

Agilent 6546 LC/Q-TOF 및 MassHunter Classifier를 이용한 식품 진위 판별 시험

저자

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

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

개요

식품 제조업에서는 허위 표시(false labeling)와 위화(adulteration 혹은 부정 혼입) 문제가 점차 증가함에 따라, 쉽게 사용할 수 있는 품질 관리 분석 도구의 필요성이 업계 내에서 강조되고 있습니다. 본 응용 자료에서는 식품 진위 판별에 대한 일상적인 검사를 가능하게 하는 새로운 분석법을 설명합니다. 워크플로는 MassHunter Profinder 10.0, Mass Profiler Professional 15.0 및 Classifier 1.0 소프트웨어를 사용하는 Agilent 6546 LC/Q-TOF로 구성하였습니다. 이 분석법은 식품 품질을 통찰할 수 있는 신뢰성 높은 결과를 빠르게 생성하였습니다.

서론

복잡한 식품 공급망에서 위화 식품과 허위 표시(labeling)가 갈수록 많아짐에 따라, 식품 제조 산업에서는 식품 진위 판별 시험에 점차 더 많은 관심을 보이고 있습니다. 고급 식품 소재와 제품의 가격이 상승함에 따라, 부정불량품이나 모조식품의 발생률은 계속 증가할 것입니다. 현재까지는 사용자 친화적인 도구의 부족으로 인해 이러한 활동을 테스트하기 위한 방법과 절차의 개발 및 배포에 제약이 있습니다. 따라서 이러한 도구와 워크플로를 발전시키면, 공급망 내의 소재 또는 소비자 시장에서의 최종 제조된 제품에 대한 품질 관리 절차를 개선할 수 있으며, 또한 이러한 발전은 식품 제조업체들이 지속적으로 출처가 분명한 진품 재료를 사용할 수 있게 해줍니다.

한편, 질량 분석법(MS)을 통해 식품의 분자 성분을 측정하고 프로파일링 할 수 있습니다. 이러한 프로파일은 높은 정밀도와 정확도로 시료를 분류하고, 시료가 진품인지 또는 부정 불량품인지를 결정하는 데 사용할 수 있습니다. Agilent 6546 LC/Q-TOF 질량 분석기는 넓은 측정 범위(dynamic range)와 동시에 낮은 질량의 분해능을 현저히 향상시켜, 복잡한 시료에서 더 많은 특징을 발견하고 측정할 수 있습니다. 식품 진위 판별 시험의 개발과 사용을 위한 분석 소프트웨어와 워크플로에는 고도로 숙련된 전문가가 필요하기 때문에, 식품 연구실에서 참여하는 것은 쉽지 않은 일입니다.

본 응용 자료에서는 시료 전처리에서부터 데이터 분석까지의 완전한 진위 판별 워크플로의 개발 및 구현을 위한 소프트웨어에 대해 소개합니다(그림 1). QuEChERS 키트를 사용해 빠르게 시료 전처리를 수행하고, Agilent 1290 Infinity II LC 및 6546 LC/Q-TOF를 사용하여 분석물질 분리 및 검출을 수행하였습니다. 진위성 모델은 과학자의 데이터 처리를

통해 구축할 수 있으며, 이 데이터 처리는 MassHunter Profinder 10.0 및 Mass Profiler Professional(MPP) 15.0을 이용해 자동화할 수 있습니다. 또한 Agilent MassHunter Classifier 1.0은 시료의 진위성 분석을 자동으로 수행하여 결과를 간소화합니다. 이렇게 개선된 도구를 사용하면, 일상적인 식품 진위 판별 분석을 광범위하고 쉽게 구현할 수 있습니다.

