

Agilent RapidFire Analyzer ソフトウェアと Agilent RapidFire Integrator ソフトウェアの RapidFire データ処理の比較

著者

Peter T. Rye
Agilent Technologies, Inc.
Lexington, MA USA

Patrick Bingham
Pfizer, Inc.
La Jolla, CA USA

はじめに

Agilent RapidFire Analyzer ソフトウェア (Analyzer) と Agilent RapidFire Integrator ソフトウェア (Integrator) は、Agilent RapidFire ハイスループット質量分析システムを用いてマルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードで取得した半定量 RF/MS/MS データの積分とレポートが可能な別個のデータ解析プログラムです。Integrator はデータの積分とレポート作成の基本要素を提供します。一方、Analyzer はこれらの機能を高速化・拡張し、より高速で信頼性が高く、より情報量の多いワークフローを使用したデータ処理を可能にします。この技術概要では、トリプル四重極 (TQ) 質量分析計を備えた RapidFire システムで取得されたデータの処理において Analyzer がいかに優れているかについて説明します。

この技術概要は、Integrator の基礎を理解していることと、すでに技術概要 Agilent RapidFire Analyzer ソフトウェア (資料番号 5991-9005EN) を読んでいることを前提としています。

Analyzer ソフトウェアの 積分は高速かつ自動

データのバッチを開くと、Analyzer はバッチ内のすべての注入を自動的に解析し、プリセットメソッドに従って、注入ごとに各 MRM クロマトグラムを積分します。対照的に、Integrator では、各シーケンスに対してピークを手動で選択して定義する必要があります。したがって、バッチ内のシーケンスの数が増えるにつれて、Integrator よりも Analyzer による時間節約がより顕著になります。

速度を比較するために、8 シーケンスのバッチ（1 就業日の作業として 8×384 ウェルプレート进行分析したことを想定）を開いて積分するのにかかる平均時間を、各プログラムを 3 回使用して計算しグラフ化しました（図 1）。Analyzer の場合、このデータのバッチを開いて積分する作業が、経験豊富なユーザーが Integrator を用いる場合と比較して 49 倍高速化されました。

Analyzer の能力を示すために、66 シーケンスにわたる 24,224 回の注入を含むデータのバッチを、個人用ラップトップコンピュータで複数回処理しました。データ積分プロセスは平均して 102 ± 2 秒で完了しました。この処理速度は、1 秒あたり 470 を超える AUC 値（注入回数 \times 注入あたり 2 回の取得 MRM）に相当します。

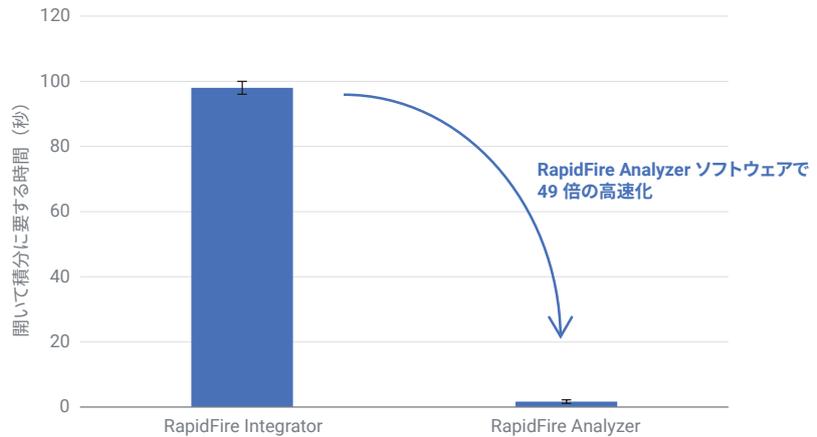


図 1. Integrator および Analyzer ソフトウェアを使用してデータを開いて積分するのにかかる時間の実証比較。8 シーケンスのバッチ（一般的な 8 時間勤務中に実行される 8×384 ウェルプレートを想定）について各プログラムを 3 回使用して開いて積分し、その平均時間をグラフ化しました。RapidFire Analyzer により、時間が 1/49 に短縮されました。

