

# 食品偽装（Food Fraud）に対抗するための手法

確実な結果を得るために

## 概要

食品偽装事件が明るみに出るたびに、食品に対する消費者の意識が高まり、法規制改正への動きが活発化しています。こういった状況を踏まえ、本書では、食品への偽和物混入に関連する分析法と実験メソッドを紹介し、多変量統計およびサンプルが属するクラス分類の予測について説明します。分子分光法などのアプローチは、比較的低コストで行える傾向にあり、こういった機器の中には、現場に持ち込めるほど小型化されているものもあります。分光計は、適切なデータ正規化手法を適用すれば、最新技術によってサンプルのスペクトルプロファイルのわずかな変化を検出できることから、食品のフィンガープリンティングに有効です。ユニット分解能および高分解能（精密質量）の質量分析計（MS）も、検出される各化合物のパターンにもとづく食品のフィンガープリンティングが可能であり、食品偽装検査において重要な役割を果たすことができます。誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）や誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-OES）などその他の分析法についても、微量元素分析にもとづく産地の判別に長けていることが実証されています。ゲノム検査では、加工サンプルであっても、魚類のDNAを正確に同定することが可能です。分析メソッドという観点では、ノンターゲットアプローチがサンプルのフィンガープリンティングに有効であることが実証されています。低価格のコンピュータワークステーションや統計ソフトウェアが出現したことで、ノンターゲットワークフローを多変量統計解析に関連付け、分析データから有益な情報を引き出せるようになりました。近年まで、これらのアプローチは多大なコストがかかったり、非常に複雑だったことから、ユーザー自身が行うことが困難でした。データは、専門の統計学者に委ねられるか、徹底的な調査が行われなままになっていました。現在では、手頃な価格のツールが登場したことにより、ユーザーが以前より容易に統計アプローチして、サンプル品質などの特性を判断したり、サンプルの属するクラス分類の予測モデルを作成できるようになっています。

## はじめに

偽和物混入がこれほど重視されるようになった背景には、ペットフードにより、犬や猫が健康被害に遭った 2007 年のメラミン事件を思い浮かべる方もいるでしょう<sup>1</sup>。この事件では、調査から犬猫用のペットフードがメラミンとそのトリアジン類似物（アンメリド、アンメリン、シアマル酸）の混合物で汚染されていたことが解明されました。タンパク質豊富なペットフードに見せかけるために、安価で窒素を多く含む工業用化学物質を使用して、ペットフード中の窒素含有量を増加させていたのです<sup>2</sup>。

こういった事実が明らかになると、メラミンによる食品への偽和物混入は、瞬く間に国際的な問題に発展しました。後に、米国で生産されていた粉ミルク、カナダで流通していたクッキー、アジアおよびオーストラリアで販売されていたチョコレート、タイの練乳、香港の鶏卵からもメラミンが検出されました。この事件では、世界保健機構（WHO）や国連食糧農業機関（FAO）、欧州食品安全機関（EFSA）、国際食品安全当局ネットワーク（INFOSAN）といった国際機関が協力し、危機の究明と解決に取り組みました。メラミンを含んでいる疑いのある食品が 68 개국で禁止またはリコールされました<sup>3</sup>。多くの国でメラミンの許容限度が規定され、FDA（アメリカ食品医薬品局）は乳児用粉ミルクの最大残留基準値（MRL）が 1 ppm、その他の製品については 2.5 ppm と定められました<sup>4</sup>。さらに、FDA には経済的な動機による不純物の混入（EMA：Economically Motivated Adulteration）作業グループが設置されました。2009 年、EMA は製品の見た目上の価値の増加もしくは生産コストの削減（つまり収益増加）を目的とした不正かつ意図的な物質の代用または添加として定義されました<sup>5</sup>。

食品への偽和物混入は、安全に対する基本的な懸念のおよばないところで消費者を騙すものです。この問題は、エクストラバージンオリーブ油（EVOO）でも発覚しています。2010 年から実施された調査により、当時の米国市場で流通していた EVOO 含有量 99 % の輸入オリーブオイルは、官能検査から EVOO に分類されないケースが多発していたことが判明しました<sup>6</sup>。現在も、専門家は EVOO の最大 80 % の表示ラベルが虚偽であると訴えています<sup>7</sup>。EVOO とそれ以外のグレードのオリーブオイルを区別する確立された検査の実施は、それほど難しいことはありません。その代表例として、HPLC によるジアシルグリセロールまたはピロフェオフィチン（クロロフィルの分解生成物）の測定があります<sup>8</sup>。しかし、この検査では、偽陽性や偽陰性の結果が生じるおそれがあります。偽装を目論む者が検査に合格できる他の油を混入させることが可能です。

香りの異常により、真正品 EVOO が官能検査で不合格になることもあります。特に保管状態の悪い EVOO は、かび臭、酸敗臭、酸味すべてで問題になる可能性があります。酸、エステル、アルデヒドなどの特定マーカーを高 ppb から低 ppm で検出できる化学分析は、その濃度にもとづいてこの問題のスクリーニングソリューションとして期待されています<sup>9</sup>。

化学者は、より信頼性の高い EMA の検査法を必要としており、新たな分析機器や分析メソッドも検討されています。重要なのは、アプリケーションとコストが両立する最適な手法を見つけることです。

## MS ベースの食品検査

飛行時間型 MS のフルスペクトル、四重極 MS のスキャン、およびフーリエ変換 MS 技術は、サンプルの分類に有効なツールです。MS 機器は、手頃な価格であるガスクロマトグラフィー/質量分析（GC/MS）機器から、高価なフーリエ変換質量分析計（FT-ICR MS）、もっと高価である高性能イオンモビリティ四重極飛行時間型機器（IM/Q-TOF）まで、幅広い価格で市販されています。



Agilent 8890 GC/5977B MSD システム

多くの揮発性および半揮発性化合物のルーチン分析には、電子イオン化（EI）を用いた GC/MS が使用されます。この手法には、EI スペクトルを、597,000 種類の化合物と 100 万以上のスペクトルが収録された大規模な NIST 17/Wiley Registry 11 ライブラリで容易に検索できるという利点があります。多数の揮発性および半揮発性化合物の暫定的同定（標準物質を使わない、MS スペクトルライブラリのみによる同定）という、強力な能力を手に入れることができます。NIST MS Interpreter や部分構造推定の機能など、ユニットマスデータから構造を推定できる構造解析ツールもいくつかあります。GC/TOF や GC/Q-TOF などのフルスペクトル精密質量分析計を活用すれば、構造情報が得られます。フラグメンテーションツリーの生成や Agilent Molecular Structure Correlator (MSC) などの熱力学ベースの構造解析ツールを通して、未知化合物を同定できるようにもなります。FT-traps（フーリエ変換ーリアイオントラップ型）MSは優れた質量分解能を備えていますが、フーリエ変換 MS は EI 分析用として完全には開発されていません。欠落したピーク（データ）が生じるとマッチファクターが低くなります。この問題への 1 つの解決策は、質量精度に重点を置いて欠落したイオン（データ）に囚われない独自の同定アルゴリズムを開発することです。

## フィーチャー抽出解析

NIST が 1990 年代初期に公開した AMDIS を利用するフィーチャー抽出ツールがあります<sup>10</sup>。AMDIS/マニュアルキュレーション/SpectConnect は、EI ピークアライメントおよびデータ抽出が行える優れたソリューションです。SpectConnect は XCMS や MZmine とは異なり、EI データ用に設計されています。