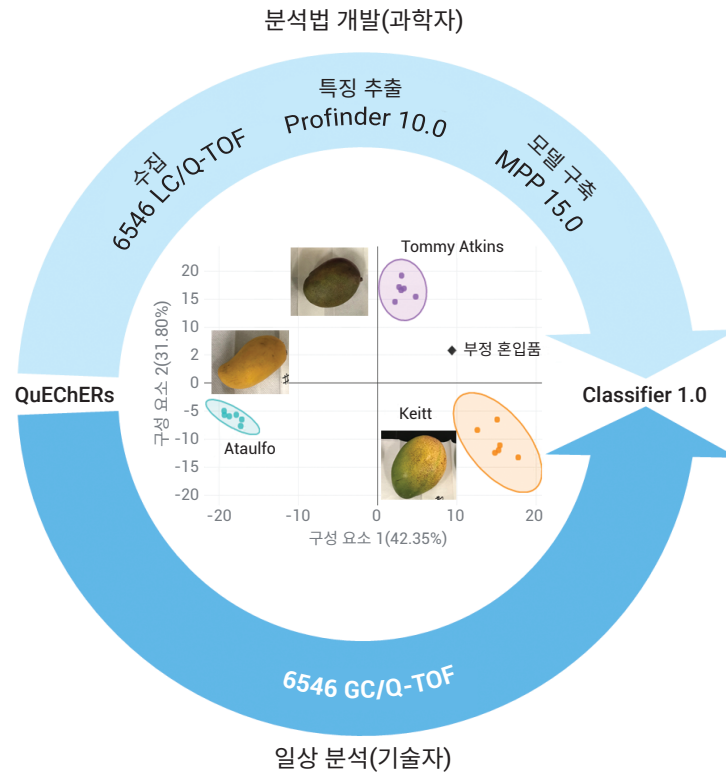


그림 1. 분석법 개발자 및 일상 분석자를 위한 진위 판별의 전체 워크플로. 이 과정은 QuEChERS 시료 추출 및 cleanup으로 시작하여 분석법 개발 절차(위)에서 6546 LC/Q-TOF를 이용해 시료 데이터를 획득한 다음, 특징 추출을 위해 크게 개선된 Profinder 10.0을 사용하고, 모델 구축을 위해 MPP 15.0을 사용하여 이들 데이터를 분석함. 개발자는 구축한 분류 모델을 Classifier 1.0에서 사용하여 QC 시료와 미지 시료를 검사할 수 있음. 일상분석에서 사용시, Classifier 소프트웨어는 사용이 간편하기 때문에 분석자가 시료를 생산적으로 실행 및 검토 가능(아래). 결과 검토는 시료가 순수한지(유색 원형) 아니면 부정 혼입품인지(위 그림에서는 검은색 마름모 표시)를 쉽게 확인할 수 있는 플롯(중앙)을 포함함.

실험

시료 설정, 전처리 및 데이터 수집

모델을 구축하려면 인증된 진품 시료가 필요합니다. 본 연구에서는 Ataulfo, Keitt, 및 Tommy Atkins의 세 가지 망고 품종을 분석하였습니다. 비록 인증 받은 진품이 아니었지만, 그들은 정확한 식별을 위해 사용할 수 있는 독특한 표현형을 가지고 있기 때문에 이 개념 증명 연구에 사용할 수 있습니다. 캘리포니아 현지 시장에서 6개의 생물학적 반복 시료 또는 각 품종별 개별적인 망고를 수집하였습니다. 망고는 껍질을 벗기고, 과육을 균질화하였습니다. 그 다음 QuEChERS EN 프로토콜에 따라 균질물을 처리하였습니다¹. 50mL 코니칼 튜브에서 10mL의 acetonitrile과 10g의 망고 균질물을 2분간 혼합한 뒤, EN 염 파우치를 넣고 2분간 진탕하였습니다. 그런 다음, 시료를 3,500rpm으로 6분간 원심분리하였습니다. 상층액을 회수하여 분석 전까지 유리 HPLC 바이알에 7°C로 보관하였습니다.

6개 생물학적 반복 시료의 균질물을 혼합하여 각 품종의 양성 QC 시료 또는 순수 시료를 만들었습니다(그림 2). 20:80 및 50:50과 같이 알고 있는 비율로 양성 QC 시료를 혼합하여 부정 혼입 시료 또는 음성 대조 시료를 준비하였습니다. QuEChERS EN에 따라 QC 시료를 전처리하여 개별 시료와 동일한 방식으로 보관하였습니다.

시료는 6546 LC/Q-TOF에 1290 Infinity II LC를 결합하여 분석하였습니다. 주입기 프로그램을 사용하여 2 μ L의 시료를 흡입한 후 니들 세척을 수행하였습니다. 다음으로, 1 μ L의 내부 표준물질(IS)로서 100ppb의 중수소 치환된 농약 혼합물을 흡입하고

니들을 세척하였습니다. 그리고 모든 시료와 IS를 주입하였습니다. 이 내부 표준물질을 통해 전체 실험에 걸쳐 데이터 품질을 모니터링할 수 있었습니다. Q-TOF는 양이온 모드(m/z 1700 범위)로 튜닝 및 질량 검교정을 수행하였습니다.

