

飛行時間型二次イオン質量分析装置を用いたショウガ辛み成分の 分布状態評価のための初期検討

横山 有太¹、田中 萌美²、谷 知夏²、徳弘 麻耶²

Evaluation of pungent substances distribution in ginger by means of ToF-SIMS

Yuta YOKOYAMA¹, Moemi TANAKA², Tomoka TANI², Maya TOKUHIRO²

Summary

Ginger is a perennial plant, which is grown in the broad area ranging from the torrid zone to the temperate zone. Naturally, it is one of the vegetables representative of Kochi Prefecture. Since there is a characteristic flavor (pungent taste) in the rhizome of ginger, it has been used as a spice or an herbal medicine from ancient times. The typical pungent substances of ginger are [6]-gingerol and [6]-shogaol. However, the distribution of pungent substances in ginger tissue is not investigated due to experimental difficulties. In this study, we evaluated the distribution of [6]-gingerol and [6]-shogaol in the freeze-drying section of ginger rhizome using ToF-SIMS equipment. By applying principal component analysis and multivariate curve resolution to obtained ToF-SIMS spectra, about ten characteristic secondary ions were extracted out of about 1,000 secondary ion peaks. Then, we performed imaging of these secondary ions. As a result, it is suggested that there are two distribution patterns in the molecules originating in ginger rhizome. One is a molecule distributed over the whole sample and other is distributed locally. We suppose the molecules distributed locally is the molecules relevant to the pungent substances.

1. はじめに

ショウガは熱帯から温帯にわたる幅広い地域で栽培されている多年草であり、高知県を代表する野菜の一つである。その根茎は独特の風味（辛み）を有し、古来より薬味や香辛料、生薬として用いられてきた。表1に、ショウガの主な辛み成分の構造を示す¹⁾。一般に、辛み成分には抗菌作用や抗酸化作用など人体に対して有用な効果を示すことが示唆されており^{2~4)}、さまざまな植物の辛み成分を利用した健康食品や抗菌グッズが販売されている。一方で、辛み成分は植物のどの部分で生成され、どういった経路を通り、どこに蓄積されているかといった植物組織中での分布状態は未だ解明されていない。これは、特定成分の分布状態計測が、植物中にその成分がどれだけ含まれるかといった定性・定量測定に較べて非常に難しいことが原因である。

通常、特定成分の分析にはガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)や液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)などが用いられる。これらは、クロマトグラフィーにより成分を化学的に分離し、質量分析計を用いて質量分離を行うことで、分離した成分の定性・定量分析を行う手法である。

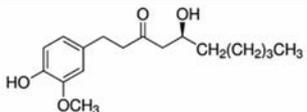
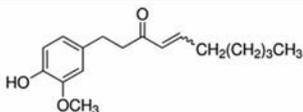
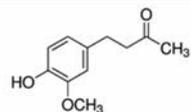
¹ 高知工業高等専門学校 ソーシャルデザイン工学科 講師

² 高知工業高等専門学校 電気情報工学科 5年

これらの手法は高精度で含有量を測定できるが、その物質が植物細胞中のどこに存在していたかといった構造情報は消失してしまう。一方、細胞の構造を計測するには顕微鏡を用いればよいが、一般的な顕微鏡ではその構造がどんな物質（分子）で形成されているか（化学情報）はわからない。構造情報と化学情報を一度に評価できる手法の一つが、飛行時間型二次イオン質量分析 (ToF-SIMS) 装置である。ToF-SIMSは、数百 μm ~ 数百 nm 程度の微小領域中に存在する分子の分布状態をイメージングすることのできる、非常に強力な測定手法である⁵⁾。ToF-SIMSの概要は2.2節で述べる。

本研究では、ショウガの辛み成分である [6]-ジンゲロール ([6]-gingerol; $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4$, M.W. 294.4) および [6]-ショウガオール ([6]-shogaol; $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_3$, M.W. 276.4) の根茎中での分布状態を解明すべく、ショウガ凍結切片試料のToF-SIMS測定を行った。以下に、その初期検討結果を報告する。

表1 ショウガの主な辛み成分¹⁾

名称	[6]-ジンゲロール	[6]-ショウガオール	ジンゲロン
化学式	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_4$	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_3$	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$
分子量	294.39	276.36	194.23
構造			

