

# イメージング質量分析による食品の品質・安全性評価法の開発

福井県立大学 生物資源学部  
平 修

## 1. 研究の目的と背景

我々は、食品を摂取することで、良好な健康状態を保持している。故に、摂取する食品の品質・安全性を評価、保証することは非常に重要である。

二次元的に質量分析 (MS) を行うことにより種々の化合物の分布状態を明らかにできるイメージング質量分析を用いて、多成分からなる食品 (農産物) の、機能性成分、および残留農薬分布を視覚的に明らかにし、新規品質評価技術を開発することが目的である。

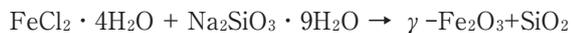
申請者は食品に含まれる機能性成分や残留農薬の検出と可視化を試み、品質と安全性を同時に保証するための研究を行った。

## 2. 研究の方法

### イオン化支援剤としてのナノ微粒子の合成

湿式沈殿法にて、コア成分を金属酸化物とし、その周りをシラノール基で一層被覆されたナノ微粒子を合成する。

(例) 酸化鉄をコアにしたナノ微粒子の合成



$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  の水溶液を Fe : Si=1 : 1 のモル比で混合し、遠心分離機で沈殿物を分離させる。その後、沈殿物を洗浄・乾燥させる。電気炉を用いて、大気中で焼成温度 873K において図 1 の焼成プロセスで焼成する。焼成温度により粒径を制御した。8 種類 (Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Ag) のコア成分の異なるナノ微粒子を合成し、物理化学的な特性評価を行った。

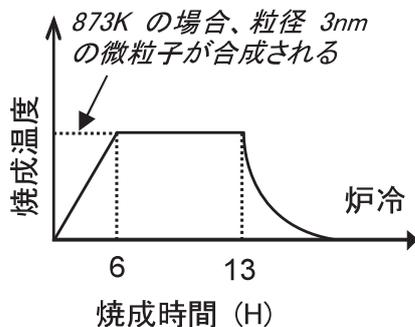


図 1 焼成時間と温度の関係

### ナノ微粒子の物理化学的特性評価

- 透過型電子顕微鏡 (TEM), X 線回折 (XRD) : 構造, 粒径評価
- 赤外分光法 (IR) : 表面修飾確認
- zeta 電位 : 表面電位 (表面修飾確認)
- 吸光度 : 質量分析に用いる N2 (337 nm), YAG (355 nm) レーザー波長付近への吸収特性評価。

### Nano-PALDI 質量分析による解析対象物質群イオン化条件の検討

質量分析装置は、一般的な、レーザー脱理 / イオン化飛行時間型 (LDI-TOF-タイプ (TOF = time of flight)) を用い、脂質、ペプチド、配糖体など少なくとも 2 種以上が混合されたサンプルを混合微粒子群により MS 分析し、それぞれの解析対象物質のイオン化を確認する。

今回、農薬群を主な標的物質とし予定よりも研究が進捗したため、他の生体物質、化合物のイオン化についても検討した。

### イメージング質量分析 (MS) による食品含有成分の局在解析

#### 芋類の天然毒の局在解析

ジャガイモにはソラニン、チャコニンといったアルカロイド系の天然毒が含有されていることが分かっており、特に発芽した部位に多く含まれていることも報告されている。しかし、これらは HPLC や、LC-MS などのクロマトグラム、スペクトルから検出しているもので、詳細な局在の報告はない。そこで、イメージング MS を用いて、これら天然毒の局在解析を行った。

サンプルを液体窒素で急速凍結し、サンプル (野菜) の連続切片 (50  $\mu\text{m}$  厚) を 2 枚作成する。(イメージング MS 用と染色用)

- イオン化支援剤を切片に噴霧した後、イメージング MS を行う。

野菜の切片に対し、一定間隔 (10 ~ 100  $\mu\text{m}$ ) 毎に 2 次的に質量分析測定を行う。注目するシグナル (成分) に対して画像化することでイメージング MS 像を取得する。

## 3. 研究内容

- 1) イオン化支援剤としてのナノ微粒子の合成
- 2) ナノ微粒子の物理化学的特性評価
- 3) Nano-PALDI 質量分析による解析対象物質群イオン

化条件の検討

4) イメージング質量分析 (MS) による食品含有成分の局在解析

#### 4. 研究の実施経過

1) イオン化支援剤としてのナノ微粒子の合成及び, (2) ナノ微粒子の物理化学的特性評価  
例として, 酸化鉄をコアとし, 粒径 3 nm, アミノ基,

水酸基が表面に付与されているナノ微粒子の特性解析結果を図 2 に示す。

他の金属塩化物を用いて合成したナノ微粒子についても同様の実験を行った。それらの結果から, いずれもそれぞれの金属酸化物をコア成分とし, 表面が水酸基およびアミノ基, シラノール基で被覆されたナノ微粒子であることが明らかになった (Table 1)。

