研究論文

食品産業支援の化学チップ開発

永井　直人[*]　笠原　勝次[*]　平石　誠[**]

On-plate chromatographic spectroscopy using Marangoni and/or Poiseuille flow

NAGAI Naoto[*]，KASAHARA Katsuji[*]and HIRAISHI Makoto[**]

抄　　録

プレート上にカバーグラスをかけその中に試料溶液を導入することでマランゴニ流,ポワズイユ流,乱流を発生させ試料成分の自己組織化を誘導して，プレート上に散逸構造のトレースを形成させる手法を開発した。このトレースに各種分析プローブを投入することで，混合物の組成を簡便に低コストで分析できるようになった。赤外，ラマン，TOF-SIMS，MALDI-TOF/MS などによる検出を試みた結果を紹介する。

1.　緒　　言

近年,食品異物や表示偽装などの「食の安全・安心」が注目されている。また，機能性食品といった食の高付加価値も注目されるようになっている。新潟県は高い食品ブランドを有しているが，今後，以上のような点に留意しつつ県内企業を科学的にサポートしていく必要があると考えられる。しかし，一昨年度発生した　ギョーザ事件に見られるように加工食品は一般に多くの成分の混合物であり，その中から注目成分を取出して分析するのは非常に困難な問題である。さらに化学構造変化まで解析しようと思うと格段に難しくなる。

これらの問題は分析装置にかける際の前処理で困難さの度合いが大きく変化する。そこで，我々は上記の問題に対応するために，主成分から微量成分まで分析可能で化学構造変化まで解析するための新しい前処理法の開発を行ってきた。さらに，食品産業ではこのような問題に時間とコストをかけることはできないので，迅速かつ低コストで実行できるシステムを構築することを考慮した。

*　下越技術支援センター
**　研究開発センター

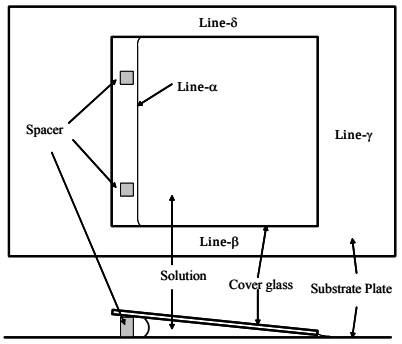

図１　化学チップシステムの構成概略図

昨年度はカバープレートを斜めに配置しその中にサンプルと溶媒を挿入することで，マランゴニ流を発生させ表面張力の違いによってプレート上での吸着位置を変化させて分離する新しいシステムを提案し実証してきた[1)]。今年度は分離効率を上げるためにさらにメカニズムの考察を行い，本手法を適用して実施した例を紹介する。なお,本法は食品分野のみならず,工業,農業，医療・バイオなどの多くの分野に適用できることを目指した。

2.　原理

2.1　送液

図１には配置の概念図を示した。シリコン

ウェハーなどのプレートの上にカバーグラスを傾斜をつけて配置し，そのすき間に試料を溶かした溶液（必ずしも完全に溶けている必要はない）を導入して放置する。液の導入は，昨年度，接触角測定装置を改造した装置においてシリンジ先端をカバーグラスのすき間付近に溶液を滴下することで行った。毛細管現象によって自動的にカバーグラス下に液が導入され，カバーグラス外にはみ出すことはない。

2.2　分離

図 2 は昨年度使用したブルーベリーエキスのエタノール溶液をカバーグラス下に導入してカバーグラスの一端（図 1 の line-βに相当）をプレートの真上から時間変化を追ったものである。時間の経過とともに(a)→(h)となっている。今年度は可視化を目的に比較的高濃度の試料を選択した。

