

RADIAN ASAP LiveID によるドライハーブのすり替え偽装のルーチンスクリーニングソリューション

Sara Stead, Nicola Dreolin, Tito Damiani, Giuseppe Sammarco, Michele Suman, Chiara Dall'Asta

Waters Corporation, University of Parma, Department of Food and Drug, Parco Area delle Scienze, Barilla G.R. F.lli SpA
Research, Development & Quality

要約

品質管理目的で食品製造業界で現在採用されている分析法の多くは、分光技術に基づいています。比較として、ダイレクト質量分析 (MS) は、比較的新しい技術であり、同等の速度と使いやすさ、およびより高い選択性、感度、診断化学情報の利点を提供することが証明されています。不純物マーカのターゲット検出または多変量分類モデルの開発のいずれかに基づく食品の真正性分析のために、多くの MS ベースの分析法が研究されてきました。この実験では、ケモメトリックスモデリングおよびそれに続くリアルタイム品質管理試験のために、LiveID と組み合わせた RADIAN ASAP の性能を評価しました。ケーススタディとして、地中海産のドライオレガノに混入した増量材の総量を使用しました。真正のドライオレガノ、オリーブの葉（頻繁に報告される混ぜ物）、およびそれらの混合物で構成されるサンプルセツ

トを使用しました。各サンプルの化学的プロファイルは RADIANT ASAP を使用して作成し、マススペクトルプロファイルの分析種診断領域を使用し、LiveID の PCA/LDA アルゴリズムを使用して多変量モデルを作成しました。独立したバリデーションにより、バイナリーモデルの予測正確度は 100% であることが示されました。次に、このモデルを使用して、一連のチャレンジサンプルをリアルタイムで分類しました。モデルに含まれていない 4 種の異なるハーブ種（マジヨラム、タイム、ミント、シスタス）の代表的なサンプルは、「外れ値」として分類し、オレガノへのオリーブとシスタスの葉の混入の推定スクリーニングしきい値、30% 以下 (w/w) が計算されました。

アプリケーションのメリット

- 使いやすさ - 最小限のサンプル前処理またはサンプル前処理なしで、最小限の装置最適化でのダイレクト分析
- 迅速で正確な結果 - ダイレクト分析と LiveID のリアルタイム認識により、情報に基づく意思決定を秒単位の時間で行うための分析が可能
- コンパクトな装置 - 設置面積が小さいため、テクノロジーをルーチンのラボ環境で展開する際に最大限の柔軟性を

はじめに

ケモメトリックスパッケージ LiveID (v2.0) と組み合わせた RADIANT ASAP を、品質管理試験目的で食品原材料を迅速にスクリーニングするためのツールとして、評価しました。経済的な動機による食品不正として、ドライハーブに添加された無関係な増量材の総量をケーススタディに使用しました。地中海産オレガノは、最も評価の高い料理用ハーブの 1 つであり、料理、香水、化粧品の機能性成分としても使用されています。以前の論文では、質量分析以外の検出法を使用して、同じように見える経済的価値の低い植物の葉（例えばウルシ、シスタス、ギンバイカ、オリーブの葉）へすり替えが報告されています¹⁻⁴。現在、この種の検査のために、食品製造セクターで採用されているスクリーニングメソッドのほとんどは、振動分光または DNA ベースの技法に基づいています⁵。ダイレクト質量分析は、他の方法と同等の速さと使いやすさで適用できる上、より高い選択性、感度、および追加の貴重な化学情報（たとえば診断マーカー化合物や予期しない汚染物質の存在）を提供することが証明されています。

RADIANT ASAP は、定評のある ACQUITY QDa 質量検出器、および直接サンプルを導入できる大気圧固体分析プローブ (ASAP) 技法に基づく、設置面積の小さい新しい装置です。ASAP の ASAP イオン化メカニズムは、極性から中極性の範囲の、広範囲の熱安定性で低分子量の揮発性および半揮発性化合物に適用できる、大気圧化学イオン化法 (APCI) です。

サンプル導入は、分析のニーズに応じて、使い捨てのガラス製キャピラリーで簡単な浸漬法を使用するか、キャピラリーの端に一定量のサンプル抽出物を注入することによって行います。浸漬法では、サンプルの形状に応じて、キャピラリーをサンプル表面に浸漬するか、サンプル表面を拭きます。サンプリングの前に、ガラス製キャピラリーを装置に口