2. 実験方法

2.1 測定試料

測定試料として、市販の高知県産ショウガ根茎の凍結切片をITOガラス基板（サイズ: $10 \times 10 \times 0.7 \text{mm}^3$ 、膜厚: 2000Å 、抵抗率: $10 \Omega/\text{sq}$ 以下、ジオマテック株式会社）に乗せ、真空乾燥させたものを用いた。図1に、試料の光学顕微鏡写真を示す。凍結切片は、包埋剤にOCTコンパウンドを用い、液体窒素で凍らせた試料をメスにより徒手で作製した。ショウガオールはショウガを加熱または乾燥させることでジンゲロールが変化して生じることが知られており、凍結乾燥試料を測定することで、これらの成分を同時に測定できると考えられる。

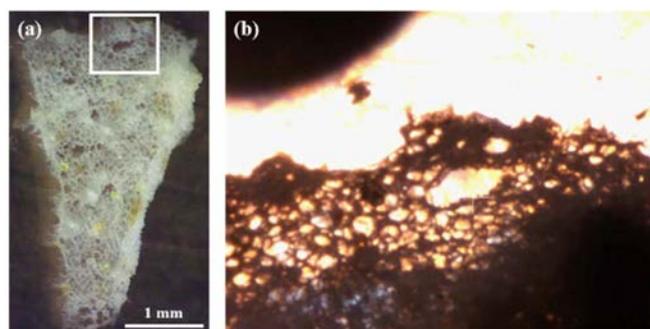


図1 (a) ショウガ切片試料の光学顕微鏡写真、(b) 測定位置の拡大写真

2.2 飛行時間型二次イオン質量分析

二次イオン質量分析 (SIMS) は、試料表面へ数百 eV ~ 数十 keV 程度に加速したイオン（一次イオンと呼ぶ）を照射し、スパッタリングにより放出される粒子の内、イオン化した粒子（二次イオンと呼ぶ）を引き出して質量分析することで、試料表面の元素組成や分布状態を計測する手法である⁵⁾。なかでも、飛行時間 (ToF) 型の質量分析計を用いたものを飛行時間型二次イオン質量分析 (ToF-SIMS) と呼ぶ。ToF-SIMS 測定の模式図を図2に示す。二次イオンには、分子構造を比較的保ったものから構造が壊れてバラバラになったものまで、さまざまな質量のイオンが含まれる。こ

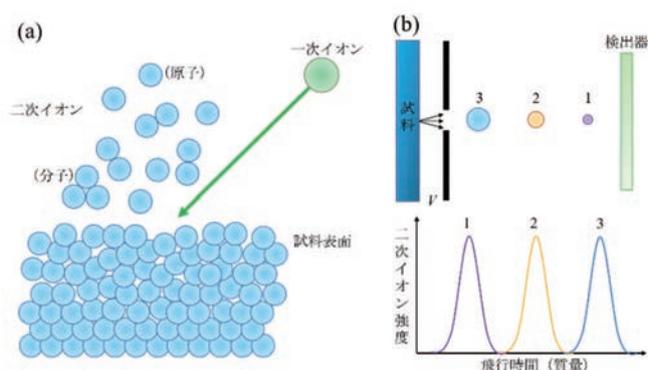


図2 (a) 二次イオン発生過程の模式図、(b) 飛行時間型質量分析計の模式図と出力されるスペクトルの関係

これらのイオンに一定のエネルギーを与えて加速すると、質量に応じた速度で運動する。これを利用したものがToF型の質量分析計である。同時に発生した二次イオンに電圧を印加して加速すると、質量の小さなイオンほど速度が大きくなるため、検出器へ早く到達する。検出器までの距離は一定であるため、飛行時間は質量の関数となる。飛行時間の分布を正確に測定することで、二次イオンの質量分布、すなわち質量スペクトルが得られる(図2(b))。また、ToF-SIMSはppmオーダーの極微量元素の検出が可能であるため、辛み成分のように揮発性の高い物質でも検出可能であると考えられる。

2.3 実験条件

試料の測定は、国立研究法人物質・材料研究機構の所有するToF-SIMS装置(Phi TRIFT V nanoTOF, ULVAC-PHI)⁶⁾を用いた。主な測定条件を表2に示す。

表2 ToF-SIMS測定条件

使用装置	Phi TRIFT V nanoTOF (ULVAC-PHI社製)	
分析用イオンビーム	30 kV Bi ₃ ⁺⁺	
	Positive : 2.20 ~ 4.20 nA DC	Negative: 2.00 ~ 3.00 nA DC
走査範囲	300×300 μm ² , 650×650 μm ² (画素数: 256×256)	
帯電中和	10 eV ~ 12 eV電子線	

