図。  
B)  $m/z$  901~907における質量スペクトルの拡大; EVOO中のTAG比はひまわり油の添加により変化する。 $m/z$  901のTAGは、通常EVOOでは見られず、ひまわり油濃度が5%のモデル混和物でも、検出することができた。

### ■結果-多変量解析

多変量解析を、主成分分析 (PCA) と log 10 スケーリングにより全ての取得試料で実施しました。統計解析に先立ち、内標であるトリカプリンを用いたロックマス法により装置付属のソフトウェア (MALDI Solutions) でマスアライメントを行いました。図3A)は、得られたPCAスコアプロットを示し、EVOO (青)、偽和処理EVOO (緑) およびヒマワリ油 (黄) の3群の良好な分離を示しています。3群間の分離が適切であることを確実にするために、全ての処理設定、すなわち、強度閾値、質量許容度およびスケール法を注意深く最適化しました。強度アライメントは  $m/z$  903のTAG (LLO/LOL) を使用してソフトウェア、eMSTAT Solutionで行いました。この  $m/z$  903 TAGの選択は、このソフトにより提示された統計的に最も関連するマーカー群から慎重に選択され、これは機械学習モデルをさらに改善しました。図3B)はPCAローディングプロットを示しており、これは図3A)のグループ分離に寄与する多数のマーカーを示しています。原点からさらに離れた点が分離に大きく寄与し、プロット上のそれらの位置は、どちらのグループに対してより重要であるかを示唆しています (例えば、 $m/z$  901マーカーはプロットの左側に位置し、ヒマワリ油の非常に代表的な成分です)。赤で強調表示されたマーカーは、ボックスプロットとROC曲線の検査に基づいて、統計的に最も関連性の高い重み付けをしています。例えば、図3C)およびD)において、マーカー  $m/z$  907のボックスプロットおよびROC曲線は、群分離に対するこのマーカーの統計的有意性を実証し、それぞれ97%および98%の感度 (Y) および特異性 (X)、ならびに偽和EVOO対EVOO (対照) についての曲線下面積 (AUC) 値のほぼ1倍を示しました。同様に、 $m/z$  901 TAGのROC曲線は、EVOO対照 (図3E) に関して、感度 (Y) および特異度 (X) の値100%およびAUC=1で、このマーカーの統計的強度を示しています。

