

# 農薬系環境汚染物質を特異的に検出する 機能性ナノ磁気微粒子の開発

## Analysis of the food product and pesticide as environmental pollutant by nano-PALDI MS

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 平 修  
School of Material Science, JAPAN Advanced Institute of Science and Technology,  
Shu TAIRA

### 1. 序論

我々の日常生活の環境中には、様々な物質が、大気、水、食品に含まれている。その中には、人体に有害となる物質（ダイオキシン類、農薬群など）がある。特に、農薬については食品中の残留農薬のポジティブリスト化（食品衛生法第11条第3項：平成18年施行）により、10 ppb を越える食品の販売を原則禁止するなど下限値が大きく下がっている。これらを迅速、簡便に回収、検出するナノ材料を開発し、新規環境センサーへ応用することが目的である。既存法は、サンプルから農薬を繊維膜などで捕捉、回収し、溶離させてから検出を行わなければならない。一成分の定量に、複数工程の処理を要する。また検出感度も ppb オーダーの検出がようやく達成された程度で、簡便・迅速、高感度検出には課題が残っている<sup>1)</sup>。

記憶媒体、ドラッグデリバリーで注目されているナノ磁気微粒子は次世代の担体として非常に有用である。汚染物質の捕捉、回収、検出能力をハイブリッドに付与したナノ材料が創成できれば簡便、迅速に環境汚染物質の特定、定量ができる。本研究では、ナノ磁気微粒子表面に、アミノ基、フェニル基、カルボキシル基など官能基を効率的に導入する。表面官能基との相互作用で目的物質を特異的に回収、濃縮する。さらに本ナノ微粒子がレーザーを照射することで表面の物質をイオン化する特徴（ナノ微粒子支援型イオン化法：Nano-Particle Assisted Laser Desorption/Ionization）<sup>2,4</sup>を持つことから、質量分析（MS）により目的物質の溶離作

業なしに、ダイレクトに検出する農薬系環境汚染物質の簡便検出の達成を目指す。

### 2. 実験

#### ナノ微粒子の作成及び表面修飾（図1）

1. 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。メタケイ酸ナトリウム溶液に金属塩化物溶液（ $MCl_2 \cdot nH_2O$  :  $M$  は、Fe）を加えて1時間室温で攪拌後、遠心分離で沈殿物を回収する。沈殿物を873Kで焼成したものをナノ微粒子とした<sup>5)</sup>。

2. アミノ基、フェニル基、カルボキシル基をシラン化、開環反応を利用してナノ微粒子表面に付与する。

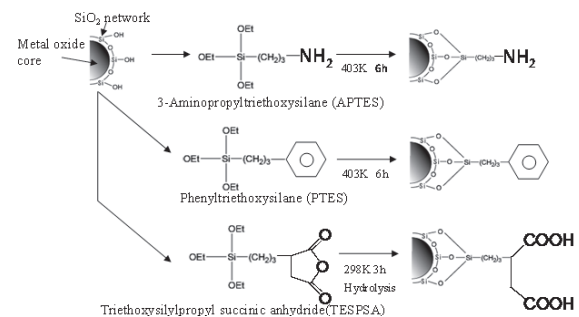


図1 機能性ナノ微粒子

#### Nano-PALDI 質量分析法による農薬検出

モデルとして水田除草剤として用いられるトップガンGT粒剤75（以下、トップガン剤）（クミアイ化学工業（株））に含有している Bromobutide（分子量（Mw）311）、Pentoxazone（Mw 353）、