GC は、アジレントをはじめとして、LECO 社、ZOEX 社などから市販されています。GC は多次元クロマトグラフィーにも適用できます。多次元クロマトグラフィーの利点は、一般に一次元 GC よりも S/N 比が高いことです。その一方、特殊なハードウェアと GC Image 社などが提供するピークデコンボリューションツールが必要になるという欠点があります。このソフトウェアツールは、サンプルを順次分析する場合には問題なく動作しますが、ノンターゲット分析の基本であるバッチ分析用として最適化されていません<sup>11</sup>。

ノンターゲットワークフローには、理想的には再帰的アルゴリズムにもとづいた再現性の高いフィーチャー抽出ソフトウェアが必要です。再帰的アルゴリズムによるフィーチャー抽出の目的は、偽陽性と偽陰性を最小化することです。ノイズと見なされたイオンを排除し、リテンションタイムと質量のアライメントを行い、イオンをビンニング処理（欠落データを補完処理する技術の一つ）してコンセンサスライブラリ（フィーチャー化合物リストとそれに対応するフィーチャー化合物スペクトルで構築）を構築します。このコンセンサスライブラリでは、個々のイオンを割り当てて同定するアルゴリズムが使われています。これにより、偽陽性の発生率が低下します。そして、未割り当ての残滓のフィーチャーを使用してターゲット検索します。判定の基準を緩和してターゲットリストを調べなおすこのプロセスが、ピークの欠落により生じる偽陰性を低減します。再帰的アルゴリズムによるフィーチャー抽出は、全体的な結果の品質を高めるように設計されています。しかし、どのアルゴリズムも完璧ではないた

め、バッチの再帰的アルゴリズムによるフィーチャー抽出に続いて、結果をバッチごとにマニュアル解析しなければなりません。XCMS Online は、スクリプス研究所が開発した低分子のノンターゲット分析用の公開リソースであり、同様にワークフローに従って欠落したピークデータを埋めます<sup>12</sup>。

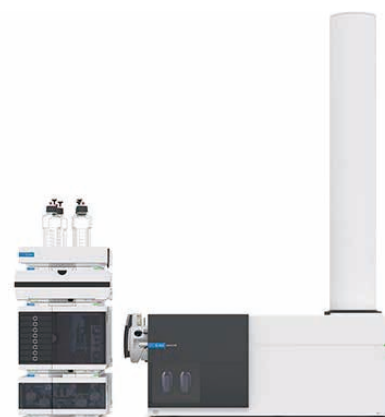
フィーチャー抽出データを確認して積分誤差を補正した後、データをテキストファイルとしてエクスポートできます。ピークが見つからない場合は、欠落しているものと見なされます。この統計ソフトウェアでは、欠落したピークをゼロのアバンドンスとして処理するか、未検出のピークとして処理するかが選択できます。ゼロのアバンドンスの選択は、統計に大きく影響します。データの入念な確認によってピークが欠落していることが確認された場合のみ選択してください。データが入念に確認されておらず、化合物が偽陰性である可能性がある場合は、未検出のピークを選択します。

## ターゲットメソッドとノンターゲットメソッド

ターゲットおよびノンターゲットのケモメトリックスアプローチを組み合わせることで、予測した化合物を正確に同定でき、予測外の化合物の存在も検出できる有効なソリューションが実現できます。このアプローチは、Hjelmeland 他が行った HS-SPME を用いてカベルネソーヴィニヨンワインの化学的プロファイルと官能プロファイルを評価した研究でも使用されています。この研究では、ノンターゲットワークフローと SIM/スキャンモードを使用したターゲット分析が行われました<sup>13</sup>。ノンターゲット化合物のデータを取り込むことで、レトロスペクティブ解析を後日行えるようになります。

バスマティやジャスミンなどの香り米には、fgr 遺伝子産物での機能喪失型突然変異により、より高濃度の 2-アセチル-1-ピロリンが含まれています<sup>14</sup>。DNA 検査でこの変異遺伝子を確認することも可能ですが、米には脂質の酸化に関与するヘキサナールなど、他にもキー

となる揮発性化合物が含まれていることがわかっています。このような揮発性化合物は、クロマトグラフィーで比較的容易に分離でき、官能特性および米への偽和物混入に関連する評価に役立てることができません<sup>15</sup>。このメソッドにヘッドスペース固相マイクロ抽出（SPME）を前処理に採用することで、サンプル前処理が簡便になることもわかっています<sup>16</sup>。



Agilent 1290 Infinity II LC/Agilent 6546 LC/Q-TOF システム

MS ベースの EMA 判定メソッドでは、再現性の高い予測モデルを作成するには、因子すべてを識別に供するのではなく、堅牢な識別に寄与する因子を検出することに重点を置く必要があります。このアプローチの適用例には、LC/Q-TOF をフルスペクトルモードで使用し、マンゴーの品種識別を評価した研究があります。堅牢な分類の行うためのクラス分類の予測モデルの作成には、新しいソフトウェアツールが使用されました。最新のソフトウェアツールを使っても、堅牢な予測モデルの開発には、相応のスキルと専門知識が必要です。とはいうものの、クラス予測モデルの構築には、それほど高い技術的スキルは不要です。ソフトウェアの自動化ツールから、フィーチャー抽出法とサンプル分類のクラス予測モデルが作成されました。このソフトウェアツールでは、開発済みの MS ベースのクラス分類の予測モデルで、データが効率よく解析できます<sup>17</sup>。

## 元素フィンガープリンティング 法による産地判別

元素フィンガープリンティングは、プロセスの品質管理、元素汚染物質の同定、微量元素プロファイルにもとづくサンプルのスペシエーションなど、さまざまなアプリケーションに適用できます。特定の原産地で生産量が限られている高付加価値の食品や飲料は、EMA の標的的です。このような商品の保護を目的とした地理的表示 (GI) の定義を明確にするため、世界貿易機関の全加盟国 164 国が知的所有権の貿易関連の側面に関する協定 (TRIPS) に合意しています。その義務は 2 つの条項が関係しており、第 22 条は、商品の原産地に関して消費者を誤解させるようなマークの使用を禁じる法律を各国が制定することを定めています。第 23 条は、商標が誤解を招くものかどうかにかかわらず、政府がワインまたは蒸留酒の GI と矛盾する商標の登録を拒否したり、その商標を無効にできるものと定めています<sup>18</sup>。

食品および飲料は、元素含有量によって原産国を特定することができます。微量元素および希土類元素の由来源は、原材料や、産地の土壌、環境、肥料、農薬などさまざまです。ワインでは、加工段階でチオール除去のために添加する  $\text{CuSO}_4$ 、鋼製発酵装置から溶出する亜鉛 (Zn) や鉄 (Fe)、蒸留装置から溶出する銅 (Cu) も関係する可能性があります。最終的な瓶詰めや保管により、ワインボトルの金属製カプセルシールから鉛 (Pb) が溶出することもあります。

食品中の微量元素の測定には、イオンクロマトグラフィー、電気化学分析、原子吸光分析などのシンプルで一般的な分析法も使用できます。電気化学的手法はシンプルで安価ですが、これが役立つのは、少数の特定金属を調べる場合だけです。原子発光分光分析計 (AES)、ICP-OES、ICP-MS など、より高価な機器では、微量元素と希土類元素を低い検出下限で同時に検出することが可能です<sup>19</sup>。

