

FT+における脂肪酸組成の測定精度に関する調査試験

1. 目的

2019年初頭に光学式多成分測定機 (FT+,FOSS社,デンマーク) の新たな測定項目として脂肪酸組成 (FAO : Fatty Acid Origin) が搭載され、本会では2019年3月に札幌および根室事業所にオプションとして試験導入した。

測定可能なFAOは、乳中脂肪酸 (FA : Fatty Acid) の生成由来による3グループ、すなわち、ルーメンの発酵産物である酢酸および酪酸を原料に乳腺組織で生合成される①De novo FA グループ (C4~14までの短鎖~中鎖FA)、牛が採食した飼料および牛体脂肪由来の②Preformed FA グループ (C15、C17、およびC18以上の主に長鎖FA)、①および②の両方の由来である③Mixed FA グループ (C16) である。

これらのデータの実用化にあたって、FT+の測定精度に係る検証と精度管理基準ならびに運用方法について検討を行ったので報告する。

2. 方法

(1) 調査期間

2019年3月~12月

(2) FT+ の標準化

月1回の頻度で、専用のイコライザー試薬 (波長標準液) を用い標準化を実施し、機器の光学系について波長および強度の補正を行った。

(3) 保存料添加がFAO測定値に及ぼす影響

主に個体乳試料の保存料として用いられるプロノポールおよびアジ化ナトリウムを、生乳試料に終末濃度で0.01~0.06%になるように添加し、FT+のFAO測定値に及ぼす影響について検討を行った。

(4) 参照法分析ならびにFT+再現精度の検証

本会で月間1回調製を行い、道内における乳成分測定機の精度管理用試料として用いている3種類のクロスチェック試料について、10ヵ月間、参照法であるガスクロマトグラフィー (GC) でFAO分析を行い、乳成分測定機の再現精度について検証を行った。なお、参照法分析に係る脂質の抽出、脂肪酸メチルエステル化処理、ならびにGC分析は、国際規格であるISO14156(IDF172,2001)、ISO15884(IDF182,2002)および、ISO15885(IDF184,2002)に基づき実施した。

GCで分析した個々のFAピーク面積を分子量に基づきmol比にし、全FA中の重量%に換算した。これをレーゼ・ゴットリーブ法により分析した脂肪率を用いて、生乳100g当り

の個々の FA 重量(g)を求めた。FA のグループ分けは、FOSS 社サービスノート¹⁾に従い、De novo は C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C14:1、Mixed は C16:0,C16:1、Preformed は、C15:0, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:2, C20:4, C22:0, C24:0 とした。

(5) 精度管理用試料の FAO 測定データの収集

精度管理用試料には、タンクローリー乳から調製した生乳パイロットならびに市販の LL 牛乳を用いた。生乳パイロットは同一ロットを 10 日～20 日間、LL 牛乳は同一ロットを最長で連続 1 ヶ月間使用した。

精度管理用試料の FAO データの収集は、FT+によるルーティン検査開始前に ZERO 点調整を行った後、生乳パイロットならびに LL 牛乳をそれぞれ連続 7 回測定した。さらに、検査中に一定間隔で生乳パイロットあるいは LL 牛乳を投入し、連続稼動中における FAO データを収集した。

(6) 精度管理基準および運用方法の検討

収集した精度管理用試料の測定データについて統計処理を行い、FAO パラメーターの精度管理基準の検討を行った。さらに、クロスチェック試料による GC 分析ならびに FT+再現精度の検証結果も参考にして精度管理運用法について検討した。