Analyzer はミスのない 実験結果を提供

Analyzer は、各アッセイに合わせて微調整が可能なプリセットメソッドに従って各 MRM クロマトグラムを積分します（詳細は以下で説明します）。その結果、Integrator とは異なり、積分処理中にユーザーの介入は必要ありません。この人手を介さない処理により、ユーザーごと、また機会ごとのピーク定義のばらつきがなくなります。Analyzer はまた、注入時間を相互に解析し、ピークの誤った割り当てを防ぎます。

Analyzer の精度を実証するために、合計 682 回の注入を含む 8 つのシーケンスを 2 回解析しました。1 回目の処理実行からの実験結果を、2 回目の処理実行からの実験結果と比較してプロットしました（図 2）。処理実行では、 $R^2 = 1$ の単一直線で示されるように、各注入に対して同一の値が生成されました。さらに 8 回の解析を実施しましたが、そのたびに同一の結果が得られました（データは示していません）。

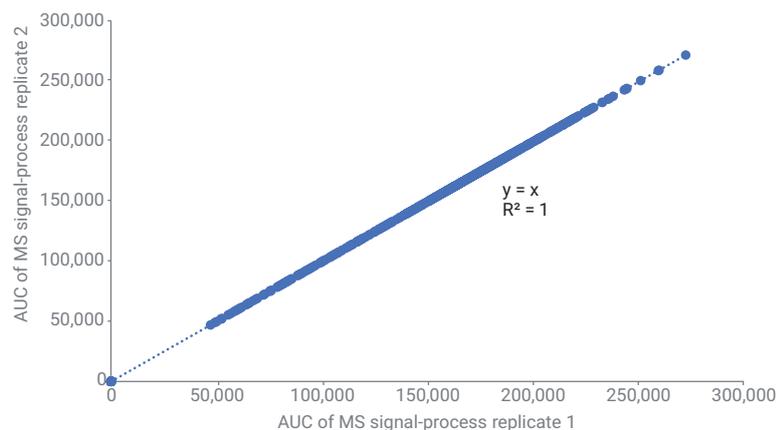


図 2. Analyzer で 2 回処理した単一データバッチから得られた実験データの相関プロット。2 回の処理実行で同一の結果が生成される結果となりました。

Analyzer はカスタマイズ可能

Analyzer のデフォルトの積分パラメータでも適切に機能しますが、ソフトウェアで積分メソッドをカスタマイズできます (図 3)。Analyzer では、ピークベースライン、テーリング、またはスプリット異常が観察される状況を制御できます。独自の積分メソッドを保存し、単一のシーケンス、単一のプレート、あるいはバッチ全体のピークに適用できます。Integrator ではピークの開始時間と終了時間を定義できますが、これらの設定はユーザーが手動で行うため、(ユーザーごと、機会ごとの) ばらつきが避けられません。

Analyzer を使用してカスタム計算テンプレートを実験結果に適用すれば、データ確認を簡素化できます (図 4)。一般的なユーザー定義の計算は、1 つの分析対象物の信号を対応する内部標準で正規化すること、生成物の信号をパーセント変換として表現することの 2 つです。ユーザーは、各計算の下限と上限を設定できます。いずれかの注入の計算値が定義された上下限值から外れた場合、その注入はユーザーレビューのためにフラグが付けられます (図 5)。計算エディタを使用すれば、個々の MRM の積分値の下限と上限を定義できます。ここでの定義により、S/N 比または信号飽和がデータ解釈に影響を及ぼす可能性がある注入の識別が容易になります。Integrator は計算や上下限值、フラグ設定をサポートしていません。