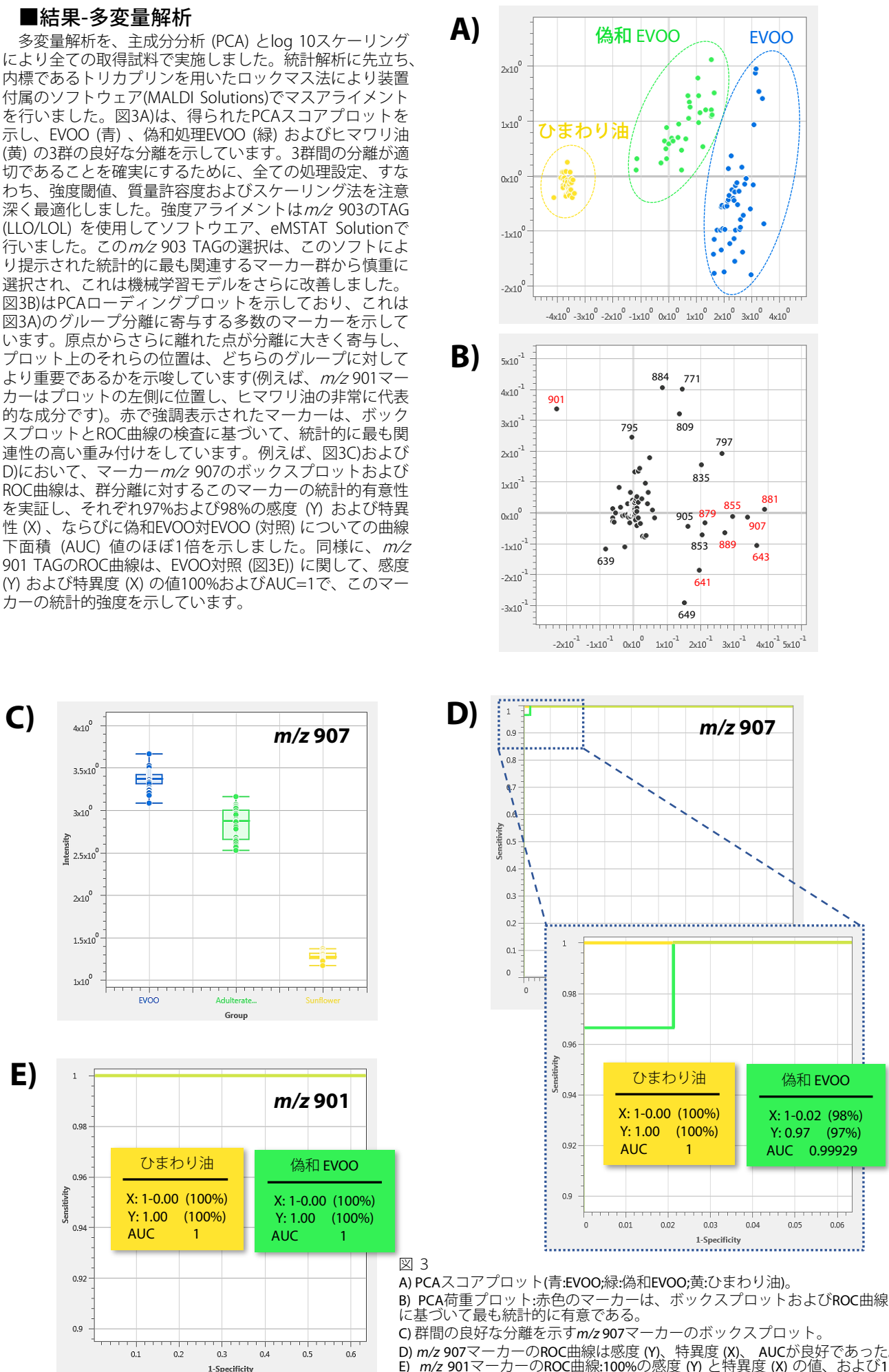


図 3

A) PCAスコアプロット(青:EVOO;緑:偽和EVOO;黄:ひまわり油)。  
 B) PCA荷重プロット:赤色のマーカーは、ボックスプロットおよびROC曲線に基づいて最も統計的に有意である。  
 C) 群間の良好な分離を示す  $m/z$  907マーカーのボックスプロット。  
 D)  $m/z$  907マーカーのROC曲線は感度 (Y)、特異度 (X)、AUCが良好であった。  
 E)  $m/z$  901マーカーのROC曲線:100%の感度 (Y) と特異度 (X) の値、および1のAUC値は、このマーカーの統計的強度を証明する。

## ■測定結果-機械学習

先に行ったPCA分類分析に基づき、機械学習による判別分析を行いました。使用したアルゴリズムはRandomForestであり、KFoldの交差検証を用いました。合計113のデータ(47 EVOO, 30混ぜ物処理EVOO及び36ヒマワリ油)を用いてモデルを訓練し、78の「不明」(盲検)データセット(26のEVOOと52の偽和処理EVOO)を用いてモデル精度を検証しました。すべての設定は、0%の推定誤差が得られるように最適化されており、モデルの精度が示されています。図4は、78の「不明」データセットの分類結果を示しています。純粋なEVOOsと高比率でヒマワリ油を含むEVOOsの正確な分類は達成が容易ですが、最大の課題は最低量の偽和油、例えばヒマワリ油5%のEVOを分類できるかどうかでした。図4からわかるように、すべての「不明」データは正しく分類されているため、モデルの精度は100%です。

また、プロットにおける「不明」偽和処理データの分布が、どのように偽和処理油中のひまわり油量に從うかにも着目することができます。例えば、5%偽和処理油は本物の対応物に近いので、プロットは2つのタイプの高い類似性を反映していると言えます。逆に、最高量のヒマワリ油(20%)で偽和処理したEVOsのグループは本物のEVOsから遠く、偽和処理した対応物により近い結果になりました。

## ■まとめ

このアプリケーションでは、オリーブ油産業に影響する非常に一般的な不正、すなわち安価な植物油によるエキストラバージンオリーブ油の偽和処理を正確に指摘するための例として簡単で堅牢な分析法を示しました。このように、島津製作所の最新卓上型MALDI-TOFMSであるMALDI-8030の高速自動分析能力と、eMSTAT Solutionの多変量解析および機械学習の能力を、非常に簡単で最小限の試料調製と組み合わせた方法は有用であると考えられます。