3. 結果および考察

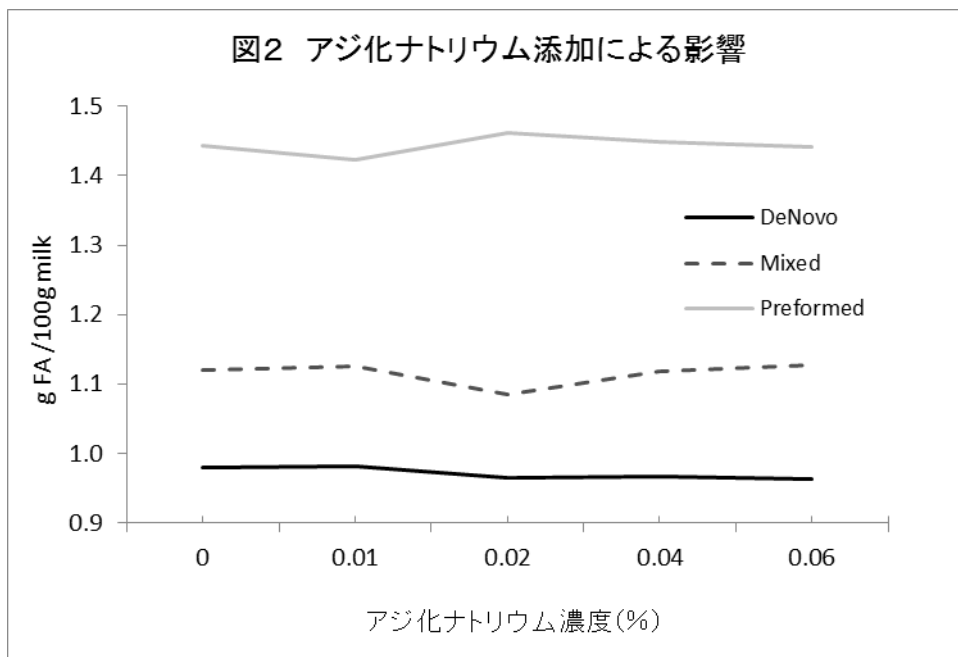
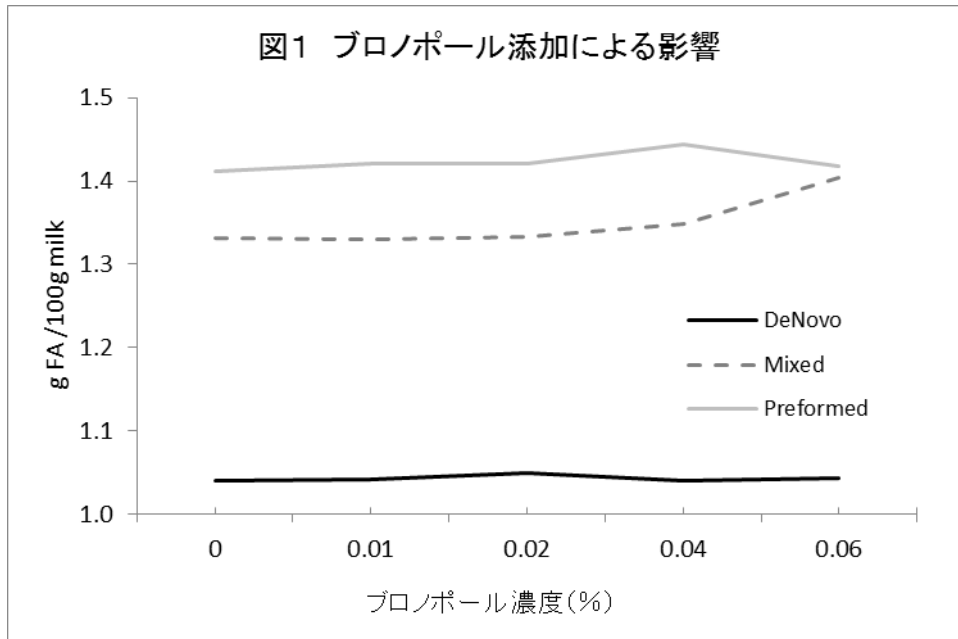
(1) 保存料添加が FAO 測定値に及ぼす影響

1) ブロノポール添加による影響

ブロノポール添加濃度と、FT+による FAO 測定値の関係については、図 1 に示すとおりである。De novo および Preformed 測定値については、添加による影響は認められなかった。一方、Mixed については通常の添加濃度である 0.02%までは変動はみられなかったが、0.04%以上では上昇傾向が認められた。検定サンプルの主な保存料として用いられるマイクロタブレット (Broad Spectrum Microtabs II™, Advanced Instruments)は、主成分がブロノポールであるため、使用する場合は指定の添加量を守る必要がある。