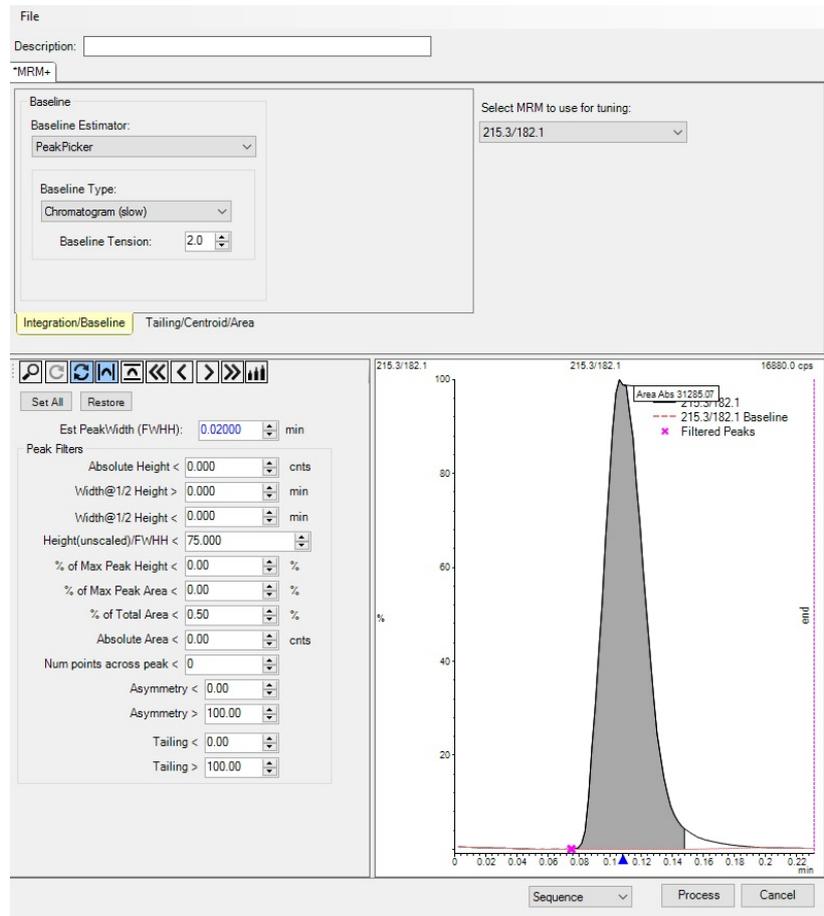


図 3. 積分メソッドエディタでは、標準のピークベースライン、ピークテーリング、およびピークフィルタリングパラメータを調整できます。設定は必要に応じて、単一シーケンス、単一プレート、またはデータのバッチ全体に適用できます。

Column Name	Equation	Low Limit	High Limit
MRM1 345.1/206.0	MRM1	150000	=
MRM2 342.0/203.0	MRM2	=	200000
MRM3 331.1/283.0	MRM3	=	=
MRM4 328.1/283.0	MRM4	=	=
MRM5 318.0/237.1	MRM5	150000	=
MRM6 312.0/231.1	MRM6	=	450000
MRM7 261.1/184.0	MRM7	=	=
MRM8 261.1/201.1	MRM8	=	=
MRM9 258.1/201.1	MRM9	=	=
MRM10 256.1/184.0	MRM10	=	=
MRM11 219.3/186.1	MRM11	=	=
MRM12 215.3/182.1	MRM12	=	=
normalized to I.S.	MRM2/MRM1	0.5	5
percent conversion	MRM3*100/(MRM3+MRM4)	=	15

図 4. 計算エディタを使用すると、ユーザー定義の計算を実験結果に適用できます。個々の MRM または計算値に対して、下限または上限を設定できます。いずれかの注入の計算値が定義された上下限值から外れた場合、その注入はユーザーレビューのためにフラグが付けられます。

Analyzer で予備的なデータ確認が容易に

データのバッチを開くと、データ品質の概要を伝えるソフトウェア機能がいくつかあります (図 5)。

- まず、ウェルウィンドウで、計算値がユーザー定義の範囲外である注入にフラグ (赤色) が付けられます。シーケンスウィンドウで、計算値、計算上下限值、および上下限值に達しなかった場合や上下限値を超えなかった場合のメッセージが表示され、この情報が拡張されます。

- 次に、ウェルウィンドウで、sip センサーが分析中にサンプル収集を確認しなかった注入がフラグ付け (赤色) されます。それに応じて、シーケンスウィンドウの sip フィールドに、これらの注入に対してエラーが表示されます。
- 3 番目に、シーケンスウィンドウで、各注入のデータを行ごとに表示することにより、処理された結果を、信号のトレンド、コントロール、外れ値について手で迅速に評価できます。
- 4 番目に、選択した注入の積分された MRM ピークがクロマトグラムウィンドウに表示されます：(a) 実際のピーク形状