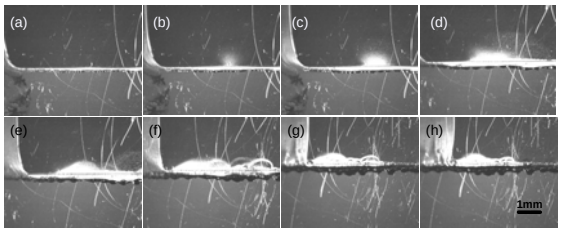

図 2　ブルーベリーエキス成分の乱流

最初，均一な溶液は次第に不均一になり「プロミネンス」領域が現れてくる(b)。このプロミネンスは渦を形成し，その渦は次第に形を変えながら”下流”に流れていくのが観察される。そして大きな渦から小さい渦へエネルギーを交換しながら次第に散逸していく様子が見える。しかし，ある領域から先へはその渦は進行しない。図 3 には「プロミネンス」が始まる直前のカバーグラスエッジ部を拡大した画像を示した。周辺を走るパーティクル（図中矢印）に注目し約 0.3 秒後のスナップショットを図 3(b)に示した。粒子は周辺の気液界面をかなりのスピードで移動し分裂しているのが観察される。液内部の流動は非常にゆっくりであるが，気液界面は高速に動いておりせん断応力が発生していることが分かる。

以上の現象から気液界面をせん断力を伴って流れる流体であることからマランゴニ流が発生していることが分かる。この流れは，気液界面において表面張力の大きい領域に向かって流れが発生する現象であり，カバーグラスの基板との隙間が小さい領域（line-γ 方向）で温度が低くなっているか，もしくは表面張力が大きい物質の濃度が高くなっているかのどちらか，あるいは両方が起こっていると考えられる。Khrustalev と Faghri の分離圧を考慮した計算では隙間のメニスカス領域の直径が小さい場合のその領域からの気化による熱伝導効率が高いことが示された[2) 3)]。すなわち、隙間の狭い領域周辺（line-γ および line-γ に近い line-β 領域）で温度が低くなっていると考えられる。実際，放射温度計で計測すると 1℃程度低いこと

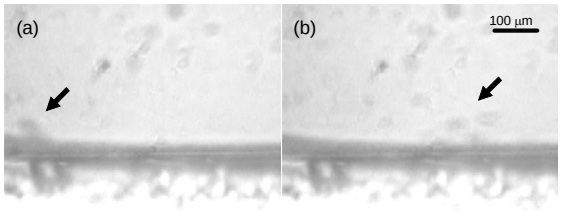

図 3　カバーグラス周辺のマランゴニ流

が確認される。

この状態で溶液がカバーグラス下で周辺に沿ってマランゴニ流によって物質移動が起こると，ル・シャトリエの原理によってマランゴニ流を阻害するために高表面エネルギー物質の物理吸着が隙間の小さい領域ではじまる。一方，上流側では低表面エネルギー物質を物理吸着させることでマランゴニ流を阻害する傾向が発生する。それでもマランゴニ流は発生し続けるが，表面エネルギー物質が吸着しさらに隙間が狭くなっているため，ある場所から流れ込んできた物質が散乱され流動が乱される領域が突如現れる。それが先に述べた「プロミネンス」であると考えられる。すなわち，ここで流動が散乱されて乱流が発生する。乱流の特徴としては最初に大

きな渦が発生し、エネルギーを小さい渦に渡していくが，そのプロセスではエネルギー散逸はない。しかし，渦がどんどん小さくなって最終的にはエネルギーを散逸してしまう [4]。図 2 は