2) アジ化ナトリウム添加による影響

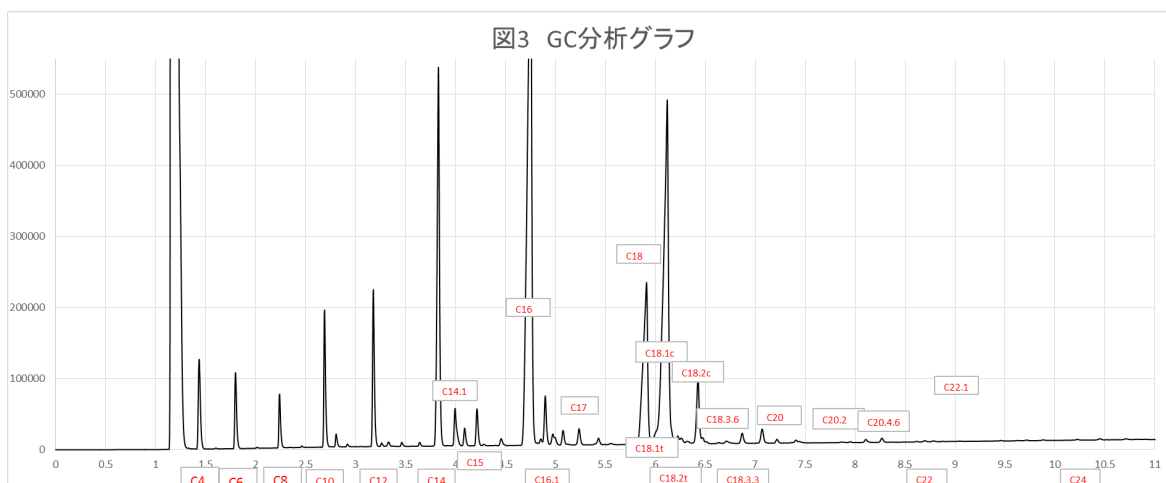
アジ化ナトリウム添加濃度と FT+による FAO 測定値の関係を図 2 に示した。いずれの FAO グループについても添加による影響は認められなかった。



(2) GC 分析ならびに FT+再現精度の検証

1) GC 分析

クロスチェック試料の GC 分析に適用したメソッド条件ならびに、分析結果の代表事例を図 3 に示した。個々の FA ピークの分離は良好であり、同定に支障を来たすことはなかった。



GCメソッド条件

| パラメーター | 設定値 |
|----------|---|
| GCシステム | SHIMAZU GC-2010AF/AOC |
| カラム | Agilent J&W DB-FastFAME、20 m × 0.18 mm、0.20 μm |
| キャリアガス流量 | ヘリウム、線速度: 32cm/sec |
| 注入口 | スプリット、250 °C、スプリット比 35:1 |
| オーブン | 80°C (0.5 分間)、 65°C/min で 175°Cまで昇温、 10°C/min で 185°Cまで昇温 (0.5 分間)、 7°C/min で 230°C まで昇温 (2分間) |
| FID | 260 °C、水素:40 mL/min 空気:400 mL/min メイクアップガス:25 mL/min |
| 注入量 | 1 μL |

2) GC と FT+の関係

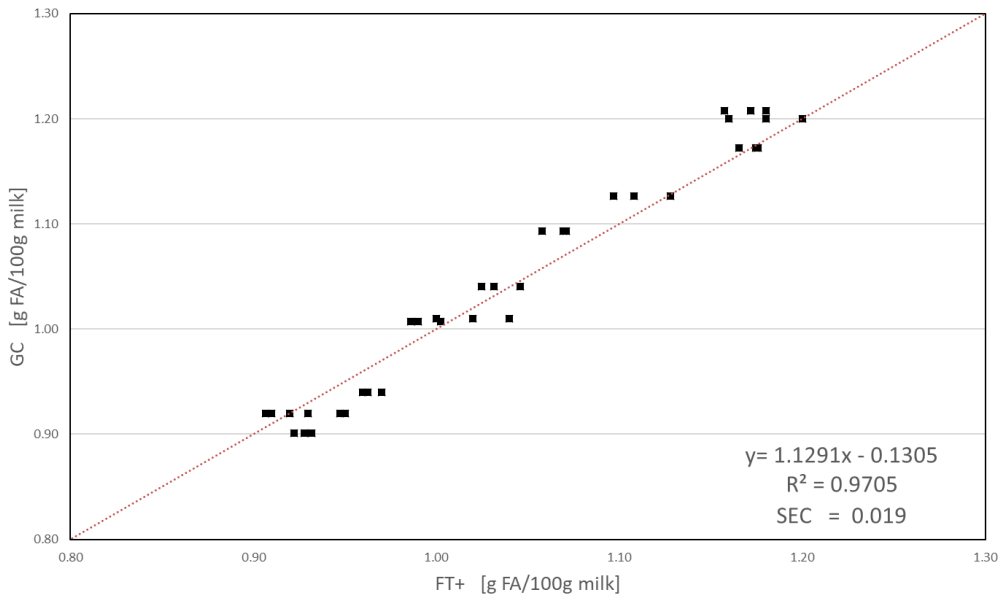
それぞれの FAO グループの GC と FT+の関係は、図 4~6 に示すとおりである。

