

# FT-IR/ATR による牛脂肪組織中のオレイン酸組成比 簡易測定技術の開発

辻村和也、吉村裕紀、山口陽子、本多昭幸<sup>1</sup>、橋元大介<sup>1</sup>

## 1 長崎県農林部 畜産課

減衰全反射吸収フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR/ATR 法) 及び多変量解析手法の一つである部分的最小二乗回帰 (PLS 回帰) を組み合わせた牛脂肪中のオレイン酸組成比簡易測定技術の開発を試みた。FT-IR/ATR 分析では、アルミニウム箔を用いることで、有害試薬による脂肪酸抽出操作等を行わず、微量の牛脂肪を未処理のまま直接分析する IR スペクトルデータ取得法 (AL-IR/ATR) を確立した。また、脂肪試料から IR スペクトルデータと通常行われているガスクロマトグラフによる脂肪酸組成比実測値の両方を取得し、PLS 回帰解析を行うことで IR スペクトルデータによるオレイン酸組成比予測用 PLS モデル式を構築した。その性能検証の結果、定量モデル式から算出した予測値とガスクロマトグラフによる実測値との間の決定係数 (相関係数) は、 $R^2=0.7949$  ( $R=0.8916$ ) と良好であり、予測誤差の平均は、 $1.3 \pm 1.0$  ポイントと十分な精度であった。加えて、PLS モデル式構築に未使用の牛脂肪試料を用いた外部検証の結果も 1.5 ポイント未満の予測値誤差 ( $1.3 \pm 0.9$  ポイント) を示した。一価不飽和脂肪酸組成比のための構築した PLS モデル式を用いた交差検証は、オレイン酸のモデル式と同様に十分な精度を持つ結果が得られた。以上、微量牛脂肪試料による FT-IR/ATR 分析を利用したオレイン酸及び一価不飽和脂肪酸組成比迅速測定技術が確立できた。

キーワード：牛肉食味、オレイン酸、一価不飽和脂肪酸、FT-IR/ATR 法、部分的最小二乗回帰 (PLS) モデル

### はじめに

牛肉の品質は、消費者のニーズに対応し、牛肉独特の香り、味、舌触りといった食味が重視される。その中で、牛肉の食味と関係がある不飽和脂肪酸、特にオレイン酸組成比は、重要な評価マーカーである。一般的に脂肪酸組成比測定にはガスクロマトグラフ (GC-FID) 法が用いられているが、ガス配管等の設備と高額な分析機器が必要であり、その手技も煩雑で時間も要する。また、簡便な方法として、近赤外線 (NIR) を利用した測定機器が開発されており、有る程度の測定精度を有した非破壊分析法であるが比較的試料量及び厚さが必要である。そのため、対象となる牛肉の部位、量及び厚さがそれぞれ異なる生産、流通、加工、販売、消費の場で全てにおいて適用は困難である。そこで、非破壊、簡便、迅速かつ微量で脂肪成分の直接分析が可能な減衰全反射吸収フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR/ATR 法) 及び多変量解析手法の一つである部分的最小二乗回帰 (PLS 回帰) による牛脂肪中 (筋間及び皮下脂肪) のオレイン酸組成比測定技術の開発

を行った。また、オレイン酸を含む一価不飽和脂肪酸組成比についても検討を行った。

### 実験方法

#### 1 試料

平成 27 年 4 月から平成 29 年 10 月までに、118 試料の牛脂肪組織を入手し、PLS モデル式構築用に 100 試料 (皮下 55, 筋間 45)、その PLS モデル式の外部検証用に 18 試料 (皮下 9, 筋間 9) をランダムに振り分けた。脂肪試料は、分析に供するまで  $-30^{\circ}\text{C}$  冷凍保存した。

