—ノート—

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計を用いた 油脂類の法科学的識別法

金子 毅, 鈴木雄亮

千葉県警察本部刑事部科学捜査研究所
〒260-0024 千葉県千葉市中央区中央港1丁目71番1号

Forensic Discrimination of Oils by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)

Tsuyoshi Kaneko and Yusuke Suzuki

*Forensic Science Laboratory, Chiba Prefectural Police H.Q.
1-71-1 Chuoko, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba 260-0024, Japan*

*(Received 17 July 2018; accepted 30 October 2018;
Published online 20 December 2018 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.754)*

Triacylglycerols (TAG) are composed of three esterified fatty acids bound to a glycerol backbone and are the main components of several types of edible or cooking oils. An oil such as salad oil is occasionally used for a crime and is left in the crime scene as physical evidence. In criminal investigation, one of important evidence is to identify the kind of oil.

Therefore, matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was used for forensic discrimination of oils. In this study, pencil lead as a matrix was used. And this MALDI-TOF-MS with pencil lead technique can potentially be used to identify unknown oil samples for forensic discrimination.

Key words: MALDI-TOF-MS, Oil, Forensic discrimination, Pencil

諸 言

サラダ油・天ぷら油などの名称で市販されている食用または調理用動植物油は、ときとして犯罪現場から物的証拠として採取されることがあり、犯罪を証明するための重要な資料としてその成分鑑定が行われる。犯罪鑑識に係る動植物油の鑑定は、油種の推定や異同識別を考慮して、ステロール・構成脂肪

酸組成の測定から得られる情報を主体として行われていることから、その情報を得る簡易的手法について報告^{1,2)}を行った。また、油種の推定や異同識別のためには、油脂の主成分であるトリアシルグリセロール (TAG) の組成情報を得ることも重要である。

ここで、TAG はそれを構成している脂肪酸の組成にもよるが、ガスクロマトグラフィーによる分離

分析が困難であるものが多く、難揮発の TAG の組成情報を得るには、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS: Liquid Chromatography Mass Spectrometry) が適しているものと思われる。油脂の LC/MS による分析についても、すでに多くの報告があり³⁻⁷⁾、TAG のマススペクトルが分子構造を反映した特徴的なパターンを示すことが知られている。LC/MS により分離されたピークは、グリセリンと結合している脂肪酸との総炭素数から不飽和結合数の倍数を差し引いて得られる数字 (ECN: equivalent carbon number) で示すことができ、そのピークは同じ ECN を持つ TAG の合成ピークとなる。したがって、1 つのピークに違う質量の TAG が混在したマススペクトルとなる特徴を持っている。また、油脂分析のための条件の多くはグラジエント測定を行うことから、つぎの検体の測定開始までに移動相の安定時間を必要とし、多数の検体を処理することとなると、さらに測定のために長時間を要することとなる。

そこで、とくに油脂試料が多検体あるような場合、その TAG の組成情報をより迅速に、簡便に得る手法として、ソフトなイオン化で詳細な質量測定を行うことができるマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) が有用なものと考えられる。MALDI-TOF-MS による油脂分析も、すでにこれまでに多くの研究者により報告⁸⁻¹¹⁾されており、その多くは油脂にマトリックス剤とカチオン化剤を添加したものを試料として測定している。また、それらの報告では有機化合物である有機マトリックス剤を使用しており、使用する有機マトリックス剤、カチオン化剤、油脂を溶解し混合するための溶剤の検討も必要となる。

一方、迅速かつ簡便な試料調整法として鉛筆の芯をマトリックス剤とする方法¹²⁾があることから、これを用いた油脂の MALDI-TOF-MS を検討し、有機マトリックス剤との比較を行った。また、得られるその質量情報と LC/MS で得られる油脂のクロマトグラムおよびそのマススペクトル情報との比較を行った。