の確認が容易となり、(b) MRM または注入間の積分結果の比較が可能になり、(c) 積分メソッドの正確さと精度が示されます。

これらの指標により、人による注意が必要な注入を素早く識別し、データ品質の大まかな情報が迅速に得られます。これに対して Integrator は、注入にフラグを付けたり、特定の注入の表示をコントロールしたり、積分結果を表示したりすることはありません。この比較から、結果の予備的な検査は Analyzer の方がユーザーフレンドリーであることがわかります。

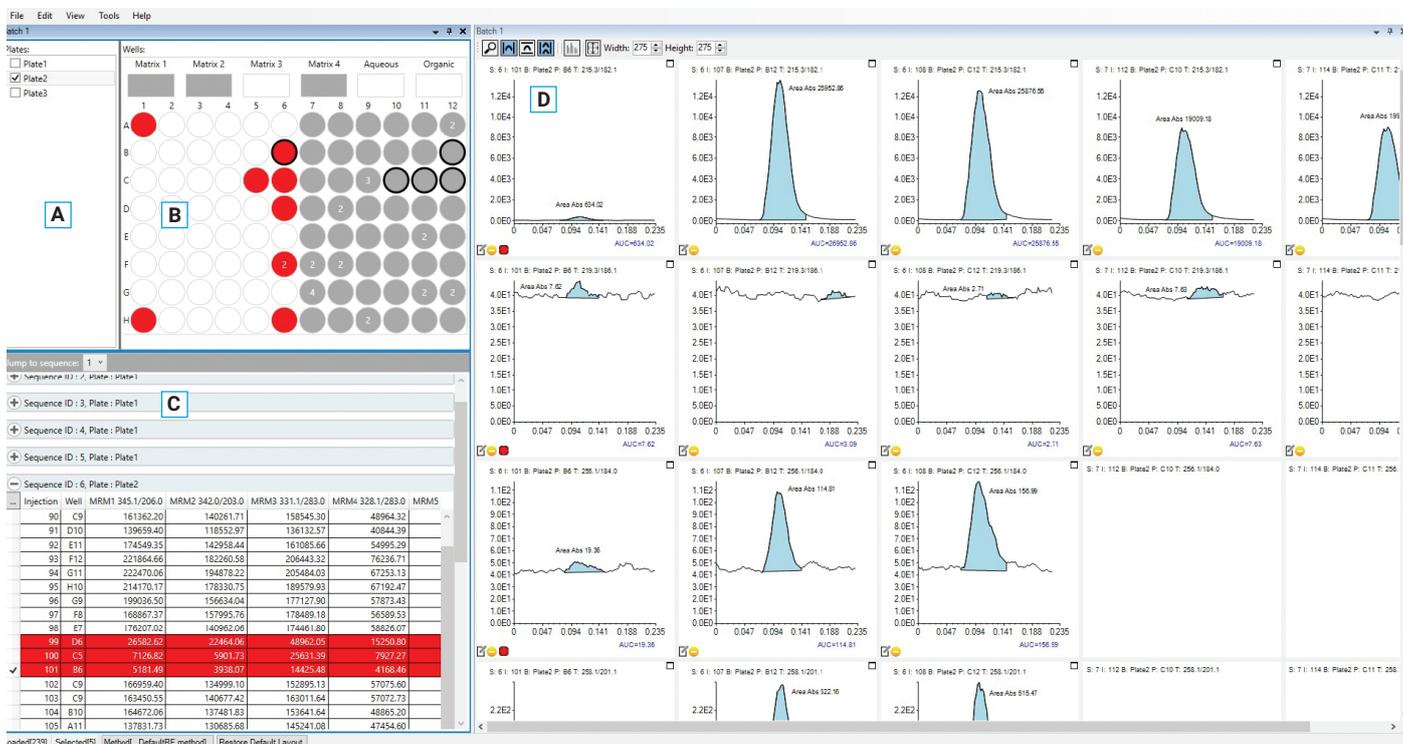


図 5. Analyzer には、データを選択して確認するための 4 つのウィンドウがあります。プレートウィンドウ (左上、A)、ウェルウィンドウ (左上、B)、およびシーケンスウィンドウ (左下、C) では、クロマトグラムウィンドウ (画面の右側、D) で表示したい MRM ピークを選択できます。このスクリーンショットは、フラグ付けによって検査が必要な注入の識別が簡単にできるかを強調するために、意図的に負荷をかけたデータから取得されたものです。

