

Agilent 6546 LC/Q-TOF および MassHunter Classifier による 食品の品質保証試験

著者

Karen E. Yannell,
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

Daniel Cuthbertson,
Agilent Technologies, Inc.
Seattle, WA, USA

概要

不正表示や偽和物の混入は食品製造業界における大きな問題となっており、この業界における品質管理分析用の使いやすいツールの必要性が強く示されています。このアプリケーションノートでは、食品の品質を保証するルーチン試験を実現する新しいメソッドについて説明します。ワークフローは、Agilent 6546 LC/Q-TOF を、MassHunter Profinder 10.0、Mass Profiler Professional 15.0、Classifier 1.0 ソフトウェアと組み合わせて構成しました。このメソッドにより、食品の品質を深く理解するうえで信頼できる結果を短時間で得られるようになりました。

はじめに

複雑な食品サプライチェーンにおいて偽和物の混入や不正表示が増大しているため、食品製造業界で食品の品質保証試験への関心が高まっています。高級原材料や製品の価格が上昇するなかで、偽和物混入製品や模倣製品の出現は増え続けています。現在、このような状況に対応するための試験のメソッドおよび手順の開発や導入は、使いやすいツールがないために限定されています。ツールやワークフローが進歩すれば、サプライチェーンでの原材料や消費者市場での最終製品の品質管理手順を改善することができます。同時に、食品メーカーは真正な原料の一貫した使用が可能になります。

質量分析計 (MS) では、食品の材料の分子成分を測定し、プロファイリングすることができます。これらのプロファイルを使用して、サンプルを分類し、真正なものであるか偽和物が混入されたものかを高い精度と確度で判定することができます。Agilent 6546 LC/Q-TOF 質量分析装置は、低質量の分解能が大幅に向上しており、広いダイナミックレンジを利用できます。これらの特長により、複雑なサンプルにおける検出および測定能力がさらに高まっています。食品の品質保証試験の開発や使用のための解析ソフトウェアとワークフローは、高度なトレーニングを受けた専門家が必要で、食品ラボが関わることは困難でした。

このアプリケーションノートでは、サンプル前処理からデータ解析までの包括的な真正性ワークフローの開発と導入のためのソフトウェアを紹介します (図 1)。QuEChERS キットを用いてサンプル前処理を高速に実行し、Agilent 1290 Infinity II LC および 6546 LC/Q-TOF を用いて成分の分離および検出を実行します。真正性確認モデルは科学者がデータ処理することで構築できますが、MassHunter Profinder 10.0 と Mass Profiler Professional (MPP) 15.0 を使用

すれば自動化することができます。Agilent MassHunter Classifier 1.0 では自動化されたサンプル真正性解析を実行して、解析結果を効率的に得ることができます。これらの向上したツールを使用することにより、食品の品質保証のルーチン分析を広く容易に導入することができます。