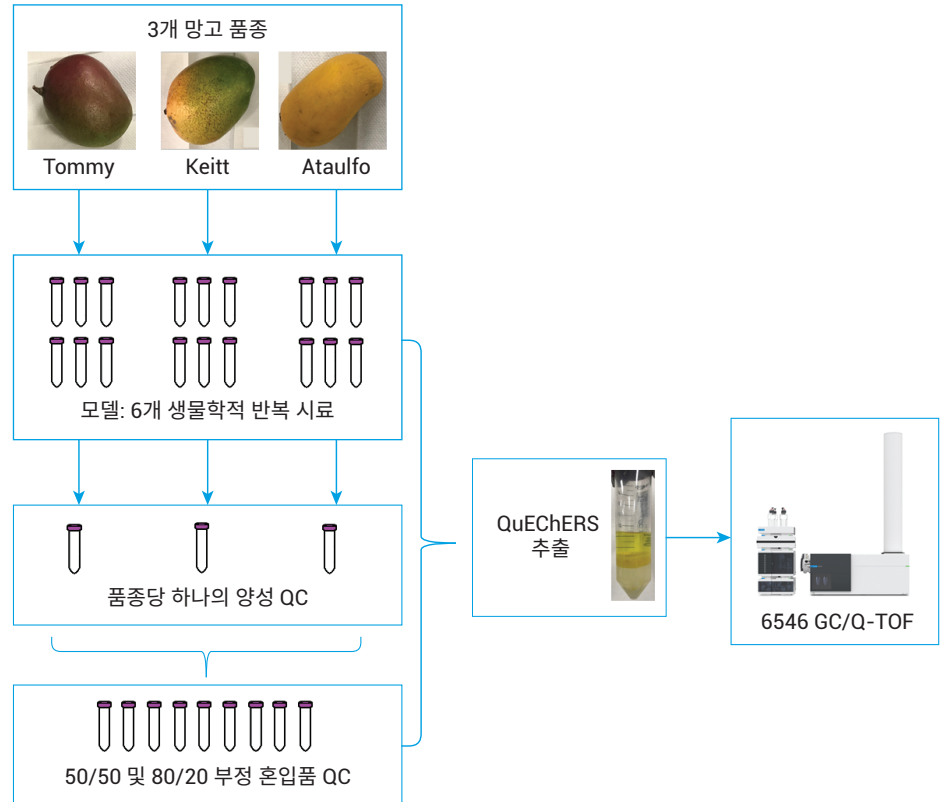


그림 2. 망고 진위 판별 모델 구축을 위한 시료 및 실험실 워크플로. 3개 망고 품종의 6개 반복 시료로 양성 QC 시료 제조. 순수 QC 시료들을 혼합하여 부정 혼입품 제조. 각 시료는 QuEChERS 키트로 처리한 후 6546 LC/Q-TOF를 사용하여 데이터 수집함.

5일간 연속으로 수집하는 동안, 두 개의 내부 기준 질량 즉, purine과 HP-921 (^1H , ^1H , ^3H -tetrafluoropropoxy phosphazine)을 이용하여 우수한 질량 정확도를 달성하였습니다. MS 데이터 수집 속도는 전체 크로마토그래피 피크에 걸쳐 최소 8~12개의 데이터 포인트를 유지하도록 설정하였습니다. 표 1은 추가적인 분석법 세부 정보를 보여줍니다.

모델 시료(6개 생물학적 반복 시료 \times 3개 품종 망고)는 워크리스트에서 임의로 순서를 정한 다음, 부정 혼합 시료를 무작위로 주입하였습니다. 이는 모델 데이터를 수집한 후에 미지 시료를 분석하는 일반적인 실험실 워크플로를 따르기 위한 것이었습니다. 워크리스트에서, 매 10회 시료 주입 후에 3개의 양성 QC 시료를 임의의 순서로 주입하였습니다. 분석법 및 모델의 지속성을 평가하기 위해, 데이터 수집 14일 후, 동일한 분석법 및 모델을 사용하여 새로 전처리한 양성 QC와 부정 혼합 시료를 분석하였습니다.

결과 및 토의

데이터 품질

중수소 치환된 내부 표준물질에 대한 질량 정확도와 면적 정보가 그림 3에 나와있습니다. 이들 결과는 모든 개별 주입 뿐만 아니라 전체 데이터 세트에 대한 품질 관리 검사의 역할을 담당합니다. 이 데이터는 전체 실험을 통틀어 6546 LC/Q-TOF가 낮은 질량 오차(2ppm 이하) 및 안정적인 신호(10% RSD 이하)를 제공함을 분명하게 보여주었습니다. 머무름 시간 드리프트는 전체 워크리스트에서 0.1분 이내에 불과했습니다. 이러한 데이터 재현성을 통해 각 실행마다 기기 성능에 대한 확신을 확보할 수 있습니다.

표 1. 6546 LC/Q-TOF 분석의 데이터 수집 세부 정보.

수집 파라미터	
컬럼	Agilent ZORBAX SB-Aq, 3.0 \times 150mm, 3.5 μm
이동상 A	Water + 0.1 % formic acid, 5 mM ammonium formate, 0.5 mM ammonium fluoride
이동상 B	Acetonitrile + 0.1 % formic acid, 5 mM ammonium formate, 0.5 mM ammonium fluoride
Sheath 가스 온도	400°C
Sheath 가스 유속	12psi
가스 온도	325°C
가스 유속	10psi
Nebulizer	20psi
캐필러리 전압	4,000V
MS Tune	m/z 1,700
MS 모드	양이온
수집	MS
MS 범위	m/z 50~1,000