Pyriminobac methyl (Mw 361), Bensulfron methyl (Mw 410) の 4 種類を使用した (図 2)。

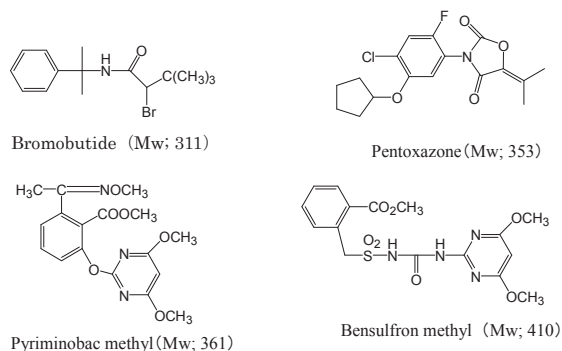


図 2 使用した農薬群の構造

ナノ微粒子 (1mg) をメタノール (1.5mL) で懸濁したものを、MS 用のターゲットプレートに滴下、乾燥した。続けて、各農薬標品溶液 (10ppm) を滴下した。その後 MS 測定を行った。質量分析装置は、マトリックス支援型 (MALDI) -TOF- タイプ (TOF = time of flight; Voyager-DE-RP; Applied Biosystems, Germany) を用いた。本方法は、レーザーを対象物質に照射しイオン化・質量を検出する方法である<sup>6</sup>。

#### 目的物質特異的トラップ&質量分析

水田除草剤として用いられるトップガン GT 粒剤 75 (クミアイ化学工業 (株)) に含有している、Pyriminobac methyl (Mw 361) を標的とした。

Pyriminobac methyl 溶解液 (10 ppm) に、フェニル基修飾ナノ微粒子 (1mg) を添加し、1 分間攪拌する。本該当ナノ微粒子は、磁化特性を有するため、磁力により回収がする (S. Taira et al. *Magnetic Nanoparticles: Properties, Synthesis and Applications* Chap. 5 (2012))。その後、永久磁石によりナノ微粒子を回収する。洗浄、回収を繰り返した後、回収したナノ微粒子を質量分析用のターゲットプレートに滴下、乾燥した。つづけて、各農薬標品溶液 (10ppm) を滴下した。その後質量分析を行った (図 3)。

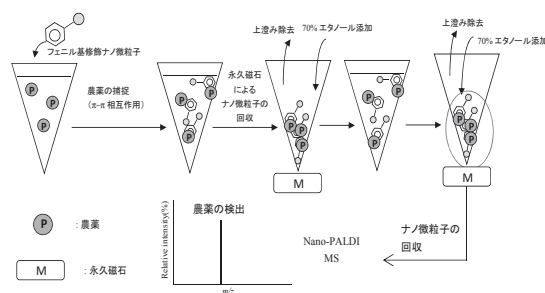


図 3 機能性ナノ磁気微粒子による農薬の回収、検出

#### 実サンプルからの農薬検出

実サンプルとして水田の用水を経時的にサンプリングし農薬の検出を行った。

また、研究の進捗が順調であったことから、将来的に農産物の遺伝子を調べる事も食品の安全に寄与することから、Nano-PALDI による核酸 (DNA, RNA) の検出を試みた。

### 3. 結果

#### ・合成したナノ微粒子の特性評価

今回、合成したナノ微粒子 (表面未修飾) の物理化学的特性評価を行った。

- (1)・X 線回折 (XRD) (コア成分構造解析)
- ・赤外分光法 (IR) (表面修飾基確認)
- ・透過型電子顕微鏡 (TEM) (形態、粒径解析)
- ・SQUID 測定 (磁化測定)

#### ・X 線回折 (XRD) (コア成分構造解析) (図 4)

$2\theta = 35^\circ$  と、 $63^\circ$  に、ミラー指数 (hkl)、(3 1 1) と、(4 4 0) が観測され、データベースと照合した結果、酸化鉄をコアとし、Si-O が存在する構造と決定できた。

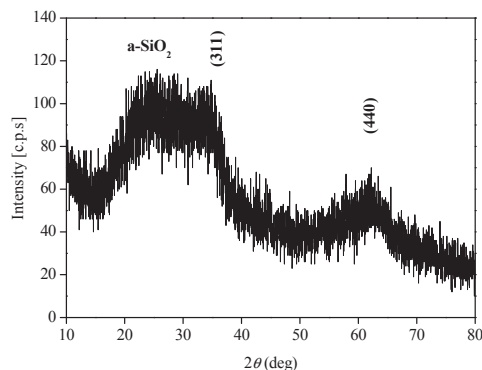


図 4 Fe(鉄)を用いて合成したナノ微粒子の XRD パターン

- ・赤外分光法 (IR) (表面修飾基確認) (図 5)  
O-H (3,400-3,100 $\text{cm}^{-1}$ ) と、Si-O (1,100-900 $\text{cm}^{-1}$ ) の伸縮が観察された。

