

ATRと判別分析を用いた、FT-IRによる栄養補助食品用ハーブの分類

概要

ほとんどの古典的な医薬品は、特定の化学構造を有し、特定の分子受容体を標的とします。ホリスティックおよび天然の病気の薬は一般にあまり特異的ではなく、ハーブまたは植物抽出物のような多成分の天然に存在する物質を使用します。これらの「栄養補助食品」は、免疫系の増強、器官および身体機能の調節などのさまざまな治療のための総合的な治療において広く使用されています。

消費者はしばしば、薬剤の費用をとて高価に感じたり、特定の疾患治療よりもむしろ全身の健康増進に対する欲求が高いことがあります。ほとんどの栄養補助食品は処方箋なしで入手可能です。

製薬業界ほど厳密に規制されているわけではありませんが、栄養補助食品メーカーは品質を保証するために、依然として材料（入荷原材料および最終製品の両方）の変動をモニタリングしなければなりません。有効性に関する主張がより積極的になり、広範に使用されるに従って、FDAは健康食品業界をさらに規制する可能性があるため、現在採用されているQA/QCの方法は将来的に方向転換を迫られるかも知れません。FT-IR（フーリエ変換赤外分光法）は、法規制遵守の点において、感度、選択性、スピード、妥当性確認手順に優れたメリットがあり、栄養補助食品の分析に優れた分析ツールとして機能します。また、当社のThermo Scientific™ OMNIC™ソフトウェアは、自動化のための強力なツールを提供するため、分析初心者でも最小限のトレーニングで満足な分析結果を得ることができます。

分析上の問題は、特定の化学組成を有する古典的薬物とは異なります。基本的に栄養補助食品は混合物であり、元の材料のロット間の差異のために実質的な変動が発生し得ます。本質的には非常に類似した二つの栄養補助食品であっても、同じFT-IRスペクトルは観察されません。また、生物学的な起源を持つことは、多くのハーブ粉末がセルロース、タンパク質、砂糖のような類似の成分を含んでいることを意味し、図1のような非常に類似したFT-IRスペクトルを示します。また、いくつかのスペクトルの差異は、サンプルの取り扱いや、湿度のような環境条件の変化によって引き起こされるかもしれません。外的要因によるものではない、サンプル自体の変動を監視することは、品質を保証する上で極めて重要です。

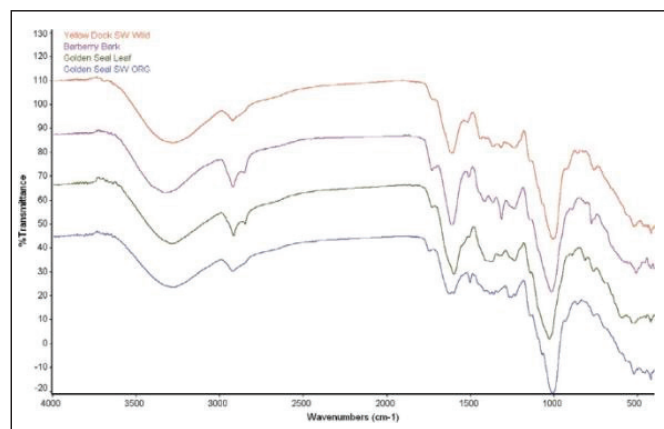


図1. 栄養補助粉末ゴールデンシール、バーベリー・バーク、イエローダックおよびゴールデンシールリーフからのスペクトル。

前述のように、多くの栄養補助食品の粉末は、それら固有のセルロース、タンパク質または糖含有量のために、類似したスペクトルの特徴を示します。このことによって、一般的なライブラリ検索を実施して一意に分類することが困難になります。生薬粉末を分類することは極めて重要ですが、生産ロットの材料の供給源を特定することも重要です。最悪の場合、ライブラリ検索は、セルロースのような大部分の成分に一致する結果をもたらします。最良の場合でさえ、ライブラリ検索では、この分析目的のために成分を十分に識別できない可能性があり、類似した一致値を有する候補の配列（検索結果「クラスター」）が出現する可能性があります。このクラスター化によって、材料を分類するのに十分な情報を得られない可能性があります。