3. 解析方法

ToF-SIMS測定により得られるスペクトルは一般に非常に複雑であるため、多変量解析を用いて解析を行う。本研究では、Eigenvector Research社の多変量解析ソフトウェア(PLS_ToolboxおよびMIA_Toolbox)⁷⁾を使用し、主成分分析(principal component analysis; PCA)⁸⁾と多変量スペクトル分解(multivariate curve resolution; MCR)^{9, 10)}を行った。以下で、それぞれの手法の概要を述べる。

3.1 主成分分析(PCA)

PCAは、多変量・多変数からなるデータを新たな軸に変換し、新しい変数(主成分)で表す手法である。PCAの概念図を図3に示す。PCAの計算は特異値分解が用いられることが多い。元データを X ($m \times n$ 行列、スペクトルデータの場合、 m はピークの個数、 n は質量)とすると、

$$X = TP^T \quad (1)$$

のように、 X をスコア(score)行列 T とローディング/loading)行列 P に分解する。このとき、元データの情報を最も多く含む成分を第1主成分(PC1)と呼ぶ。この向きを表す基底ベクトルがローディングであり、各データの主成分軸への射影がスコアである。第1主成分で説明しきれなかったものが第2主成分となる。同様にして、第3主成分、第4主成分・・・が得られる。主成分は元の変数

と同じだけ生成されるが、はじめの数個程度の成分で元データの情報を十分に表せる場合が多い。PCAでは解が一意的に決定されるため恣意的要素が入り込むことは無いが、軸を回転させているため、得られた解析結果に物理的・化学的意味があるとは限らず、解釈には注意が必要である。

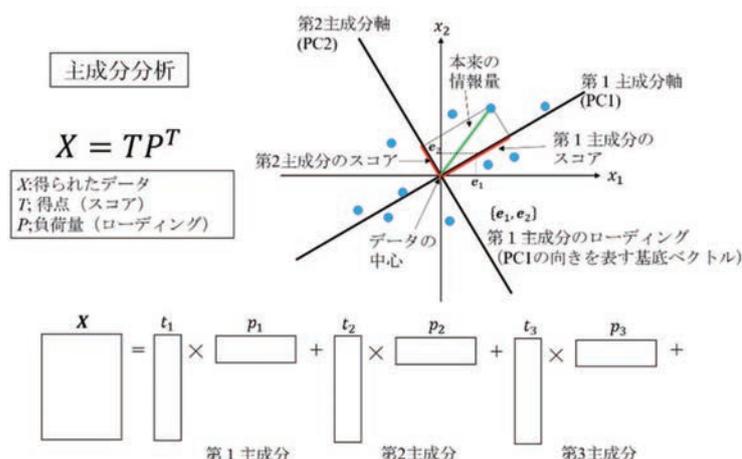


図3 主成分分析の概念図

3.2 多変量スペクトル分解 (MCR)

MCRは、多数の成分が混合したデータから純粋成分を分離する手法である。PCAとは異なり、適切な条件で解析を行うことができれば、試料に含まれる実際の成分の分布が得られる。図4に、MCRの概念図を示す。スペクトルデータの場合、得られたデータXは複数の成分のスペクトルの和であると考え、以下のように分離する。

$$X = CS^T + E \quad (2)$$

ここで、Cは純粋成分の濃度行列、Sは純粋成分のスペクトル、Eは残差行列である。MCRでは無

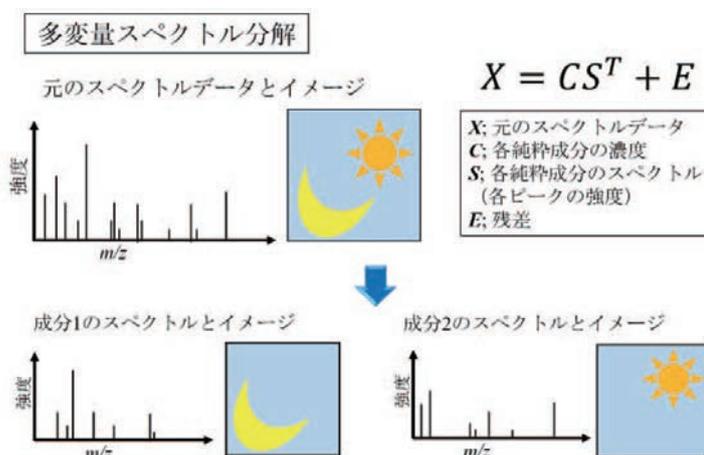


図4 多変量スペクトル分解の概念図

限に分解することが可能であるため、実際には適当な条件（非負値であるなど）を満たす解を求めることになる。また、MCRではあらかじめ成分数を設定する必要がある。そのため、まずはPCAを行い試料に含まれる成分数を見積もり、それをもとにMCRを行うことが有効である¹¹⁾。解析条件にもよるが、一般にPCAよりもMCRのほうが各成分をより鮮明に分解することができる。