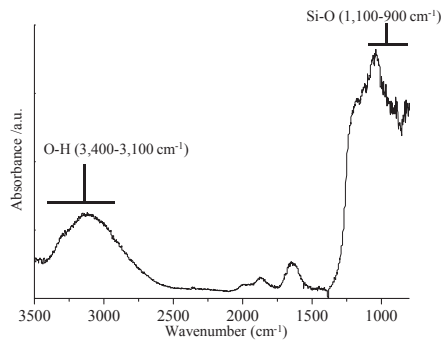


図 5 Fe (鉄) を用いて合成したナノ粒子の FT-IR スペクトル

- ・TEM 観察 (形態、粒径解析) (図 6)  
粒径 3.0nm  $\pm$  0.1nm の粒子であることが確認した。

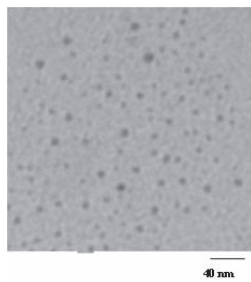


図 6 Fe (鉄) を用いて合成したナノ粒子の TEM 像

これらの結果より、得られた物質は、酸化鉄をコアとし、その周りを Si-O 層が多い、表面には水酸基が存在しているナノ粒子であると結論づけた (図 7)。

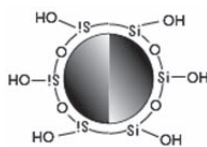


図 7 合成したナノ粒子の構造予想図

- ・SQUID 測定 (磁化測定) (図 8)

強磁場になるに従い直線的に磁化が増加していることから、得られたナノ粒子が常磁性 (paramagnetism) 体であることを確認した。

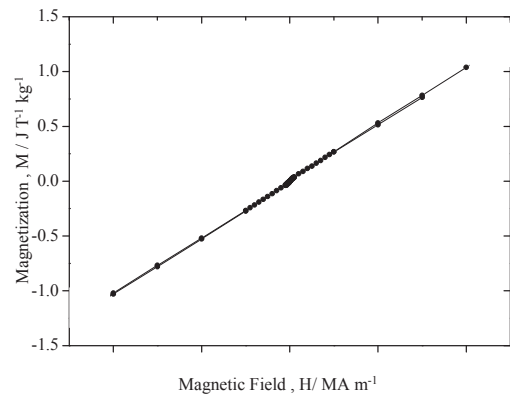


図 8 ナノ粒子の SQUID グラフ

- ・機能化したナノ粒子の特性評価

アミノ基、フェニル基、カルボキシル基をナノ粒子表面にシラン化法で共有結合的に修飾した。以下の特性評価を行った。

- ・赤外分光法 (IR) (表面修飾基確認) (図 9)