当社のThermo Scientific™ TQ Analyst™ソフトウェアには、栄養補助食品のQCに利用できる強力なツールが含まれています。FT-IRが得意とする分子の指紋判別能力と組み合わせた判別分析（DA：Discriminant Analysis）は、栄養補助食品の評価プロセスに優れた解決策を提供します。DAは、既知の物質の主要なクラスを決定するため、および未知の物質が特定のクラスに入るかどうかを決定するための両方の分類技術として適切に機能します。これにより、FT-IRを使用して工場に入荷してくる材料をスクリーニングして、それらが主要な分類のいずれかに属するかどうかを決定することができます。

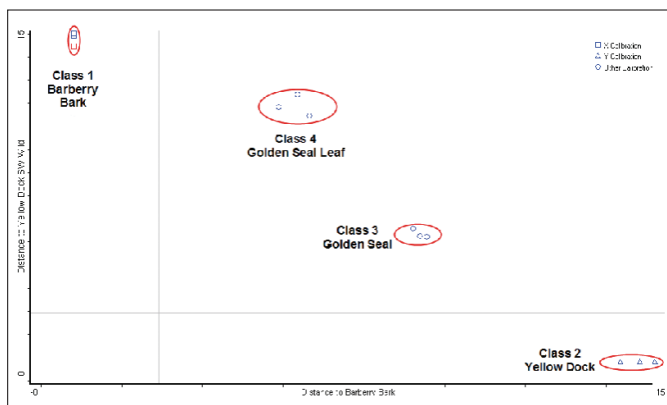


図2. 本文に記載されているように、四つのクラスのクラスター化を示すTQ Analystプロット。各点は、図3に示す標準物質の表のスペクトルにリンクされています。

既知濃度の一連の標準物質からのスペクトルを処理し、それらの関連性から検量線を作成することによって、未知の濃度のサンプルの定量評価を行うことができます。

分類プロセスは、同様に、既知の成分を有する多くの異なるバッチのサンプルからスペクトルを収集することから始まります。これらの標準はDAアルゴリズムに算入され、スペクトルの特徴および既知の同一性に基づいてクラスターを形成します。ハーブ粉末に関する例を図2に示します。そしてクラスター中心とサンプルスペクトルの「距離」を計算することによって、未知のサンプルを評価します。各クラスを中心から未知物質までの距離はマハラノビス距離として知られており、以下のように算出されます：

$$D_M = \sqrt{(X - X_{avg})^T S^{-1} (X - X_{avg})}$$

n 個のデータ点を含むスペクトルでは、 D_M はマハラノビス距離（スカラー）に等しく、 X はスペクトル（ $n \times 1$ ベクトルとして表される）、 X_{avg} は平均スペクトル（ $n \times 1$ データベクトル）、 S^{-1} は共分散行列の逆数（ $n \times n$ 行列）、 T はベクトル転置を示します。

スペクトルの任意の領域を選択して、キャリブレーションモデルを構築することができます。キャリブレーションが構築されると、このメソッドは、提供されるすべてのクラスの標準に対して D_M を計算するために、この領域を使用します。 D_M が小さければ、クラスへの帰属を示します。大きな D_M は排除を示唆します。いかなるクラスについても小さな D_M が見出されない場合、その物質は完全に未知である可能性が高いと言えます。帰属に関する閾値は、ユーザー自身で設定することができます。

別の重要な考慮すべき事項は、サンプリングです。Thermo Scientific™ Nicolet™ iS50本体に内蔵できるビルトインATRアクセサリを用いると、迅速で確実なサンプルハンドリングが実現します。ビルトインATRアクセサリは、長寿命のダイヤモンドアクセサリを組み合わせることにより、迅速なサンプリングと使いやすさの向上を実現しました。簡単に述べると、ATRでは、IR光はIR透過クリスタル（ダイヤモンド、ゲルマニウム、ZnSeまたはSi）に集束されます。結晶および付属品（たとえば単一反射または多重反射）は、試料の物理的および光学的特性に応じて最適なものを選択する必要があります。ビルトインATRアクセサリを使用すると、ダイヤモンドに少量の材料を載せた後、圧力装置を使ってサンプルに密着させるだけで測定を開始できます。混合や粉砕といった作業は不要で、数秒でデータを収集することができます。またビルトインATRはFT-IR本体の試料室を独占することなく、1台のFT-IR分光光度計をさまざまな分析目的に合理的に使用できます。