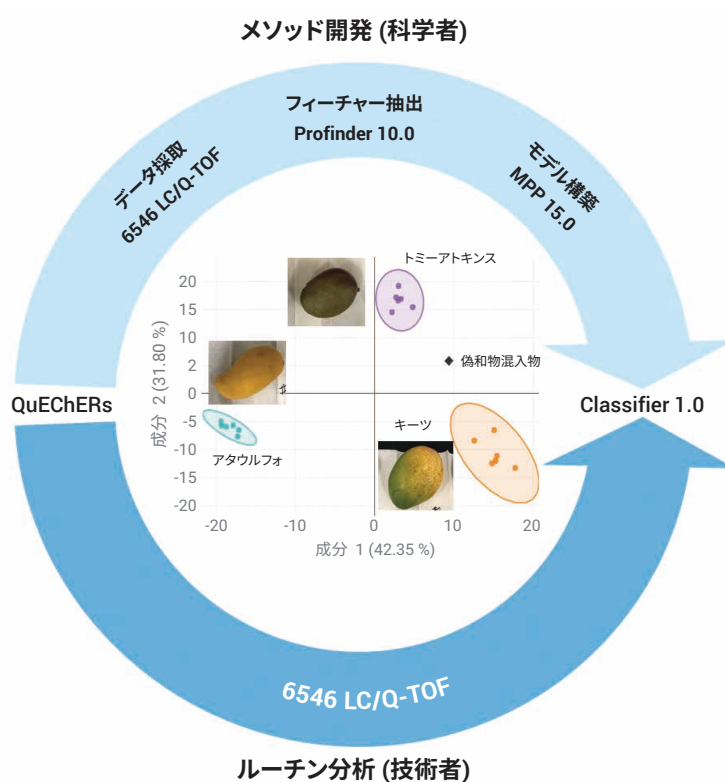


図 1. メソッド開発者やルーチン分析者向けの包括的な真正性確認ワークフロー。QuEChERS サンプル抽出およびクリーンアップによりプロセスを開始します。メソッド開発の手順 (上部) では、サンプルのデータを 6546 LC/Q-TOF を使用して採取します。採取したデータは、フィーチャー抽出機能が大幅に向上した Profinder 10.0 およびモデル構築用に MPP 15.0 を使用して解析します。開発者は、Classifier 1.0 の分類モデルを使用して、品質試料サンプルおよび未知化合物をテストできます。ルーチン使用において、Classifier ソフトウェアは使いやすく、分析者はサンプルを効率的に分析しレビューできます (下部)。結果レビューにはプロット図 (中央) が含まれ、サンプルが純粋なものか (色付き楕円内) または偽和物が混入されたものか (ここでは、黒色のひし形) を容易に判別できます。

実験方法

サンプルのセット、前処理、データの取り込み

モデルの構築には、認定された真正性サンプルが必要です。この調査では、3種類のマンゴー品種、アタウルフォ、キーツ、トミーアトキンスを分析しました。これらは認定された真正なものではありませんが、ユニークな表現型があり、正しく同定することができるため、今回の概念証明の調査の条件は満たしています。生物学的複製物6個、つまり、品種別にマンゴー6個ずつを、カリフォルニア地域の地元の市場から集めました。マンゴーの皮をむき、果肉をホモジナイズしました。ホモジネートは QuEChERS EN プロトコルを用いて処理しました¹。50 mL コニカルチューブ内で、10 g のマンゴーホモジネートを 10 mL のアセトニトリルで2分間混合しました。1個の EN 塩パウチを追加して2分間振とうしました。その後、サンプルを6分間 3,500 rpm で遠心分離しました。上澄み層を回収し、分析までガラス製 HPLC バイアル中で 7 °C で保管しました。

6個の生物学的複製物のホモジネートを混合することによって、各品種についてポジティブ品質管理試料 (QC)、つまり、純粋サンプルを作成しました (図 2)。ポジティブ QC サンプルを既知の比、例えば 20:80 と 50:50 で混合することによって、偽和物混入サンプル、つまりネガティブ品質管理試料を調製しました。QuEChERS EN を用いて QC サンプルを調製し、各サンプルと同様に保管しました。

1290 Infinity II LC と 6546 LC/Q-TOF の組み合わせを用いてサンプルを分析しました。インジェクタプログラムを使用し、2 µL のサンプルを吸引した後、ニードル洗浄を実行しました。次に、1 µL の内部標準 (IS)、100 ppb の重水素化した農業混合液を吸引し、ニードルを洗浄した後、すべてのサンプルと IS を注入

しました。この内部標準により、実験全体を通じたデータ品質のモニタリングが可能になりました。ポジティブモードで、Q-TOF をチューニングして校正しました (m/z 1,700 レンジ)。