同位体比質量分析法 (IR-MS) は、安定同位体比にもとづいて産地の判別に役立つことが実証されています。この手法は、安定性の高い IR-MS に接続された元素アナライザを使用して、サンプルを水素、二酸化炭素、一酸化炭素、窒素、酸素、二酸化硫黄などの単純なガスに変換します。 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  比は主に植物の生化学反応 (生成過程)、窒素の同位体比には産地の土壌の状態 (生育環境) が反映されやすいことから、 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  や  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  のような元素の同位体比をまとめてプロットして、産地の判別に役立てることができます。窒素の同位体比は、使用された肥料の種類に大きく左右される可能性があります。大気中の窒素が結合した無機質肥料は同位体比がほぼゼロですが、有機肥料では  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  比が高くなります<sup>20</sup>。



Agilent 7900 ICP-MS システム

ICP-MS は、パワフルな元素分析ツールであり、70 種類以上の元素に対して ppb または ppt レベルの優れた検出下限を達成できます。微量元素が検出は、土壌の pH、湿度、粘土、腐植酸と複合体などのさまざまな地理的要因によって決まります<sup>21</sup>。例えば、中国雲南省産プーアール茶の品質保証試験を実施した研究では、ICP-MS で 30 品種の茶サンプル

で 29 種類の元素が 3 回繰り返し測定されました。分析結果に対して、教師あり学習を用いた多変量統計解析が行われました。正準相関分析により、2 つのベクトルが明らかになりました。第 1 ベクトルは、Na、Mg、Ca などの多量元素、Sr、Zr、Mo などの微量元素にもとづくものです。この第 1 ベクトルは茶の産地によって異なっていました。第 2 ベクトルにより、緑茶と、紅茶および黒茶が分類されました。この第 2 ベクトルは、Rb、Mn、W、Re、および Tl の濃度に依存し、紅茶および黒茶には、これらすべての元素がより高濃度で含まれていました<sup>22</sup>。

ICP-MS で起こる干渉の多くは、単原子イオンではなくイオン断面積の大きい多原子イオンによるものです。この特性 (イオン断面積大きい) を利用して不活性ガスと衝突させること (コリジョン/リアクション) で、バックグラウンド干渉を排除できます。このプロセス (衝突過程) は運動エネルギー弁別 (KED) と呼ばれ、すべてのイオンがその衝突断面積に比例した運動エネルギーを失います。このプロセスで多原子イオンに十分なエネルギーを失わせることで、多原子イオンを質量スペクトルから排除することができます。衝突に用いるコリジョンガスはヘリウムなどの不活性ガスを使用するため、副反応や新しい生成物による干渉は起こりません<sup>23</sup>。トリプル四重極 ICP-MS でも、運動エネルギー弁別が利用されます。コリジョンセルで反応性の高いガスを使用することで、単元素干渉を排除することも可能です<sup>22</sup>。最新の ICP-MS 機器では、どちらの場合も従来機よりもはるかに高い選択性と感度が得られます。



## 分光法による食品の真正性 検査

ワインおよび蒸留酒では、複数のタイプの EMA が確認されています。純正ボトルの調達、より安価な代用品での希釈、安価なアルコールや添加物による品質の偽装といったオリジナル製品に見せかけるための単純な手口もあれば、希釈した非課税の変性アルコールで作られた危険な偽造品のような悪質なものであります<sup>24</sup>。

### フーリエ変換赤外 (FTIR)、 近赤外 (NIR)、およびラマン分光法

牛乳は、偽和物混入が最も盛んに行われている食品 7 種のうちの 1 つです<sup>25</sup>。牛乳への偽和物混入には、かさ増し、タンパク質含有量値の増加、または製品の殺菌を目的に、水、乳清、水酸化ナトリウム、尿素、メラミン、および過酸化水素が使用されています。牛乳サンプルを直接測定できれば理想的ですが、水や脂肪によって一部のスペクトル信号がマスクされます。牛乳の偽和物の検出および定量に関する研究では、クロロホルム抽出による脂肪の除去の後、少量の水分を除いてからダイヤモンドプリズムによる全反射 (ATR) 測定しました。どの分光法を用いても、顕著な吸収バンドが現れました。中赤外 (MIR) では、 $1,600 \sim 1,200 \text{ cm}^{-1}$  において、対照サンプルと偽和物混入牛乳サンプルのスペクトルに大きな違いが見られました。乳清が混入された牛乳のスペクトルでは、 $1,635 \text{ cm}^{-1}$  で著しいアミド I の伸縮 (C=O)、 $1,530 \text{ cm}^{-1}$  でアミド II (N-H 変角/C-H 伸縮) が認められました。尿素、人工乳、および尿が混入されたサンプルは、 $1,615 \text{ cm}^{-1}$  で強い尿素の伸縮 (C=O)、 $1,454 \text{ cm}^{-1}$  で  $\text{NH}_4^+$  の変角を示しました。さらに、O-H 伸縮領域 ( $3,700 \sim 3,200 \text{ cm}^{-1}$ ) で強いバンド、複合フィンガープリント領域 ( $1,200 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$ ) で追加の吸収バンドが観察されました<sup>26</sup>。NIR 領域

の波数範囲は  $13,300 \sim 4,000 \text{ cm}^{-1}$  です。このエネルギー領域は電子を励起させるほど高くありませんが、分子を基底振動状態に遷移させるには十分です。NIR スペクトルは、分子の振動エネルギー準位の遷移から生じる分子振動の倍音および結合音の微弱信号にもとづきます。NIR は、その低い吸光率により MIR よりも深くサンプルに浸入できるという利点があります<sup>27</sup>。具体的には、牛乳の偽和物混入サンプルの NIR 測定では、 $7,700$  および  $5,000 \text{ cm}^{-1}$  に 2 つの顕著な吸収バンドが現れました。

MIR および NIR 機器は、どちらでも偽和物混入検査が可能ですが、MIR の方が主成分分析 (PCA) ベースのケモメトリクス解析で、より良好な分類モデルと定量結果が得られる傾向にありました<sup>26</sup>。UV-Vis および IR 手法はどちらも吸光度にもとづいているため、吸光量は絶対測定値です。これらの手法が物理パラメータと無関係ということではありません。例えば、サンプルの粒度は非常に重要です。次に示す米の真正性判定に関する議論では、粒状の米に合わせて補正するために多重散乱補正が必要でした。

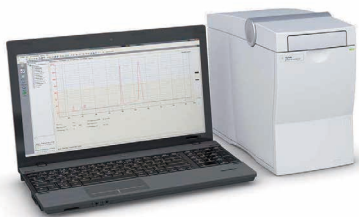
米は、世界人口の半数以上の主食です。年間約 4 億 8000 万トンの精白米が生産され、その 85 % を人が消費しています<sup>28</sup>。米は低品質の米によるかさ増しや偽和物混入が容易なため、残念ながら EMA 問題となっています<sup>29</sup>。産地判別<sup>30</sup> などの分類やサンプル品質の測定など、米を現場で評価できる測定可能な NIR 手法が開発されました。NIR を用いたこれらの研究では、正規化が NIR メソッドの品質の予測を左右する重要な要因となっています。サンプル品質の研究においては、多重散乱補正により米のサンプルクラスを識別することができましたが、トレンド (傾向変動) 除去および平均による中心化では、十分な成果が得られませんでした<sup>31</sup>。NIR による米の真正性判定の研究では、多重散乱補正が共通して使用されています<sup>32</sup>。