ードし、自動クリーニング手順（ベイクアウト機能と呼ばれる）を実施して、ガラス表面に存在する汚染物を除去します。

RADIAN ASAP では、水平サンプルローディング機構が組み込まれている固定したイオン化ソースの形状を利用します。この固定ソースの形状は、APCI ピンとイオン化領域に近接したサンプリングキャピラリーの最適な配置が固定されるため、分析法開発段階を最小限に抑える役目をします。イオン化およびサンプリングコーンの領域は、質量検出器への軸から外れています。中性種の一部およびイオン電流がイオンガイド領域に入るのを防止するこの設計が、粗サンプルからの検出器汚染を低減することにより、分析法の頑健性を向上する役目を果たします。

実験方法

真正品サンプル

モデルのトレーニングとバリデーションの目的で、以下の植物種から特性解析した真正のサンプルのセットを、商業生産者から直接調達するか、あるいは、植物種、原産国、収穫年が既知の成長中の植物から採取するかしました。それらの植物種は、地中海産オレガノ (*Origanum vulgare* & *O. vulgare* spp. heracleoticum) $n = 35$ 、オリーブ (*Olea europaea*) $n = 20$ 、マジョラム (*Origanum majorana*)、シスタス (*Cistus incanus*)、タイム (*Thymus vulgaris*)、ミント (*Mentha spicata*) です。

代表的な可能性のあるすり替え物は、オレガノとの系統発生的近接性に基づいて選択しました。選択した3つの植物種は同じ科 (*Lamiaceae*) に属し、これらのうち2つはオレガノと同じ属 (*Origanum*) に属しています。ハーブ不正の増量材として以前に報告された別の科に属する2つの追加の植物種 (*Oleaceae* および *Cistaceae*) もこの実験に含めました¹。

すり替え偽装のシナリオに似せるために、真正のオレガノと他のハーブ種が含まれている混合物を重量対重量ベース (0 ~ 30% の範囲) で調製しました。

抽出プロトコル

均質な乾燥植物材料を秤量し (0.2 g)、10 mL のメタノールで抽出しました。混合液を、ロータリーシェーカーを使用して 1,300 rpm で 10 分間振とうしました。抽出液を 1000 rpm で 4 分間遠心分離し、得られた上清のアリコート (400 μ L) を 1 mL のオートサンプラーバイアルに分注しました。



図 1. サンプルの乾燥および粉碎したハーブ材料から最終結果までの分析ワークフローステップ

サンプル導入

事前に洗浄したガラス製キャピラリーを、抽出液が入っているオートサンプライアルに十分な深さまで浸し、約 5 秒間、溶液と接触したままにしました。ガラス製キャピラリーはすぐに RADIAN ASAP サンプルローダーに取り付けて、イオン化ソース領域に導入しました。プロトン移動イオン化メカニズムを促進するために、抽出物がまだ湿っている間に分析しました。

表 1. RADIAN ASAP パラメーターおよび設定

パラメーター	設定
イオン化モード	ASAP+
コロナピン	3 μ A (既定値)
脱溶媒ガス (N ₂) 温度	450 °C
サンプリングコーン	12 V (既定値)
取り込みモード	フルスキャン (連続)
質量範囲	100-1000 Da
スキャン速度	2 Hz
サンプリング方法	キャピラリー浸漬

表 2. LiveID ケモメトリックモデルのパラメーターおよび設定

パラメーター	設定
モデルのトレーニングおよび認識に適用する 相対ピーク検出しきい値	50%
モデルのアルゴリズム	PCA/LDA
PCA コンポーネント	3
LDA コンポーネント	1
外れ値メソッド	標準偏差
外れ値の距離	3
ビンニング分解能	1 Da
質量範囲	300–750 Da

LiveID バージョン 2.0 を、ケモメトリックモデルのトレーニング、バリデーション、リアルタイム認識に使用しました。
。LiveID ケモメトリックソフトウェアの詳細については、アプリケーションノート 720006205EN を参照してください
6。