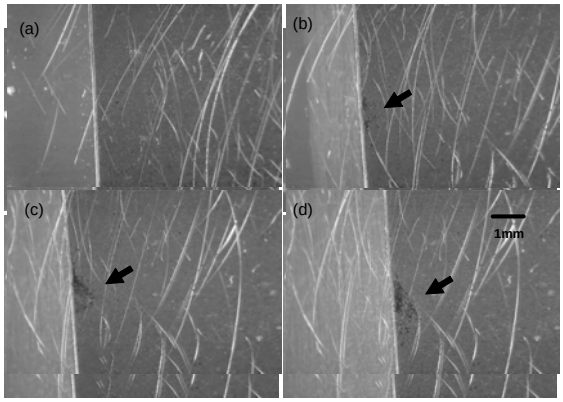

図 4　溶液導入部付近に現れる渦構造

その間に現れる「コヒーレント構造」を示していると考えられる。このコヒーレント構造が形成される間に物質の混合と再配列が起こる。

図 4 には隙間の最も大きい領域（line-α）で溶液が導入された後の気液界面の時間変化を示した。時間とともに(a)→(d)となっている。最初，均一に分散されていた溶液中の成分は次第に渦を形成しながら集まっていく。最終的には集まって，マランゴニ流にのってカバーグラス周辺領域（line-β や line-δ）に流れ込んでいく。このような現象は表面張力の不均一性のゆらぎによって形成されるベナード・マランゴニセルと考えられ，それを溶液の断面で観察していることになると考えられる [5) 6)]。

一方、溶液に非常に良く溶け込んでいる物質は，最後まで吸着せず，最もカバーグラスの隙間が狭いライン上に相対的に表面エネルギーの大きい物質から析出･吸着していくことになる。なお，この過程における流体の駆動は毛管現象の不均一性に基づくポワズイユ流である [7)]。

以上をまとめると，カバーグラス周辺の気液界面のプレート上にはマランゴニ流によって駆動された溶液成分が表面エネルギーの違いによって異なる場所に物理吸着され，さらに流動してきた物質は高表面エネルギー物質による散乱で乱流を発生させその中で混合と再配列を起こす。一方，ベナール・マランゴニセルによって集まってきた溶解されにくい成分はゆっくりとマランゴニ流によって駆動されて，line-β あるいは line-δ 上で吸着する。逆に，溶解度の高い成分は最後までポワズイユ流によって駆動されて最後に表面エネルギーの大きい物質から析出・吸着される。以上の一連のプロセスによって溶液の中に一様に溶解，分散していた成分はプレート上に分離されていくと考えられる。

カバーグラス下に一様溶液を導入して放置しておくだけで，分離が起こっていくことは一見するとエントロピーが減少していくように見えるが。この過程の中で，溶媒の蒸発という非常に大きなエントロピー増加が起こっていることから，系全体としてはエントロピーが増加しているが，カバーグラス下の溶液で見ると非平衡開放系となっており，部分的にエントロピーが減少して不均一組織構造が現れたものと考えられる。プリゴジンはこのような構造を「散逸構造」もしくは「自己組織化」と呼んだが [8)]，本系では「散逸構造」のトレースが現れたものであり，この「散逸構造のトレース」を分析に利用し，低コストの分離分析を達成しようという点で革新的と考える。

2.3　ブルーベリー分離分析結果

流動が終了した後にカバーグラスを剥がし，現れたシミを分析した結果を図 5 に示した。本実験では可視化が目的ではないので，低濃度試料にて赤外およびラマン分光分析を行った結果

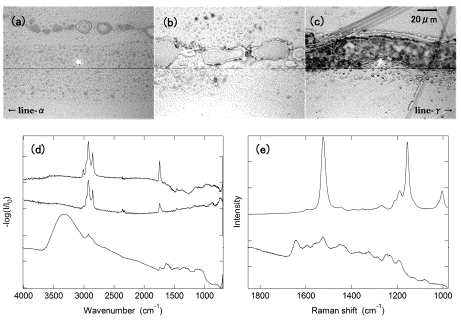

図 5　ブルーベリーエキスの分離結果

である。上図左から右へは吸着した成分の写真であるが，明らかに吸着物質の形態的な違いが観察される。下図にはスポットで分析した赤外およびラマンスペクトルを示した。昨年度の試料をプレート上に置いた場合と同様に，飽和脂肪酸油脂,不飽和脂肪酸油脂,アントシアニン，カロテノイドが分離して検出されていることを確認することができた。