3.3 データ変換

PLS_ToolboxおよびMIA_Toolboxで解析を行うには、測定データをBIF形式のファイルに変換する必要がある。本研究では、測定装置付属のソフトウェア (WinCadence) を用いて変換を行った。まず、ToF-SIMS測定で得られたデータの内、質量電荷比(m/z)が0～500の範囲から1,000個のピークを自動抽出した。その後、手動で不要なピークの削除や自動抽出できなかったピークの追加を行った。なお、測定時の画素数(256×256)ではデータが大きくなりすぎるため、解析では128×128画素数を下げた。

4. 実験結果・考察

4.1 ToF-SIMSスペクトルと二次イオン像

図5に、測定で得られたToF-SIMSスペクトル（正イオン測定）と、全二次イオン像の一例を示す。本測定では、試料中の異なる4か所でデータを取得したが、各測定においてスペクトル形状はほぼ同一であるため、以降は図5のスペクトルの解析結果について述べる。スペクトルの横軸は m/z 、縦軸は強度（イオンの検出個数）である。全二次イオン像は、測定範囲から発生したすべての二次イオンの強度を足し合わせたものであり、試料表面の概観を示している。スペクトル全体では、 m/z 39（カリウム）のピークが非常に強く検出されている。一般に、生体試料に含まれるカリウムやナトリウム(m/z 23)は、ToF-SIMS測定では強度が大きくなる。また、物質によってイオン化効率が異なるため、強度の大きなピークが主要成分であるとは限らない。

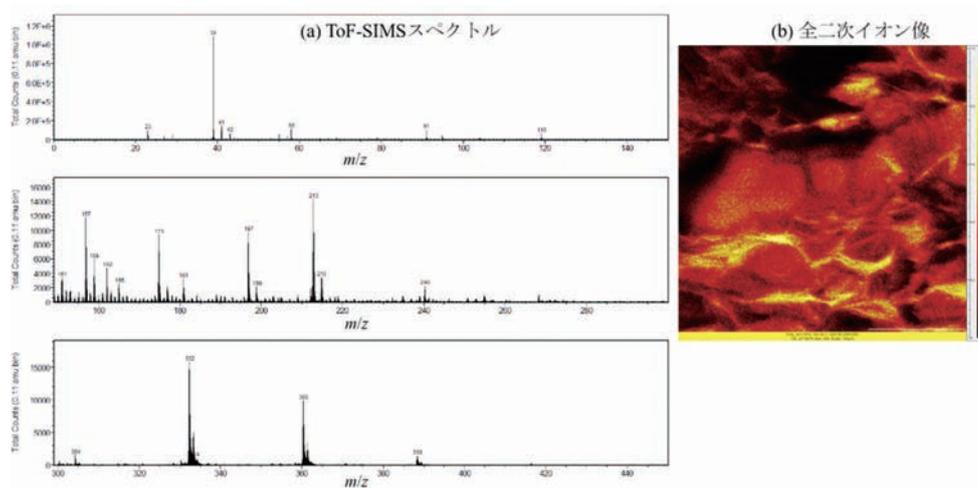


図5 (a) 代表的なToF-SIMSスペクトル(positive SIMS, m/z 0~450)、(b) 全二次イオン像

一方、ショウガの辛み成分である[6]-ジンゲロール(m/z 294.4)、[6]-ショウガオール(m/z 276.4)の分子イオンはほとんど検出されていない。本測定で使用した装置は30kVの Bi_3^{++} を一次イオン源としており、衝突時に試料表面へ与えるエネルギーが大きい。そのため、分子構造が破壊され、断片化（フラグメント化）した二次イオン（フラグメントイオン）が主に発生していると考えられる。フラグメント化の機構は非常に複雑なため、発生するフラグメントイオンを予想することはほぼ不可能である。しかし、分子構造によっては分裂しやすい部分が存在するため、特定の間隔でピークが現れることがある。例えば、図5(a)のスペクトル2段目の m/z 181, 197, 213のように、一定の間隔（この場合16ずつ）でピークが現れている部分がある。これは、元分子から m/z 16の分子（例えばOや CH_4 など）が外れた、あるいは付着しているためであり、これら一連のピークは同じ分子由来であると考えられる。他にも、3段目の m/z 304, 332, 360, 388のように、 m/z 28ずつでピークが現れている部分などもある。