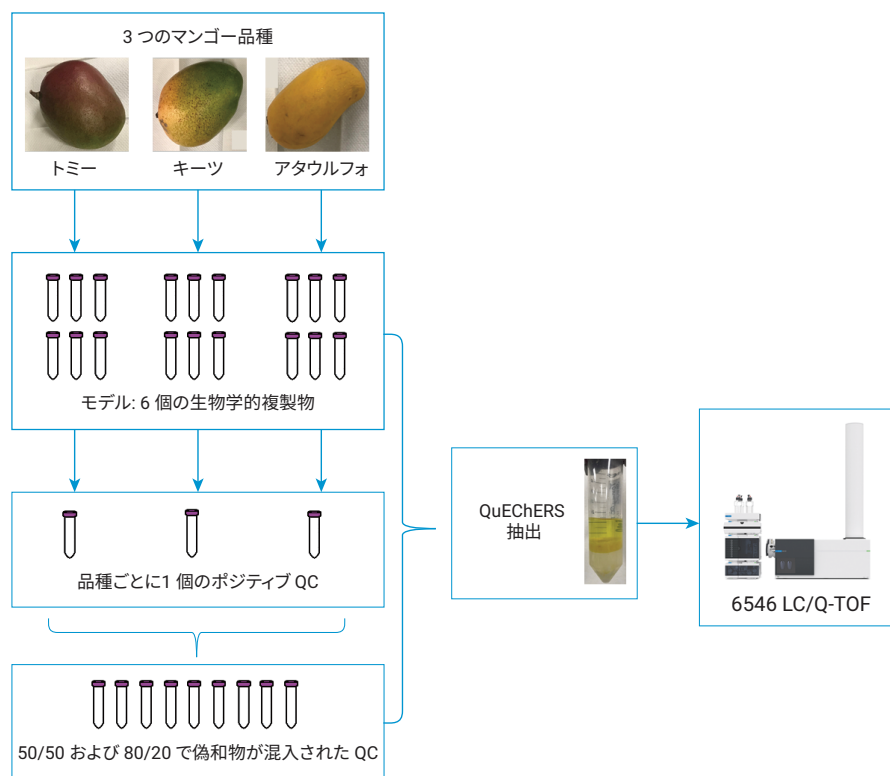


図 2. マンゴーの真正性モデルを構築するためのサンプルとラボのワークフロー。3種類のマンゴー種の6個の複製物を使用してポジティブ QC サンプルを作成しました。偽和物混合物は、純粋な QC を混ぜて作成しました。各サンプルを QuEChERS キットを用いて処理し、6546 LC/Q-TOF を使用してデータを採取しました。

5 日間の連続取り込みにわたって、2 つの内部参照質量、プリン、HP-921 ((1H, 1H, 3H-テトラフルオロプロポキシ) ホスファジン) を用いて優れた質量精度を達成しました。クロマトグラフィーで得られた全てのピークにわたって最少で 8 ~ 12 データポイントを維持するように MS データ取り込みスピードを設定しました。表 1 に追加のメソッドの詳細を示します。

モデルサンプル (6 個の生物学的複製 × 3 種類のマンゴー品種) がワークリストでランダム化され、その後にランダムに偽和物混入サンプルを注入しました。これは、モデルデータ、続いて未知のサンプルが採取される、典型的なラワークフローを再現することを目的としました。ワークリストでは、10 サンプル注入後に、3 個のポジティブ QC サンプルをランダムな順で注入しました。メソッドおよびモデルの耐久性を評価するために、データ採取後 14 日目に、新たに調製したポジティブ QC と偽和物混入サンプルを、同じメソッドとモデルを用いて分析しました。

結果と考察

データ品質

図 3 に、重水素化した内部標準の質量精度と面積をプロットしました。これらの結果は、すべての注入だけでなく、データセット全体についての品質管理チェックとなります。データは、実験全体を通して、6546 LC/Q-TOF の質量誤差が小さく (<2 ppm)、信号が安定していた (<10 % RSD) ことを示しています。リテンションタイムのドリフトはワークリスト全体を通してわずか 0.1 分でした。このデータの再現性が、各分析における機器性能の信頼性を示しています。

表 1. 6546 LC/Q-TOF 分析のデータ採取の詳細

取り込みパラメータ	
カラム	Agilent ZORBAX SB-Aq, 3.0 × 150 mm, 3.5 μm
移動相 A	水 + 0.1 % 塩酸、5 mM 塩酸アンモニウム、0.5 mM フッ化アンモニウム
移動相 B	アセトニトリル + 0.1 % 塩酸、5 mM 塩酸アンモニウム、0.5 mM フッ化アンモニウム
シーガス温度	400 °C
シーガス流量	12 psi
ガス温度	325 °C
ガス流量	10 psi
ネブライザ	20 psi
キャピラリー電圧	4,000 V
MS チューニング	<i>m/z</i> 1,700
MS モード	ポジティブ
データ取り込み	MS のみ
MS 範囲	<i>m/z</i> 50 ~ 1,000