3. 応用

以下では，上記の原理に基づいて分析応用を行った例をいくつか紹介する。

3.1 米

図 6 には県内の加茂産の米(a)と黒崎産の米(b)を時間飛行型 2 次イオン質量分析装置（TOF-SIMS）で測定したマッピング分析の結果を示した。この手法は高い感度で表面 nm 深さのフラグメント（正および負）イオンを検出することができる手法で，なおかつマッピング分析も可能である。図には油脂由来の成分のフラグメント(上段)とアミンのフラグメント(右下）およびリン酸（左下）とカリウムおよびカルシウムイオン（中段）のフラグメント分布を示した。明るいところは濃度が高い領域を示している。油脂のフラグメントが現れる位置とアミンの現れる位置は明らかに異なっており分離が達成されていることが分かる。これは赤外分光やラマン分光で分析されるトリグリセリド(油脂）やアミド（タンパク）の位置とも一致している。また、加茂産と黒崎産という米でほぼ同様な分布になっており、手法としての再現性も確認される。加茂産と黒崎産ではリン酸の強度分布に大きな違いが認められる点が特徴である。筆者の食べた感じでは加茂産の方がおいしく感じられたが，リン酸濃度が影響している可能性が考えられる。あるいは産地の違いによる米の代謝成分の違いを反映したものとも考えられる。タイ米を同様に分析すると油脂成分の中でもパルミチン酸やステアリン酸由来の脂肪酸成分が多く検出される。これは文献で報告されている結果とも一致しており [9]，また，タイ米ではケイ素濃度が高い傾向も見られるなど地域間の違いを解析するのに利用できる可能性が高い。

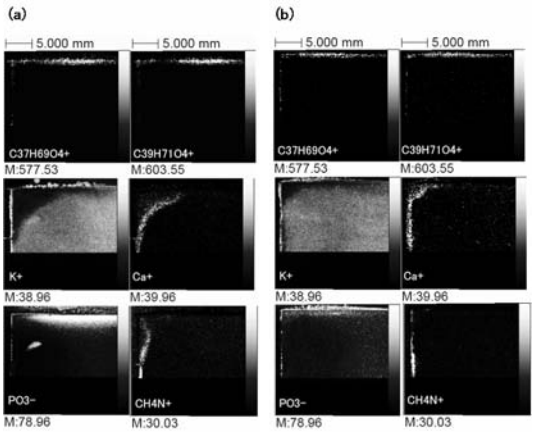

図 6　加茂産(a)と黒崎産(b)の米の TOF-SIMS 分析結果

本法では，油脂はいつもほぼ同様な位置に液滴として吸着して残ることが確認できる。そこで，それらの液滴に注目して新米，古米，古古米の油脂の化学構造変化を調べることができるかどうか確認した。図 7 には赤外分光分析とラマン分光分析の比較結果を示した。赤外分析から油脂は古古米になると加水分解してエステル(1740cm^{-1})がカルボン酸(1710cm^{-1})となるが古米では新米との中間状態となっていることが分かる。一方、ラマン分光分析では C=C 結合が強

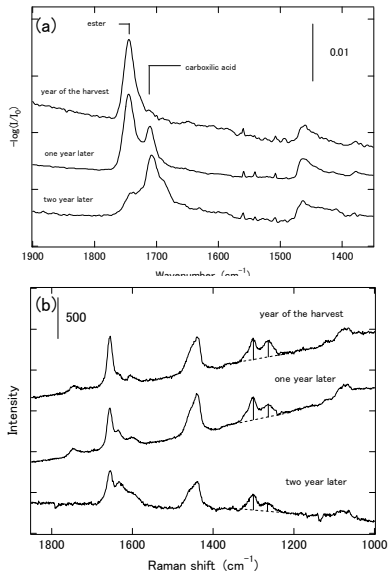

図 7　新米，古米，古古米の構造変化
(a)赤外，(b)ラマンスペクトル

く現れるが(1640cm^{-1}付近)，C-H 変角振動の相対強度を不飽和結合のそれと比較すると(1350cm^{-1}と 1260cm^{-1}バンドの比)，不飽和度が減少していくことが分かった。