このように、ToF-SIMSスペクトルの特徴からある程度の予想を立てることはできるが、フラグメントの発生機構は未だ未解明であり、スペクトルを一瞥しただけではどのピークが測定対象物由来のものかはわからない。そこで、PCAとMCRを用いてスペクトルの分離を行い、試料に含まれる特徴的な成分の抽出を試みた。

4.2 PCAによるデータ解析

3.3節で述べた手順により変換したスペクトルデータに対し、PCAを行った。解析を行うにあた

りデータの前処理を行うことが一般的である。本研究では、①前処理なし、②標準化(autoscaling)、③中心化(mean center)の3つで解析を行った。標準化処理を施したスペクトルデータへPCAを適用した場合、各主成分に同程度のローディングを持つ成分が多数含まれてしまい、各成分をうまく分離することができなかった。これは、標準化処理により非常に強度の弱いピークまでもが解析結果に影響を与えるようになったためであると考えられる。一方、前処理なしおよび中心化処理を施した場合はほぼ同様の結果が得られたが、後述の寄与率やスコアプロット等から、中心化処理のほうが各成分をうまく分離できていると判断した。そこで、以降では中心化を施したデータを用いて考察を行う。

図6に、中心化を施したデータの解析結果を主成分4(PC4)まで示す。左側のイメージがスコアプロット、右側の散布図がローディングプロットである。括弧内のパーセンテージは寄与率(各々の主成分が元データに対してどれだけの情報を含んでいるか)を示す。PC1とPC2で元データのおよそ91%を抽出している。ローディングプロットは、スコアプロットがどの m/z を表しているかを示している。PC1では m/z 39の強度が一番大きく、スコアプロットは主に m/z 39の分布を表していると考えられる。前述のように m/z 39はカリウムであり、カリウムは試料全体に分布していると考えられる。

PCAでは正負両方の値をとる。これは、正の部分の強度が大きく、負の部分の小さいという意味ではなく、正の部分と負の部分では特徴が異なる、すなわち異なる物質が存在していることを示している。PC2のスコアプロットでは、PC1と同じ部分、特にPC1の強度が正に大きかった部分が正に大きくなっており、その周辺が負に大きくなっている。ローディングプロットを見ると、正に大きい部分には m/z 58, 91, 119などが多く存在すると考えられる。また、 m/z 332, 360も比較的強度が大きいことが特徴である。一方、 m/z 39は負に強く出ており、スコアプロットで暗くなっている部分にはカリウムが多く存在することがわかる。これはPC1の結果とも対応している。

PC3, PC4は寄与率が非常に小さいが、いくつかの特徴的な成分の分布を示している。これらの結果から、本測定試料には主に①PC1の正、②PC2の正、③PC3の正、④PC3の負、⑤PC4の正、⑥PC4の負、の6つの成分が含まれていると考えられる。次に、この成分数を初期条件とし、MCRを行った。

