SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

MALDI-TOF質量分析法　MALDI-8030

MALDI-8030と多変量解析を用いた食用生肉の識別

Michael Nairn[1]、山崎 雄三
[1]KRATOS ANALYTICAL LTD

ユーザーベネフィット

- ◆ ホモジナイズ、溶解、pH調整、そしてプレートへの滴下という、4段階のシンプルな試料調製で測定可能です。
- ◆ 従来法より低い分析コストが期待できます。
- ◆ 高品質のスペクトルを数分で迅速に取得できるため、安定した自動分析が可能です。

■はじめに

食材偽装は、混ぜ物処理され、人間の食用に適さない可能性のある食品を一般消費者が摂取してしまう可能性のある重大な問題です。2013年には、馬肉スキャンダルがヨーロッパで大きなニュースとなりました。そこでは、犯罪的な行為によって馬肉が牛肉製品に大量に（最大100%）[1]含まれていることが判明し、人間の食物流通に入り込んだことが明らかになりました。

2021年、馬肉スキャンダルが再び表面化し、馬肉が子牛肉と詐称されたという報道がなされました[2,3]。この種の犯罪行為は、食物流通におけるトレーサビリティと品質基準の完全な崩壊の典型例であり、特に憂慮すべきものです。

英国議会の食品偽装に関するPOSTNOTE 624[4]によると、食品偽装対策の障壁の一つは、検査のコストと有効性であるとされています。

本稿では、卓上型MALDI-TOF MSであるMALDI-8030と統計分析ソフトウェア、eMSTAT Solution™を組み合わせた生肉のスクリーニングを検討しました。食品安全性を向上させ、肉の混入を最初から防止するために、原産種を特定し、肉の種を迅速かつ費用対効果的にプロファイリングする可能性を紹介します。

■方法

60の生肉サンプルを測定しました。サンプルの内訳は、地元およびオンラインの英国のスーパーマーケットからの15頭の牛肉（ステーキ、挽肉）、15頭のラム（チョップ、レッグ、ひき肉）、15頭の鶏肉（むね、大腿）および15頭の豚肉（ロース、メダリオン、ひき肉）でした。サンプルは処理直前まで-20°Cで保管しました。各肉サンプル（40 mg）は、電動乳棒ミキサー（Argos Technologies）を使用して、500 µLの0.1% TFA中で1分間均質化されました。均質化した試料を21.3k RCFで5分間遠心し、上清を脂肪層を避けながら吸引し、分析直前まで-20 ℃で保存しました。

ホモジネートをpHチェックし、5 µLの10% TFAで調整して、サンプルが酸性 (pH<5) を維持していることを確認しました。200 µLの試料ホモジネートと200 µLのアセトニトリルを混合し、ゲル沈殿物をピペットで除去しました。同量の肉抽出物（例:pHチェックされた10 µLの鶏肉とpHチェックされた10 µLの牛肉など）を混合して肉混合物を調製しました。調製した２種の肉混合物は、肉A/肉Bの比率として25%/75%、50%/50%、75%/25%でした。

使用したマトリックスはCHCA (エタノール/アセトニトリル/3% TFAaq = 33/33/33 中に40 mg/mL) でした。

データ取得時にロックマスとして使用するための内部標準として、アンジオテンシン1 (5 pmol/µL) を0.5% v/vの濃度でマトリックス溶液に添加しました。

MALDIターゲット（FlexiMass-DS）上に食用肉あるいはその混合物サンプルの1 µLをスポットし、サンプルスポットが濡れたままの状態でマトリックス溶液1 µLを加えました。その後、サンプルを完全に乾燥させました。

試料を卓上型MALDI-TOFMSであるMALDI-8030で正イオン・リニアモードにて分析しました。MALDI Solutionの機能であるData qualityをデータ取得時に用い、特定の品質基準を満たすデータプロファイルのみを平均スペクトルに追加しました。

前処理からの測定プロセスの概要を図1に示します。

統計解析にはeMSTAT Solutionを用いました。各サンプルは、*m/z* 1,500-20,000の範囲で正規化されたスペクトルをもとに、主成分分析 (PCA) で最適に分離されました。