結果および考察

LiveID モデルのトレーニング

LiveID で真正品モデルを作成するために、35 種の異なる真正オレガノと 18 種の異なるオリーブの葉のサンプルが含まれているトレーニングセットを選択しました。サンプルは、1 人の分析者が 1 つの装置で異なる 2 日間にわたってランダムな順序で分析し、サンプルごとに 2 回の技術的繰り返しを行って、70 のオレガノサンプルと 36 のオリーブの葉のサンプルの母集団を作成しました。真正のオレガノおよび他のハーブのサンプルに対して生成された RADIAN ASAP スペクトルは、技術的繰り返しおよび生物学的繰り返しにおいて再現性があり、機能豊富なプロファイルを示しました。LiveID (v.2.0) を使用して、真正オレガノサンプルと混ぜ物をしたオレガノサンプルを区別するためのケモメトリックモデルを作成し、バリデーションしました。

MassLynx の生データを LiveID と前処理ステップにインポートし、装置の感度変動を考慮して、トータルイオン電流(

TIC)による正規化、およびスケージングに適用した平均センタリングを実施しました。スペクトルライブラリー母集団の LiveID ワークフローステップが図 2 にまとめられています。

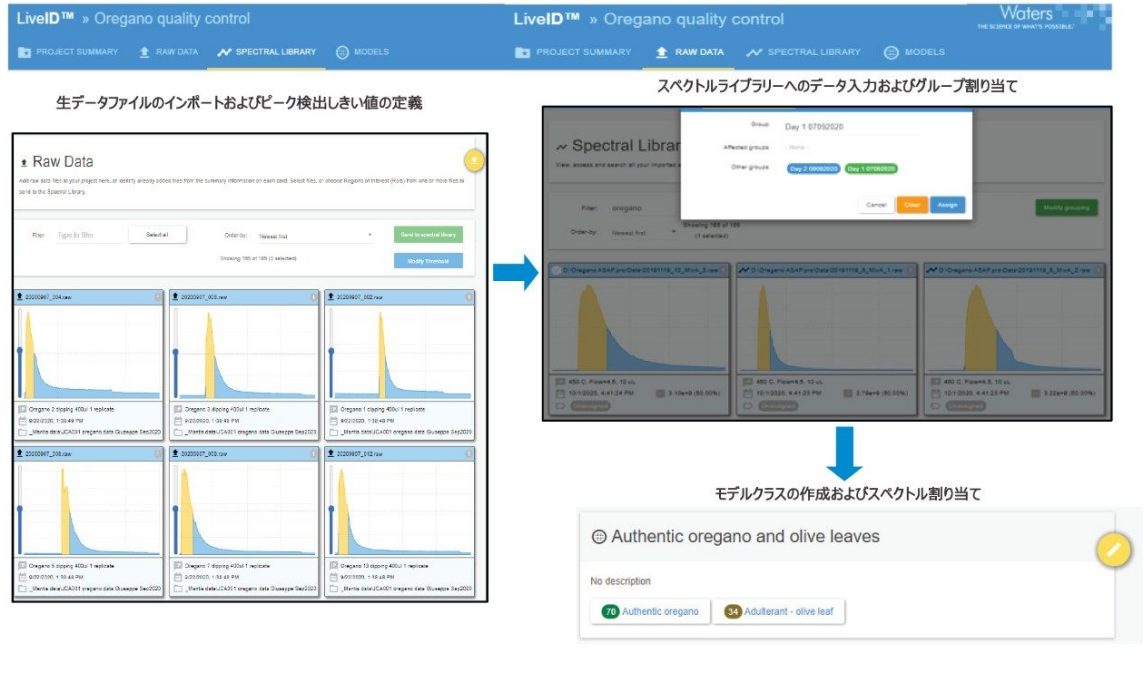


図 2. LiveID ワークフロー。生データのインポート、ピーク検出のしきい値処理、スペクトルライブラリーの母集団、グループの割り当て、モデルクラスの作成を示しています。

モデルの最適化段階では、取り込んだ全スペクトル範囲 (m/z 100 ~ 1000) および 5 つの主成分を使用して、管理なしで主成分分析 (PCA) モデルを構築しました。1 Da 単位のビニング分解能を適用しました (RADIAN ASAP 検出器の質量分解能と相当)。LiveID PCA 単一成分ローディングプロットを調べて、ハーブの種に応じたクラスタリングに統計的に関連性がある m/z の特徴が明らかになりました。