いずれのグループについても決定係数 (r^2) は 0.9 以上と強い相関性が認められ、回帰式の傾きは 1.0 近傍にあった。FT+の測定精度を表す標準誤差 (SEC) については、表 1 に示すとおり、個別試料において De novo が 0.019 g FA/100g milk (以下、%/milk と記す)、Mixed が 0.028 %/milk、Preformed が 0.036 %/milk であり、De novo の精度が最も良好であった。また、3 試料平均値では De novo が 0.011 %/milk、Mixed が 0.026 %/milk、Preformed が 0.030 %/milk であった。

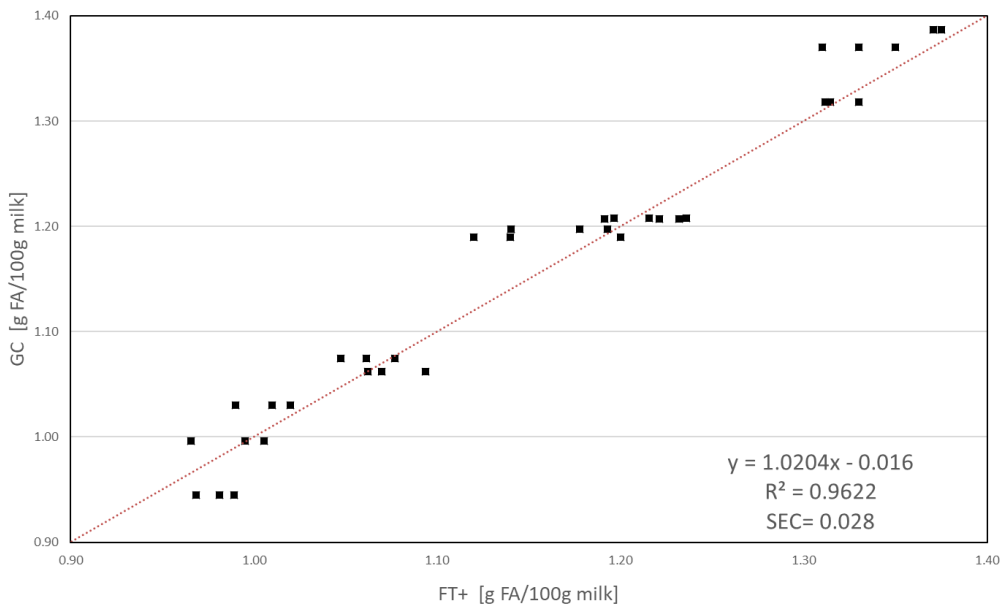
表1 GC vs FT+ 回帰分析における標準誤差

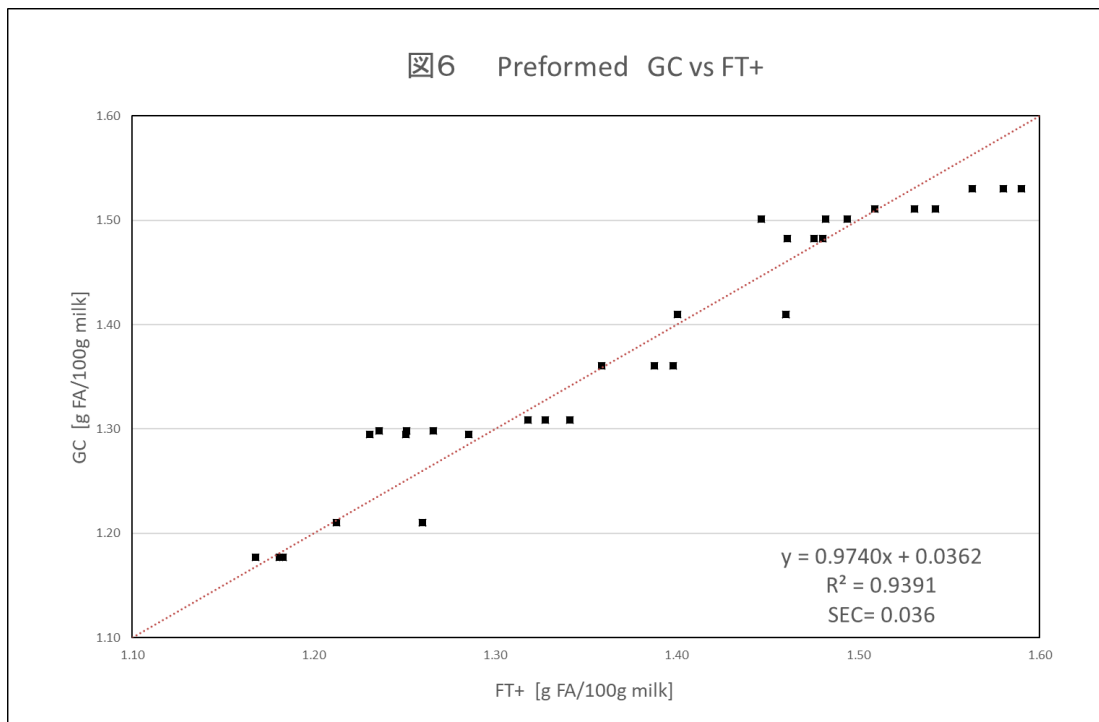
| | n | [g FA/100g milk] | | | | | |
|---------|----|------------------|-------|-----------|-------------------------------|-------|-----------|
| | | 標準誤差 (SEC) | | | GC分析値からの再現許容差 (標準誤差 × 2.8) | | |
| | | De novo | Mixed | Preformed | De novo | Mixed | Preformed |
| 個別試料測定値 | 36 | 0.019 | 0.028 | 0.036 | 0.05 | 0.08 | 0.10 |
| 3試料平均値 | 12 | 0.011 | 0.026 | 0.030 | 0.03 | 0.07 | 0.08 |