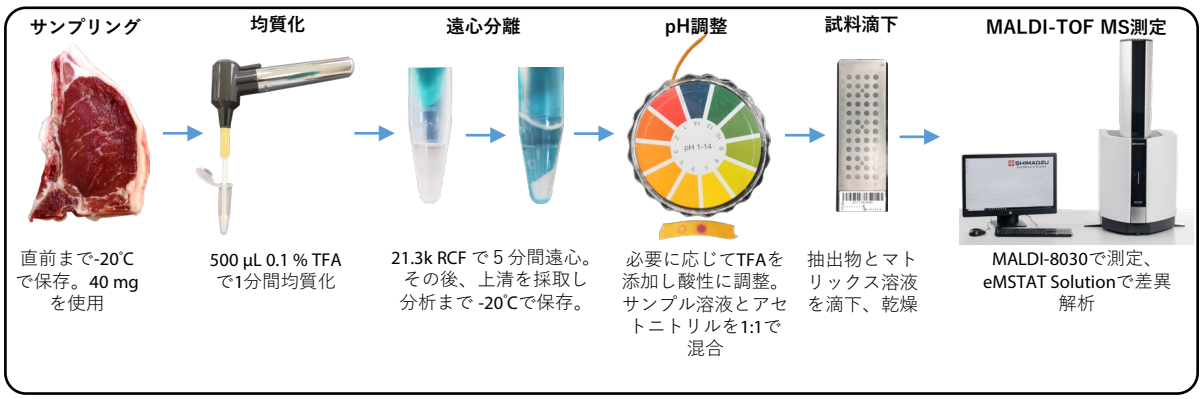

図１　前処理および分析のワークフロー

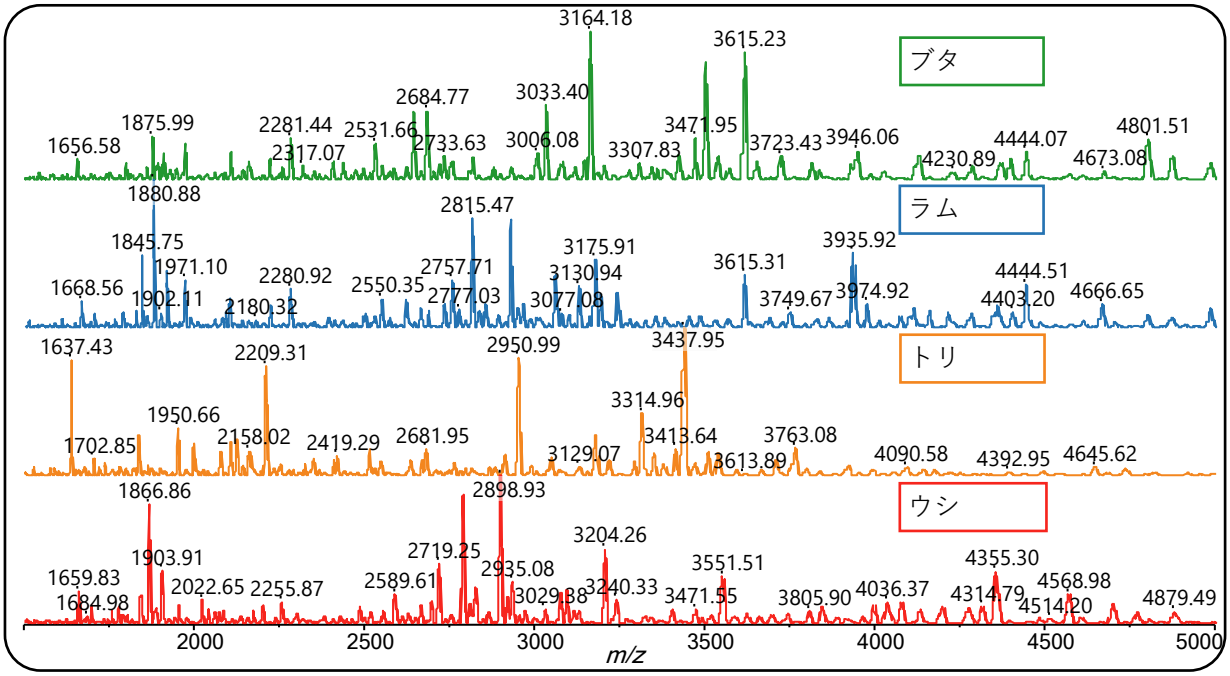

図２　　４種類の食用肉から得られたマススペクトルの比較

■結果

今回の検討結果は、基本的な試料調製法とMALDI-8030での分析、およびeMSTAT Solutionでの多変量分析を使用して、4つの食用肉とその混合物が明確に区別されることを示しました（図2と図3）。主成分分析による統計解析を行った結果、eMSTAT Solutionで生成されたスコアプロット（図3）は、4種類の食用肉を互いに区別することが可能であることを示しています。

同様の手法で、二成分混合物を50:50の比率で調製したサンプルの測定も実施しました。図３に示すように、50:50の混合物はスコアプロット上で明確な分離を示し、かつ構成する食用肉100%の群間に位置しました。他方、データは示していませんが、75:25の混合物の場合、そのスコアプロットでの分布は、一部非混合サンプルと重複していました。eMSTAT SolutionとMALDI Solutionsのデータを調べると、動物種に特徴的なピークは、これらの25%含有サンプルのマススペクトルでは観察できていないことが分かり、今後の課題と考えられます。

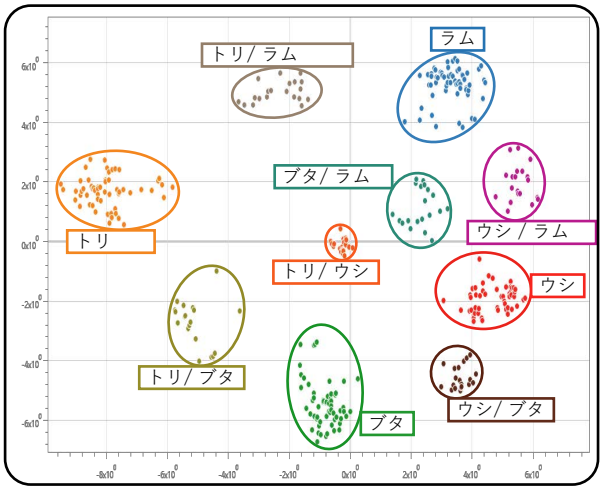

図３　　４種類の肉グループと50:50の混合物のスコアプロット
各楕円はグループの境界を示すために手動で追加しました。

■まとめ

本稿の実験の目的は、食用肉に粗悪な不純物が含まれていないか迅速にスクリーニングし、疑わしいサンプルにフラグを立て、さらなる分析を行う方法を検討することでした。

その結果、MALDI-8030を使用して、4種類の食用肉と50:50の混合物を区別するために適用可能なクオリティの高いMALDI-MSスペクトルを生成する方法が提示されました。

MALDI-8030は、最小限のサンプル前処理で食用肉のサンプルをスクリーニングするのに適していることが証明されました。今後、この明確な識別方法のさらなる検討により、食品生産に使用される肉の種類を迅速かつ費用対効果の高い方法でチェックできる判別分析モデルの開発が期待されます。

■参考文献

1) "Findus beef lasagne contained up to 100% horsemeat, FSA says". BBC News. 7 February 2013 (browsed in 20-Dec-2022).
https://www.bbc.co.uk/news/uk-21375594
2) "The horse meat scandal has resurfaced" Food control. 01 September 2021 (browsed in 20-Dec-2022).
https://affidiajournal.com/en/the-horse-meat-scandal-has-resurfaced-1
3) "15 000 tonnes of illegal food and beverages off the market" Europol (browsed in 20-Dec-2022).
https://www.europol.europa.eu/media-press/newsroom/news/15-000-tonnes-of-illegal-food-and-beverages-market
4) POSTNOTE 624 on food fraud
https://researchbriefings.files.parliament.uk/documents/POST-PN-0624/POST-PN-0624.pdf

eMSTAT Solutionは、株式会社 島津製作所またはその関係会社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

12-MO-498-JP　　初版発行：2023年 1月

島津コールセンター　0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。
本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

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。
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。

© Shimadzu Corporation, 2023