最も診断に有用なスペクトル範囲は m/z 300 ~ 750 であることがわかったので、この範囲を以降のモデルトレーニングおよびバリデーションの段階で使用しました。管理付きアルゴリズムである線形判別分析を PCA モデルに適用して、PCA/LDA モデルを生成しました。3 つの主成分が保持され、96% を超えるデータの全分散が説明されました。線形判別分析 1 つを縮小したデータセットに適用しました。標準偏差の 3 倍 (97% 信頼区間) の外れ値距離を、スコアとクラスのセントロイドからの残差距離の両方と組み合わせたクラスの周囲に定義しました。

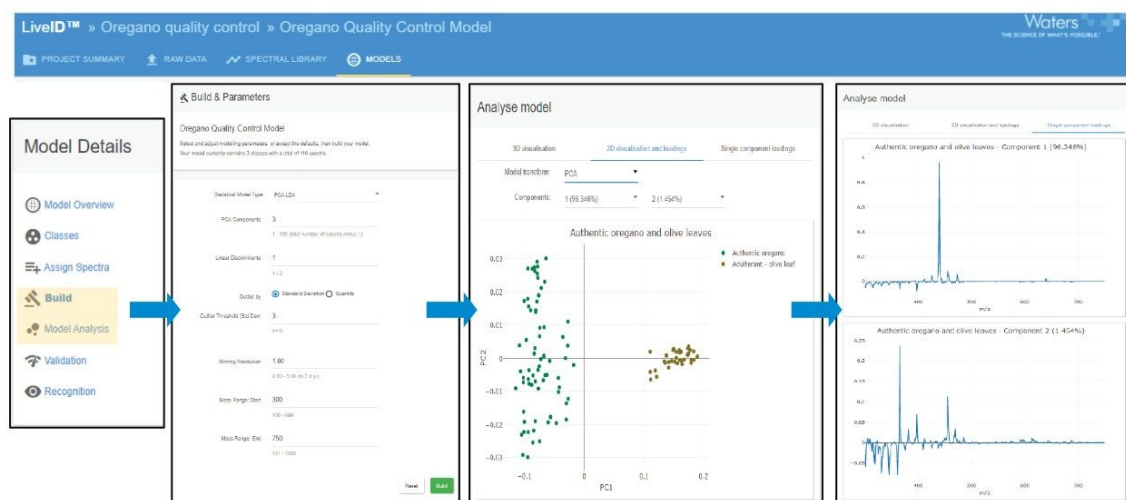


図 3. LiveID オレガノモデルの最適化したパラメーター、PCA モデルの 2D スコアのプロット、PC1 と 2 の単一成分ローディングプロット

LiveID のクロスバリデーション

自動 *in-silico* クロスバリデーションを、LiveID で使用可能な 2 つのバリデーションメソッドを用いて実行しました。「1 ファイル除外」メソッドを使用して、混ぜ物識別の予測精度 % を決定し、「1 グループ除外」メソッドを使用して、モデルの日間安定性を評価しました。

「1 グループ除外」の場合、1 日目と 2 日目に取り込んだサンプル繰り返しを LiveID スペクトルライブラリーのグループに割り当てました。モデルは、分析日のグループに従って作成した後、隔日に取り込んだ繰り返しでチャレンジし、およびその逆を行いました。

上記のモデルのパラメーターを使用すると、両方のバリデーションモードで 100% の全体的な正確性スコア（予測精度）が得られ、モデルによって、化学的プロファイルの違いに基づいて、モデルに含まれる 2 種類のハーブの葉が確実に区別されていることが示されました。モデルの日間安定性は頑健であり、分析日間の技術的な差異は無視できる程度であることが示されています。