空間オフセット型ラマン分光法 (SORS) は、欧州の空港において手荷物検査に使用されています<sup>33</sup>。科学の進歩により、蛍光などの妨害が解決されつつあることから、この手法は EMA の阻止に有望な技術と見られています。従来のラマンシステムでは、約  $785 \text{ nm}$  のレーザーが使用されます。感度は良好ですが、蛍光による干渉を受けやすいという欠点があります。新しいラマンシステムでは、より長い波長が使用されます。Agilent Resolve ハンドヘルド検出器 SORS は、波長を  $830 \text{ nm}$  に増加させ、生成される信号レスポンスを小さくし、蛍光の干渉を大幅に抑えることで、蛍光の妨害を解決します。加えて、SORS 法では色付きのプラスチックやガラスなどの包装材による蛍光が低減します。SORS の操作には、スペクトル正規化ステップが含まれます。検出器は、まず、ゼロモードのスペクトルを収集します。これは、従来の後方散乱配置 (表面による偏光を集光) で測定するようなものです。レーザーは、オフセット測定によってスペクトルへの容器の寄与を補正する前に、自動的に位置を調整します。

Scotch Whiskey Research Institute から入手した変性剤および偽和物を添加して、実際に EMA と同程度に混入されたウイスキーとして調製された EMA サンプルで、SORS が評価されました。一般的に使用されている変性剤は、メチルエチルケトン、イソプロピルアルコール、メチルイソプロピルケトン、エチル sec-アミルケトン、メタノール、安息香酸デナトニウムの 6 種類です。これらの変性剤は、ハンドヘルド 検出器 (SORS) により ppm からサブ ppm レベルの濃度まで検出されました。香料としてウイスキーに混入される一般的な偽和物には、バニリン、スクロース、リモネン、トランス-アネトールがあります。これらの化合物は低 ppm 範囲で検出されました。すべての評価テストは、ネジ式キャップ付きの密閉ガラスバイアル越しで実施されました。この手法が実際に有用であることを実証するため、店

舗で購入したワインおよび蒸留酒に一般的な透明フリント、緑色および茶色のガラス製容器に入った追加サンプルでSORS がテストされました。濃色のガラスでは光の透過率が低下したことから、S/N を最大化するためには測定回数を増やす必要がありました。これらの条件では、メタノールについては 250 ppm まで（許容濃度 20,000 ppm または 2 % を優に下回る）、その他すべての偽和物については ppm 範囲で検出することができました。Agilent Resolve ハンドヘルド検出器 SORS は、麻薬、爆発物、および有害物質の現場用検出システムとして販売されています。上記の研究では、検出下限（LOD）を達成するため、オフライン処理メソッドが使用されました。（現状、Agilent Resolve ハンドヘルド検出器 SORS では使用できません）

## 遺伝子プロファイリングによる真正性の検査



Agilent 2100 バイオアナライザ

従来、魚類の真正性の検査では目視検査が用いられてきました。残念ながら、多くの魚類は生きた状態での視覚的な識別が難しく、加工過程でひれや鱗を取り除くと視覚的に同定できなくなります。現場での検査に抗体ベースの検査ソリューションを適用することもできますが、タンパク質は熱によって変性する性質があるため、このアプローチは調理後の肉には適用できません。もう 1 つの異なるアプローチである DNA 検査は、加工食品に対しても比較的安定しています<sup>34</sup>。遺伝子領域のゲノムプロファイルで、オーバーラップによる解釈の複雑化がおこななければ、肉とタンパク質の単純な混和物の同定に使用できます<sup>35</sup>。DNA

検査は有効な検査手段として期待されていますが、考慮しなければならない事項もいくつかあります。欠点の 1 つは、核ゲノムが大きく、そのほとんどが維持されることです。一方、ミトコンドリア DNA (mtDNA) は、変異速度が比較的速く、一方の親に由来し、核ゲノムの 100,000 分の 1 のサイズです<sup>36</sup>。当初、ミトコンドリアシトクローム b および c 領域の両方を対象とした mtDNA アプローチが開発され、やがて Barcode of Life Data System (BOLD) による DNA バーコーディングが公認されました。動物の同定には、シトクローム c オキシダーゼ (COI) 遺伝子の 684 塩基ペア領域が標準的なバーコード領域として設定され<sup>37</sup>、魚類の検査プロトコルとして標準法に採用されました<sup>38</sup>。

魚類の mtDNA 解析における進歩は、ハードウェアの進歩などによるものです。初期の実験では、ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型解析 (PCR-RFLP) 法、キャピラリーゲル電気泳動および染色によるエンドポイント検出が使われました<sup>39</sup>。このアプローチは、ゲル電気泳動ステップを lab-on-a-chip キャピラリー電気泳動システムに置き換わり、進歩しました<sup>40</sup>。

しかし、陸生植物用の Barcode of Life アプローチの開発には長い時間がかかりました。これは、植物種の遺伝的多様性が高いためです。維持された核の転写領域をターゲットとするのが確実である決着になり<sup>41</sup>、2009 年に Consortium for the Barcode of Life (CBOL) の Plant Working Group により、rbcL および matK ゲノム配列の使用が推奨されました<sup>42</sup>。この標準アプローチが正式決定されるまで、PCR-RFLP ではさまざまなマイクロサテライトマーカーが使用されていました。バスマティ米の真正性判定の概念実証プロジェクトがその一例です。この研究では、バスマティ米以外の米が 10 ~ 20 % 混入された混和物を、DNA 検査によりすばやく判定することができました<sup>43</sup>。

PCR-RFLP アプローチは標準的な認証アプローチとなっており、Barcode of Life ベースの公開データベースで照合する単一配列の生成に長けています<sup>44</sup>。この他、未知種の混合物を同定するための、次世代シーケンシング (NGS) にもとづくアプローチの開発も進められています。NGS では、細菌による DNA 断片のクローニングが不要になります。この手法はセルフフリーであり、複数のサンプルを 1 回の分析でシーケンシングできます。さらに、結果を視認するためのゲル電気泳動は必要ありません<sup>45</sup>。NGS では、DNA の断片化と処理が並行して行われるため、すり身のような複数の生物種から成る水産加工製品の同定に適しています。実験において、種特異的なユニバーサルプライマー、魚類および軟体類の属と種を分類するメタバーコーディングアプローチを使用することにより、魚類および軟体種を識別することができます。Basic Local Alignment Tool (BLAST) は、シーケンスアライメントを行うアルゴリズムを持ち、類似するシーケンス群を発見するバイオインフォマティクス専用ソフトウェアです<sup>46</sup>。

## その他の主な手法

人工電子鼻 (E ノーズ) は、化学（電流測定および導電率測定）、圧電、および光学（匂いの感知）センサを使用します。MS や GC を用いて、揮発性化合物を対象としたケムセンサーやにおい識別装置もあります<sup>47, 48</sup>。これらの E ノーズセンサのうち最も使用頻度が高いのは、電気化学センサです。センサの数および種類、その選択性および感度は E ノーズアプリケーションによって異なります。E ノーズは、高速スクリーニングが可能のため、従来の GC に代わる手法として使用できます。E ノーズを用いてさまざまな産地のエメンタルチーズの同定を行った研究結果も発表されています<sup>49</sup>。このアプローチの欠点は、クロマトグラフィーまたはスペクトルデータがなく、モニタリング対象の特定の揮発性化合物を同定できないことです。