☒4 De novo GC vs FT+



☒5 Mixed GC vs FT+





(3) 精度管理用試料の測定精度について

1) 日間再現精度ならびに併行精度

FT+の測定機稼働前確認における生乳パイロットおよびLL牛乳測定値の併行精度(Sr)と日間再現精度(SR)は、表2に示すとおりである。また、FOSS社によるFAO検量線モデルの公称精度を表3に示した。

Srの平均値は、De novoが0.011(0.008~0.014)%/milk、Mixedは0.028(0.019~0.032)%/milk、Preformedが0.026(0.021~0.030)%/milkであり、いずれもメーカーが示す公称精度の範囲内であった。

SRの平均値は、De novoが0.009(0.005~0.013)%/milk、Mixedは0.019(0.012~0.023)%/milk、Preformedが0.017(0.013~0.021)%/milkであった。これらの結果については、表3に示した再現精度のメーカー公称精度が、GCとFT+測定値間の標準誤差を示すものであるため検証できなかった。

今回の試験には、FT+ 400(低速タイプ:時間当たり400検体処理)および600(高速タイプ:時間当たり600検体処理)の2タイプを供したが、併行精度および再現精度の数値はいずれも400タイプの方が低く、600タイプよりも良好な精度を示した。これは、高速タイプのマシン(600タイプ)が、低速タイプよりも1試料当りの波長分析回数が少ないことによる影響と考えられた。

表2 精度管理用試料の再現精度ならびに併行精度

| FA種別 | 測定機種別 | [g FA/100g mil] | | | | | | 併行精度 | |
|-----------|----------|-----------------|-------|--------------------------------|-------|-------------------|-------|-------|-------|
| | | SR | | 再現精度 管理限界値 (2 σ) | | 再現許容差(r) vs基準値 | | Sr | |
| | | LL | 生P | LL | 生P | LL | 生P | LL | 生P |
| De novo | 札幌FT+400 | 0.007 | 0.005 | 0.014 | 0.010 | 0.020 | 0.014 | 0.008 | 0.009 |
| | 札幌FT+600 | 0.013 | 0.006 | 0.026 | 0.012 | 0.036 | 0.017 | 0.012 | 0.012 |
| | 根室FT+600 | 0.011 | 0.010 | 0.022 | 0.020 | 0.031 | 0.028 | 0.014 | 0.012 |
| | 平均 | 0.011 | 0.007 | 0.021 | 0.015 | 0.030 | 0.021 | 0.012 | 0.011 |
| Mixed | 札幌FT+400 | 0.015 | 0.012 | 0.030 | 0.024 | 0.042 | 0.034 | 0.019 | 0.021 |
| | 札幌FT+600 | 0.021 | 0.021 | 0.042 | 0.042 | 0.059 | 0.059 | 0.032 | 0.032 |
| | 根室FT+600 | 0.023 | 0.019 | 0.046 | 0.038 | 0.064 | 0.053 | 0.029 | 0.030 |
| | 平均 | 0.020 | 0.018 | 0.040 | 0.036 | 0.056 | 0.050 | 0.027 | 0.028 |
| Preformed | 札幌FT+400 | 0.016 | 0.013 | 0.032 | 0.026 | 0.045 | 0.036 | 0.023 | 0.021 |
| | 札幌FT+600 | 0.018 | 0.018 | 0.036 | 0.036 | 0.050 | 0.050 | 0.030 | 0.028 |
| | 根室FT+600 | 0.021 | 0.017 | 0.042 | 0.034 | 0.059 | 0.048 | 0.027 | 0.028 |
| | 平均 | 0.018 | 0.016 | 0.037 | 0.032 | 0.052 | 0.045 | 0.027 | 0.026 |