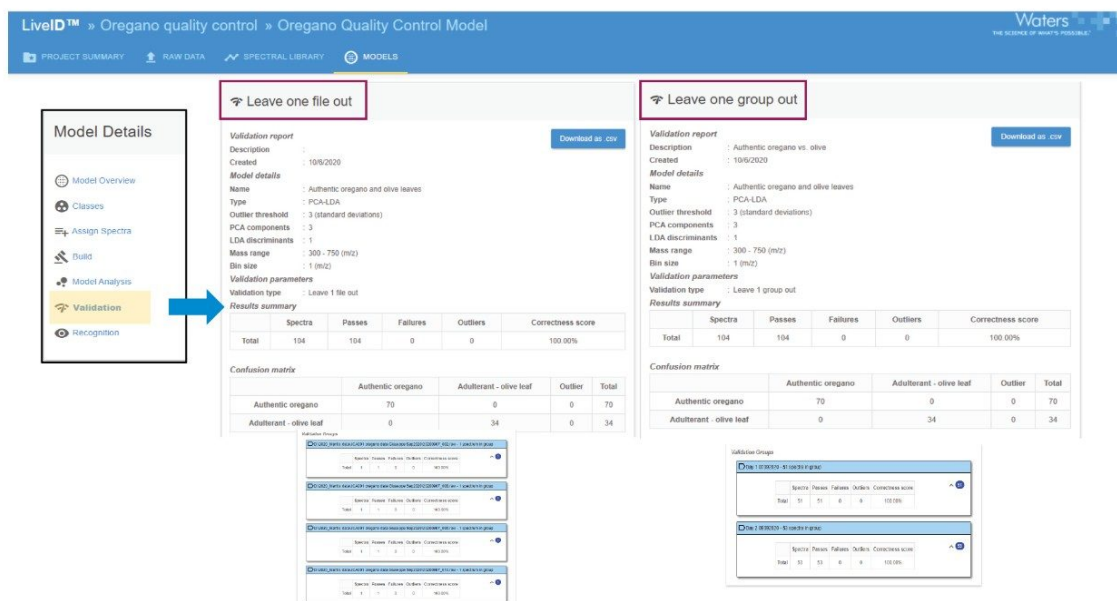


図 4. 「1 ファイル除外」モードと「1 グループ除外」モードでのオレガノモデルの LiveID クロスバリデーションの結果

LiveID による認識を使用した独立したバリデーション

再現性、頑健性、予測正確度をさらに評価するために、モデルをさまざまな混ぜ物と比較し、予想される不正のシナリオ（100% 混ぜ物として）およびモデルのトレーニングに使用しなかった一部の真正のオレガノとオリーブの葉のサンプルをシミュレーションしました。

ランダムに選択した 7 つの真正のオレガノと 2 つのオリーブの葉のサンプル（モデルのトレーニングに用いたセットの 20%）を、4 台の異なる装置のうちの 1 台で、3 人の分析者の 1 人が、浸漬またはピペッティングによるサンプル導入技法を用いて試験しました。すべての場合に、LiveID の再生認識は、信頼性スコア 100% で正しい分類結果を返しました。モデルに存在しない 4 つの異なるハーブ種（マジョラム、タイム、シスタス、ミント）の代表的なサンプルもバリデーション試験に含めました。モデルは「外れ値」の分類を返しました。これは、化学プロファイルが、定義されている外れ値距離範囲内で真正のオレガノまたはこのモデルに含まれる単一の混ぜ物のクラス（オリーブの葉）のいずれにも一致しないと認識されたことを示します。

サンプルコード	供給者のコード、 原産国、収穫年	使用装置 および分析日	オペレーター	導入方法	LiveID 分類および (信頼性スコア)
真正のオレガノ - 2	A イタリア、2018 年	装置 1 14/11/2019	オペレーター 3	ピベッティング	オレガノ (100%)
真正のオレガノ - 21	B イタリア、2019 年	装置 2 07/09/2020	オペレーター 2	浸漬	オレガノ (100%)
真正のオレガノ - 37	C イタリア、2019 年	装置 3 09/09/2020	オペレーター 1	浸漬	オレガノ (100%)
真正のオレガノ - 45	D イタリア、2018 年	装置 2 07/09/2020	オペレーター 2	浸漬	オレガノ (100%)
真正のオレガノ - 53	E イタリア、2019 年	装置 3 07/09/2020	オペレーター 1	浸漬	オレガノ (100%)
真正のオレガノ - 69	F ギリシャ、2018 年	装置 4 07/09/2020	オペレーター 3	ピベッティング	オレガノ (100%)
真正のオレガノ - 85	F 不明	装置 3 09/09/2020	オペレーター 1	浸漬	オレガノ (100%)
オリーブ - 17	G イタリア、2019 年	装置 3 11/09/2020	オペレーター 1	浸漬	オリーブ (100%)
オリーブ - 20	G イタリア、2019 年	装置 3 07/09/2020	オペレーター 1	浸漬	オリーブ (100%)
シスタス - 1	ドイツ、2019 年	装置 3 07/09/2020	オペレーター 1	浸漬	外れ値 (100%)
マジョラム - 英国	英国、2020 年	装置 2 07/09/2020	オペレーター 2	浸漬	外れ値 (100%)
ミント - 英国	H 英国、2020 年	装置 3 11/09/2020	オペレーター 1	浸漬	外れ値 (100%)
タイム - 1	H イタリア、2019 年	装置 3 11/09/2020	オペレーター 1	浸漬	外れ値 (100%)