1D および 2D 高分解能 NMR で得られた結果を多変量統計解析することにより、蜂蜜業界における食品偽装が検出されました。この手法は、糖やアミノ酸など複数のパラメータの同定および定量に役立てられました。食品の安全性を高め、品質管理を確実にするため、スクリーニングされた食品のプロファイル（分析結果）は、食品サンプルの大規模データベースによって真正性が照合されます<sup>50</sup>。

## 一般的なノンターゲット分析 ワークフロー

分光分析などクロマトグラフィー以外の手法を使用するのは、個々の化合物を同定しないときです。これらの実験では、サンプルの種類を識別するスペクトルの特徴にのみ注目します。一方、MS ベースの手法では、同定のプロトコルに従ってサンプルを取り扱います。得られる豊富なデータから、結果を既知の偽和物、官能的な劣化、疑われる汚染物質と比較できます。ノンターゲットアプローチにターゲット化合物を追加することで、より有益に洞察力が向上します。

同定が正確に行われないと、実験結果の統計的有意性が損なわれる可能性も認識しておかなければなりません。誤った同定結果は含めず、結果は同定しないままにしておくべきです。ターゲット（既知）化合物は、確実に同定できる場合のみ、実験に組み込みます。化合物をクロマトグラフィーで分離する際、安定しないリテンションタイム、不完全なピーク分離、異性体化合物や同重体化合物、未分離のピークなどは、同定の大きな問題となります。これらの問題は、アライメントの問題、ピークの誤検出（偽陽性および偽陰性）、同定エラーにつながります。これらの問題のない状況でも、データの確認がワークフローの重要なステップになります。

偽和物混入の判定に用いられる化学検査の多くは、明確な数種の特徴のみスクリーニングしています。EVOO を例にとると、サンプル品質に影響する既知の分解生成物には、クロロフィルの分解生成物であるピロフェオフィチン、かび臭の一因となる 1-オクテン-3-オールなどの化合物です。他に、発酵臭、酸敗臭、またはかび臭を有する既知化合物があります。

化学検査は、専門家パネルによる官能検査で強化することができます。この官能検査アプローチの最大の欠点は、多大な労力がかかる（高コスト）、時間がかかる（作業時間を短時間に止めないと、検査員の疲労などから微妙な特性を見極める能力が低下する）ことです。官能パネルの訓練キットと多変量統計を組み合わせることで、より低コストで効率と再現性の高めた真正性の判定アプローチを実現することができます。

## 多変量統計に影響を与える 実験での主な要因

偽和物混入検査は、希釈やマスクが起こりうる製品より、原材料で行うのが理想的です。できれば、複数の分析法を評価して目的の要件に最適な手法を選んでください。分光分析、質量分析、および NMR 分析のすべてが、特定の食品偽装検査の選択肢になります。競合する手法から選択する際は、コスト、煩雑さ、感度、および可搬性が決定の要因になります。

判別のためのクラス分類の実験は、真正なサンプルと偽和物混入のサンプルのグループ数を同程度にしてバランスを取ってください。一元配置分散分析（one-way ANOVA）実験では、分散の不均一性が前提となるため、サンプリングを均等に行わないと、統計結果に偏りが生じる可能性があります。最近の統計ソフトウェアツールは、偏りがある程度補正できますが、最初から対応して影響を最小化すべきで、データを収集後に労力を費やすより得策です。

多変量統計によるクラス分類の予測メソッドを構築し、検査で判別の予測結果を得るのは難しい作業ではありません。ただし、独立変数が多すぎるとクラス分類の予測メソッドで訓練データセットに適合しているにもかかわらず、実際のサンプルに適用できない可能性があります。この状態は、データの過剰適合（オーバーフィッティング）から起きます。このような状況に陥る失敗の低減には、二次元 PCA への単純化がクラス分類に有効かどうかを確認します。一般に、クラスの差の予測において、必要な独立変数が少ない予測モデルがより強力なモデルであり、データの過剰適合が起こりにくくなります。

データの品質はきわめて重要であり、適切なデータ解析の原理を理解して実験を計画してください。まず、ノンターゲット分析のワークフローで、サンプル前処理を最小限した状態から始めます。サンプル前処理の影響で、検出できる内容に偏りが生じてしまわないためです。ですが、必要に応じて希釈や単純な抽出を行い、マトリックス効果の影響には対処してください。良好なクラスの分類モデルでは、特徴的な要因を予測で使用します。これらの要因が決まったら、最終的な予測メソッドを構築するため、分類モデルに使われる変数（化合物など）が確実に分析できるサンプル前処理とクロマトグラフィーの条件を最適化します。

データの正規化についても、十分に考慮する必要があります。小規模なサンプルのクラス分類の予測メソッドでは、正規化させるための対照用サンプルが適用できます。このアプローチは、マトリックス効果や機器状態の影響を低減できるという利点もあります。しかし、この対照用サンプルの分析は内部標準を添加する作業以外に、対照用サンプルを毎回分析する必要があります。クラス分類の予測メソッドの運用には適していません。代わりに、評価対象の偽和物を内部標準として使用することが適しています。同様に各分析バッチの最初と最後に QC サンプルを使用して、機器性能が安定していることを確認してください。サンプルのクラス分類の予測メソッドをハイスループット化する最適化もおすすです。



サンプルのクラス分類の予測は、教師あり学習の 1 つの形態です。理想的には予測メソッドで従属変数の数を限定し、変数を 1 つにすることがおすすめです。例えば、変数となるサンプルの種類は、溶媒ブランク、対照、既知の偽和物です。牛乳であれば、偽和物として水、乳清、水酸化ナトリウム、尿素、メラミン、過酸化水素が考えられます。偽和物がこのように明らかであれば、サンプルあたり 3 回の反復実験結果のテクニカルレプリケートからクロマトグラフィーの再現性が確認できます。条件あたり 5 つのサンプルがあれば、十分な統計的有意性が得られるはずですが、各ターゲット偽和物は、サンプルスペクトル上に現れるそれぞれの特徴的な吸収周波数から識別できることもあります。ハンドヘルド FTIR を使用した分光アプローチで、現場で偽和物混入を突き止めることができ、検査ラボでの検査が不要になります。

しかし、頻発する EVOO の判別ミスからもわかるように、一部の代用品（偽和物）は捉えにくく、それを暴くのは容易ではありません。このようなケースでは、この偽装を検出するためのクロマトグラフィーとクラス分類の予測ワークフローが必要になります。メソッドの適用範囲は、初めに決めておきます。例えば、特に保管状態の悪い EVOO では、発酵臭、かび臭、酸敗臭、酢のような酸味すべてが問題になる可能性があり、格下のオリーブ油に分類される原因となります。これらの 4 つの品質劣化は特徴がはっきりしていますが、その他にも EVOO の分類ミスにつながるフェノタイプ（表現型）要因が多くあります。一般的な香りの特性が同定できる十分な堅牢性を備えたメソッド作成する必要があるでしょうか。何種類のオリーブ品種を訓練セットに含めばよいでしょうか。