材料および方法

1. 試料および試薬

測定のための油脂試料は、トリオレイン (東京化成工業株式会社、純度80%以上)、市販の食用調合植物油 (サラダ油)、キャノーラ油、大豆油、綿実油、ひまし油、あまに油、パーム油、オリーブ油、やし油の各溶液を用いた。溶液の溶剤は、MALDI-TOF-MS 用試料調製にはクロロホルムとアセトニトリルとの等量混合液を各試料濃度が10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ となるように、LC/MS 用試料調製には初期混合比の移動相溶液を各試料の濃度が1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ となるように用いた。

マトリックス剤として、2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (2,5-DHB)、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸 (CHCA)、3-インドールアクリル酸 (3-IAA)、5-クロロサリチル酸 (5-CSA)、2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン-水和水物 (2,4,6-THAP)、鉛筆 (三菱, Hi-uni 2B) を用いた。鉛筆芯以外の有機マトリックス剤は、いずれも東京化成工業株式会社のものを使用し、いずれも濃度が10 mg/mL となるようにアセトニトリルに溶かした。

カチオン化剤は、濃度5 mg/mL のトリフルオロ酢酸ナトリウム (NaTFA) のアセトニトリル溶液を用いた。クロロホルム、アセトニトリル、NaTFA は、いずれも和光純薬工業株式会社のものを用いた。

2. MALDI-TOF-MS

質量測定は、マトリックス支援レーザー脱離飛行型質量分析計 ultrafleXtreme (Bruker Daltonics) を用い、測定は次のとおり行った。まず、アルミニウムの板 (長辺75 mm, 短辺25 mm, 厚さ0.3 mm) の表面に鉛筆で直径約2 mm の円を描き、この円の内側も鉛筆で塗りつぶし、この部分に測定試料とカチオン化剤の混合液を滴下し、溶剤を留去した。このアルミニウム板をスライドガラス用 MALDI プレートホルダーに装着し、TAG の質量測定を行った。

アルミニウム板の表面は、あらかじめ金属研磨剤で磨き、その後有機溶剤により洗浄したものを使用した。

イオン化は smartbeam-II (355 nm) レーザーシステムを用い、質量測定はポジティブのリフレクタモードで行い、測定質量範囲を m/z 0-2000 とした。

有機マトリックス剤については、試料との混合溶液をアルミニウム板に載せ、溶剤を留去したものについて測定を行った。

3. LC/MS

LC/MS は、液体クロマトグラフ UFLC-20 システム (島津製作所) により成分分離を行い、タンデム質量分析計 LXQ (Thermo Scientific) によりマスペクトルの測定を行った。分離カラムは、ODS-3 (長さ250 mm, 内径4.6 mm, 粒子径 5 μm , ジーエルサイエンス) を用い、移動相にアセトンとメタノールの混合液を 1 mL/min の流量で使用した。移動相のグラジエント条件は、アセトン濃度を体積分率で50%から7分間で95%とし、その後測定終了までこの濃度を保持するようにプログラムした。オープン温度は40°Cに設定し、試料注入量は10 μL とした。質量分析の条件は、大気圧化学イオン化をポジティブモードで用い、キャピラリー電圧42 V、質量測定範囲 m/z 50-2000 のスキャンモードとした。

結果および考察

1. 有機マトリックス剤を用いた TAG の質量測定

食用調合植物油の油脂試料にその等量のマトリックス剤溶液と 1/5 容量のカチオン化剤溶液を加えた混合液0.2 μL を MALDI 用プレートにのせ、溶剤を蒸発させたものについて測定を行った。その結果、2,5-DHB, 2,4,6-THAP, 5-CSA の3種のマトリックス剤では、植物油の TAG 情報 (ナトリウム (Na) 付加物に相当する質量イオン: $[M + Na]^+$) を示すマスペクトルを測定することができたが、CHCA および 3-IAA ではほとんどみられなかった。また、TAG のマスペクトルが測定されたマトリックス剤のうち、2,5-DHB での TAG の測定強度がもっとも高かったことから、今回用いたマトリックス剤のなかでは、2,5-DHB が植物油の TAG 測定において最も適したものといえる。