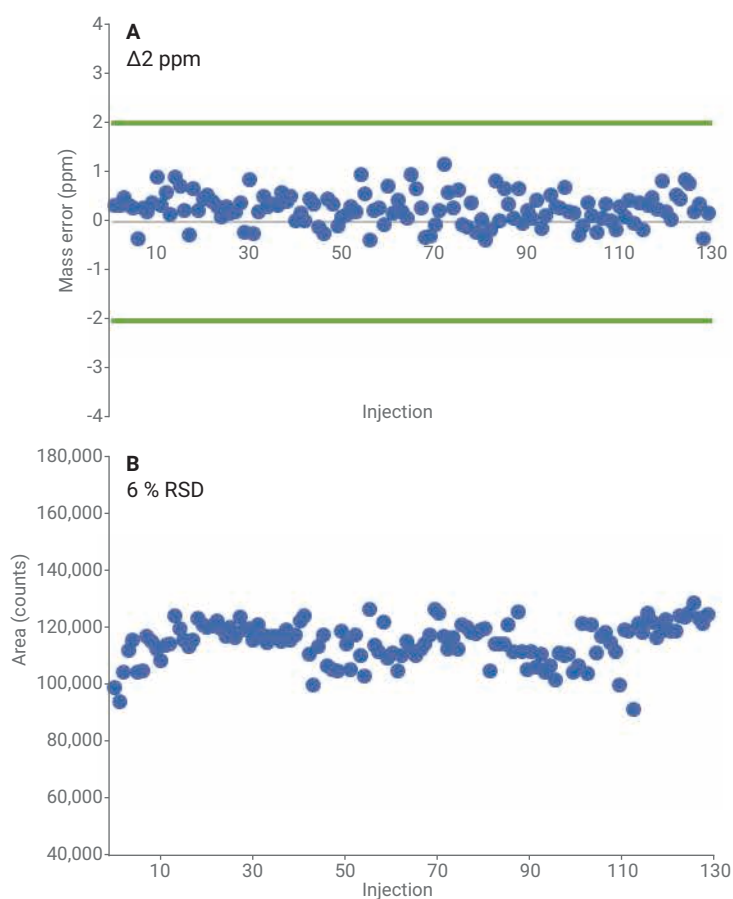


図 3. 分析全体中のジメトエート-d₆ (*m/z* 236.0446、RT 10.4 分) の結果。100+ 注入での質量誤差は 2 ppm 未満の誤差で、面積は 6 % の相対標準偏差 (RSD) で安定していました。これらの値は、6 個の内部標準の典型的な分析結果です。

メソッド開発のワークフロー： Profinder 10.0 と MPP 15.0

食品の品質保証における分析の目標は、確固たる識別子を見つけることであり、すべての識別要因を見つけることではありません。この方針により、分析モデルをアップデートしなくても、長期間使用することができます。他のタイプの分析（例えば、メタボロミクス）と比較して、この Profinder および MPP ワークフローの間には多くの重要な違いがあります。

18 個のモデルサンプルを Profinder 10.0 にロードして、マンゴーの品種ごとにグループ分けしました。データセット内のリテンションタイムドリフトが非常に小さいため、解析のためのリテンションタイムの補正は不要でした。バッチ再帰的フィーチャー抽出法（低分子/ペプチド）ウィザードを選択して、対象を定めない方法でフィーチャーを検出しました。デフォルトのメソッドを少し変更しました。一般的な有機分子（非ハロゲン）同位体モデルおよび荷電状態限界が 1 で、プロトン化されたイオン種を選択しました。ウィザードが要求する際は常に、高さフィルタ 3,000 を使用しました。最終的に、分子特性抽出（MFE: Molecular Feature Extractor）アルゴリズムとフィーチャー品質のターゲットスコアは 80 に設定しました。

後で Classifier 1.0 ソフトウェアで使用するために、メソッドを固有の名前で保存しました。

ノンターゲット分析により 4,000 以上のフィーチャー（エンティティ）を検出し、これらの結果を Profinder アーカイブ（.PFA）ファイルとしてエクスポートし、MPP にインポートしました。MPP へのインポート後、頻度、リテンションタイム、ANOVA 統計解析の統計値、倍率変化に基づいて、データをフィルタリングしました（図 4）。解析が終了してから、部分最小二乗判別分析（PLS-DA: partial least square discriminant analysis）モデルを作成しました。適合度（ R^2 ）、予測指数（ Q^2 ）について PLS-DA プロットとグルーピングを調査し、MPP モデルとしてエクスポートしました。

ルーチン分析ワークフロー： Classifier 1.0

この開発プロセスで、サンプルからのフィーチャーの抽出（Profinder）およびモデル獲得のためのフィーチャーの処理（MPP）をルーチンラボで効率的に実行する方法を確立します。新たに採取したサンプルのルーチン分類においては、Profinder および MPP は短時間での容易な分析には適していません。高度な専門知識が必要となるためです。Classifier 1.0 は革新的なソフトウェアであり、保存済みの Profinder および MPP メソッドを取り込んで新しいサンプルに適用し、結果を短時間で得

られます。このソフトウェアを使用すると、分析者はProfinder および MPP を使用する必要がなくなります。

Classifier にはメソッドおよびサンプル情報を入力するシンプルなインターフェースがあります（図 5）。一度サンプルが提供されると、Classifier での分析中にいつでも、追加のサンプルをプロジェクトに追加できます。各サンプルの分析は数分で完了し、処理がサンプルキューに移動すると、データをレビューできます。1 つ以上のサンプル結果を含むプロジェクトを保存して、再び呼び出し、レポートとしてエクスポートすることができます。