表 3. ランダムに選択した真正のオレガノのサンプル、オリーブ、およびその他の可能性のある混ぜ物種を使用し、再現性のある条件下で実施した独立バリデーションの結果

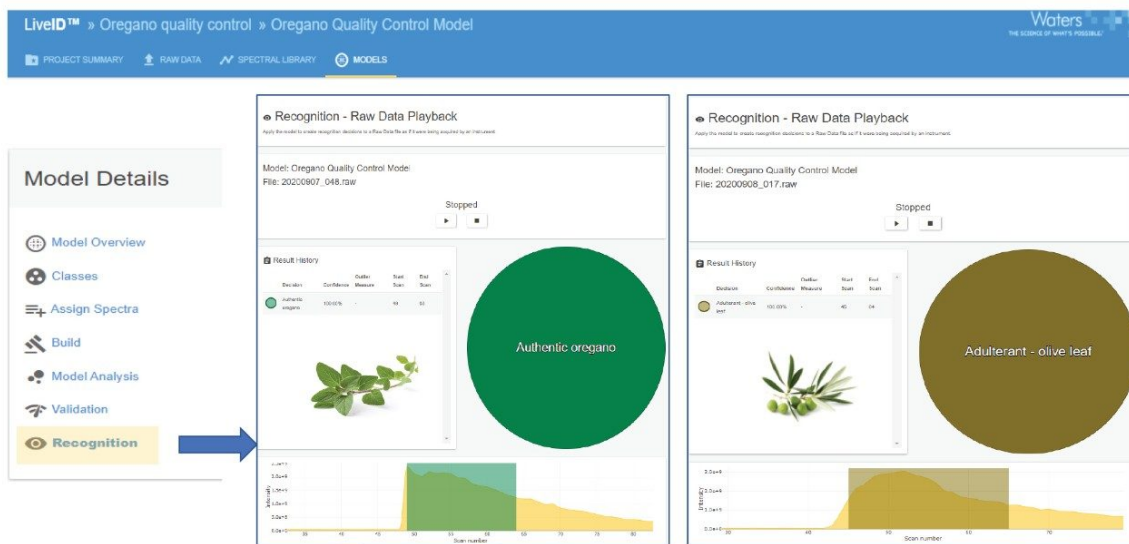


図 5. 2つの異なる RADIANT-ASAP 装置で取り込んだ2つの独立したバリデーショナルサンプル（オレガノ-45 およびオリーブ-2）に対する LiveID によるリアルタイムの認識結果の例

分析法のスクリーニング検出限界（SDL）を推定するために、真正のオレガノに個々の混ぜ物種（オリーブおよびシスタス）がそれぞれ 10% および 30%（w/w）含まれているブレンドを使用しました。これらのブレンドを、同じ装置で、異なる 2 日間に分析し（n=6）、LiveID のリアルタイム認識を用いて分類しました。SDL は、オリーブとシスタスの両方について 30% 以下と推定され、両方の植物種で頑健な 30% 以下のスクリーニングしきい値を設定できることを示しています。他の可能性のある混ぜ物またはそれらの混合物のカットオフレベルを定義するには、さらなる作業が必要です。