2. 鉛筆芯をマトリックス剤とした TAG の質量測定

アルミニウム板に鉛筆で描いた円部位に、食用調合植物油の油脂試料にその等量のアセトニトリルと 1/5 容量のカチオン化剤溶液を加えた混合液0.2 μL を滴下し、溶剤を留去した後、この部分について MALDI-TOF-MS 測定を行った。得られたマスペクトルは、2,5-DHB を用いて得られた以上の強度で TAG 情報を示すものであった。測定されるス

Fig. 1 MALDI-TOF-MS spectra of salad oil with 2,5-DHB (Upper) and pencil lead (Bottom) as assisted matrix

Fig. 2 MALDI-TOF-MS spectra of oil samples. (a): Canola oil, (b): Soybean Oil, (c): Cottonseed Oil, (d): Castor Oil, (e): Linseed Oil, (f): Palm Oil, (g): Olive Oil, (h): Coconut Oil

Fig. 2 MALDI-TOF-MS spectra of oil samples. (a): Canola oil, (b): Soybean Oil, (c): Cottonseed Oil, (d): Castor Oil, (e): Linseed Oil, (f): Palm Oil, (g): Olive Oil, (h): Coconut Oil

ペクトルを比較するためにレーザー照射回数は、いずれも2000ショットとした。また、鉛筆についてはBから10Bのものを比較したところ、検出されるイオン強度にはほとんど差はみられなかったものの、5B以上の鉛筆では芯が柔らかくアルミプレート上に黒丸を記すことが困難となることから2Bを選択した。Fig. 1に、2,5-DHB（上段）と鉛筆芯（下段）を使用したときに得られた食用調合植物油のマススペクトルを示す。

そのほかの油脂試料（なたね油、大豆油、綿実油、ひまし油、あまに油、パーム油、オリーブ油、やし油）にその1/5容量のカチオン化剤溶液を加えた混合液について測定して得られたマススペクトルをFig. 2に示す。レーザー照射は、各油脂のマススペクトルが十分に確認できる2000–4000ショットの間で行った。これらのTAGの質量情報は、各油

脂の構成脂肪酸の組成を反映していることがわかる。たとえば、オリーブ油のスペクトル（Fig. 2(g)）では、 m/z 908がメインとなっており、これはトリオレインの質量に相当し、その次に強度の高い m/z 882はグリセリンと結合している脂肪酸がオレイン酸2つとパルミチン酸1つ（または、リノール酸とステアリン酸とパルミチン酸）の質量に相当している。オリーブ油の構成脂肪酸のうち約7割がオレイン酸であり、リノール酸とパルミチン酸が各約1割であることから矛盾のないTAG組成を反映した質量情報といえる。

また、Fig. 1に示した食用調合植物油は、そのラベルに大豆油となたね油との調合油と表示されており、Fig. 2(b)の大豆油とキャノーラ油のスペクトルからもそのTAG組成を反映しているといえる。

Fig. 3 Total ion chromatogram (upper) of palm oil and mass spectrum (bottom) of detected peak (ECN 48)

Fig. 4 Total ion chromatogram (upper) of triolein and mass spectrum (bottom) of detected peak (ECN : 48)

3. LC/MS と MALDI-TOF-MS による TAG の測定

油脂の LC/MS で得られる情報は、溶出・検出されるピークの保持時間とそのピークのマスペクトルであり、Fig. 3 と Fig. 4 にそれぞれパーム油とトリオレインから得られたトータルイオンクロマトグラム（上段）と最大ピーク（保持時間約10分）のマスペクトル（下段）を示す。このピークは、いずれも ECN : 48 に相当するピークであり、いずれも TAG を構成している脂肪酸の1つがとれた2つのオレイン酸からなるジアシルグリセロール由来と考えられるフラグメントイオン (m/z 604) が主となっており、よく似たマスペクトルを示している。パーム油では2つのオレイン酸と1つのパルミチン酸からなる TAG (m/z 860) および1つのオレイン酸と2つのパルミチン酸からなる TAG (m/z

834) と考えられるピークが、トリオレインではトリオレインを示す TAG (m/z 886) がそれぞれ検出されており、マスペクトル情報の詳細な分析をすることで構成脂肪酸の情報を得ることができる。