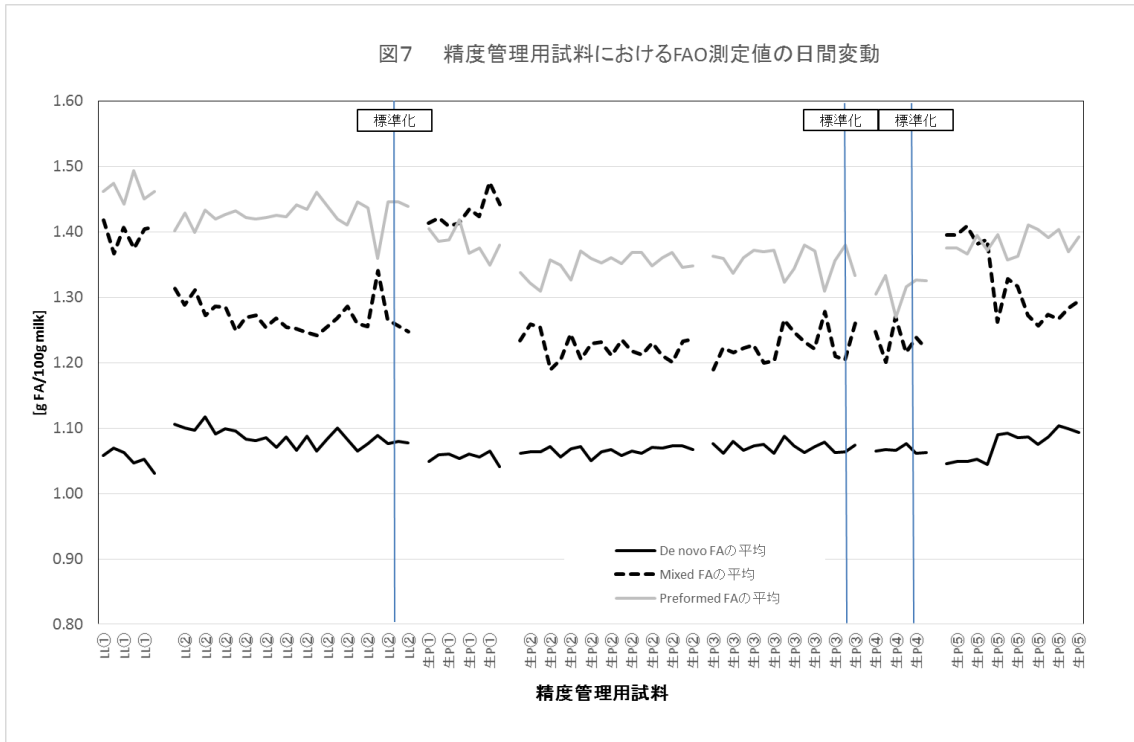
表3 FOSS測定機FAO検量線モデルの公称精度

| | [g FA/100g milk] | | |
|------------------------|------------------|-------------|-------------|
| | De novo | mixed | preformed |
| 併行精度 (Repeatability) | 0.007-0.017 | 0.024-0.039 | 0.017-0.037 |
| 再現精度 (Accuracy, vs GC) | 0.018-0.046 | 0.053-0.101 | 0.047-0.116 |

※ 表中の数値は、複数測定機によるデータ範囲を示している

2) 日間変動グラフ

精度管理用試料の日間変動は図 7 に示すとおりである。De novo は、Mixed および Preformed と比較すると最も安定して推移していた。いずれの FAO グループも、経過日数による測定値のシフト傾向はみられなかった。また、図中に示したとおり、データ収集期間中に 3 回の標準化を行ったが、標準化前後における測定値の特徴的な変動は認められなかった。