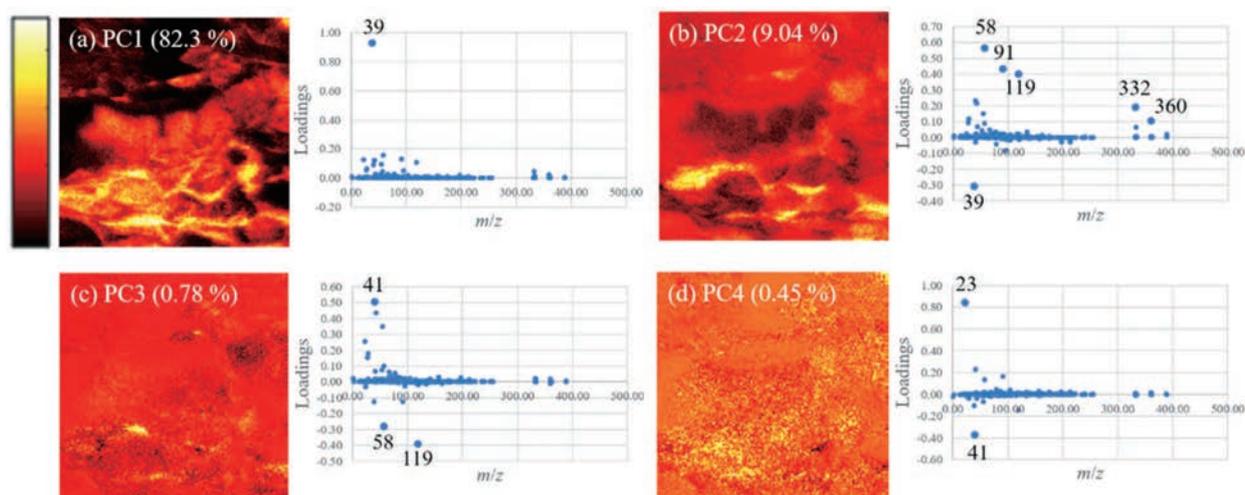


図6 PCA (中心化処理) のスコアプロット (左側) およびローディングプロット (右側)

4.3 MCRによるデータ解析

図7に、成分数を6として計算したMCRの結果を示す。左側が各成分(component)の分布イメージ、右側がそのローディングである。MCRでは計算時の条件として濃度行列、スペクトル行列が非

負値であるとするため、標準化や中心化のようにデータの中心を揃えるような前処理を行うとうまく解析できない場合がある。そこで本研究では、Poisson scalingと呼ばれる前処理（ToF-SIMSスペクトルへ適用する場合、二次イオン強度の平方根平均をとる）を採用した。

Comp.1とComp.2の分布イメージは同じような部分で強度が大きくなっているが、ローディングを見るとComp.1では m/z 39（カリウム）が、Comp.2では m/z 23（ナトリウム）が主要な成分であり、この部分に植物組織が存在することを示している。Comp.3-5も似たようなイメージであり、図5(b)の全二次イオン像で特に強度が大きかった部分が抽出されている。しかし、ローディングを見ると、Comp.3では m/z 41、Comp.4では m/z 58, 119、Comp.5では m/z 58, 91, 332, 360といった分子の寄与が大きい。PCAでは、 m/z 58, 91, 119, 332, 360は同じ主成分（主成分2）に表れていたが、MCRを行うことで、 m/z 119は他とは特徴が異なることが示唆された。 m/z 119は基板に使用しているITOガラスの構成要素であるスズ(Sn)の原子量(118.7)に近く、またToF-SIMSスペクトル強度も大きいことから、基板由来である可能性がある。Comp.6はComp.3-5で暗く表示されている部分の強度が大きくなっており、細胞の内部の分布を主に表していると考えられる。この部分には、 m/z 39, 55, 197, 213といった分子が多く存在している。

MCRを行うことで、PCAよりも詳細かつ鮮明に特定の分子を抽出することができた。しかし、成分によっては複数の m/z のローディングが大きくなっており、十分に分離できていない可能性がある。そこで次に、MCRで示唆されたこれら特徴的な分子について、それぞれの二次イオン像を作製し、分布状態を比較した。