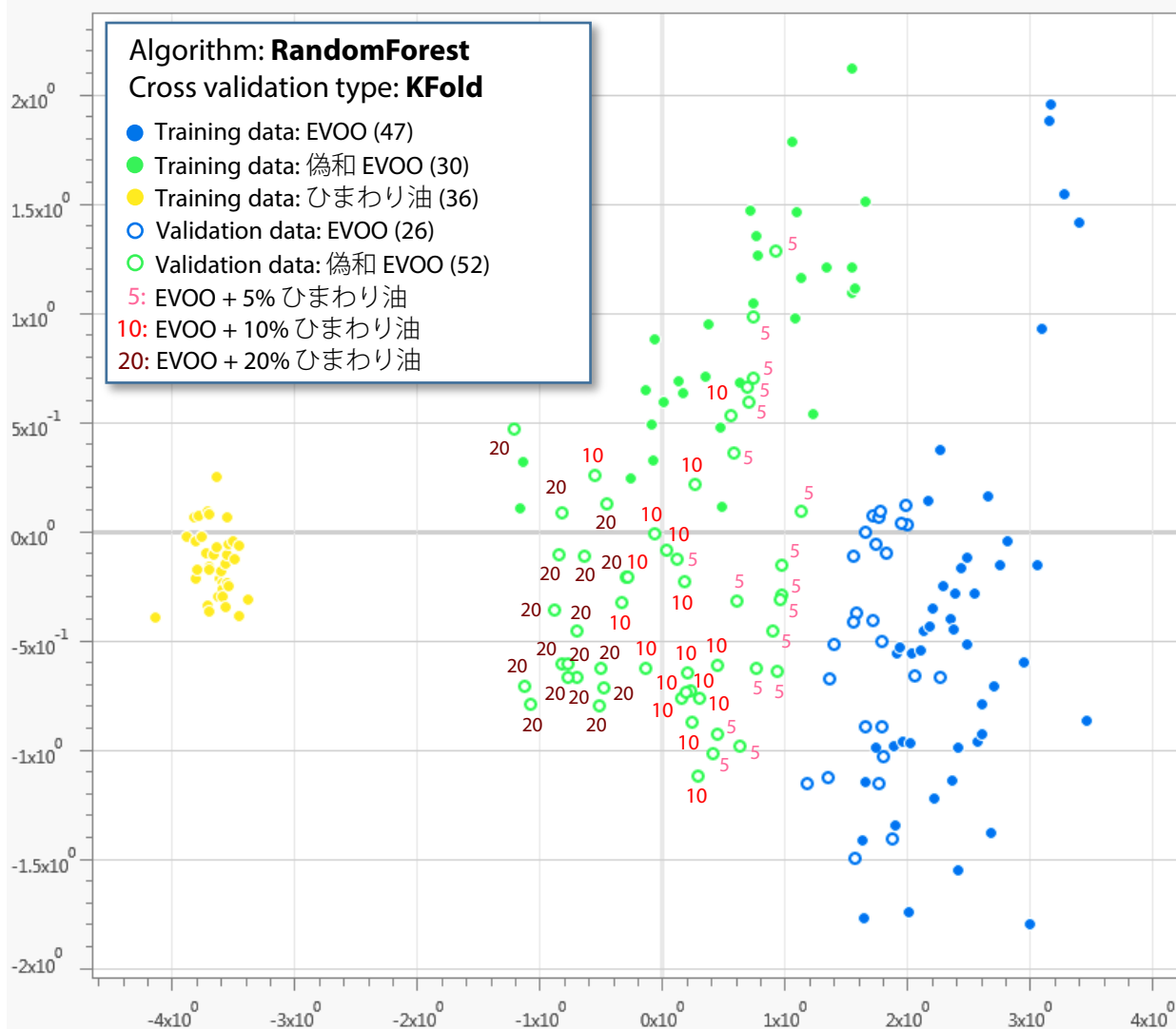


図 4  
機械学習による(RandomForest; KFold)データの分類結果を示すスコアプロット。26のEVOsと52の「不明」偽和EVOsデータを用いて、モデルとその精度(100%)を検証した。プロットにおける「不明」の偽和処理EVOOデータの分布はEVOO中にスパイクされたヒマワリ油の量を反映する。

eMSTAT Solutionは、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

12-MO-485-JP 初版発行：2022年 2月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。  
<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022