#### 2 ガスクロマトグラフ法による牛脂肪組織中遊離脂肪酸組成比分析

前処理方法は、事前の検討で既手法<sup>1)</sup>と同等の結果が得られることを確認したナカライテスク社の脂肪酸メチル化キットを用いた。牛脂肪組織約 200 mg を小試験管に取り、抽出試薬 2 mL を加えてガラス棒で肉片を押しつぶし、ボルテックスで攪拌後、上澄み液 0.5 mL を分取し、キットプロトコルに準じてメチルエステル

化反応を行った。最終溶液について、水素炎イオン化型検出器付ガスクロマトグラフ(GC-FID)に供し、主要7脂肪酸(C14:0 [ミスチン酸]、C14:1 [ミストレイン酸]、C16:0 [パルミチン酸]、C16:1 [パルミトレイン酸]、C18:0 [ステアリン酸]、C18:1 [オレイン酸]、C18:2 [リノール酸])のピーク面積を取得した。オレイン酸組成比は、7種の脂肪酸の総ピーク面積に対するオレイン酸の面積値から算出した。また、一価脂肪酸(MUSFA)組成比(C14:1 + C16:1 + C18:1)も同様に算出した。GC-FIDは、GC-2010システム(島津製作所製)を使用した。分析条件は表1に示す。

表1 GC分析条件

【使用機器】	GC-2010システム(島津製作所)
【検出器】	水素炎イオン化検出器(FID)
【GCカラム】	Rtx-2330 (60 m × 0.25 mm ID, 0.2 μm, Restek)
【注入モード】	スプリット(1:100)
【注入口温度】	250°C
【キャリアーガス】	ヘリウム
【線速度】	35 cm/秒
【昇温条件】	160°C (15分) - 4°C/分 - 200°C - 30°C/分 - 230°C (2分)
【注入量】	1 μL

### 3. 全反射フーリエ変換赤外分光法(FT-IR/ATR法)

による牛脂肪赤外吸収(IR)スペクトルの取得

微量の牛筋間及び皮下脂肪を市販アルミニウム箔(AL:2.5 cm×2.5 cm程度に切ったもの)に直接薄く塗布し、FT-IR/ATR測定を行うアルミニウム箔直接分析法(AL-IR/ATR法)によりIRスペクトルデータを各試料につきn=2で取得した。ALは光を良く反射しIRスペクトル上にほとんど吸収をもたないためATR分析との相性が良く油脂のサンプリング用いた事例もあることから、今回適用した<sup>2)</sup>。FT-IRは、Agilent Cary 630 (アジレント・テクノロジー社)を用いた。ATRアタッチメントは、1回反射型ダイヤモンドATRアタッチメントを用いた。FT-IR/ATR分析条件を表2に示す。

表2 FT-IR/ATR分析条件

【使用機器】	Agilent Cary 630 FTIR(アジレントテクノロジー)
【アタッチメント】	ダイヤモンドATR (1回反射型)
【スペクトル測定範囲】	4000 cm <sup>-1</sup> ~ 600 cm <sup>-1</sup>
【バックグラウンドスキャン回数】	32
【サンプルスキャン回数】	32
【分解能】	2 cm <sup>-1</sup>

### 4 PLSモデルの構築及び内部交差検証

PLSモデル構築用試料のGC-FID分析で得られたオレイン酸組成比及び同試料からAL-IR/ATR分析で

得られたIRスペクトルデータをPLS解析することでオレイン酸及び一価脂肪酸組成比を算出するためのPLSモデルの構築を試みた。最適なPLSモデル構築のために、AL-IR/ATR分析で得られた脂肪酸の構造に由来するスペクトルピークのうち、予測率の高い波長域を探索した。

PLSモデルの評価は、検量データを用いた10分割相互検証法(10 fold cross-validation method)で得られる「予測誤差の二乗の和(prediction error sum of squares, 以後PRESSと略す)」、「理論値と予測値の回帰直線の傾き」および「相関係数」で行った。

PLS定量モデル構築及び内部交差検証には、Thermo Fisher Scientific社のGRAMS/IQを用いた。

### 5. PLSモデルの外部交差検証

外部検証用18試料について、構築したモデル式を用い、IRスペクトルデータによるオレイン酸組成比及びMUSFA組成比の予測値を算出した。組成比算出には、Thermo Fisher Scientific社のIQ Predictを用いた。