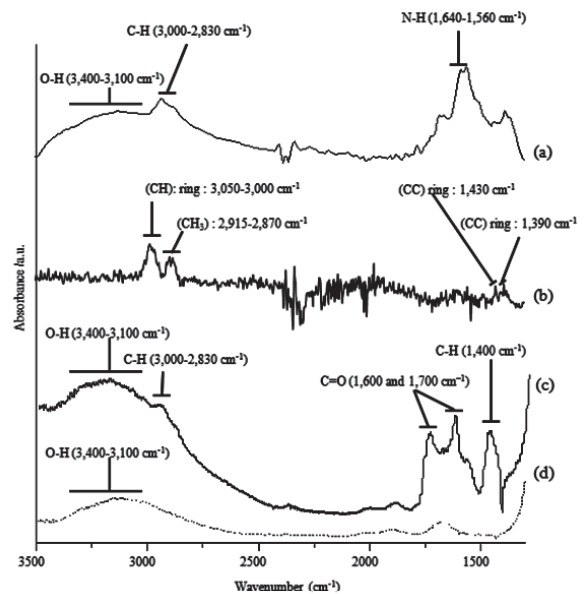


図 9 アミノ基 (a)、フェニル基 (b)、カルボキシル基 (c)、未修飾 (d) ナノ粒子の FT-IR スペクトル

- ・アミノ基修飾ナノ粒子 (図 8a)  
N-H (1,640-1,540  $\text{cm}^{-1}$ ), C-H (3,000-2,830  $\text{cm}^{-1}$ ), O-H (3,400-3,100  $\text{cm}^{-1}$ ) の伸縮が検出された。
- ・フェニル基修飾ナノ粒子 (図 8b)

芳香環特異的な C-C ring (1,430 and 1,390  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{CH}_3$  (2,915–2,870  $\text{cm}^{-1}$ ), C-H (3,050–3,000  $\text{cm}^{-1}$ ) の伸縮が検出された。

・カルボキシル基修飾ナノ微粒子 (図 8c)

C=O (1,600 and 1,700  $\text{cm}^{-1}$ ), C-H (3,000–2,830, 1,400  $\text{cm}^{-1}$ ), O-H (3,400–3,100  $\text{cm}^{-1}$ ) の伸縮が検出された。

コントロールとして図 8d に未修飾ナノ微粒子の FT-IR スペクトルを示す。シラン化法で修飾された場合、ナノ微粒子の水酸基 (OH) がシラン剤と反応するため、消費される。そのため、O-H (3,400–3,100  $\text{cm}^{-1}$ ) の伸縮ピークが減少する。カルボキシル基修飾の場合は、カルボキシル基 (-COOH) にも O-H 基が存在するので修飾後も O-H (3,400–3,100  $\text{cm}^{-1}$ ) が顕著に検出されている。

・zeta 電位測定 (表面電位測定) (図 10)

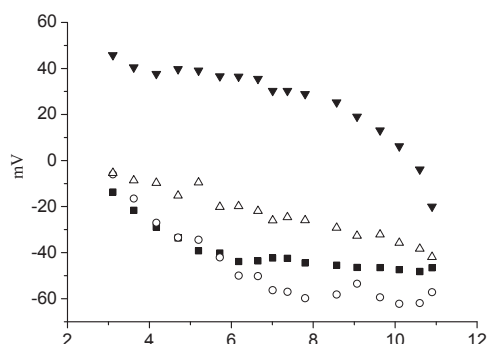


図 10 アミノ基 (▼)、フェニル基 (△)、カルボキシル基 (■)、未修飾 (○) ナノ微粒子の FT-IR スペクトル

各修飾基がナノ微粒子に存在している場合、未修飾ナノ微粒子に比べ、アミノ基修飾ナノ微粒子は等電点 (pH9.8) が存在し、そこを境にアルカリ側でマイナス、酸性側でプラス電荷を示している。フェニル基修飾ナノ微粒子はどの pH 条件でもマイナス電荷を示しているが、フェニル基が電荷に寄与しないため、未修飾ナノ微粒子に比べ小さい電荷を示している。カルボキシル基修飾ナノ微粒子も、マイナス電荷のみを示しているが、未修飾に比べるとその値は小さい。これは、シラン化法で官能基を修飾し

た場合、ナノ微粒子表面の水酸基 3 つに対して 1 つの官能基が修飾されるため、全体の電荷が小さくなった物と推察する (図 1 参照)。

・Nano-PALDI 法による農薬検出 (図 11)

未修飾ナノ微粒子を用いて、ナノ微粒子に農薬を検出する能力があるかを確認した。

用いた農薬は、Bromobutide (Mw; 311) Pentoxazone (Mw; 353), Pyriminobac methyl (Mw; 361), Bensulfron methyl (Mw; 410) である。