3) 日内再現精度

任意の日内における FAO 測定値の再現精度 (SR) は、表 4 に示すとおりである。いずれの測定機および FAO グループについても表 2 に示した再現精度管理限界値 (2σ) の範囲内であった。

表4 精度管理用試料の日内変動(再現精度)

| FA種別 | 測定機種別 | 再現精度 | |
|-----------|----------|-------|-------|
| | | SR | |
| | | LL | 生P |
| De novo | 札幌FT+400 | 0.011 | 0.009 |
| | 札幌FT+600 | 0.011 | 0.010 |
| | 根室FT+600 | 0.014 | 0.012 |
| | 平均 | 0.012 | 0.010 |
| Mixed | 札幌FT+400 | 0.029 | 0.029 |
| | 札幌FT+600 | 0.035 | 0.031 |
| | 根室FT+600 | 0.034 | 0.033 |
| | 平均 | 0.033 | 0.031 |
| Preformed | 札幌FT+400 | 0.026 | 0.025 |
| | 札幌FT+600 | 0.031 | 0.031 |
| | 根室FT+600 | 0.031 | 0.035 |
| | 平均 | 0.030 | 0.031 |

(4) 精度管理基準および運用法の検討

1) 併行精度

本試験の結果がメーカー公称精度の範囲内にあったことから、併行精度管理基準は、表 3 に示した公称精度の最大値である De novo : 0.017、Mixed : 0.039、Preformed : 0.037 とした。

2) 再現精度 (旬間・月間)

クロスチェック試料の再現精度管理基準について検討した。GC と FT+間の標準誤差から算出した両法分析値の再現許容差を表 1 に示した。この再現許容差を参照法である GC 分析値を基準値とした場合の FT+における再現精度管理基準とした。

3) 再現精度 (日間)

メーカー公称精度が示されていないため、表 2 に示した生乳パイロットの SR に基づき検討した。精度管理用試料における日間測定値の許容範囲 (管理幅) は、測定機と基準値間との再現許容差 (r) $SR \times 2.8$ (95%信頼限界) の最大値である、De novo : 0.03、Mixed : 0.06、Preformed : 0.05 とした。

4) 再現精度 (日内)

表 4 に示した生乳パイロットの SR 最大値の 2σ 値すなわち De novo:0.05、Mixed:0.07、Preformed : 0.07 を、日内の再現精度管理基準とした。

5) 精度管理基準の総括および運用法

以上に述べた精度管理基準について表 5 にまとめた。

表5 FAOの精度管理基準および運用法

| 管理ポイント | 実施頻度 | アイテム | 精度管理基準 | 適用 |
|---------|------|-----------------------------|---|--|
| 標準化 | 月1回 | イコライザー試薬 | イコライザー | |
| 再現精度 | 旬1回 | クロスチェック試料(n=3) (個別試料測定値) | De novo: $\leq \pm 0.05$ Mixed: $\leq \pm 0.08$ Preformed: $\leq \pm 0.10$ | 全マシンの平均測定値を基準値とする GCvsFT+回帰分析[標準誤差]*2.8 |
| | | クロスチェック試料(n=3) (3試料平均値) | De novo: $\leq \pm 0.03$ Mixed: $\leq \pm 0.07$ Preformed: $\leq \pm 0.08$ | 全マシンの平均測定値を基準値とする GCvsFT+回帰分析[標準誤差]*2.8 |
| 併行精度 | 旬1回 | クロスチェック試料(n=3) | De novo: $\leq \pm 0.017$ Mixed: $\leq \pm 0.039$ Preformed: $\leq \pm 0.037$ | |
| 参照法(GC) | 年1回 | クロスチェック試料(n=3) | 再現精度管理基準により評価 | |
| ※日間再現精度 | 測定日毎 | 生乳パイロット試料 | De novo: $\leq \pm 0.03$ Mixed: $\leq \pm 0.06$ Preformed: $\leq \pm 0.05$ | 必要に応じ評価 |