すり替え種	科および属	真正オレガノのすり替え %	LiveID 分類および出現率 % (n = 6)	決定
オリーブ <i>Olea europaea</i>	Oleaceaea <i>Olea</i>	10	“外れ値” 30% オレガノ 70%	SDL 未満
		30	“外れ値” 100%	SDL 以上
		0	“外れ値” 100%	SDL 以上
シスタス <i>Cistus incanus</i>	Cistaceae <i>Cistus</i>	10	オレガノ 6/6	SDL 未満
		30	“外れ値” 6/6	SDL 以上
		0	“外れ値” 6/6	SDL 以上

表 4. ドライオレガノの経済的な動機による偽装で以前に記載した 2 つの可能性のある混ぜ物の推定スクリーニング検出限界

結論

- RADIANT ASAP と LiveID モデリングソフトウェアの組み合わせにより、分析法開発と最適化の所要時間が非常に短い概念実証アプリケーションとして、ドライオレガノのすり替え偽装を検出するための頑健なモデルを開発できました。
- 熟練したオペレーターでなくても、解釈しやすい結果を数分で生成できます。
- バリデーション試験の結果から、RADIANT ASAP LiveID ソリューションの機能が、ハーブの混ぜ物シナリオをリアルタイムで認識するための、正確で頑健なルーチンスクリーニングツールとなり、その他の食品および飲料商品の品質管理に適用できる可能性があることが証明されました。
- 経済的メリットのための希釈偽装は、通常、比較的高いレベルの混ぜ物で行われます。得られたパフォーマンスから、この分析法が、ドライハーブの偽装を検出するための業界で展開可能なソリューションとして、目的に適合した方法であることが示されています。

参考文献

1. Black, C., Haughey, S. A., Chevallier, O. P., Galvin-King, P., & Elliott, C. T. (2016). A Comprehensive Strategy to Detect the Fraudulent Adulteration of Herbs: The Oregano Approach. *Food Chemistry*, 210, 551–557.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.004> <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.004>>

2. Drabova, L., Alvarez-Rivera, G., Suchanova, M., Schusterova, D., Pulkrabova, J., Tomaniova, M., Kocourek, V., Chevallier, O., Elliott, C., & Hajslova, J. (2019). Food Fraud in Oregano: Pesticide Residues as Adulteration Markers. *Food Chemistry*, 276, 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.143> <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.143>>
3. Marieschi, M., Torelli, A., Bianchi, A., & Bruni, R. (2011a). Detecting *Satureja montana* L. and *Origanum majorana* L. by Means of SCAR-PCR in Commercial Samples of Mediterranean Oregano. *Food Control*, 22(3–4), 542–548. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.001> <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.001>>
4. Wielogorska, E., Chevallier, O., Black, C., Galvin-King, P., Delêtre, M., Kelleher, C. T., Haughey, S. A., & Elliott, C. T. (2018). Development of a Comprehensive Analytical Platform for the Detection and Quantitation of Food Fraud using a Biomarker Approach. The Oregano Adulteration Case Study. *Food Chemistry*, 239, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.083> <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.083>>
5. Black, C., Chevallier, O. P., & Elliott, C. T. (2016). The Current and Potential Applications of Ambient Mass Spectrometry in Detecting Food Fraud. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.005> <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.005>>
6. Black, C., Stead, S., Chevallier, O., Martin, N., Elliott, C. T. A Real Time Lipidomics Approach for Detecting Fish Fraud using Rapid Evaporative Ionisation Mass Spectrometry and LiveID software (2018). Waters Corporation Application Note, 720006205EN. https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134968181&locale=en_GB <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134968181&locale=en_GB>

謝辞

Sara Stead (Waters Corporation), Tito Damiani (University of Parma, Department of Food and Drug, Parco Area delle Scienze), Nicola Dreolin (Waters Corporation), Giuseppe Sammarco (University of Parma, Department of Food and Drug, Parco Area delle Scienze & Barilla G.R. F.lli SpA Research, Development & Quality), Michele Suma (Barilla G.R. F.lli SpA Research, Development & Quality) and Chiara Dall’Asta (University of Parma, Department of Food and Drug, Parco Area delle Scienze).

ソリューション提供製品

LiveID ソフトウェア <<https://www.waters.com/134939519>>

RADIAN ASAP ダイレクト質量検出器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135073413>>

720007045JA、2020 年 10 月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [サイトマップ](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)