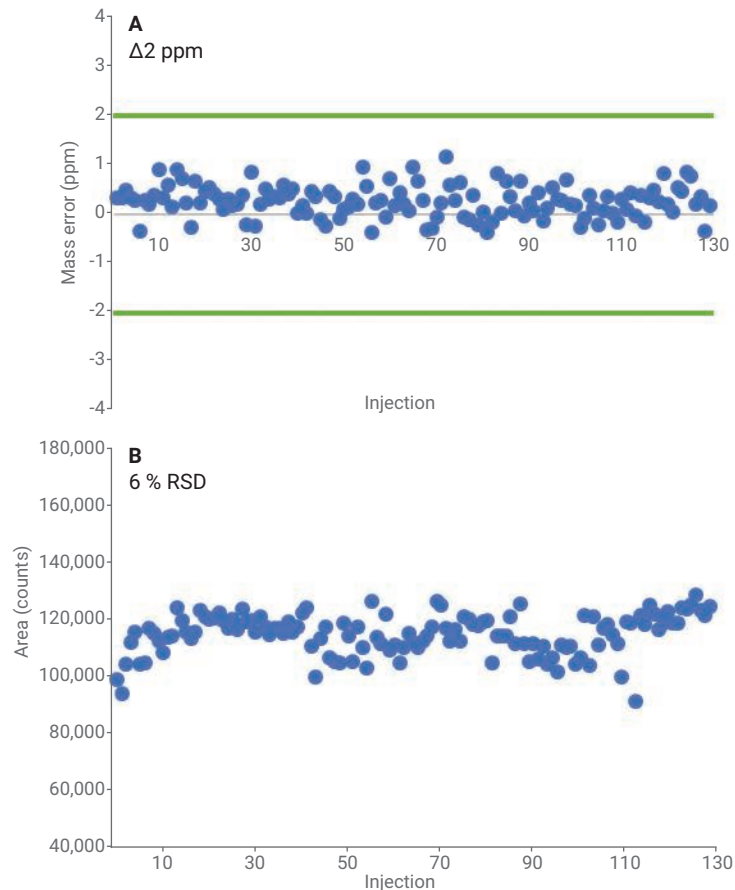


그림 3. 전체 분석 중 Dimethoate- d_6 (m/z 236.0446, RT 10.4 분)의 결과. 100회 이상의 주입에 대한 질량 오차는 2ppm 이하였으며, 면적은 6%의 상대 표준 편차(RSD)로 높은 안정성을 나타내었음. 이는 6종의 내부 표준물질 중 하나의 대표적 결과임.

분석법 개발 워크플로: Profinder 10.0 및 MPP 15.0 활용

식품 진위성 분석의 목표는 모든 차별화 요소(differentiator)를 찾는 것이 아니라, 가장 확고한 식별자(identifier)를 찾는 것입니다. 이러한 전략을 통해, 분석 모델을 업데이트할 필요 없이 장기간 사용할 수 있습니다. 이 Profinder와 MPP 워크플로 간에는 기타 유형의 분석(예: 대사체학)과 비교하여, 많은 주요 차이점이 있습니다.

18개의 모델 시료를 Profinder 10.0에 로드하고 망고를 품종별로 그룹화하였습니다. 이 데이터 세트의 머무름 시간 드리프트가 최소화된 덕분에, 이 분석에서는 머무름 시간 보정이 필요하지 않았습니다. 비표적 방식으로 특징을 검출하기 위해 Batch Recursive Feature Extraction(배치 재귀적 특징 추출, 저분자/펩타이드용) 마법사를 선택하였습니다. 기본 분석법에서 몇 가지 사항을 변경하였습니다. 양성자화된 이온 중을 일반 유기 분자(할로겐 없음) 동위원소 모델과 하전 상태 허용치 1로 설정하였으며, 높이 필터는 마법사에서 요청할 때마다 3000을 사용했습니다. 마지막으로 molecular feature extractor(MFE) 알고리즘과 특징 품질의 목표 점수를 80으로 올렸습니다.

이 분석법은 고유의 이름으로 저장하여 나중에 Classifier 1.0 소프트웨어에서 사용하였습니다.

비표적 분석은 4,000개 이상의 특징(성분)을 발견하였으며, 이러한 결과를 MPP로 가져오기 위해 Profinder Archive(.PFA) 파일로 내보냈습니다. 데이터를 MPP로 가져오면, 빈도와 머무름 시간, ANOVA 통계 분석 및 배율 변화로 필터링할 수 있습니다(그림 4). 분석 완료 후, 부분 최소 제곱법 판별 분석(PLS-DA) 모델이 생성됩니다. PLS-DA 플롯 및 그룹의 적합도(R²), 예측 능력(Q²)을 검사한 후 MPP 모델로 내보냈습니다.

일상적 분석 워크플로: Classifier 1.0 활용

개발 과정은 일상의 실험실에서 시료의 특징을 추출하고(Profinder) 이를 처리하여 모델을 얻을 수 있는(MPP) 효과적인 방법을 확보해줍니다. 새로 수집한 시료의 일상적 분류에 있어, Profinder와 MPP는 높은 수준의 전문지식이 필요하기 때문에 신속하고 간편한 분석에서 다루기에는 쉽지 않습니다. Classifier 1.0은 분석자가 저장된 Profinder 및 MPP 분석법을 가져와 새로운 시료에 적용하여 빠른 결과를 생성할 수 있게 하는 혁신적인 소프트웨어입니다.

이 소프트웨어는 분석자로 하여금 Profinder와 MPP의 사용을 요구하지 않습니다.

Classifier는 분석법과 시료 정보를 입력하는 간단한 인터페이스를 가지고 있습니다(그림 5). 시료를 제출한 후, Classifier 분석 동안에 언제든지 추가 시료를 프로젝트에 덧붙일 수 있습니다. 각 시료를 분석하는 데 단 몇 분 밖에 걸리지 않으며, 처리 과정이 시료 대기열로 이동함에 따라 데이터를 검토할 수 있습니다. 하나 또는 그 이상의 시료 결과를 포함하는 프로젝트는 저장하거나, 다시 열기하거나 또는 보고서로 내보낼 수 있습니다.

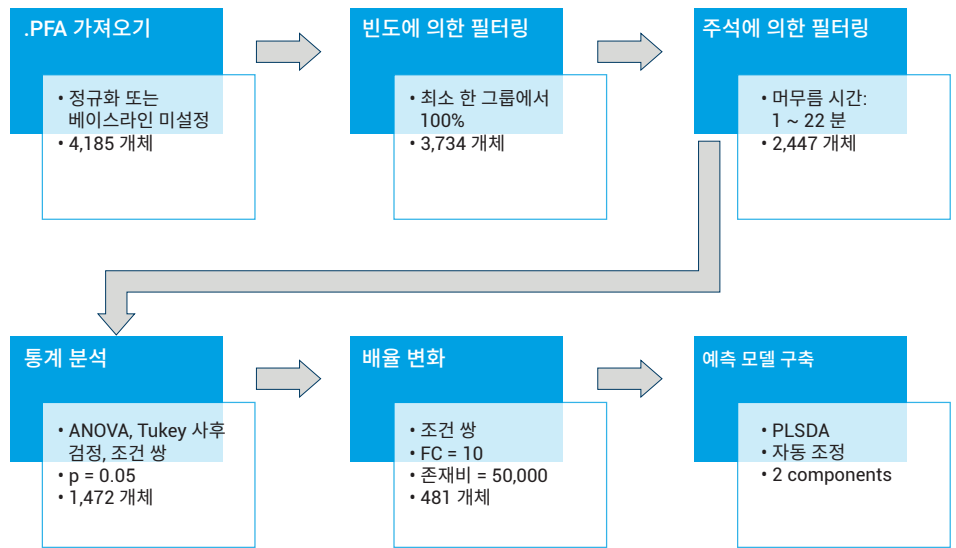


그림 4. MPP 분석 워크플로 및 주요 파라미터. 각 필터링 단계에, 남아 있는 개체(entity) 수 기록

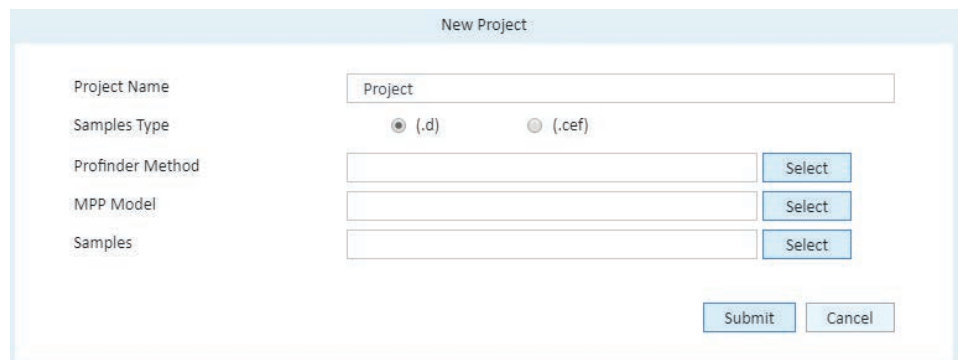


그림 5. 간단하고 사용이 쉬운 Classifier 1.0의 새로운 프로젝트 사용자 인터페이스. 분석법 개발 단계에서 생성한 Profinder 분석법과 MPP 모델을 선택. 하나 이상의 시료 추가 가능

본 연구에서는, MPP 모델, Profinder 분석법 및 모든 부정 혼입 시료를 하나의 Classifier 1.0 프로젝트에 추가하였습니다. 결과는 Sample Table(그림 6A)에 기록되었으며, 이 표의 각 행은 시료 명, 예상 분류 및 분류와 관련된 신뢰도 값을 포함합니다. 아직 분석되지 않은 미결 시료는 결과를 사용할 수 있을 때까지 Sample Table에 대기 상태('Queued')로 남아 있습니다(그림 6B). 데이터를 검토하려면 Sample Table에서 시료를 선택할 수 있습니다. 이렇게 선택하면 인터페이스가 업데이트되면서 검토한 시료의 위치가 모델의 주성분

분석(PCA) 플롯에서 검은색 마름모로 나타냅니다. 이 플롯은 Hotelling 타원 또는 95% 신뢰도 타원 내에 있는 모델 시료를 포함하고 있습니다(그림 6C). 분석한 모든 시료에 대해, 모델에 속하는 개별 특징 또한 Compound Table에서 검토할 수 있습니다(그림 6D).

이 분석에서 망고 QC 데이터는 모델 구축에 포함되지 않았지만, 대신 진품 시료에 대한 QC 체크로서 Classifier 1.0에서 분석하였습니다. 각 QC 시료는 정확하게 분류되었고, PCA 플롯은 QC의 정확한

품종과 일치하였습니다. 모델을 생성했던 6 개의 생물학적 반복 시료는 Hotelling 타원에 조밀하게 포함되어 있습니다(그림 7). 검토 시료는 PCA 플롯에서 검은색 마름모로 나타나 있습니다. Hotelling과 관련한 시료의 위치는 Sample Table에 나열된 신뢰도 값과 같이 순도를 나타냅니다(그림 6A). 시료가 순수 QC일 때, 검은색 마름모는 시료가 속하는 망고 그룹 안에 있거나 매우 가까운 곳에 있습니다(그림 7A와 7B). 시료가 부정 혼입품일 경우, 검은색 마름모는 그룹과 멀리 떨어져 나타납니다(그림 7C와 7D).

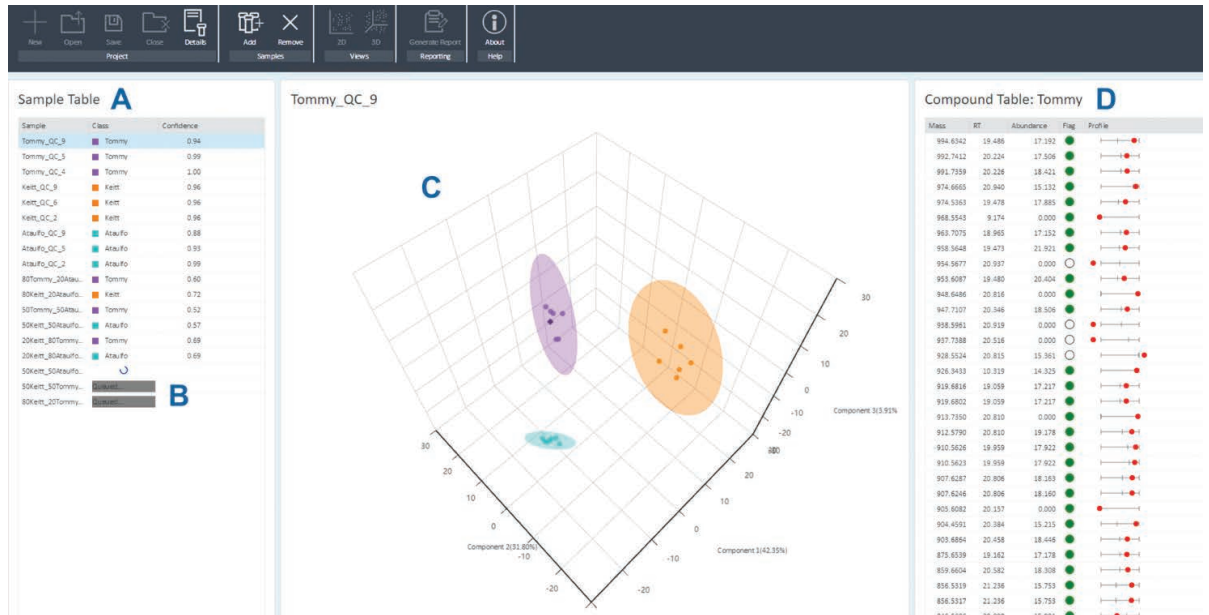


그림 6. Classifier 1.0 결과는 Sample Table(A)에 표시되며 분석되지 않은 시료는 대기중으로 나타남(B). 개별 시료의 상세 내역은 PCA 플롯(C) 또는 Compound Table(D)의 특징 상세 정보에서 확인 가능