訓練データがフェノタイプの違いやターゲット特性の多様性までカバーできているかどうか、微妙な違いでクラス分類の予測ができるか確認が大切です。サンプル数は統計的検出力において、どう影響するでしょうか。サンプルの最小必要数は、事後分析によりパイロット実験の統計的検出力の分析から判断できます<sup>51</sup>。質量分析法を利用する際は、特にクロマトグラフィーの再現性が重要になります。クロマトグラフィーのドリフト（保持時間ずれ）補正の機能をもつソフトウェアもありますが、分析中にリテンションタイムがドリフトしている場合は、ピークアライメントを行っても、ほぼ重なったピークとして現れる構造異性体を正しく同定できない場合があります。クロマトグラフィーの問題は、事後より事前に回避しておく方が得策です。分析に供するサンプル順に起因する影響がないようにするため、ランダムな順序でサンプルを分析してください。例えば、マトリックス干渉により、信号の抑制や増大が起きることがあります。大抵、この現象はバッチを通して徐々に起こります。

データ採取後、結果を偏らせる可能性のあるクロマトグラムやスペクトルで外れ値がないことを確認してください。この作業は、データを目視で確認するシンプルなアプローチでも行えます。問題がバッチに因るクロマトグラフィーの影響であると考えられる場合には、配置と軸の正規化で補正できる場合もあります。バッチ効果補正アルゴリズム ComBat はオンラインで入手可能で、さまざまな多変量統計パッケージに組み込まれています<sup>52</sup>。良好なバッチであることを確認するため、PCA クラスタリングやグループ内相関を調べて、不良サンプルの検出を行ったり、箱ひげ図（Box-and-whisker plot）で正規分布になっているか確認します。値が平均値から標準偏差の何倍分離れているかを示すマハラノビス距離を求めることで、より体系的に処理することができます<sup>53</sup>。

もう 1 つの便利なアプローチは、分光分析ベースのクラス分類の予測メソッドを開発する際に、再帰的なワークフローでデータ処理することです。このアプローチは、分析データの偽陰性および偽陽性の問題に有用です。クロマトグラフィーのドリフト（保持時間ずれ）や機器のレスポンスの変動を解決するように最適化されたフィーチャー抽出およびデータアライメントプロトコルもいくつかあります。これらのツールでは、フィーチャー抽出時にアライメントを実行し、クロマトグラフィーに由来するサンプルのばらつきを解決できます。データが大量なため、マニュアルでは結果の確認することが難しく、再帰的なワークフローを使用できない場合は、統計ソフトウェアで欠落した値をゼロではなく欠落として処理することを検討してください。どんな多変量統計パッケージでも、この処理はデータインポート機能として実行できるはずですが、使用可能なすべてのデータを追跡（トラック）することを最後におすすめします。データの解釈を複雑にしている交絡因子を突き止めることが必要なこともあります。Warwick Dunn らの参考文献では、分光分析の実験計画と品質管理について非常に詳しく論じられています<sup>54</sup>。

## 多変量統計、有意性検定と確認

多変量統計は、食品偽装の同定においてきわめて重要な役割を果たすことができます。産地の真正性、食品の品質評価、または偽和物混入に対して言えることです。査定する EMA の種類にかかわらず、適格と不適格の基準となる特性（およびその原因となる化合物）の決定には、サンプルデータ（不適格）とリファレンスサンプルデータ（適格）の両方を抽出する必要があります。この作業は多くの場合、不適格サンプルとリファレンスサンプルの違いを手作業で骨が折れる調査として行われてい



ました。不適格サンプルを調べることにより、新たな特性が明らかになると、ターゲットリストの化合物としてライブラリに追加されました。こういった作業によって作り上げられたのが、既知の分解生成物まで検出する検査と官能評価の組み合わせであり、現在、多くのラボで行われている姿です。化学的検査も官能検査も、それだけでは理想的とは言えません。

Agilent Profinder ソフトウェアは、質量およびリテンションタイムのアライメントの両方が行えます。データを Profinder アーカイブファイルとしてインポートすれば、リテンションタイムと質量の中央値がインポートできるため、Agilent Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアではリテンションタイムをアライメントするステップが省略できます。MPP ソフトウェアには、CEF ファイルをインポートできる質量アライメントオプションがまだ残っています。CEF ファイルを使用する場合は、Profinder と MPP では質量の定義がわずかに異なるため、この差異の対応として MPP で質量のアライメントウィンドウを大きく設定することをおすすめします。アジレント製品以外からデータファイルをインポートする場合は、ファイルをテキストファイルとしてインポートし、ターゲットワークフローを使用する必要があります。

独立変数が 1 つの場合は、フィーチャー抽出および単純なペアワイズ処理できるケモメトリックス解析のオンライン統計ツールがあります<sup>55, 56</sup>。独立変数が複数ある場合でも適用できる統計ツールもあり、データクラスターリング、クラス分類の予測、マルチオミクス解析、パスウェイ解析など高度な解析ができます。複雑なデータセットの差分解析や視覚化が行えます。MPP や IBM 社の SPSS、Waters 社の Progenesis Q1 などのツールも利用可能です。多くのユーザーが、ノンターゲット分析やサンプルのプロファイリングに関心を持っていますが、高度な統計パッケージの使用法の習得には消極的です。こういった背景を踏ま

え、アジレントの MPP ソフトウェアは、使い易く、かつ、機器性能も最大限に活かせるよう作られています。前述の通り、堅牢な予測メソッドの開発には、科学的スキルと分析の専門知識が必要です。しかし、クラス分類の予測モデルを実行するのは、それほど面倒ではありません。Classifier ソフトウェアは、LC/Q-TOF での分類モデルの分析を自動化するために開発されたソフトウェアです。

得られた結果の統計的検出力について、単独で検証することが重要です。実験結果の統計的検出力を評価するためのスタンドアロン型の検出力分析プログラムがあります<sup>51</sup>。事後分析では、検査したサンプルサイズを指定して、結果の検出力を計算します。ここで言う検出力は、特定の対立仮説が真の場合に帰無仮説が却下される確率を指します。

## クラス分類の予測/ クラシファイア (classifier)

多変量統計では、まずサンプルのクラス分類をもとに、クラスを最も確に識別する成分(エンティティまたはフィーチャー)を分析します。その後、これらの予測成分を使用して、サンプルのクラス分類の予測 (SCP) モデルを作成します。この説明から、サンプルのクラス分類の予測の別名が教師あり学習であることがわかりになるでしょう。

エンティティリストがあればクラスを分類できるように思われますが、有効な SCP モデルを作成することはできません。モデルで訓練データのランダム誤差を説明できても、サンプルで基本的な関係を説明できない状況はデータの過剰適合と呼ばれます<sup>57</sup>。

作成する SCP モデルの予測精度を最大限まで高めるには、高いデータ品質が不可欠です。データの品質が高ければ、サンプルに適したフィルタリングおよび精度の高い予測モデルが構築できます。SCP でサンプルデータのフィ

ルタリングが適切に行われていれば最善の結果が得られます。多変量統計に関する項の説明通り、Profinder は再帰的なデータ抽出によって、ユーザーが評価しなければならない偽陰性および偽陽性の数を低減できるように設計されています。このツールは、スキャンおよびフルスペクトルの質量スペクトルデータで使用できます。アジレントには、4300 ハンドヘルド FTIR や 8700 LDIR ケミカルイメージングシステムなどの機器もあり、IR データを視覚化および解析ができます。MicroLab Expert ソフトウェアでは、ケモメトリックスおよび予測モジュールも提供しています(オプション)。