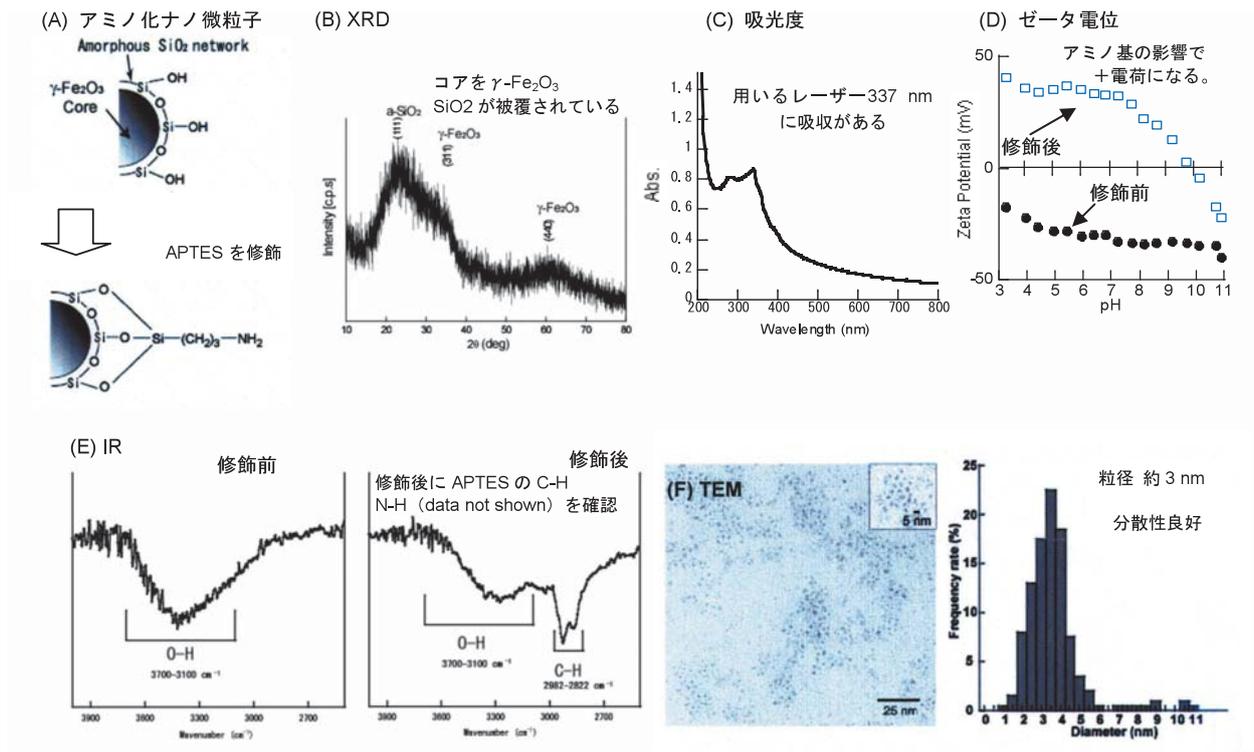


図 2 ナノ微粒子の特性評価

アミノ基修飾図 (A), XRD (構造) (B), 吸光度 (光吸収) (C), ゼータ電位 (表面電位), IR (修飾基確認) (E), TEM 像 (形態) (F)

Table 1 Characterization of nanoparticles

Core element	Structure	Functional group	Diameter (nm)
Ti	TiO <sub>2</sub> (Brookite)	OH, NH <sub>2</sub>	3.2
Cr	Cr(OH) <sub>3</sub> · 3H <sub>2</sub> O	OH, NH <sub>2</sub>	16.2
Mn*	Mn <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	OH, NH <sub>2</sub>	4.8
Fe**	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Macaulayite)	OH, NH <sub>2</sub>	3.6
Co***	Co(OH) <sub>2</sub>	OH, NH <sub>2</sub>	3.0
Ni	Ni(OH) <sub>2</sub> (Theophrastite)	OH, NH <sub>2</sub>	6.1
Cu	CuO	OH, NH <sub>2</sub>	8.1
Ag	Ag <sub>2</sub> O	OH, NH <sub>2</sub>	9.3

### 3) Nano-PALDI 質量分析による解析対象物質群イオン化条件の検討

「農薬の簡便検出」の技術開発を目的とした。特に標的とした農薬は、稲作栽培に除草剤としてよく用いられる4種類の農薬 (bromobutide, pentoxazone, pyriminobac methyl, bensulfuron methyl) である。米の生産地域は広く、