※: ルーティンの精度管理からは除外する

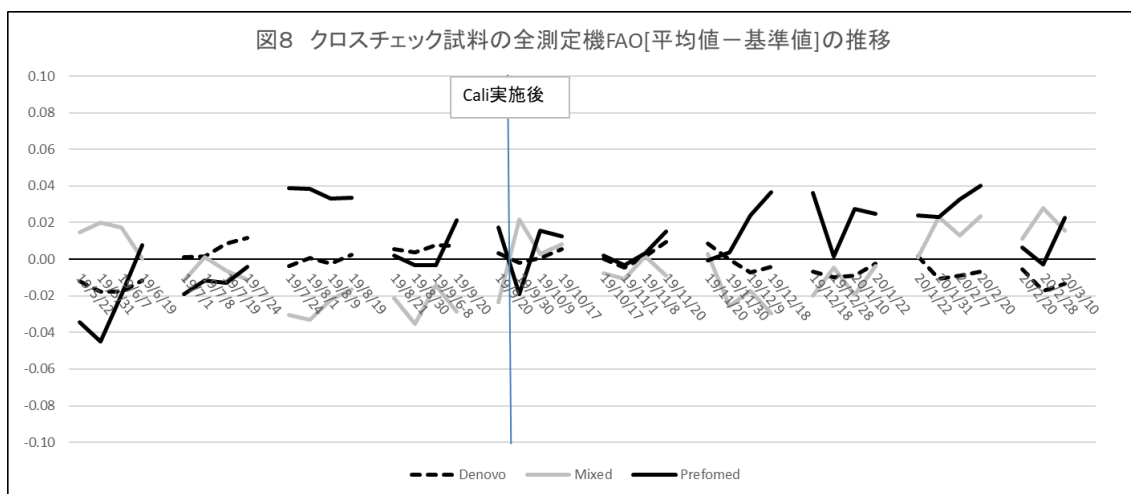
メーカーが推奨する FAO パラメーターの精度管理運用法は、以下のとおりである。

- ① FAO を初期導入したマスターマシンに対し、15~20 試料の GC 分析値で intercept 調整のみのキャリブレーションを実施する。
- ② 1 ヶ月後に再度 GC 分析を行い、マスターマシンの確認を行う。
- ③ その後は、月間 1 回の標準化を継続実施する。
- ④ 年 1 回程度、10 試料程度の GC 分析を実施し、FT+の確認を行う。
- ⑤ FAO オプションの追加導入マシンに対しては、マスターマシン測定値に合わせるようキャリブレーションを行う。

今回の調査試験において、クロスチェック試料の GC 分析値を基準値として、個々の FT+ が再現許容差から逸脱したのは、試験を実施した 10 ヶ月間のうち、個別試料においては、全 3 台における延べ評価機会 342 回中 (1 台当たり 114 回)、De novo は 1 回、Mixed は 0 回、Preformed で 3 回であった。3 試料平均においては、延べ評価機会 117 回中 (1 台当たり 39 回) Preformed の 1 回のみであった。キャリブレーションの実施は、微調整を含め 1 台当たり 1~2 回であった。

同じく同期間におけるクロスチェック 3 試料の GC 平均値と、FT+ 3 台の平均値を、ロットごとに比較したところ、図 8 に示すとおり、両法の差は最大で、De novo が $\pm 0.02\%/milk$ 、Mixed および Preformed は $\pm 0.04\%/milk$ 以内であり、長期間にわたり安定して推移した。このことから、GC によりキャリブレーションを実施した複数台の FT+ 平均値は、GC 分析値の代替として適用できるものと考えられた。

また、生乳パイロットおよび LL 牛乳の日間変動についても長期間におけるシフト傾向は認められず、月間 1 回の標準化前後における変動もみられなかった。



以上のことから、メーカーが推奨する精度管理運用法のとおり、導入時における GC 分析結果に基づく測定機のキャリブレーションと、その後の月間 1 回の定期的な標準化の実施によって、測定精度の長期的な安定性は維持可能であり、頻繁なキャリブレーションは不要であると結論付けられた。さらに、GC によりキャリブレーションを実施した複数台の FT+平均値は、GC 分析値の代替として適用できるものと考えられた。

そこで、本会における精度管理の運用としては、今回 FAO パラメーターを試験導入した 3 台の測定機をマスターマシンとして位置付け、この 3 台のクロスチェック 3 試料の測定平均値を FAO 基準値とし、追加配備した測定機については、この基準値に基づきキャリブレーションを実施する。本会所有の全測定機への配備が完了した後は、全測定機のクロスチェック 3 試料平均値を基準値とし、再現精度管理基準を逸脱した場合には、キャリブレーションを実施する。GC 分析については、確認のため年 1 回程度の頻度で実施する。

(小坂英次郎、國川尚子、中野まどか)

参考文献

- 1) Daniel Schwarz, Fatty acid profiling according to origin for optimising feeding and management of dairy cows – a new approach, A WHITE PAPER FROM FOSS p.7 Table 5, November 2018