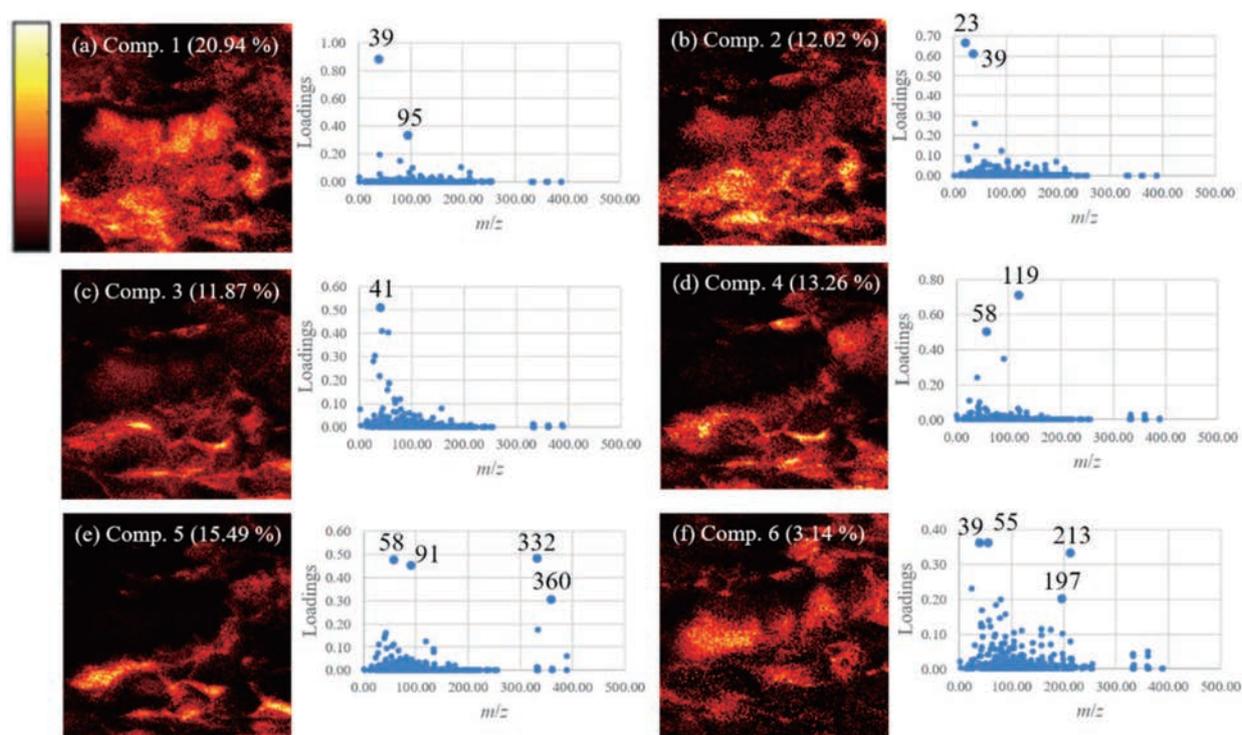


図7 MCR (Poisson scaling) による各成分のイメージ (左側) およびローディングプロット (右側)

4.4 二次イオン像による分布状態評価

図8に、全二次イオンおよび m/z 23, 39, 58, 91, 119, 197, 213, 332, 360の二次イオン像($300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$)を示す。 m/z 23(Na), 39(K)は全二次イオン像と同じ分布を示しており、試料全体に分布している。また、 m/z 197と213も、強度は弱いが生試料全体に分布しており、植物由来（特に細胞内部の）分子であると考えられる。一方、 m/z 58, 91, 119, 332, 360は全二次イオン像で強度の大きい部分に多く分布しており、同一分子のフラグメントである可能性がある。なかでも、 m/z 332と

360は質量数が28ずれており、さらに図5 (a)のスペクトルには m/z 304, 388も現れていることから、同じ分子に由来するフラグメントイオンである可能性が高い。 m/z 332は[6]-ジゲロールにカリウムが吸着し、水素が一つとれた場合の分子量に近く、一連のピークはここから m/z 28の分子（例えばCOやC₂H₄）が吸着・脱離することで生じたフラグメントであると考えられる。

このように、PCAおよびMCRで示唆された二次イオンを実際にマッピングすることで、主に試料全体に分布している分子と、特定部分に分布する分子が存在することが明らかとなった。

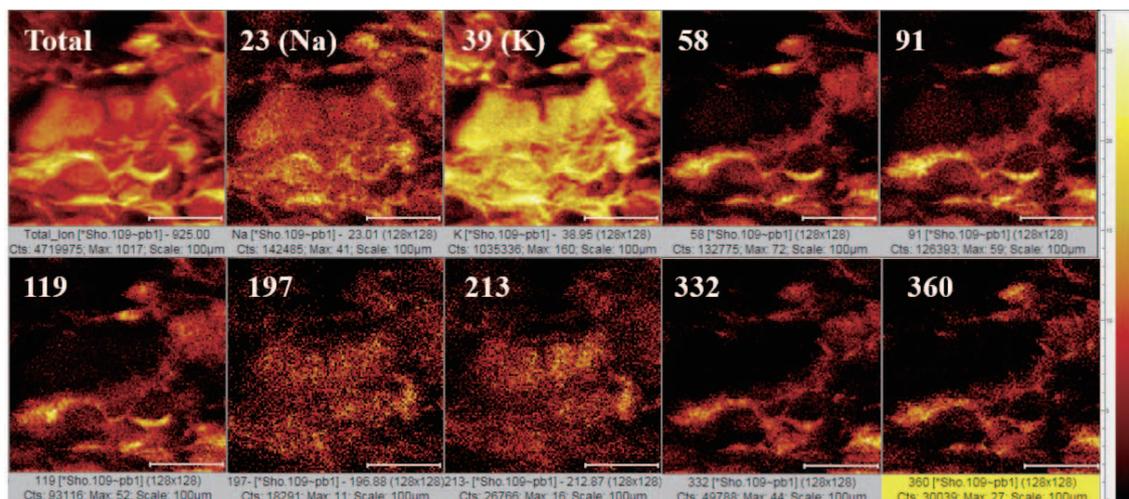


図8 主な二次イオン像 (300×300 μm²)