## 結果及び考察

### 1 全反射フーリエ変換赤外分光法(FT-IR/ATR法)による牛脂肪赤外吸収(IR)スペクトル

確立したAL-IR/ATR法により取得した牛脂肪IRスペクトルを図1に示す。既報<sup>3)-5)</sup>と同様に脂肪酸の構造に由来する波長として1160 cm<sup>-1</sup>付近(C-O伸縮、CH変角)、1,462 cm<sup>-1</sup>付近(C-H変角)、1,745 cm<sup>-1</sup>付近(C=O伸縮)、2,852 cm<sup>-1</sup>付近(C-H非対称伸縮)、2,921 cm<sup>-1</sup>付近(C-H対称伸縮)が、AL-IR/ATR法により取得したスペクトルデータからも確認され、当該分析方法の有効性が示された。また、皮下脂肪と筋間脂肪にIRスペクトルデータに差はみられなかった。

### 2 PLSモデルの構築及び内部交差検証

PLSモデルに適用可能な波長範囲として、空気中の水分の影響を受ける1,462 cm<sup>-1</sup>付近及び1,745 cm<sup>-1</sup>付近の波長域を排除し、脂肪酸に特徴的なピークのうち、不飽和度によりピークシフトが現れる<sup>6)</sup>とされる2,985~2,818 cm<sup>-1</sup>及び1,254~998 cm<sup>-1</sup>の2波長域を選択し、波長と強度からなるRowデータを平準化処理、ベースライン補正及び二次微分処理したものを暫定モデル式構築に用いた。暫定モデル式から予測された試料の濃度行列とGC分析された試料の既知濃

度行列との予測誤差 PRESS 値が最小になる潜在成分数を探索した。オレイン酸 PLS モデルについては、「9」、MUSFA モデルでは「8」が最適な潜在成分数であり、その値で構築した PLS モデルを用い、内部交差検証を行った。最終的に決定した解析条件を表 3 に示す。また、フロースキームを図1に示す。

表 3 PLS 解析条件

<b>【Data processing】</b> <Data preparation>:Mean Center, Variance Scale <Baseline>:Automatic <Pathlength Correction>:None <Derivative>:GAP 2 <sup>nd</sup> , 20 points
--

それぞれの最適な潜在成分数及び解析条件から算出された AL-IR/ATR 予測値と GC-FID 実測値の相関図を図 2 に示す。オレイン酸における決定係数(相関係数)は、 $R^2=0.7949$  ( $R=0.8916$ )と良好であり、予測誤差の平均は、 $1.3 \pm 1.0$  ポイントと十分な精度であった。また、MUSFA では、決定係数(相関係数)は、 $R^2=0.8302$  ( $R=0.9112$ )と良好であり、予測誤差の平均は、 $1.3 \pm 1.2$  ポイントとオレイン酸と同様に十分な精度であった。また、それぞれの傾きも 0.8 以上あり、有意な相関関係が確認できた( $p<0.001$ )。

### 3 PLS モデルの外部交差検証

ランダムに選ばれた 18 試料(皮下:9、筋間:9)について、構築した PLS モデル式を当てはめ、外部交差検証を行った。その結果、オレイン酸においては、皮下脂肪試料の平均予測誤差は  $1.8 \pm 0.7$  ポイント、筋間脂肪試料の平均予測誤差は  $0.7 \pm 0.9$  ポイントであり、全体の平均予測誤差  $1.3 \pm 0.9$  ポイントと外部交差検証でも内部交差検証結果と同等であった。

同様に、MUSFA では、皮下脂肪試料の平均予測誤差は  $1.4 \pm 0.8$  ポイント、筋間脂肪試料の平均予測誤差は  $1.0 \pm 0.9$  ポイントであり、全体の平均予測誤差  $1.2 \pm 0.8$  ポイントと良好であった。(表 4)