世界でも主食の一つとされる重要な穀物であるため、残留農薬の検査は重要である。本手法を用いて、まず、農薬群のイオン化に最適なナノ微粒子を選定することにした。次に、合成したナノ微粒子を用いて上記農薬群標品の検出をそれぞれ行い、得られた結果を統計学的に考察することで農薬検出に適したナノ微粒子を決定した。

Table 2 Ion intensity of standard pesticides by Nano-PAKDUNS

Pesticide	Core element of NPs	Ti	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Ag
bromobutide +H	(m/z312)	2668	2121	3466	25000	893	n.d.	2342	n.d.
pentoxazone +H	(m/z354)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pyriminobac methyl +H	(m/z362)	863	1708	n.d.	2317	3517	1005	6538	1505
pyriminobac methyl+Na	(m/z384)	7214	2808	1248	3395	n.d.	4744	22000	3999
pyriminobac methyl+K	(m/z400)	5245	5140	1649	6262	n.d.	1833	6586	1608
bensulfuron methyl +H	(m/z411)	289	579	2788	2452	1196	n.d.	2348	2432
bensulfuron methyl +Na	(m/z433)	305	655	13000	4375	n.d.	n.d.	4375	2593
bensulfuron methyl +K	(m/z449)	243	988	13000	4890	n.d.	n.d.	4900	2311

n.d: not detected

Table 2 に示された農薬群の質量分析データをもとにナノ微粒子間の類似性を決定し統計学的にグループ化すると、A群 (Fe), B群 (Cu), C群 (Mn), D群 (Co, Cr, Ti, Ag, Ni) の4つに分けることができた。Table 2の結果から、A, B, C, D群の順に検出時のイオン強度が高い。従って、この順に農薬を高率的にイオン化できると考えられる。

#### ○派生研究

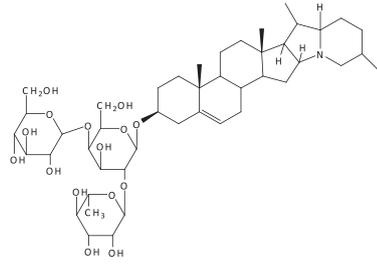
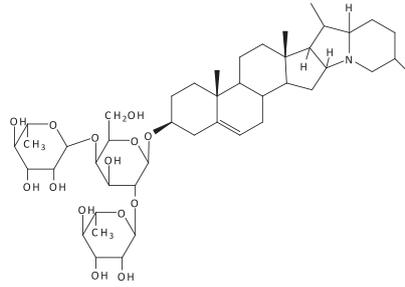
ここで、酸化銀をコアとしたナノ微粒子は、標的物質の質量+銀イオンという特異的なスペクトルが検出され、この減少を用いてイオン化しにくい物質である、チミン、ミノキシジル (育毛剤) のイオン化高率が向上するかを検討した。結果として、有機マトリクス、酸化鉄ナノ微粒子では、チミンを検出できないのに対し、酸化銀ナノ微粒子は、

チミンの質量 (126) に Ag107, Ag109 が付加した、m/z 233.4 と 235.4 が検出できた<sup>1)</sup>。

#### 4) イメージング質量分析 (MS) による食品含有成分の局在解析 (未発表データ)

市販品のジャガイモ (男爵) を冷暗所で2ヶ月保存した後、発芽を確認したものを用い、凍結切片を用いた。標的物質を、 $\alpha$ -ソラニン (Mw 867.5),  $\alpha$ -チャコニン (Mw 851.5) とした。これらが、MALDI法でイオン化することを確認できた。

$\alpha$ -ソラニン,  $\alpha$ -チャコニンは、芽表面 (周皮) と、周皮に同様に局在していることが明らかになった。また、細胞分裂の盛んな形成層、我々が食する塊茎にはほとんど存在していないことがわかる。

 $\alpha$ -ソラニン(Mw 867.5) $\alpha$ -チャコニン(Mw 851.5)