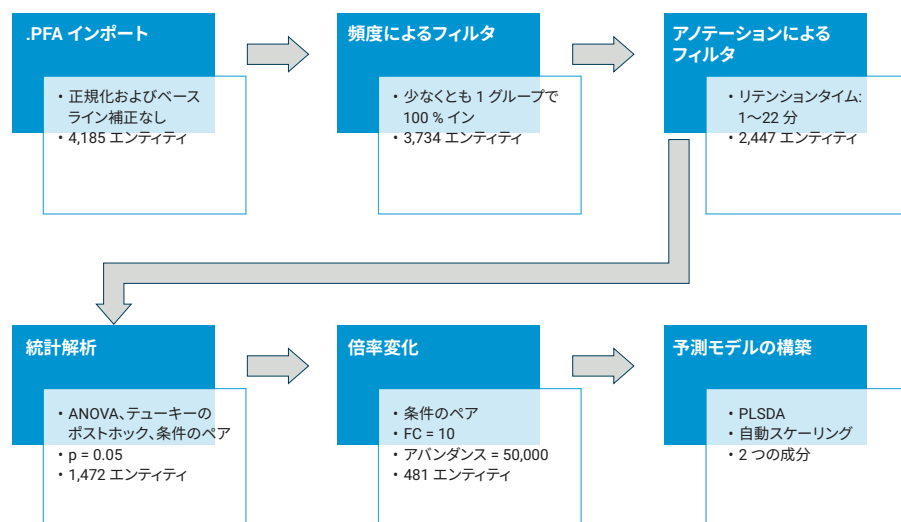


図 4. MPP 分析ワークフローおよびキーパラメータ。それぞれのフィルタリング段階で、残ったエンティティの数を示します。

New Project

Project Name	Project	
Samples Type	☒ (.d) ☐ (.cef)	
Profinder Method		Select
MPP Model		Select
Samples		Select
Submit Cancel		

図 5. 簡素で使いやすい Classifier 1.0 の新しいプロジェクト用のユーザーインターフェース。メソッド開発段階で作成される Profinder メソッドと MPP モデルが選択されます。1 個以上のサンプルを追加できます。

今回の研究では、MPP モデル、Profinder メソッド、すべての偽和物混入サンプルを Classifier 1.0 プロジェクトに追加しました。結果が Sample Table (サンプルテーブル) (図 6A) に追加され、各行にサンプル名、予測クラス、分類における信頼値が表示されます。分析前の保留中のサンプルは、結果が利用できるようになるまで、Sample Table (サンプルテーブル) にサンプルキューとして残ります (図 6B)。Sample Table (サンプルテーブル) でサンプルを選択してデータをレビューできます。選択すると、インターフェースが更新されて、レビューされたサンプルの位置がモデルの主成

分分析 (PCA) プロット内に黒のひし形で示されます。このプロットは、ホテリング楕円、つまり 95 % 信頼楕円内にモデルサンプルを含みます (図 6C)。分析されたすべてのサンプルについて、モデルに帰属する個々のフィーチャーを Compound Table (化合物テーブル) でレビューすることも可能です (図 6D)。

この分析では、マンゴーの QC データは、モデル構築には含まれず、Classifier 1.0 で真正性サンプルの QC チェックとして分析されました。各 QC サンプルは適切に分類され、PCA プロットは QC の正しい品種と適合しました。モデルを作成した 6 個の生物学的複製物は、

ホテリング楕円内に正確に含まれました (図 7)。レビューサンプルは、PCA プロット内に黒いひし形で表示されます。Sample Table (サンプルテーブル) にリストされている信頼値と同様に、ホテリング楕円を基準とするサンプルの位置はその純度を示します (図 6A)。サンプルが純粋な QC の場合、黒のひし形はそのサンプルが属するマンゴーグループの中または非常に近くに存在します (図 7A および 7B)。一方、偽和物混入サンプルの場合、黒のひし形はグループから離れたところにプロットされます (図 7C と 7D)。