3.2　メタミドホス／ギョーザ

最近「食の安全・安心」が大きく注目されるようになった理由として冷凍ギョーザに農薬のメタミドホスが混入されていたことがあげられる。それも，予想を超える濃度であった。さらに牛乳にメラミンが混入されているなど，通常の製造工程の混入では想像できないような物質や濃度の場合があることが大きな問題となっている。このようなケースでは分析する側も単に食品に関する知識だけではなく，工業製品や毒物に関する知識も要求され，主要成分から微量成分まで分析可能な技術が要求されるようになっている。

図 8 は市販の冷凍ギョーザにモデル的にメタミドホスを種々の重量比で混ぜてそのギョーザを試験管に取ってエタノール : 水=1 : 1 の溶媒で激しく振とうさせた後にその液を本法にて流したのちの分析の結果である。写真で特徴的なシミはカバーグラスと基板との間の隙間が最も狭い最後のライン（line-γ）に現れる。メタミドホスは水に良く解けるため最終的にはポワズイユ流で駆動されて，その領域に現れるものと考えられる。特徴的なシミ領域でラマンスペクトルはメタミドホスを検出できることが分かる。図

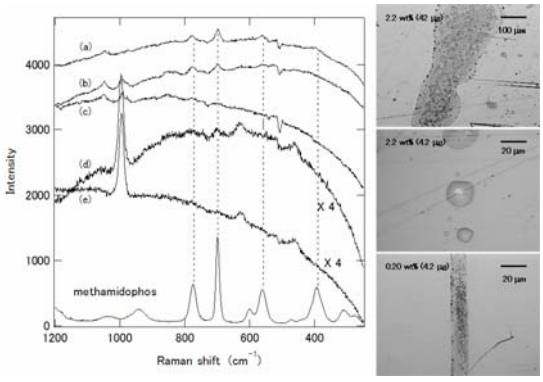

図 8　ギョーザにメタミドホスを混入させた試料のシミとラマン分析結果

では，ギョーザに対する重量比で示した場合と採取した溶液の体積から計算された絶対量とを示した。濃度ではラマン分光分析で 200ppm まで検出可能で絶対量でもマイクログラムオーダーは十分検出可能であった。TOF-SIMS などの質量分析を使えばさらに高感度に検出できると考えられる。

3.3　タンパク

タンパクは食品のみならず医療やバイオ分野でもその分離と構造解析が注目されている。そこで，まずモデル系として水にアルブミンとリゾチームを溶かした溶液を本法にて流動させ，水がなくなったあとラマン分光にて分析した。赤外分光では両者ともポリアミドとしての吸収しか現れず，判定するのに 2 次構造までの解析が必要になるため，ラマンにて判定を行った。ラマン分光ではリゾチームで 1560cm^{-1}にピークが現れるため両者の区別が可能である。このピークはトリプトファンのインドール環の伸縮振動のピークである。図ではシミの模式図とその位置およびそれぞれの位置でのラマンスペクトルを示した。カバーグラスで傾斜のついている

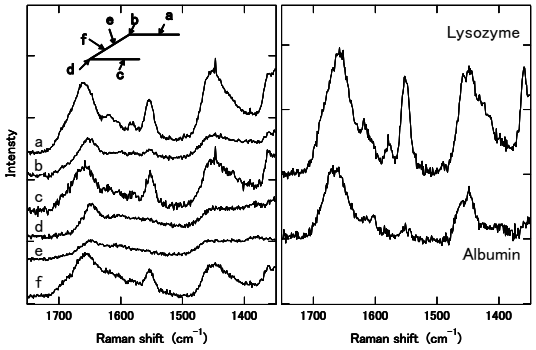

図 9　リゾチームとアルブミン混合試料の分離分析結果

ところでは主にリゾチームが認められ隙間の最も狭くなっている端部付近でアルブミンが認められる。一方，隙間が最も狭いラインでは主にアルブミンが認められるもののところどころリゾチームも認められるという結果になった。アルブミンの水への溶解度が大きいことが主に効いているように思われるが，この分離はかなり