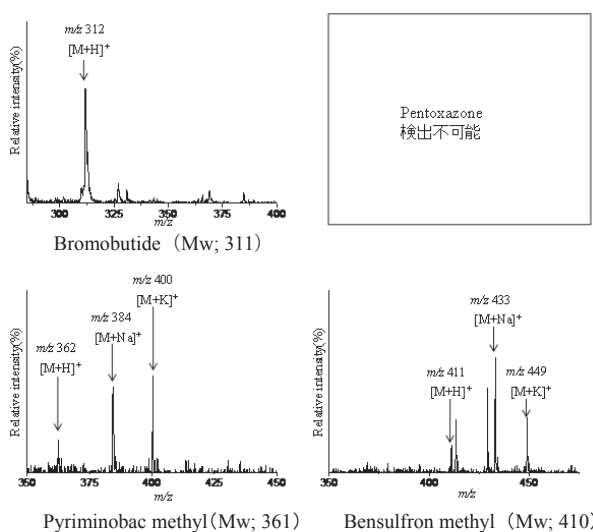


図 11 Nano-PALDI 法による農薬標品の MS スペクトル

Bromobutide (Mw; 311) は、プロトン付加体で検出された。

Pentoxazone は検出できなかった。

Pyriminobac methyl は、プロトン、ナトリウム (Na)、カリウム (K) 付加体で検出された。

Bensulfron methyl は、プロトン、ナトリウム (Na)、カリウム (K) 付加体で検出された。

これら農薬の様な低分子物質は、既存法ではマトリクス試薬 (低分子) と質量が近接しているためマトリクスのシグナルがノイズとなり測定できない。今回の Nano-PALDI 法では低分子領域にノイズが発生しないため、低分子物質を検出するナノ材料、検出法として有用なことが示された。



## 水田用水の農薬経時的变化 (図 12)

水田用水と水田土壌を専用の容器に採取し、トップガン剤を添加し、散布後、0、7、15、45、65日目に用水を採取し、農薬の存在を Nano-PALDI MS 法で確認した (図 12)。

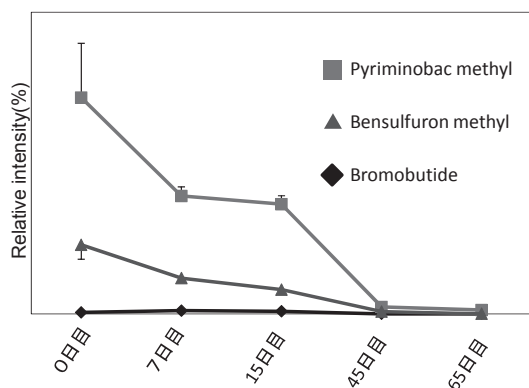


図 12 Nano-PALDI MS 法による人工水田サンプルの農薬経時的变化

農薬群が経時的に変化(減少)している。トップガン剤の効果は 55 日程度であるので、0～15 日までは緩やかな減少傾向にあり、45 日を過ぎた頃から急激に減少していることが分かる。従来、同様の結果を得るために、LC-MS や、GC-MS が用いられている。これらは、定量性に優れている反面、時間的、コスト的にも負担のかかる方法である。今回、Nano-PALDI 法により、分離・精製作業をせず、サンプルの濃縮だけで経時的な農薬の変化を示すことを可能にした。

## 機能性ナノ粒子を用いた Nano-PALDI MS による農薬の検出 (図 13)

ナノ粒子表面にフェニル基を修飾した、「フェニル基修飾ナノ粒子」により、農薬を捕捉し、検出できるかを検討した。

Pyriminobac methyl (Mw 361) を標的とした。

コントロールとして、未修飾ナノ粒子を用いて同様の実験を行った。

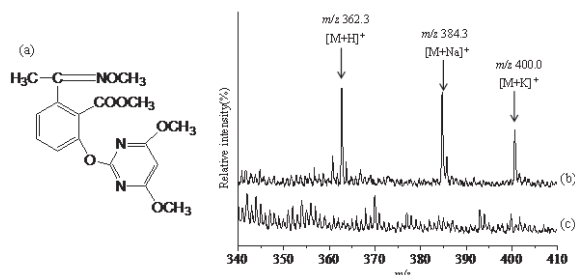


図 13 Pyriminobac methyl の構造式 (a)、フェニル基修飾ナノ粒子 (b) と未修飾ナノ粒子 (c) による農薬の回収後の Nano-PALDI MS スペクトル