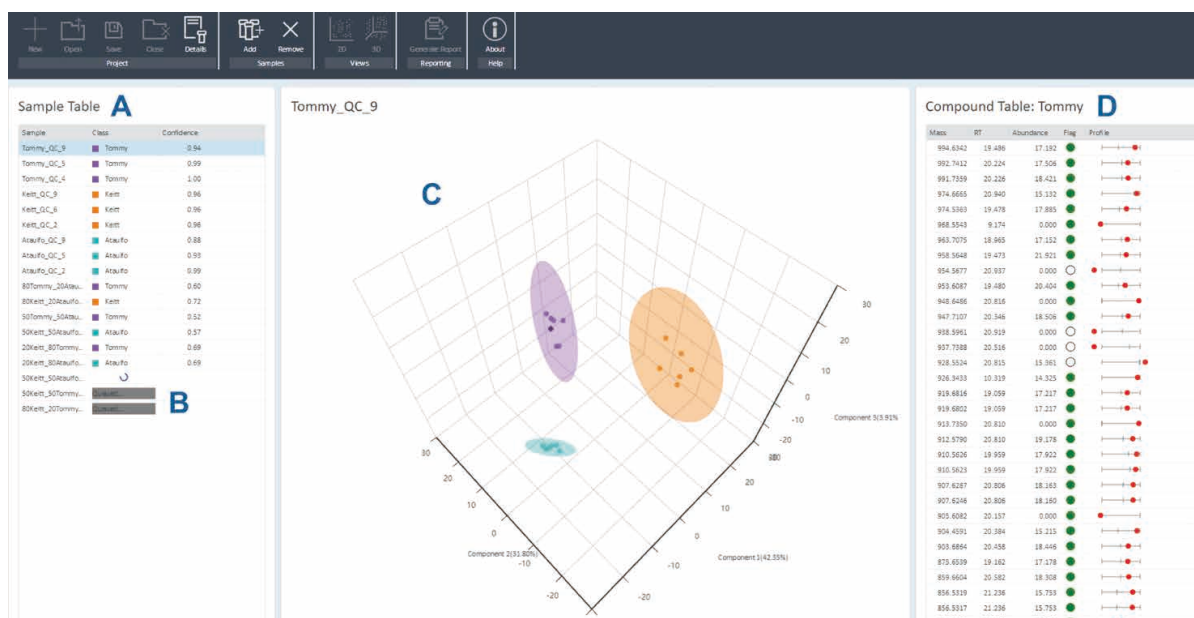


図 6. Classifier 1.0 の結果が Sample Table (サンプルテーブル) (A) に表示され、未分析のサンプルはキューに残っています (B)。個々のサンプルの詳細は PCA プロット (C) に、フィーチャーの詳細は Compound Table (化合物テーブル) (D) に表示されます。