明瞭に現れる。しかし，他の複数のタンパクが混入している場合の分離と検出が出きるかということを検討するために，さらにラクトフェリンとカゼインを混ぜた試料を用意し実験を行った。分離効率を上げるためにカバーグラス形状を工夫し加工を施した石英板を用意した。また，分析もマトリックス支援レーザー脱離時間飛行型質量分析装置（MALDI-TOF/MS）を行った。この分析はタンパクなどの非常に大きな質量を持つ物質を分解せずイオン化して分析できる画期的手法であり，島津製作所の田中耕一氏がノーベル賞を受賞したことで著名である。結果の

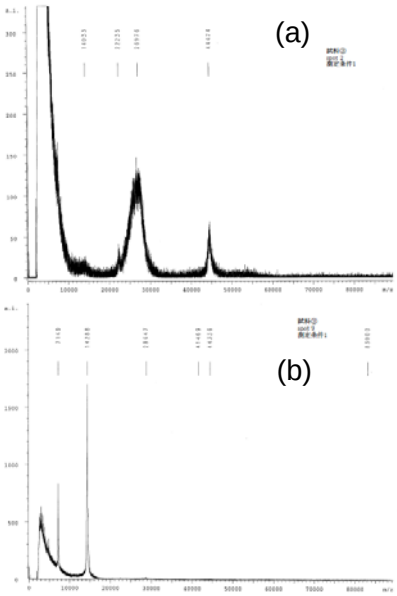

図 10　分離タンパクの MALDI-TOF/MS 分析結果
(a) line-γ 付近 (b) line-β 付近

一部を図に示した。やはり，リゾチームが傾斜のついているカバーグラス周辺に検出され，アルブミンおよびカゼインは最も隙間の小さいラインで検出された。リゾチームは質量数 14000 付近に，アルブミンは 44000 付近にピークが認められている。また，カゼインは 27000 付近に認められている。比較的溶解度の高いラクトフェリンが隙間の大きい領域（line-α と line-β の交差領域）で観察されている。

今回は構成物が分かっている試料でモデル的に分析したが、プレート上で分離してそれぞれの成分を検出できたことから，多くのバイオ分野の試料に関しても比較的簡便に分離分析が可能になるのではないかと思われる。

4. 結　　言

（1） カバーグラスをプレート上に傾斜をつけてその隙間に溶液を導入して溶媒を気化させることで，溶質を自己組織化させて分離分析する技術を開発した。

（2）分離した成分を赤外，ラマン，TOF-SIMS，MALDI-TOF/MS などの主要成分から微量成分，高質量成分の分析が可能であることを確認した。

（3）食品はじめ，工業製品，農業，医療・バイオなど多くの分野に利用可能である。

参考文献

1）永井直人，笠原勝次，佐藤健，“食品産業支援の化学チップ開発”，新潟県工業技術総合研究所工業技術研究報告書，37 号，2009，p3.

2）D. Khrustalev，A. Faghri，Int. J. Heat Mass Transfer，38，1995，p3091.

3）D. Khrustalev, A. Faghri, J. Heat Transfer，118，p725.

4）テネケス，ラムレイ，“乱流入門”，東海大学出版会，1998.

5）E. L. Koschmieder，J. Fluid Mech，30，1967，p9.

6）E. L. Koschmieder，M. I. Biggerstaff，J. Fluid Mech，167，1986，p49.

7）ドゥジェンヌ，ブロシャール・ヴィアール，ケレ，“表面張力の物理学”，吉岡書店，2003.

8）グレアゴール・ニコリス，イリア・プリゴジン，“散逸構造”，岩波書店，1992.

9）石谷孝佑，大坪研一，“米の科学”，朝倉書店，1995.