外部磁場 (永久磁石) によるナノ粒子の回収を行うことができた。フェニル基ナノ粒子を用いた場合、農薬溶解液に添加し、洗浄後のナノ粒子を回収し、質量分析を行っても、Pyriminobac methyl (Mw 361) のシグナルが検出できた。コントロールの未修飾ナノ粒子では、同様の条件では検出することが出来なかった (図 13)。Pyriminobac methyl に限らないが、農薬は低分子であると同時に、芳香環を持つ骨格の物が多い。ナノ粒子表面のフェニル基とは、 $\pi$ - $\pi$  相互作用により農薬がナノ粒子表面に捕捉・保持され、洗浄してもナノ粒子表面に残存すると考察できる。未修飾ナノ粒子では捕捉・保持することができず、洗浄工程で農薬がなくなる。

機能性ナノ粒子を用いて、農薬を捕捉、保持、検出することができた。この現象は、農薬の濃縮効果も期待される。既存の質量分析の検出感度以下の濃度 (ppb オーダー) でも、農薬を検出することができるか、混合物の中から農薬のみを捕捉、保持、検出できるかなど検討していく。

## 4. まとめ

低分子物質の検出を目指したナノ粒子群の開発に成功した。

(派生成果として、核酸の検出に成功した)

・農薬、農薬群を検出するのに最適なナノ粒子を選定できた。

・Nano-PALDI MS 法により、簡便に、実サンプルからの農薬、農薬群を検出に成功した。

・経時的に実サンプルからの農薬、農薬群を検出に成功した。

・機能性ナノ微粒子（フェニル基修飾ナノ微粒子）を用いて、農薬を特異的に補足し、検出することに成功した。

これらは、新規農薬検出物質の開発、検出法の確立に結びつく成果になる。今後、農産物などの種類を拡大し、様々なサンプルに使用できる汎用性のある技術とするために、研究を続けていく。

## 5. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、援助いただきました財団法人近畿地方発明センターに感謝いたします。

## 参考文献

1. 産業構造審議会産業技術分科会, 2009.
2. S. Taira, I. Osaka, S. Shimma, D. Kaneko, T. Hiroki, Y. Kawamura-Konishi and Y. Ichianagi, *Analyst*, 2012, **137**, 2006-2010.
3. S. Taira, Y. Sahashi, S. Shimma, T. Hiroki and Y. Ichianagi, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 1370-1374.
4. S. Taira, Y. Sugiura, S. Moritake, S. Shimma, Y. Ichianagi and M. Setou, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 4761-4766.
5. S. Moritake, S. Taira, Y. Ichianagi, N. Morone, S.-Y. Song, T. Hatanaka, S. Yuasa and M. Setou, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2007, **7**, 937-944.
6. K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida, *Proceedings of the 2nd Japan-China Joint Symposium on Mass spectrometry*, 1987, 185-187.

## 研究成果

1. S. Taira (Corresponding), D. Kaneko, K. Onuma, A. Miyazato, T. Hiroki, Y. Konishi-Kawamura, Y. Ichianagi “Synthesis and characterization of functionalized magnetic nanoparticles for the detection of pesticide” *Magnetism of Nanoscaled Inorganic Assemblies* (in press)
2. S. Taira (Corresponding), I. Osaka, S. Shimma, D. Kaneko, T. Hiroki, Y. Kawamura-Konishi, Y. Ichianagi “Oligonucleotide analysis by nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry” *Analyst*, **137** 2006-2010 (Cover Article) (2012)



ナノ微粒子質量  
分析が表紙とし  
て掲載

画像の転載許可取得済み

3. S. Taira (Corresponding), S. Shimma, I. Osaka, D. Kaneko, Y. Ichianagi, 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)
4. S. Taira, D. Kaneko, Y. Konishi-Kawamura, Y. Ichianagi “Application of functionalized nanoparticle for food science” *Nanoscope Systems for Basic Science and Applications* (Submitted)