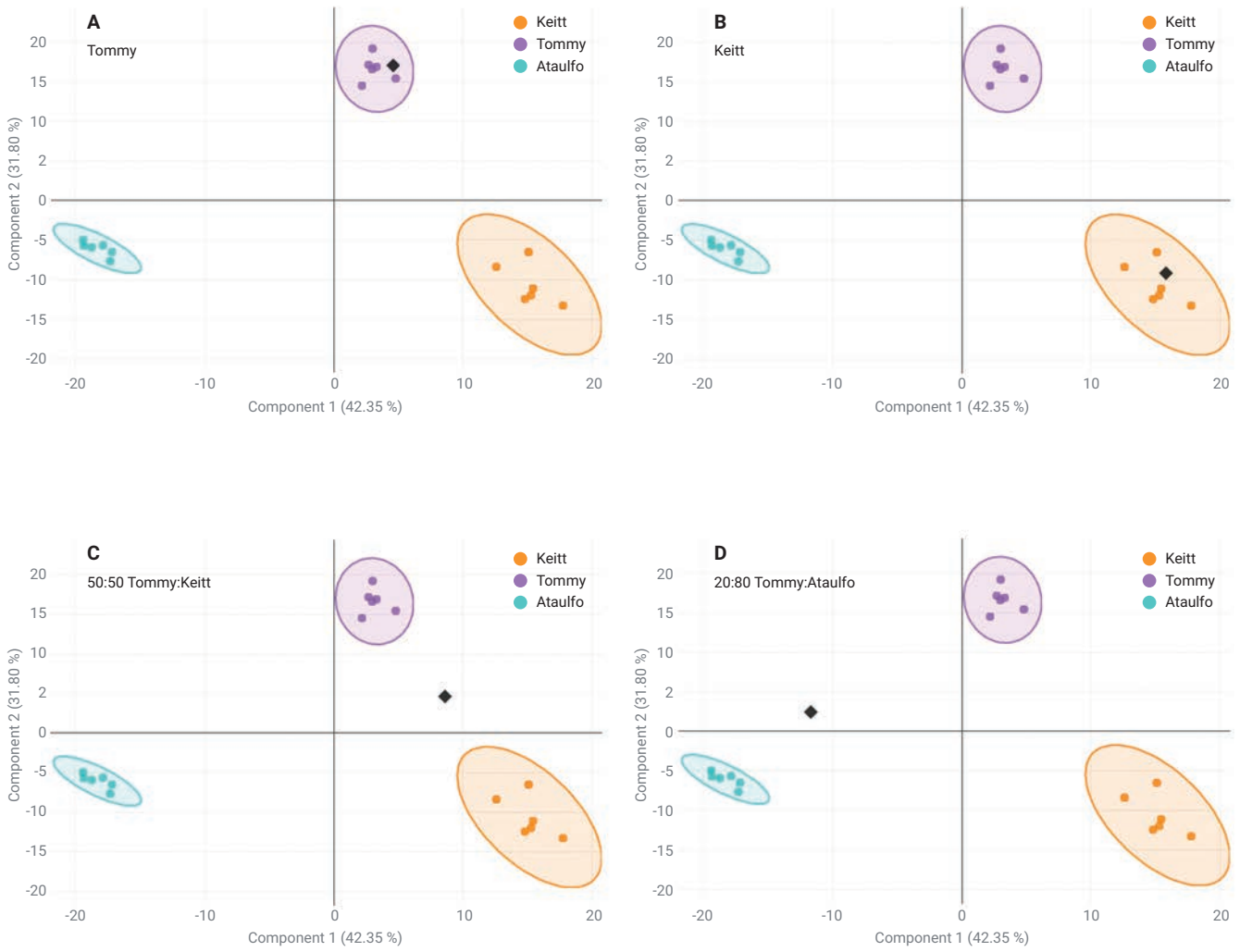


그림 7. Classifier 1.0 PCA 플롯 결과. Keitt 종류는 주황색, Tommy Atkin 종류는 보라색, Ataulfo 종류는 청록색으로 표시. 검은색 마름모는 선택한 시료를 나타냄. 순수 시료 (A) Tommy와 (B) Keitt의 경우 해당 품종 그룹 내에 직접적으로 시료 포함됨. 부정 혼입품, (C) 50% Tommy: 50% Keitt 및 (D) 20% Tommy: 80% Ataulfo 러 모델 그룹 가까이 있지 않음

그림 8에 이 연구에 대한 신뢰도 결과가 요약되어 있습니다. 순수 QC 시료의 신뢰도가 높은 반면, 부정 혼입품 시료와 음성 대조군의 신뢰도는 상대적으로 더 낮습니다. 이 경우에는 신뢰도 값만을 근거로 하였을 때 0.8의 cutoff에서 시료가 순수 또는 부정 혼입품인지를 정확하게 식별하는 데 100%의 정확도를 갖습니다. 또한 이 분석법은 첫째 날과 14번째 날에 수집된 시료에서 동일한 결과를 얻었으므로, 확장된 일련의 분석에서 우수한 결과를 유지합니다. 그리고 이 분석법은 신뢰도 값에서 5% 이하의 RSD를 보이며(n = 10) 정밀도 또한 매우 높게 나타났습니다.

분석법 개발 과학자를 위한 새로운 워크플로 개선 사항

MPP 15.0의 분석법 자동화 도구는 분석법 개발 과학자들로 하여금 분석법을 효율적으로 생성하여 일상 분석에 전달하도록 돕습니다. 그림 9에서 볼 수 있듯이, 이 도구는 분석 옵션 목록에서 간편하게 드래그 앤 드롭 선택으로 분석법을 구축합니다. 일단 분석법을 구축하면, 저장하여 모든 새로운 .PFA에 사용할 수

있기 때문에, Workflow 메뉴의 모든 단계를 클릭하며 진행할 필요가 없습니다. 또한 이 소프트웨어 개선을 통해 저장된 분석법을 간편하게 재적용할 수 있어 새로운 진품 시료를 모델에 추가하는 것이 더욱 쉽습니다. 그림 4에 나타나있는 것과 같은 통계 분석법은 추가적인 진품 시료를 포함하여 재처리함으로써 적은 시간과 적은 인적 오류로 마우스 클릭 한 번만에 업데이트된 모델을 생성할 수 있습니다.