5. 今後の課題

本測定では、植物由来と思われる分子の内、試料全体に分布する分子と、特定部分に分布する分子が存在することが明らかとなったが、どれが辛み成分 ([6]-ジゲロール、[6]-ショウガオール) 由来の分子であるかの同定までは行えなかった。特に、 m/z 58, 91などの低質量分子は炭素、水素、酸素の組み合わせで非常に多くの種類が考えられる。例えば、 m/z 58となる組み合わせにはC₄H₁₀やC₃H₆Oなどがあり、これらはジゲロールやショウガオールが分裂することで生成される可能性もあるが、植物細胞のどこからでも発生する可能性があるため、本測定結果からだけでは辛み成分由来であるとは言えない。また、基板の影響を受けている可能性や、包埋剤 (OCTコンパウンド) 由来の可能性もあるため、さらなる検討が必要である。具体的には、(1) [6]-ジゲロール、[6]-ショウガオール溶液のToF-SIMS測定、(2) 基板をSiに変更、(3) OCTコンパウンドを使用しない切片試料作製、(4) 一次イオン源の変更などを検討している。

6. まとめ

本研究では、ショウガ根茎部の凍結乾燥切片をToF-SIMS装置を用いて測定し、ショウガ辛み成分である[6]-ジゲロール、[6]-ショウガオールの分布状態の評価を試みた。得られたスペクトルをPCAおよびMCRを用いて解析することで、1,000個程度の二次イオンピークの中から、10個程度の特徴的な二次イオンを抽出することができた。これらの二次イオンの分布状態を評価することで、植物由来と思われる分子には、試料全体に分布する分子と、特定部分に分布する分子が存在することが明らかとなった。しかし、今回の測定のみではショウガ辛み成分の分布状態までは特定できな

かった。今後、試料作製方法や測定条件を改善することで、辛み成分の分子イオンの分布状態を特定していく。最終的に、辛み成分の生産地や品種依存性を調査することで、特色を生かしたブランド化による販売促進や地域振興などにつなげていきたい。

謝 辞

本研究は、“株式会社テイク・システムズ”からの助成金により行うことができました。厚く御礼申し上げます。試料の測定は、“文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム 微細構造解析プラットフォーム 試行的利用制度(B) (地方支援)”による助成ならびに“国立研究法人物質・材料研究機構 技術開発・共用部門 材料分析ステーション 表面・微小領域分析グループ”の安福秀幸博士、岩井秀夫博士のご協力により行うことができました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 永谷園生姜部HP http://www.shouga-bu.com/report/report_3.html (2018/10/31)
- 2) J. Yamahara, S. Hatakeyama, K. Taniguchi, M. Kawamura, M. Yoshikawa, *Yakugaku Zasshi* 112(9), 645-655 (1992).
- 3) V. Dufour, M. Stahl, C. Baysse, *Microbiology* 161, 229-243 (2015).
- 4) Z. Lu, C. R. Dockery, M. Crosby, K. Chavarria, B. Patterson, M. Gledd, *frontiers in Microbiology* 7, 1403-1-9 (2016).
- 5) 石田英之、吉川正信、中川善嗣、宮田洋明、加連明也、萬尚樹、「分析化学実技シリーズ 応用分析編1 表面分析」、共立出版株式会社 (2011).
- 6) 物質・材料研究機構 ナノテクノロジープラットフォーム 表面分析装置のHP <http://www.nims.go.jp/nmcp/equipment7.html> (2018/10/31)
- 7) Eigenvector Research社HP <http://eigenvector.com/> (2018/10/31)
- 8) 尾崎幸洋、宇田明史、赤井俊雄、「化学者のための多変量解析 ―ケモメトリックス入門―」、講談社サイエンティフィク (2002).
- 9) 長谷川健、「スペクトル定量分析」、講談社サイエンティフィク (2005).
- 10) S. Muto, T. Yoshida, K. Tatsumi, *Materials Transactions*, 50, No.5, 964-969 (2009).
- 11) Y. Yokoyama, T. Kawashima, M. Ohkawa, H. Iwai and S. Aoyagi, *Surf. Interface Anal.* 47, 439-446 (2014).