(A)ジャガイモの凍結切片光学像

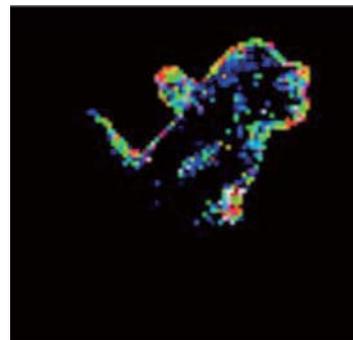
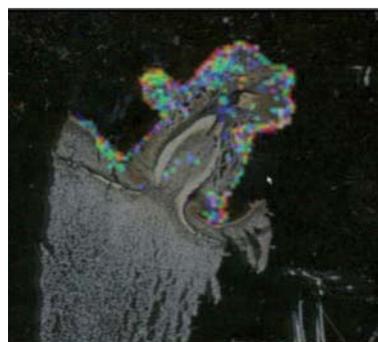
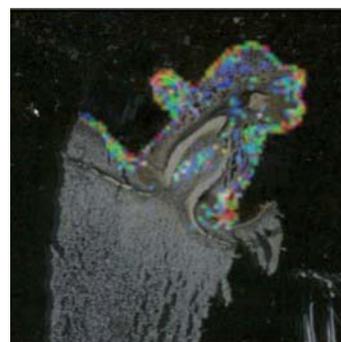
イメージング MS 条件

マトリクス:CHCA

解像度:200  $\mu$ m

測定イオン: ポジティブイオン

(B)ジャガイモのイメージング MS 像

 $\alpha$ -ソラニン $\alpha$ -チャコニン $\alpha$ -ソラニンと光学像との重ね合わせ像 $\alpha$ -チャコニンと光学像との重ね合わせ像図3  $\alpha$ -ソラニン (Mw 867.5) と,  $\alpha$ -チャコニン (Mw 851.5) に対するイメージング MS 像

## 5. 研究から得た結論・考察

### Nano-PALDI MSによる農薬検出について

ナノ微粒子の種類によりイオン化できる農薬が異なることが示唆された。実験結果を統計処理することで標的物質に適したナノ微粒子を選択できることも示唆できた。これまで検出が困難とされてきた物質についてもイオン化できたことは大きな貢献である。

### イメージング MSによる食品含有成分局在解析について

これまで、ジャガイモの毒は芽に多いとされ、発芽後は深く塊茎部まで抉って除去していたが、イメージング MSの結果では、周皮と、芽の表面に存在している以外は、ほとんどソラニン類は局在していない。周皮に存在していることも、皮を除いて食することを推奨する根拠となる画像を得ることができた。

このように、天然毒の局在を可視化した例はないことから、食品の安全性の指標として質量分析技術が貢献できることを示したことは大きいと考えられる。

## 6. 残された問題、今後の課題

今回、Nano-PALDIによるナノ微粒子の選定は、実験値と統計処理を用いたいわば力技であり、今後、ナノ微粒子によるイオン化の原理などを追及することで理論的に、標的物質のイオン化に適したナノ微粒子の選定を実現したい。

局在解析についても、サンプルの発芽を時系列でイメージするなどして、今回示した結果にさらなる根拠を与えることで、さらに食の安全に対してさまざまな提案ができると考える。

## 7. 謝辞

今回、小職の研究を採択していただいた(公)東洋食品研究所に感謝いたします。本助成を用いて、多くの科学的データを積み重ねることができ、また、論文発表<sup>2)</sup>、学会発表<sup>3)</sup>、を行うことができました。重ねて御礼申し上げます。

## 8. 成果

- 1) S. Taira, H. Taguchi, R. Fukuda, K. Uematsu, Y. Ichiyanagi, Y. Tanaka, Y. Fujii, H. Katano. Silver Oxide Based Nanoparticle Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for the Detection of Low Molecular Weight Compounds. *Mass Spectrometry* 3 : S0025-S0025, 2014.
- 2) S. Taira, K. Uematsu, D. Kaneko, H. Katano. Mass Spectrometry Imaging : Applications to Food

*Science. Anal. Sci.* 30 : 197-203, 2014.

- 3) S. Taira, (招待講演) "Nanomaterial for SALDI MS' 4<sup>th</sup> Asia Oceania Mass Spectrometry Conference (Taipei, Taiwan) (10-12 July, 2013)
- 平 修 (依頼講演) 「ナノ微粒子質量分析法による食品分析」 第77回北陸質量分析談話会 2013年6月24日
- 平 修 (依頼講演) 「ナノ微粒子支援型質量分析 (Nano-PALDI MS) の生体分析および可視化」 第62回分析化学会年会 2013年9月12日
- 平 修 (依頼講演) 「バイオ質量分析イメージング : 見えないものを見る」 第6回北陸合同バイオシンポジウム 2013年11月9日
- 平 修 (招待講演) 「ナノ微粒子質量分析 (Nano-PALDI MS) による核酸の特異的イオン化」 第61回イオン反応研究会 2013年11月23日
- 平 修 (依頼発表) 「測れない物を測る, 見えない物を見るナノ科学」 JAIST/i-BIRD 主催マッチングセミナー 2014年2月26日