実験

この実験ではNicolet iS50 FT-IR 分光光度計とビルトインATRアクセサリを使用しました。ステンレススチールパックにろう付けされたダイヤモンドは、その硬度、スペクトル範囲（5,000～80 cm^{-1} ）、および化学的不活性により、今回の分析に理想的です。分光器にはDTGS検出器とKBrビームスプリッターを装備しました。分光計および付属品のページには窒素を使用しました。数種の栄養補助ハーブ粉末を、この試験のためにウェスタンボタニカルズ社からご提供いただきました。サンプルには、バーベリー・バーク、ゴールデンシールリーフ、ゴールデンシール、イエロードックが含まれていました。完全な中赤外域（4000～400 cm^{-1} ）にわたり、12秒（8 cm^{-1} 分解能で16回積算）でデータを収集しました。スペクトルは、さらなる処理なしでDAIに使用しました。

結果

校正スペクトルは、4種類の栄養補助ハーブ粉末の複数のサンプルセットから得ました。図2は、メソッド校正および妥当性確認から得られたグルーピングを示します。各点は、単に一つの値ではなく、スペクトルを表しています。点（スペクトル）がクラスターに近いほど、サンプルがそのクラスに属する可能性が高くなります。TQ Analystは、視覚化のために異なるクラスを選択することを可能にします。ここでは、イエロードックまでの距離をY（縦）軸に、バーベリー・バークまでの距離をX（横）軸に示します。

図2に示された標準物質のいくつかについて、校正結果を図3に示します。未知物質のクラスは、未知物質とすべてのクラスとの間の D_M を計算することで決定され、次にソフトウェアは、最低 D_M を有するクラスを選択します。

図4に示す分析レポートでは、未知試料と最も近いクラスとの間のマハラノビス距離を基に数値（クラスまでの距離）を算出しています。

イン デックス	スペクトルの表	実際のクラス	計算クラス	距離	次点のクラス	次点の距離	イエロードック SWワイルド までの距離	バーベリー・ バークの距離
1	バーベリー・ バーク	バーベリー・ バーク	バーベリー・ バーク	0.8158	ゴールデン シールリーフ	6.0355	14.4735	0.8158
2	ゴールデンシール SW ORG	ゴールデンシール SW ORG	ゴールデンシール SW ORG	0.8175	イエロードック SWワイルド	6.2351	6.2351	9.5635
3	イエロードック SWワイルド	イエロードック SWワイルド	イエロードック SWワイルド	0.8163	ゴールデン シールSW ORG	6.3185	0.8163	14.8369
4	バーベリー・ バーク	バーベリー・ バーク	バーベリー・ バーク	0.8154	ゴールデン シールリーフ	6.4292	14.9331	0.8154
5	ゴールデン シールリーフ	ゴールデン シールリーフ	ゴールデン シールリーフ	0.8163	バーベリー・ バーク	5.8941	11.8448	5.8941
6	ゴールデン シールリーフ	ゴールデン シールリーフ	ゴールデン シールリーフ	0.8165	バーベリー・ バーク	6.6479	11.4731	6.6479
7	ゴールデン シールリーフ	ゴールデン シールリーフ	ゴールデン シールリーフ	0.8166	バーベリー・ バーク	6.3551	12.3818	6.3551
8	イエロードック SWワイルド	イエロードック SWワイルド	イエロードック SWワイルド	0.8161	ゴールデン シールSW ORG	5.9025	0.8161	14.3553
9	イエロードック SWワイルド	イエロードック SWワイルド	イエロードック SWワイルド	0.8168	ゴールデン シールSW ORG	6.8221	0.8168	15.2121
10	ゴールデン シールSW ORG	ゴールデン シールSW ORG	ゴールデン シールSW ORG	0.8171	イエロードック SWワイルド	6.2598	6.2598	9.3888
11	ゴールデン シールSW ORG	ゴールデン シールSW ORG	ゴールデン シールSW ORG	0.8165	イエロードック SWワイルド	6.5762	6.5762	9.2105
12	バーベリー・ バーク	バーベリー・ バーク	バーベリー・ バーク	0.8171	ゴールデン シールリーフ	6.4466	15.0045	0.8171