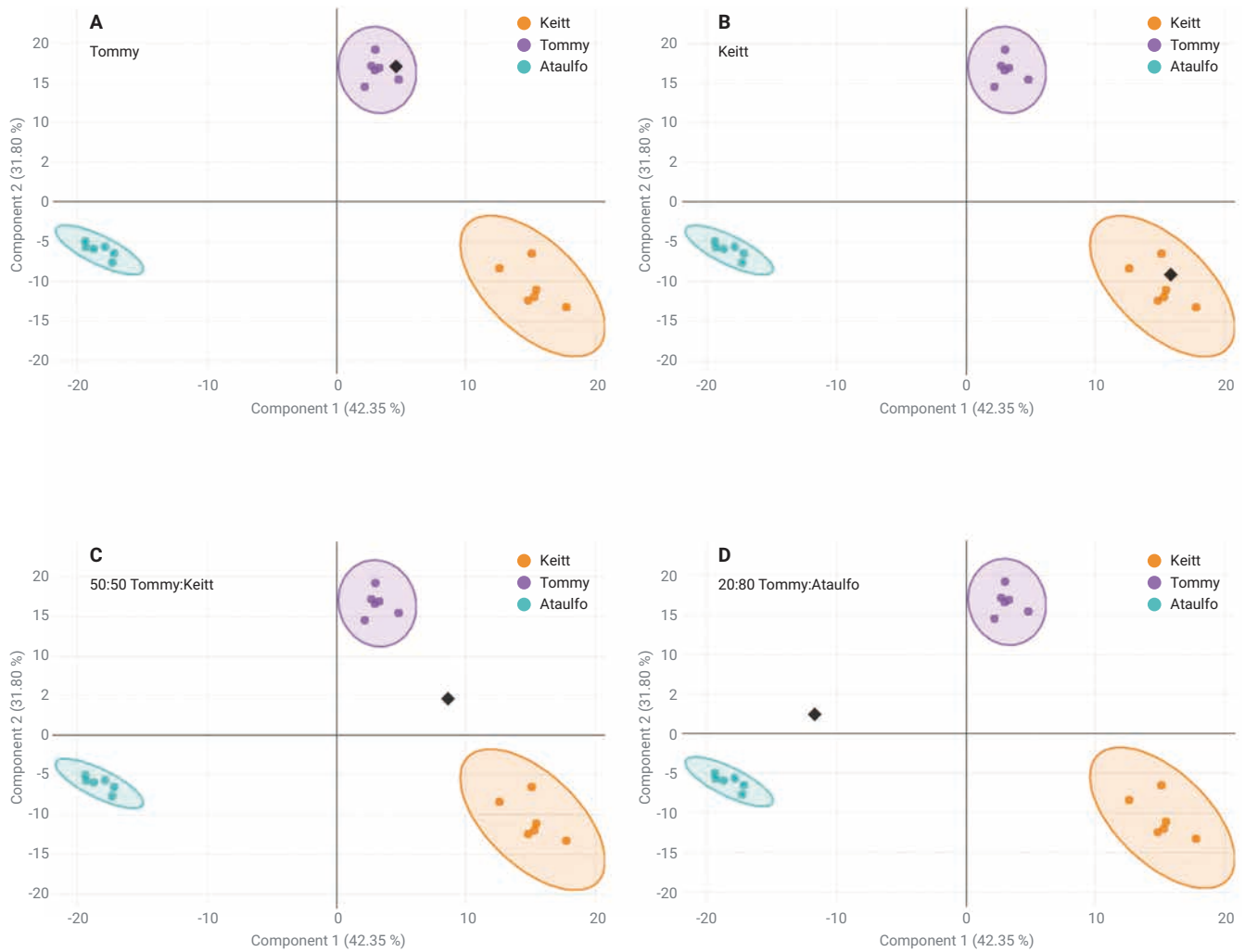


図 7. Classifier 1.0 の PCA プロットの結果。キーツ種はオレンジ色、トミーアトキンス種は薄紫色、アタウルフォ種はティール色です。黒色のひし形は選択したサンプルを示しています。純粋なサンプルである (A) トミーと (B) キーツは、それぞれのグループ内に存在します。偽和物混入サンプルの (C) 50 % トミー : 50 % キーツ、および (D) 20 % トミー : 80 % アタウルフォは、各モデルグループの近くにはありません。

図 8 に、今回の調査の信頼値をまとめています。純粋な QC サンプルの信頼値は高く、一方、偽和物混入サンプルやネガティブ試料の信頼値は低くなっています。この場合、0.8 のカットオフ値は、信頼値のみをベースとして純粋サンプルまたは偽和物混入サンプルを 100 % の精度で正しく同定できます。さらに、1 日目と 14 日目で採取したサンプルについて同じ結果が得られたことから、このメソッドでは長期の一連の分析についても再現性の高い結果を得られることが示されました。メソッドの精度も非常に高く、信頼値については RSD が 5 % 未満です (n = 10)。

メソッド開発の科学者向けの 新たなワークフローの進歩

MPP 15.0 のメソッド自動化ツールにより、メソッド開発の科学者はメソッドを効率的に作成でき、速やかにルーチン分析に適用できます。図 9 のツールでは、使いやすいドラッグアンドドロップでリストから分析オプションを選択し、メソッドを構築することができます。メソッド構築が完了すると、これを保存して任意の新しい .PFA として使用できるため、ワークフローメニューのすべてのステップを順にクリックする

の必要はありません。このソフトウェアの向上により、保存した分析メソッドを容易に再適用できるため、新しい真正性サンプルをモデルに追加することも容易になります。図 4 の例などの統計解析メソッドを追加の真正性サンプルとともに再処理することができ、マウスを 1 クリックするだけで、時間をかけず人的ミスを少なくして、更新モデルを作成することができます。

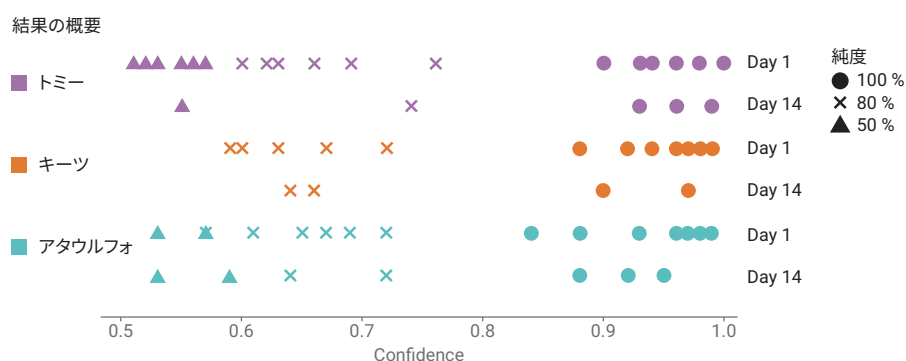


図 8. Classifier 1.0 で得られたマンゴー結果のサマリプロット図。色は各サンプルについてマンゴーの品種分類を表しています。1 日目と 14 日目の実験から得られた分析結果をプロットしています。