Analyzer は優れたレポートオプションを提供

Analyzer と Integrator の両方によって生成されるデータレポートには、ウェル、洗浄、およびマトリックスステーションからの実験結果が含まれます。ただし、Analyzer からのレポートには、計算データ、取得情報、メタデータも含めることができ、これらは解析前にユーザーがオプションでインポートできます。取得情報の例としては、取り込み時間、機器名、カートリッジの種類、カートリッジ注入回数、メソッド名、MS メソッド名などがあります。メタデータの例には、サンプル名、グループ、濃度などの注入固有の情報が含まれます。これらのオプションにより、Analyzer からのデータレポートの全体的な品質と有用性が向上しています。

Analyzer は Integrator とよく関連するデータを提供

ソフトウェアプラットフォーム間のデータの相関は、特にプロジェクトの途中で Analyzer の導入を検討しているラボにとって極めて重要です。Integrator と Analyzer からのデータ出力間の相関を調べたところ、結果は並外れたものでした。26 種類の化合物およびコントロールの 22 のデータポイント阻害曲線のサンプルを RapidFire-TQ で分析し、結果のデータを Analyzer と Integrator で個別に処理しました。AUC 値は Prism ソフトウェアを使用してグラフ化し、IC₅₀ 値を生成しました (図 6)。Analyzer からの出力の IC₅₀ 値 (X 軸) を Integrator の出力値 (Y 軸) に対してプロットすると、グラフはソフトウェア出力間でほぼ完全な相関 ($R^2 = 0.9993$) があることを示しました。観察された小さな偏差は、Integrator

ワークフロー内の人為的エラー (具体的には、ピークの開始時間と終了時間の定義) によるものと考えられます。このプロセスの反復によって精度にばらつきが生じるためです。逆に、上で示したように、Analyzer の処理を複数回繰り返しても、同じ IC₅₀ 結果が得られました。

まとめると、Analyzer は、時間の節約、精度、予備データのレビュー、レポートオプションなど、RapidFire-TQ データの処理において Integrator よりも多くの利点があります (表 1)。

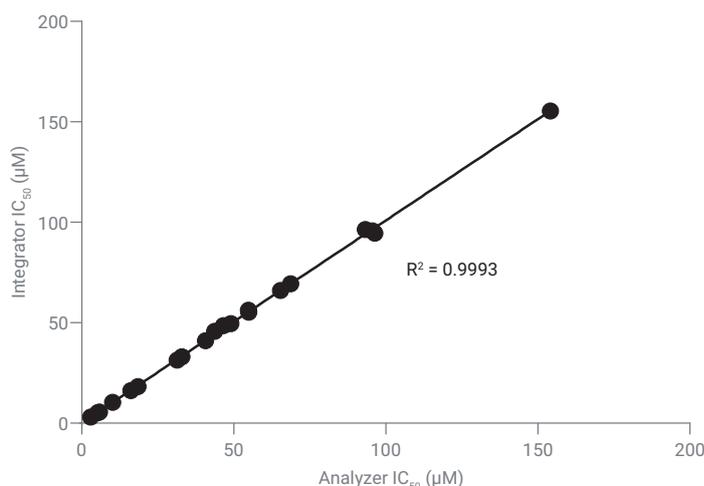


図 6. Integrator および Analyzer ソフトウェアで処理された IC₅₀ データの相関

表 1. Integrator ソフトウェアと Analyzer ソフトウェアの機能の比較

	Integrator	Analyzer
使いやすさ	○	○
大量のデータバッチに対応	○	○
自動ピーク積分	×	○
プレートベースの視覚化	×	○
計算	×	○
例外によるレビュー (未注入や、計算値が上下限値を超えた注入のフラグ付け)	×	○

ホームページ

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

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. 2018

Printed in Japan, May 1, 2018

5991-9004JAJP