## ま と め

以上の結果、アルミホイル、FT-IR/ATR 法と PLS 回帰を組み合わせた簡易・迅速で、現場でも適用可能な精度をもつオレイン酸(含一価不飽和脂肪酸)組成比の測定技術が確立できた。それにより、通常の GC 分析に比べ、最大で 1/14 の時間削減が出来ること試算さ

れ、その精度も平均値で $\pm 2$ ポイント程度であると考えられる。今後実用化に向けては、更に検体数を増やすとともに、施設間や FT-IR 機器間の交差検証が必要である。

## 参 考 文 献

- 1) 社団法人 畜産技術協会、牛肉の品質評価のための理化学分析マニュアル、2003.3.
- 2) 見城ら：ATR-FTIR による皮脂組成の簡易分析法, J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn., 31 (2), 176-182, (1997).
- 3) Kiyohiko Toyoda *et.al* : CHARACTERIZATION OF FATTY ACID COMPOSITION PROFILE OF JAPANESE BLACK WAGYU BEEF BY ATR-FTIR SPECTROSCOPY, Proceedings of the 5th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering Tokyo, Japan, (2010).
- 4) Kiyohiko Toyoda *et.al* : FTIR Spectroscopy Analysis of Fatty Acid Composition for Quality Evaluation of Beef, Proceedings of the 5th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering Jeonju, Korea, (2012).
- 5) 豊田ら：肉牛資源の戦略的価値形成のための非破壊牛肉品質評価システムの開発、科学研究費補助金研究成果報告書, (2010).
- 6) Yoshida S, Yoshida H.: Nondestructive analyses of unsaturated fatty acid species in dietary oils by attenuated total reflectance with Fourier transform IR spectroscopy. Biopolymers. Dec;70(4):604-13,(2003).

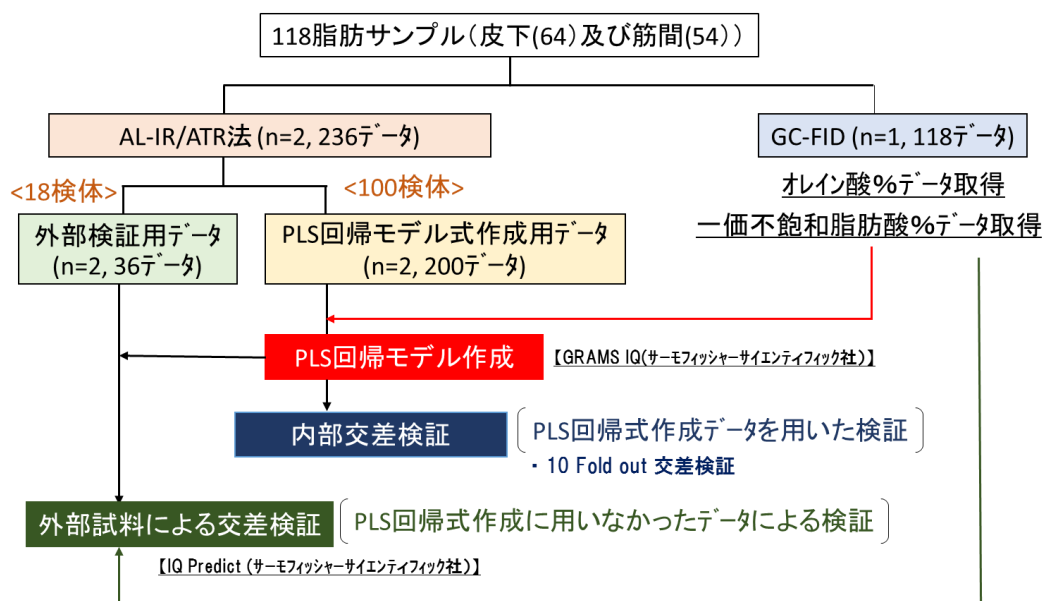


図 1 PLS モデルの構築、内部及び外部交差検証フロースキーム

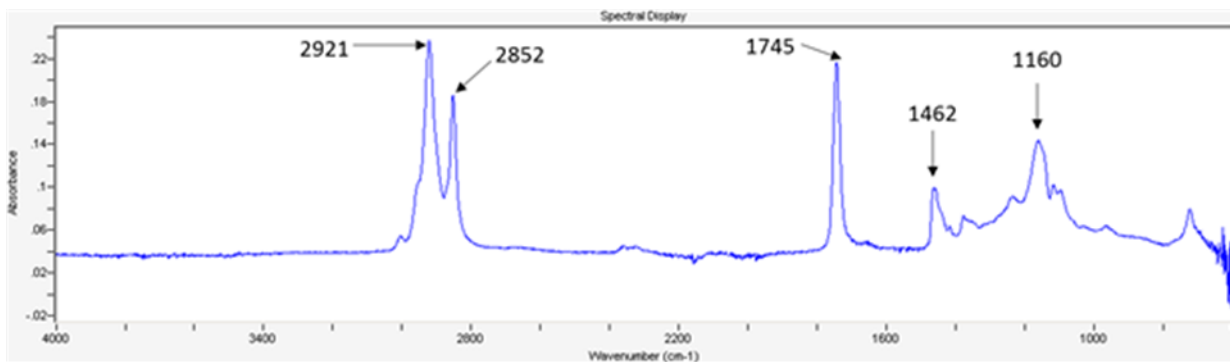


図 2 AL-IR/ATR 法による牛脂肪(皮下)の IR スペクトル

1,160 cm<sup>-1</sup>:C-O 伸縮,及び CH 変角、1,462 cm<sup>-1</sup>:C-H 変角(はさみ)、1,745 cm<sup>-1</sup>:C=O 伸縮、  
2,852 cm<sup>-1</sup>:C-H 非対称伸縮、2,921 cm<sup>-1</sup>:C-H 対称伸縮

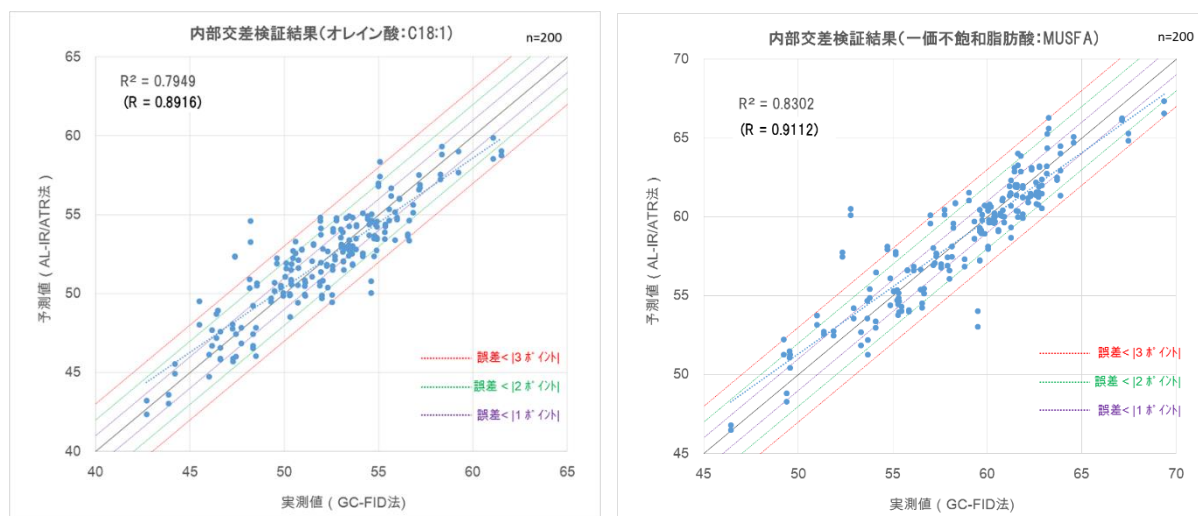


図3 オレイン酸及び一価不飽和脂肪酸 PLS モデルの内部交差検証  
 左:オレイン酸, 右:一価不飽和脂肪酸(MUSFA)