各予測モデルは、その特性により適用できる状況がそれぞれ異なるため、複数の予測モデルを組み合わせた評価とカスタマイズが可能です。

- **部分的最小二乗判別**は、ベクトル解析を実行して、クラス間の差を説明するモデルを開発します。外れ値は結果に重大な影響を与え、このモデルが失敗する原因になります。データ品質が一貫した状況であれば、良好に機能して単純なモデルでクラスを識別できます。
- **サポートベクターマシン (教師あり学習を用いるパターン認識モデルの一つ)**は、オーバーラップしているサンプルクラスに対しても使用できます。このアルゴリズムでは、各サンプルが二次元または三次元空間にある点であると見なされます。クラスを隔てる平面が複数存在するときに、このアルゴリズムのクラス分類能力が最大に発揮されます。
- **単純ベイズ推定**では、クラスが互いに独立しているものと仮定されます(いわゆる、クラスは条件付き独立)。このアルゴリズムでは、各クラス内の分散のみ決定されるため、小規模なエンティティセットに対して有効です。

- **決定木**では、すべて、またはほぼすべてのサンプルにエンティティが存在するケースに良好に機能します。一連の if-then-else の選択（条件 if で、真 true で実行するプロセス then と偽 false で実行するプロセス else のフロー制御）を通してクラスを分類します。
- **ニューラルネットワーク**では、クラス間に複雑な（または未知の）関係がある場合の分類に適しています。データ内に複数のクラスが存在しているケースに最適です。

一般に、作成後のモデルを評価するためのアプローチが2つあります。その1つは Leave-one-out 交差検証（1個抜き交差検証）です。このアプローチでは、訓練セットから1つのクラスのデータファイルを除外し、そのファイルを後から予測モデルで分類します。このプロセスをすべてのクラスのファイルについて繰り返すことで、モデルへの訓練データの適応性を示す混同行列を生成します。もう1つは n 重交差確認です。このアプローチでは、訓練データを n 個のグループにランダムに割り当てます。1つを除くすべてのグループをモデルの訓練に使用し、最後のグループはモデルの評価に使用します。このプロセスを n 回繰り返すことにより、混同行列を生成します。一般に、n 値は 3 にすれば十分です。モデルの作成、訓練、および評価が完了したら、既知のサンプルを使用して、それが訓練データとはまったく無関係であることを予測できるかどうかを検証する必要があります。

このように、多数のステップが必要になるため、多変量統計の経験がまったくないユーザーにとって、プロセス全体がかなり複雑に見えるでしょう。そういった方には、教師あり学習モデルを開発するためのフィーチャー抽出、有意性検定、モデル作成、および評価を1つのプロセスに統合したガイド付きワークフローオプションとツールがあります<sup>17</sup>。

サンプル前処理製品、分析機器、ソフトウェア、ワークフロー、およびサポートをすべてカバーした包括的なソリューションをお客様に提供することが、アジレントのゴールです。このガイドは、食品偽装と闘うための一般的な手法の評価に役立てていただくことを目的としています。Agilent Resolve ラマンシステムや 4300 ハンドヘルド FTIR などの可搬型機器による現場で実施可能な分光分析アプローチについて取り上げました。Agilent 2100 バイオアナライザシステムを DNA が分解されている加工サンプルも含めた魚類を正確に同定するためのラボ用ゲノム検査機器として紹介しました。マトリックス耐性に優れた 7900 ICP-MS や経済的な 5110 ICP-OES などの機器による微量元素分析にもとづく産地の同定が容易に行えることを示しました。

アジレントには、ユニット分解能および高分解能（精密質量）MS ベースの食品分類に最適なソリューションがあります。Agilent 8890 GC と Agilent 5977B シングル四重極 MS を組み合わせた GC/MSD は、結果をスペクトルライブラリで照合し、揮発性および半揮発性の偽和物を同定することができます。Agilent 6546 LC/QTOF は、水溶性汚染物質の分析に適した研究用の高分解能精密質量機器です。アジレントの食品偽装に対応する分析・解析ワークフローソリューションには、四重極および飛行時間型機器で得られた質量分析データの再帰的な処理やレトロスペクティブな分析が可能な MassHunter Profinder ソフトウェアが含まれています。一般的な食品偽和物およびアレルゲンが検索できる精密質量およびユニットマスマスライブラリもあります（PCDL）。アジレントは、ユーザーが求めるサンプルのクラス分類の予測モデルを構築、サンプル品質などの特性（判別など）を予測できる Mass Profiler Professional や使いやすい MassHunter Classifier など機器の性能を最大限に活かす統計ツールを提供しています。

## 参考文献

1. Barboza, D.; Barrionuevo, A. Filler in Animal Feed Is Open Secret in China. *The New York Times* 30 April **2007**.
2. Litzau, J. J.; Mercer, G. E.; Mulligan, K. J. GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide, and Cyanuric Acid. v. 2.1, *FDA Center for Veterinary Medicine*, original posting May 5, **2007**.
3. Bhalla, V.; et al. Melamine Nephrotoxicity: an Emerging Epidemic in an Era of Globalization *Kidney International* **2009**, 75, 774–779.
4. GC-MS Screen for the Presence of Melamine, Ammeline, Ammelide, and Cyanuric Acid. *U.S. Food and Drug Administration*, LIB No. 4423, vol. 4, October **2008**.
5. FDA Notice of Public Meeting on Economically Motivated Adulteration. *74 Fed. Reg.* 15,497 (April 6, **2009**).
6. Frankel, E. N.; et al. Tests Indicate That Imported “Extra Virgin” Olive Oil Often Fails International and USDA Standards. *UC Davis Olive Center*, July **2010**.
7. Cord, C. 80 Percent is the New 69 Percent. *Olive Oil Times* Nov. 30, **2016**.
8. Ayton, J.; Mailer, R. J.; Graham, K. The Effect of Storage Conditions on Extra Virgin Olive Oil Quality. *RIRDC* April **2012**, 12/024.
9. Morales, M. T.; Luna, G.; Aparicio, R. S. Comparative Study of Virgin Olive Oil Sensory Defects. *Food Chem* **2005**, 91(2), 293–301.
10. Stein, S. E.; Scott, D. R. Optimization and Testing of Mass Spectral Library Search Algorithms for Compound Identification. *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, 5(9), 859–866.

11. Taro, Q.; *et al.* New Investigator Tools for Finding Unique and Common Components in Multiple Samples with Comprehensive Two-Dimensional Chromatography. *Chromatography Today* **2018**, 13–18.
12. Smith, C. A.; *et al.* XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* **2006**, 78(3), 779–782.
13. Hjelmeland, A. K.; *et al.* Characterizing the Chemical and Sensory Profiles of United States Cabernet Sauvignon Wines and Blends. *Am. J. Enol. Vitic.* **2013**, 64(2), 169–179.
14. Bradbury, L. M.T.; *et al.* The Gene for Fragrance in Rice. *Plant Biotechnol. J.* **2005**, 3, 363–370.
15. Bergman, C. J.; *et al.* Rapid Gas Chromatograph Technique for Quantifying 2-Acetyl-1-Pyrroline and Hexanal in Rice (*Oryza sativa*, L). *Cereal Chem.* **2000**, 77(4), 454–458.
16. Grimm, C. C.; *et al.* Screening for 2-Acetyl-1-Pyrroline in the Headspace of Rice using SPME/GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 245–249.
17. Yannell, K. E.; Cuthbertson, D. Food Authenticity Testing with the Agilent 6546 LC/Q-TOF and MassHunter Classifier. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0694EN, March **2019**.
18. WTO Analytical Index, *TRIPS Agreement Articles* **2018** 22, 23.
19. Ibanez, J. G.; *et al.* Metals in Alcohol Beverages: A Review of Sources, Effects, Concentrations, Removal, Speciation, and Analysis. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, 21, 672–683.
20. Förstel, H. The Natural Fingerprint of Stable Isotopes – Use of IRMS to Test Food Authenticity. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, 541–544.
21. Drivelos, S. A.; Georgiou, C. A. MultiElement and MultiIsotope-Ratio Analysis to Determine the Geographic Origin of Foods in the European Union. *Trends Anal. Chem.* **2012**, 40, 38–51.
22. Nelson, J.; Hopfer, H. Authentication of Specialty Teas: An Application Note. *Food Qual. Saf.* **2019**, December/January, 32–33.
23. Woods, G. Measurement of Trace Elements in Malt Spirit Beverages (Whisky) by 7500cx ICP-MS. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-7214EN, August **2007**.
24. Ellis, D. I.; *et al.* Through-Container, Extremely Low Concentration Detection of Multiple Chemical Markers of Counterfeit Alcohol Using a Handheld SORS Device. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 12082.
25. Moore, J. C.; Spink, J.; Lipp, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* **2012**, 77(4), R118–R126.
26. Santos, P. M.; Pereira-Filho, E. R.; Rodriguez-Saona, L. E. Application of Hand-Held and Portable Infrared Spectrometers in Bovine Milk Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61, 1205–1211.
27. Pasquini, C. New Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14(2), 198–219.
28. Muthayya, S.; *et al.* An Overview of Global Rice Production, Supply, Trade, and Consumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2014**, 1324, 7–14.
29. Vemireddy, L. R.; *et al.* Review of Methods for the Detection and Quantification of Adulteration of Rice: Basmati as a Case Study. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, 52(6), 3187–3202.
30. Kim, S. S.; *et al.* Authentication of Rice Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Cereal Chem.* **2003**, 80(3), 346–349.
31. Teye, E.; *et al.* Innovative and Rapid Analysis for Rice Authenticity Using Hand-Held NIR Spectrometry and Chemometrics. *Spectrochim. Acta A* **2019**, 217, 147–154.
32. Yu, Y.; *et al.* Accuracy and Stability Improvement in Detecting Wuchang Rice Adulteration by Piece-Wise Multiplicative Scatter Correction in the Hyperspectral Imaging System. *Anal. Methods* **2018**, 10, 3224–3231.
33. Izake, E. L. Forensics and Homeland Security Applications of Modern Portable Raman Spectroscopy. *Forensic Sci. Int.* **2010**, 202(1-3), 1–8.
34. Dooley, J.; *et al.* Improved Fish Species Identification by the Use of Lab-on-a-Chip Technology. *Food Control* **2005**, 16, 601–607.
35. Dooley, J. J.; *et al.* Fish Species Identification Using PCR-RFLP Analysis and Lab-on-Chip Capillary Electrophoresis: Application to Detect White Fish Species in Food Products and an Interlaboratory Study. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 3348–3357.
36. Hebert, P. D.; *et al.* Biological Identifications Through DNA Barcodes. *Proc. Biol. Sci.* **2003**, 270(1512), 313–21.
37. Ratnasingham, S.; Hebert, P. D. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Mol. Ecol. Notes* **2007**, 7, 355–364.

38. Handy, S. M.; *et al.* Evaluation of the Agilent Technologies Bioanalyzer-Based DNA Fish Identification Solution. *Food Control* **2017**, *73*, 627–633.
39. Cespedes, A.; *et al.* Identification of Flatfish Species Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification and Restriction Analysis of the Cytochrome b Gene. *J. Food.Sci.* **1998**, *63*, 206–209.
40. Dooley, J. J.; *et al.* Improved Fish Species Identification by the Use of Lab-on-a-Chip Technology. *Food Control* **2005**, *16*, 601–607.
41. Wattoo, J. I.; *et al.* DNA Barcoding: Amplification and Sequence Analysis of rbcL and matK Genome Regions in Three Divergent Plant Species. *Adv. Life Sci.* **2016**, *4(1)*, 3–7.
42. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *PNAS* **2009**, *106(31)*, 12794–12797.
43. Garrett, S.; Clarke, M. Use of the Agilent 2100 Bioanalyzer for Basmati Rice Authenticity Testing. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-6836EN, **2007**.
44. Wong, E. H.; Hanner, R. H. DNA Barcoding Detects Market Substitution in North American Seafood. *Food Res. Int.* **2008**, *41(8)*, 828–837.
45. Xing, R-R; *et al.* Application of Next Generation Sequencing for Species Identification in Meat and Poultry Products: A DNA Metabarcoding Approach. *Food Control* **2019**, *101*, 173–179.
46. Giusta, A.; *et al.* Seafood Identification in Multispecies Products: Assessment of 16SrRNA, cytb, and COI Universal Primers' Efficiency as a Preliminary Analytical Step for Setting Up Metabarcoding Next-Generation Sequencing Techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65(13)*, 2902–2912.
47. Dymerski, T.; Chmiel, T.; Wardencki, W. Invited Review Article: An Odor-Sensing System—Powerful Technique for Foodstuff Studies. *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, *82*, 111101–111132.
48. Śliwińska, M.; *et al.* Food Analysis Using Artificial Senses. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1423–1448.
49. Pillonel, L.; *et al.* Analytical Methods for the Determination of the Geographic Origin of Emmental Cheese: Volatile Compounds by GC/MS-FID and Electronic Nose. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *216*, 179–183.
50. Bertelli, D.; *et al.* Detection of Honey Adulteration by Sugar Syrups Using One-Dimensional and Two-Dimensional High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8495–8501.
51. Faul, F.; *et al.* Statistical power analyses using G\*Power 3.1: Tests for Correlation and Regression Analyses. *Behav. Res. Methods* **2009**, *41(4)*, 1149–1160.
52. Johnson, W. E.; Li, C. Adjusting Batch Effects in Microarray Expression Data Using Empirical Bayes Methods. *Biostatistics* **2007**, *8:1*, 118–127.
53. Schultz-Trieglaff, O.; *et al.* Statistical Quality Assessment and Outlier Detection for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Experiments. *BioData Mining* **2009**, *2:4*.
54. Dunn, W.; *et al.* The Importance of Experimental Design and QC Samples in Large-Scale and MS-Driven Untargeted Metabolomic Studies of Humans. *Bioanalysis* **2012**, *4:18*, 2249–2264.
55. Tautenhahn, R.; *et al.* XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. *Anal. Chem.* **2012**, *84(11)*, 5035–5039.
56. Styczynski, M. P.; *et al.* Systematic Identification of Conserved Metabolites in GC/MS Data for Metabolomics and Biomarker Discovery. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 966–973.
57. Smilde, A. K.; *et al.* Metabolomics in Practice: Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data. M. Lämmerhofer; W. Weckwerth, Eds. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag & Co., 2013, p. 266.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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, July 15, 2019  
5994-1076JAJP