図3. DA検量に使用される標準物質の部分的なリスト。材料の「実際の」クラス（ユーザーによって入力される）は、その分類の適切さを確実にするために、計算されたクラスと比較します。DM値は、そのクラスの中心までの距離を示します。距離が小さいほど、分類一致は良好でした。

方法の名称：	ホリスティックハーブの分類のための識別分析
メソッドファイル名：	C:\My Documents\Omnic\Quant\quant for herbs\Herbals Application Note.qnt
改訂：	3
保存日時：	Thu Jun0810:27:572006 (GMT-07:00)
スペクトルのタイトル：	Barberry Bark 2
スペクトルのファイル名：	C:\My Documents\Omnic\Spectra\Application Western Botanical\quant test BB2.SPA
スペクトルの日付：	Thu Mar1610:33:512006 (GMT-08:00)
完全なスペクトル適合：	97.7
測定領域適合：	97.7
インデックス：	1
クラス名：	バーベリー・バーク
クラスまでの距離：	0.82
合否：	合格

図4. 未知の物質のレポートの例。レポートには、クラス名、そのクラスの平均点までの距離、および分類に基づいた合格または不合格の結果が含まれます。

理想的には、DA校正では、クラスは重複なしで十分に分離されることになります。図2では、プロットの左上領域に示されるデータは、バーベリー・バーク (x軸値が小さい) と強く相関し、イエロードック (y軸値が大きい) と弱く相関します。右下のデータはイエロードックと同様に強く相関しますが、バーベリー・バーク (小さいy、大きいx) とはほとんど相関しません。対角線付近のデータクラスターは、ゴールデンシールおよびゴールデンシールリーフのために、軸に沿った材料との相関が悪い (xおよびyの両方が大きいため) ことがわかります。TQ Analystでは、相関に関するすべての可能性を閲覧でき、一連の対に関する相関プロットを作成することができます。

図3の校正表は、複数の情報を示しています。各検量スペクトルのタイトル、ユーザーによってサンプルが割り当てられたクラス、DA検量によって決定されたクラス (最低D_M)、関連D_M値、次のもっとも近いクラスの名前およびD_Mがすべて報告されます。この校正表の各スペクトルは、マハラノビスプロットの点にリンクされています。標準が適切にブルーピングされていない場合 (たとえば、D_MがBであることを示す一方、Aに分類されている場合)、エラーメッセージがポップアップ表示されます。また、スペクトル適合および距離が所与の閾値を超えると警告が出ます。

校正済みのメソッドを用いた未知物質の分析を図4に示します。
この場合、ユーザーがハーブ粉末をどのクラスに分類するべきかをソフトウェアで設定しました。カスタマイズ可能なレポートは、未知のスペクトルがそのもっとも近いグループ内にどれくらいうまく適合するかを数値化し、そのグループの平均に関してマハラノビス距離を算出します。また、レポートには明確な合格／不合格も記載されています。ここにおける不合格とは、物質がDAによって別のグループに分類されているか、分類されるグループが見つからなかったことを示します。
このように簡単なSOP（標準操作手順）を開発することができます。ビルトインATRでサンプリングを実行し、予想される識別を入力します。データは処理され、TQ Analystは以下のようなガイダンスを示します：合格の場合、その原材料を使うことを許可します。不合格の場合、その原材料はさらなる分析を必要とするため隔離すべきと指示されます。この方法を使用することで、ユーザーは分光法に関する広範な知識なしで、確実に原材料の評価を行うことが可能です。

結論

TQ Analyst内の判別分析手順は、Nicolet iS50 FT-IR 分光光度計およびビルトインATRと組み合わせることで、栄養補助食品用ハーブ粉末の強力な特性評価用分析ツールとなります。これらの原材料の迅速かつ確実な分類を行える、スクリーニングおよび品質保証両方において信頼できるツールです。このように低コストかつ高スループット、そしてシンプルな操作性を備えたハードウェアとソフトウェアは、急速に成長する栄養補助食品産業のための理想的なソリューションとなります。

© 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転載を禁じます。 FTIR109-A2008OB
ここに記載の会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
また、記載されている製品は研究用機器であり、診断目的およびその手続き上での使用はできません。
記載の価格は 2020 年 8 月現在のメーカー希望小売価格です。消費税は含まれておりません。
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
実際の販売価格は、当社販売代理店までお問い合わせください。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC