

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：13302

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710124

研究課題名（和文） ナノ微粒子支援型質量分析による食品多成分評価法の開発

研究課題名（英文） Food analysis by Nano-Particle Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (Nano-PALDI MS)

研究代表者

平 修 (TAIRA SHU)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・助教

研究者番号：30416672

研究成果の概要（和文）：Nano-PALDI MSを用いて、これまで低分子が測定しにくかったMALDI法に比べ、測定対象物質のみをイオン化、検出することができた。具体的に、食品の検出に適したナノ微粒子を合成することができた。食品として、キュウリ、生薬、農薬などを標的として網羅的解析および機能性成分の局在などをイメージングした。本研究において、Nano-PALDI法が、生体物質、低分子化合物の検出および局在解析として適していることを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Our pilot study showed that the nanoparticles could ionize the food complex sample and image the localization of functional component without the aid of chemical and liquid matrices used in conventional MS methods. Iron oxide nanoparticle is suitable to detect nutrition. Analysis of the MS/MS spectra obtained using nano-PALDI MS will yield information regarding the chemical structure of the analyte.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ナノバイオ、質量分析

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：Nano-PALDI、質量分析、食品、農薬、イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

食品を摂取することで、我々は良好な健康状態を保持している。その食品の品質を簡便、迅速に評価することは、食の安全・安心を保証する上で重要である。食品が我々に与える影響は、多成分の相乗的作用、あるいは、生体代謝物質との複合的な作用の結果として成立しており、それは食品の品質に大きく左右される。「食品自体」と、「食品が生体に与える影響」の2つを科学的に解析することが、食品の品質評価向上につながると研究代表者は考えている。しかし、多成分から構成されている食品の品質を一度の分析で評価することは難しい。これまで食品の品質評価は、食品に含まれる多成分を、成分毎に分離、抽

出し、それぞれを分析する手法が一般的であり、実験が煩雑で時間を要する、サンプルロスの発生で食品の全体像（含有成分、成分バランス）を把握することが困難である。また、食品が生体に与える影響は、成分の複合的動態が重要であることは国内でも提唱されている。海外では、ニュートリゲノミクス（栄養遺伝学）を用いて食品の機能を解明しようとしている。食品が与える影響は単一の各種成分（アミノ酸、ビタミン、脂質、サポニン等）で議論されているが、食品全体像に対しての研究は、良い解析技術・手法がないため殆ど実現されておらず、簡便に全体像が把握できる技術開発が必要である。質量分析は、一度に高感度、広範囲に大量の

物質を検出可能で、複合成分の解析に適している。しかし、「検出=イオン化された」ということであり、通常の質量分析では全ての含有成分をイオン化（検出）しているとは言えない。また、マトリクス支援型イオン化 (MALDI) 法 MS ではマトリクス自体のシグナル ( $m/z$  200-500) が検出されるため低分子物質の解析には不向きである。

## 2. 研究の目的

ナノ微粒子をイオン化支援剤として用いる質量分析法 (Nano-particle Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (Nano-PALDI MS)) と、MS イメージング法を用いて、簡便に食品の品質を評価する、「新規食品評価法」の開発が目的である。食品多成分一斉解析のために、広範囲な分子領域と多種類の成分に対応する Nano-PALDI MS を開発する。具体的には、表面修飾、コア成分を検討した種々のナノ微粒子イオン化支援剤の合成と、それらの混合比率や成分のイオン化条件の検討をする。食品品質評価に MS イメージングを用いて食品に含まれる成分の局在、含有割合を視覚的に提供する。最後に、食品成分が生体 (細胞レベル) に与える影響を解析することで、食品自体と、その機能の品質を評価する。

## 3. 研究の方法

(1)-①. イオン化支援剤としてのナノ微粒子の合成粒径・コア・修飾成分の検討  
・湿式沈殿法にて、ナノ微粒子を合成する。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  $\text{Fe}:\text{Si}=1:1$  のモル比で混合し、遠心分離機で沈殿物を分離させる。沈殿物を洗浄・乾燥させる。

(1)-②. ナノ微粒子による食品成分、生体成分、農薬のイオン化  
・食品および生体構成成分 (脂質、ペプチド、糖、配糖体、核酸など) と、農薬、(100 pmol ~ 1 fmol /  $\cdot$  l) を各ナノ微粒子によりイオン化し、MS 測定を行う。  
・得られた MS スペクトルから主成分解析法でナノ微粒子のグルーピングを行う。統計学的にナノ微粒子と解析対象物質の関係を明らかにし、どのナノ微粒子がどの標品をイオン化するのに最適化なのかを決定する。

(2)-①. 食品個体の質量分析イメージング (MSI)

・サンプルを液体窒素で急速凍結し、サンプル連続切片 (50  $\cdot$  m 厚) を 2 枚作成する。(MS 用と染色用)

(2)-②. で得られた混合ナノ微粒子群 (メタノール懸濁) を、切片に噴霧する  
・2 次的に nano-PALDI MS (解像度 10~

100  $\cdot$  m) を行い、イメージング像を得る。野菜、食肉類に含まれる成分群 (①と同様、ペプチド、脂質など) を解析対象とする。

## 4. 研究成果

食品を構成する標品 (脂質、ペプチド、配糖体、核酸など) をイオン化できるナノ微粒子を開発した。各金属酸化物 (コア成分は、Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Ag) をコアにしたナノ微粒子を一段階の合成法で合成した。Mn は、配糖体、脂質を、Fe は核酸を高率にイオン化することを確認した。特に、統計学的手法を駆使したことで、ナノ微粒子と食品成分イオン化高率を関係が明らかにできた。その結果より、配糖体 A, B の食品成分に対し、それぞれイオン化に適した 2 種類のナノ微粒子を混合すると配糖体 A, B をより高率にイオン化することを発見した。

ナノ微粒子の機能化に伴い、物質を選択的にイオン化する手法を開発した。ナノ微粒子表面に、アミノ基、カルボキシル基、フェニル基を修飾した。特に、フェニル基修飾酸化鉄ナノ微粒子においては、芳香環物質と非芳香環物質が混在した溶液にフェニル基酸化鉄ナノ微粒子を添加すると芳香環物質のみを選択的に補足・回収することができた。本ナノ微粒子は、質量分析にかけることができ、回収ナノ微粒子にレーザーを照射すると、芳香環物質が検出された。つまり、 $\pi$ - $\pi$  相互作用によりナノ微粒子が芳香環を捕捉したため、選択的検出が可能になった。食品成分にも応用ができるため本年は食品成分検出のためのナノ微粒子開発に成功した。Nano-PALDI MS を用いて、これまで低分子が測定しにくかった MALDI 法に比べ、測定対象物質のみをイオン化、検出することができた。

次に、核酸を酸化鉄ナノ微粒子を用いて、Nano-PALDI MS 法でイオン化すると、核酸内のリン酸基 2 個に対し、1 個の二価鉄イオン (以下  $\text{Fe}^{2+}$ ) が配位される。これが核酸特異的な事象であり、質量を測定できる他、 $\text{Fe}^{2+}$  の付与数から塩基鎖長を決定できる。本成果は英国王立化学会の Analyst (2012 年 4 月号) に表紙として掲載されている。高麗人参に関して、2D マッピング法を用いて、簡便に成分群を識別できた。特に、カルスと高麗人参 (根) では、カルスに有効成分が多く含有していること、カルスでも培養条件が異なることで含有比率、成分が異なることを簡便に示すことができた。農薬に関して検出に最適なナノ微粒子を探索した。8 種類のコア成分 (Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Ag) の異なるナノ微粒子を合成した。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。最後に、自作した小型水田の田面水

に含まれる残留農薬を経時的に検出した。クラスター解析により、農薬検出に適したナノ微粒子の選定を行った。選定したナノ微粒子が、実サンプルを測定する上でも有効であることを実証した。本研究において、Nano-PALDI法が、生体物質、低分子化合物の検出法として適していることを示すことができ、それが医、工、農学分野へ還元できる技術であることから、今後も研究を続けることでさらなる発展を目指す。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. 平 修、小西 康子、金子 大作、一柳 優子 「ナノ微粒子支援型質量分析法による残留農薬検出法」 *日本食品工学会誌* (査読有) **14** 9-17 (2013).
2. I. Osaka, H. Hisatomi, Y. Ueno, S. Taira, Y. Sahashi, H. Kwasaki, R. Arakawa “Two-dimensional Mapping Using Different Chromatographic Separations Coupled with Mass Spectrometry for the Analysis of Ginsenosides in Panax Ginseng Root and Callus” *Analytical Sciences* (査読有) **29**, 429-434 (2013)
3. S. Taira, D. Kaneko, Y. Kawamura-Konishi, Y. Ichiyanagi “Application of functionalized nanoparticle for mass spectrometry” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (in press) (査読有) (2012)
4. S. Taira(Corresponding), I. Osaka, S. Shimma, D. Kaneko, T. Hiroki, Y. Kawamura-Konishi, Y. Ichiyanagi “Oligonucleotide analysis by nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry” *Analyst*, **137** 2006-2010 (Cover Article) (2012) (査読有)
5. S. Taira(Corresponding), D. Kaneko, K. Onuma, A. Miyazato, T. Hiroki, Y. Konishi-Kawamura, Y. Ichiyanagi “Synthesis and characterization of functionalized magnetic nanoparticles for the detection of pesticide” *International Journal of Inorganic Chemistry* 7 pages doi:10.1155/2012/439751(2012) (査読有)
6. S. Taira, M. Hashimoto, K. Saito, O. Shido “Visualization of decreased docosahexaenoic acid in the hippocampus of rats fed an n-3 fatty acid-deficient diet by imaging mass spectrometry” *Journal of Biophysical Chemistry* **3**, 221-226 (2012) (査読有)
7. S. Taira(Corresponding), S. Shimma, I. Osaka, D. Kaneko, Y. Ichiyanagi, R. Ikeda, Y. Konishi-Kawamura, S. Zhu, K. Tsuneyama, K. Komatsu ” Mass spectrometry imaging of the capsaicin localization in the capsicum fruits” *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* **1**, 61-65 (2012) (査読有)
8. S. Taira(Corresponding), D. Kaneko, K. Yokoyama, T. Sawaguchi “In situ scanning tunneling microscopy study of interfacial structures of self-assembled monolayers of 3-(2-pyridyldithio)propionyl hydrazide on Au(111)” *Journal of Molecular Imaging & Dynamics* (in press) (2012) (査読有)
9. S. Taira, S. and Y. Ichiyanagi “Analysis of Complex Materials using Functionalized Magnetic Nanoparticles”. *Magnetic Nanoparticles: Properties, Synthesis and Applications* Chap. **5**, 179-204 (2012) (査読有)
10. S. Taira, Y. Sahashi, S. Shimma, T. Hiroki, Y. Ichiyanagi “Nanotrap and mass analysis of aromatic molecules by phenyl group-modified nanoparticle” *Analytical Chemistry* **83** 1370-1374(2011) (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

1. 平 修、「ナノ微粒子質量分析 (Nano-PALDIMS) の低～高分子の網羅的検出」 2012年10月25-26日、愛知、名古屋、第17回高分子分析討論会 (ポスター) (審査員賞)
2. 平 修、「イメージング質量分析による食品・生薬品質評価」第7回メタボロームシンポジウム 2012年10月11日、鶴岡市、山形県 (招待講演)
3. Y. Ueno, I. Osaka, H. Hisatomi, S. Taira, H. Kawasaki, R. Arakawa ” Mass spectrometric analysis of ginsenosides in Panax ginseng root and callus using pseudo two-dimensional liquid chromatogram” 19<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference 2012, Kyoto, Japan Sep. 15-21 (Poster) (2012)
4. S. Taira, D. Kaneko, Y. Konishi-Kawamura, Y. Ichiyanagi

- “Oligonucleotide analysis by nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry” 19<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference 2012, Kyoto, Japan Sep. 15-21(Poster) (2012)
5. 平 修、金子 大作、一柳 優子、小西 康子 「ナノ微粒子質量分析 (Nano-PALDI MS)による新規農薬検出法の開発」2012、8月8-9日、北海道、日本食品工学会第13回年次大会(口頭) **(優秀口頭発表賞)**
  6. 平 修、金子 大作、朱 妹、小松 かつ子、小西 康子 「トウガラシに含まれるカプサイシン・イメージング質量分析」2012、8月8-9日、北海道、日本食品工学会第13回年次大会(ポスター)
  7. 東海 情満、平 修、小西 康子 「イメージング質量分析によるキュウリ内農薬局在解析」2012、8月8-9日、北海道、日本食品工学会第13回年次大会(ポスター) **(ポスター賞)**
  8. S. Taira, S. Shimma, D. Kaneko, Y. Ichianagi “Nano capture and mass spectrometry of aromatic molecules by phenyl group-modified nanoparticle” International Conference on Nanoscience + Technology2012, Paris, France July 23-28 (Poster) (2012)
  9. 平 修、「ナノ微粒子ー質量分析 (Nano-PALDI)法による生体組織、食品分析のご紹介」高分子分析研究懇談会第363回例会 2012年6月29日、逗子、神奈川県(招待講演)
  10. 平 修、「ナノテクノロジーを用いた質量分析とその応用」第2回日本質量分析学会 春季シンポジウム 2012年6月1日、東京、虎ノ門(招待講演)
  11. I. Osaka, H. Hisatomi, Y. Ueno, S. Taira, H. Kawasaki, R. Arakawa “Pseudo two-dimensional chromatograms of ginsenosides in Panax ginseng root and callus” ASMS2012, Vancouver, Canada May 20-24 (Poster) (2012)
  12. D. Kaneko, S. Taira, A. Miyazato, N. Hiraishi, T. Shimada, T. Kaneko, “Bio-based Adhesive Resin - From Synthesis to possible Application” 8th International Colloquium on Heterogeneous Ziegler-Natta Catalysts, Kanazawa Japan March 20-23(Poster) (2012)
  13. 平 修、新聞 秀一、小西 康子、一柳 優子「ナノ微粒子支援型質量分析 (Nano-PALDI MS) による分子選択的イオン化」2011、9月13-15日、大阪、第

- 59回日本質量分析学会(ポスター)
14. 平 修、「質量分析による食品成分のイメージング解析」2011、8月5-6日、京都、日本食品工学会第12回年次大会(口頭)、**(優秀口頭発表賞)**
  15. 平 修、「おたね人参のジンセノサイド局在イメージング」2011、8月5-6日、京都、日本食品工学会第12回年次大会(ポスター)、**(ポスター賞)**

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: 核酸検出用のイオン化支援キット及びこれを使用した質量分析法  
 発明者: 平 修、佐橋裕子  
 権利者: 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学・日東電工(株)  
 種類: 特許出願  
 番号: 特願2012-054376  
 出願年月日: 平成24年3月12日  
 国内外の別: 国内

名称: 配糖体群質量分析用イオン化支援剤及びこれを使用した質量分析方法  
 発明者: 平 修、佐橋裕子  
 権利者: 国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学・日東電工(株)  
 種類: 特許出願  
 番号: 特願2011-124505  
 出願年月日: 平成23年6月2日  
 国内外の別: 国内

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平 修 (TAIRA SHU)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・助教

研究者番号: 30416672