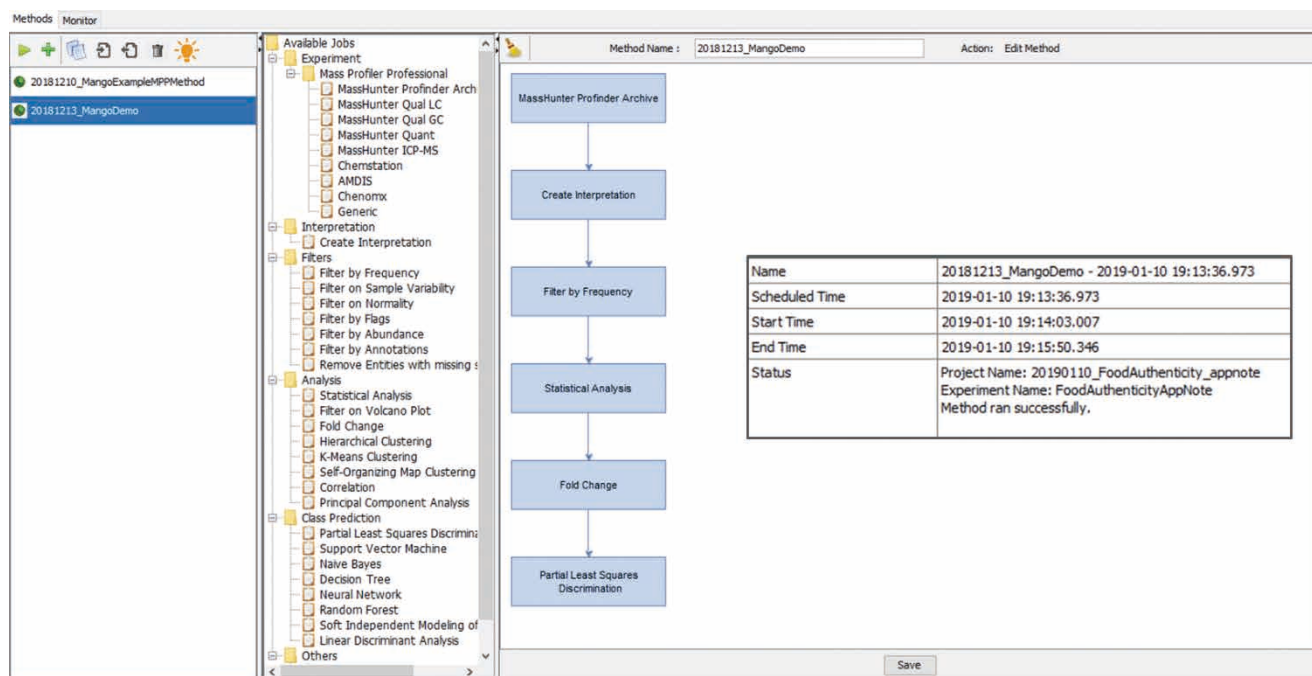


図 9. 新しい機能を持つ MPP 15.0 メソッド自動化インタフェース。左のパネルは、メソッドのリストで、目的のメソッドを開始するためのプレイボタンが表示されています。中央のパネルのステップを選択することによってメソッドに追加し、右のパネルに新しいメソッドを構築できます。メソッド自動化を使用すると、分析が高速化し、完了時にレポート (挿入された表) が作成されます。

結論

偽和物混入および不正表示の製品や原材料が頻繁に発生しているため、食品の品質保証ワークフローでは食品試験をよりルーチン化する必要があります。この有望なワークフローは、6546 LC/Q-TOF、Profiler 10.0、MPP 15.0、Classifier 1.0 を使用して実現できます。メソッド開発の科学者は、モデルの構築を支援するより高速で自動化されたワークフローを利用できます。ルーチン分析では、Classifier 1.0 を使用するだけで新しいデータからの高速分類が可能になります。このワークフローにより、明確かつ信頼できる結果を短時間で得て、原材料や製品の品質の調査に活かすことができます。

参考文献

1. <https://www.agilent.com/en/products/sample-preparation/sample-preparation-methods/quechers/extraction-kits-preparation-methods/quechers/extraction-kits>

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, March 8, 2019
5994-0694JAJP