表4 オレイン酸及び一価不飽和脂肪酸(MUSFA) PLS モデルの外部交差検証  
 左:オレイン酸, 右:一価不飽和脂肪酸(MUSFA)

脂肪	サンプル No.	予測平均値(%)	GC-FID オレイン酸 実測値(%)	vs GC-FID 誤差 (ポイント)	脂肪	サンプル No.	予測平均値(%)	GC-FID MUSFA 実測値(%)	vs GC-FID 誤差 (ポイント)
皮下脂肪	①	51.0	48.4	2.6	皮下脂肪	①	56.6	55.6	1.0
	②	52.4	51.3	1.1		②	59.5	58.4	1.1
	③	51.3	49.2	2.0		③	59.1	57.2	2.0
	④	52.6	54.4	-1.8		④	60.4	63.5	-3.1
	⑤	59.9	57.6	2.2		⑤	69.9	68.0	2.0
	⑥	52.6	53.6	-1.0		⑥	59.7	59.7	-0.1
	⑦	53.8	55.4	-1.6		⑦	60.1	62.1	-2.0
	⑧	49.4	48.0	1.4		⑧	57.0	56.4	0.6
	⑨	51.5	50.0	1.4		⑨	56.5	56.9	-0.4
	⑩	50.0	49.9	0.1		⑩	52.9	54.5	-1.7
筋間脂肪	⑪	52.4	51.9	0.5	筋間脂肪	⑪	58.3	57.0	1.3
	⑫	50.1	51.3	-1.2		⑫	52.2	54.6	-2.4
	⑬	56.3	56.7	-0.5		⑬	64.1	63.1	1.0
	⑭	54.6	56.7	-2.1		⑭	59.0	60.9	-2.0
	⑮	53.3	51.6	1.8		⑮	58.4	56.0	2.3
	⑯	54.0	54.1	-0.1		⑯	60.1	59.7	0.4
	⑰	54.0	54.6	-0.5		⑰	60.1	60.6	-0.4
	⑱	48.7	49.0	-0.3		⑱	55.3	55.3	0.0

## Development of simple measurement method for oleic acid composition in beef fat tissue by FT-IR / ATR

Kazunari TSUJIMURA, Hiroki YOSHIMURA, Yoko YAMAGUCHI,  
Akiyuki HONDA<sup>1</sup> and Daisuke HASHIMOTO<sup>1</sup>

*1 Livestock Division, Agriculture and Forestry Department*

We developed a simple and easy measurement method for the composition ratio of oleic acid in beef fat by combining Fourier transform infrared spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (FT-IR/ATR) and partial least squares regression (PLS model) which is one of multivariate analysis methods. In FT-IR/ATR analysis, we established an analytical method to apply beef fat directly to aluminum foil with a small amount of beef fat (AL-IR/ATR). This method does not use harmful reagents. In addition, the PLS model for predicting oleic acid composition ratio was constructed using both FT-IR/ATR spectral data obtained from a fat sample and measured values of fatty acid composition ratio obtained by gas chromatographic analysis. As a result of internal cross-validation, the coefficient of determination (coefficient of correlation) between the predicted value calculated by applying the PLS model and the traditional measured value by the gas chromatograph, was a high value of  $R^2 = 0.7949$  ( $R = 0.8916$ ). The average of the prediction errors was  $1.3 \pm 1.0$  points, which was good accuracy. External cross-validation using other beef fat samples also had a prediction error of less than 1.5 points. Furthermore, the PLS model constructed for monounsaturated fatty acid composition also confirmed the goodness of the results of cross-validation.

In this research, a rapid measurement technique of oleic acid and monounsaturated fatty acid composition ratio value from small volumes of beef fat using FT-IR/ATR analysis was established.

Key words: Taste of beef, Oleic Acid, Monounsaturated fatty acid, FT-IR/ATR, Partial least squares (PLS) model.