결과 요약

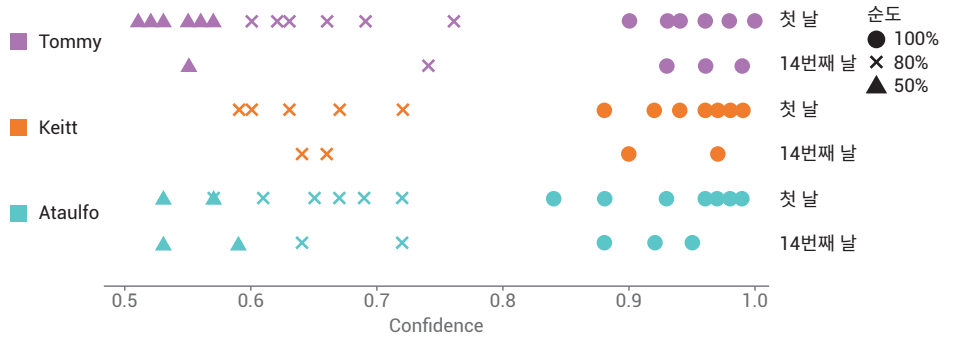


그림 8. Classifier 1.0의 망고 결과에 의한 요약 플롯. 색상은 각 시료에 대한 망고 품종 분류를 나타냄. 첫째 날 및 14번째 날의 실험 데이터 표시

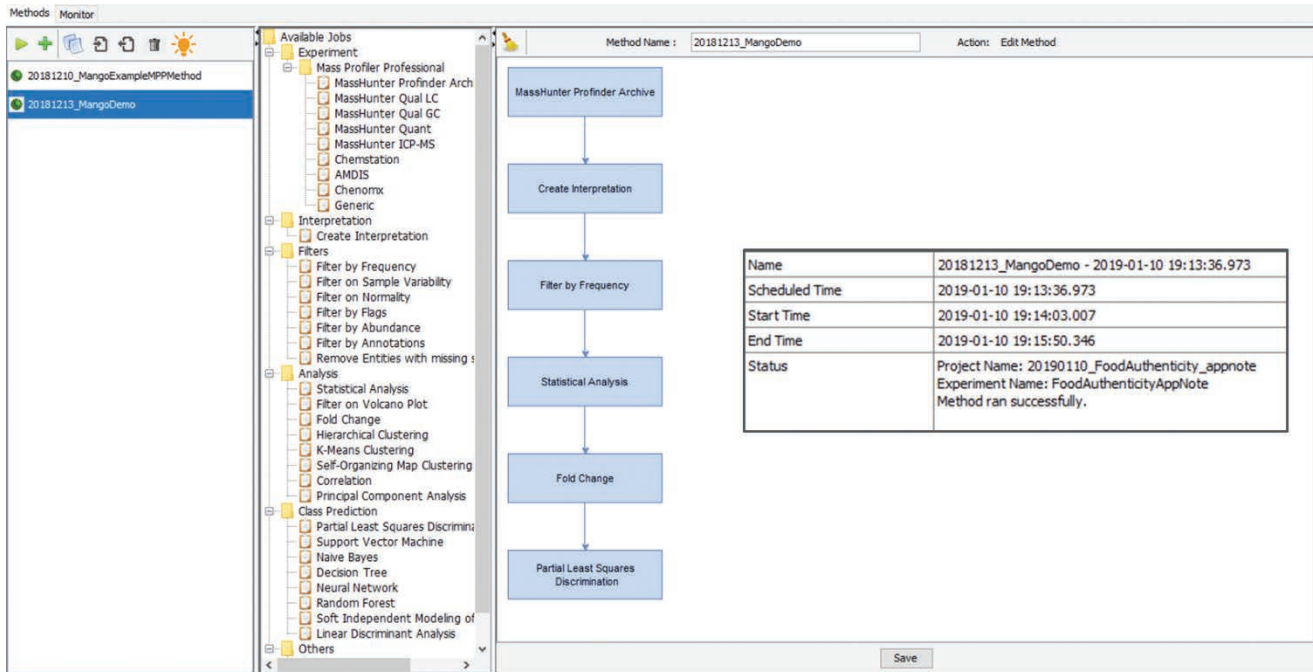


그림 9. 새로운 기능을 가진 MPP 15.0 분석법 자동화 사용자 인터페이스. 원하는 분석법의 개시를 위한 시작 버튼이 있는 분석법 목록(왼쪽 패널). 분석법에 추가할 단계를 중앙 패널에서 선택하여 오른쪽에 새로운 분석법 구축 가능. 분석법 자동화 사용으로 분석을 빠르게 수행하고 완료 후 보고서 획득(압화)

결론

위화 및 허위 라벨링된 제품 및 소재가 보편화됨에 따라, 식품 검사를 보다 일상적으로 만들 수 있는 식품 진위 판별 워크플로가 필요하게 되었습니다. 이러한 워크플로는 6546 LC/Q-TOF와 Profinder 10.0, MPP 15.0 및 Classifier 1.0을 통해 실현됩니다. 분석법 개발 과학자는 모델을 구축하는 데에 도움이 되는 더 빠르고 자동화된 워크플로를 가지게 되었으며, 일상 분석의 경우에는 분석자가 Classifier 1.0만으로 새로운 데이터의 분류 작업을 빠르게 수행할 수 있습니다. 이 워크플로는 실험실에서 소재와 제품의 품질을 탐구하는데 있어 빠르고, 명확하며, 신뢰할 수 있는 결과를 생성합니다.

참고 문헌

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

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 3월 8일, 한국에서 인쇄
5994-0694KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