ここで、トリオレインの MALDI-TOF-MS により得られたマスペクトルを Fig. 5 に示す。マスペクトルの主ピークは、構成する脂肪酸が3つのオレイン酸からなっている TAG ($[M+Na]^+ : m/z$ 908) であることがわかり、Fig. 2(f) のパーム油のマスペクトル（上から2段目）と比較しても、その違いが容易に判断できる。

つぎに、Fig. 6 にひまし油の LC/MS により得られたトータルイオンクロマトグラム（上段）と最大ピーク（保持時間約4分）のマスペクトル（下段）を示す。ピークの保持時間情報からは、ECN が非常に小さいものとも思われるが、ひまし油を構成し

Fig. 5 MALDI-TOF-MS spectrum of Triolein

Fig. 6 Total ion chromatogram (upper) of Castor Oil and mass spectrum (bottom) of detected peak (retention time: 4 min)

ている脂肪酸の約9割がリシノール酸であり、水酸基を持っているため、通常のTAGの測定で得られるクロマトグラムと同様に扱うことができない。また、このピークはトリリシノール酸グリセロール

(m/z 934 : $[M+H]^+$) と考えられるが、マスペクトルは水分子3つ分がはずれたと考えられるフラグメントイオン (m/z 880 : $[M-3H_2O+H]^+$) が出現しておりマスペクトルからの判断も困難であ

る。それに対し、MALDI-TOF-MS によって得られる質量情報 (Fig. 2(d)) は、トリリシノール酸グリセロール (m/z 956 : $[M+Na]^+$) の存在を示しており、質量情報を得るために有用なものといえる。

これまでに報告してきた油脂の LC/MS 測定⁷⁾では、その質量情報は TAG から脂肪酸 1 つがとれたフラグメントイオンが主ピークとなることや、測定条件によっては成分分離が不十分であることから、詳細な質量情報として油脂の TAG 組成を得ることが困難であったが、MALDI-TOF-MS を利用・併用することで TAG の質量情報を容易に得ることができ、本装置が犯罪鑑識に係る油類鑑定に有用であることがわかった。油脂の MALDI-TOF-MS において、2,5-DHB が油脂分析に対し良好なマトリックスであることがわかったが、この溶液を長期間 (1 週間程度) 保存した場合、測定される油脂のスペクトル強度が極端に低下するといったことがあった。これに対し鉛筆を用いる本手法が試薬溶液の保存または測定時に調製する煩雑さをなくし、より迅速かつ簡便な測定試料の調製に適応できるものと考えられる。

文 献

- 1) Mikuma T. and Kaneko T., A quick discrimination of vegetable oil by solid-phase microextraction method. *Forensic Sci. Int.*, **198**, 79–84, 2010.
- 2) 金子 毅, 野島裕香, 鈴木雄亮, マイクロコイルを用いる GC 用サンプリングデバイスの試作とその応用. 分析化学, **64**, 363–369, 2015.
- 3) Mottram H. R. and Evershed R. P., Elucidation of the bovine milk fat triacylglycerols using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **926**, 239–253, 2001.
- 4) Hočapek M., Jandera P., Zderadička P. and Hrubá L., Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1010**, 195–215, 2003.
- 5) Héron S., Dreux M. and Tchaplal A., Post-column addition as a method of controlling triacylglycerol response coefficient of an evaporative light scattering detector in liquid chromatography- evaporative light-scattering detection. *J. Chromatogr. A*, **1035**, 221–225, 2004.
- 6) Héron S., Maloumbi M.-G., Dreux M. Verette E. and Tchaplal A., Method development for a quantitative analysis performed without any standard using an evaporative light-scattering detector. *J. Chromatogr. A*, **1161**, 152–156, 2007.
- 7) 三熊敏靖, 金子 毅, 液体クロマトグラフィー/質量分析法によるアシルグリセロールの直接検出を用いた植物油の法科学的異同識別. 分析化学, **59**, 399–404, 2010.
- 8) Asbury G. R., Al-Saad K., Siems W. F., Hannan R. M. and Hill H. H. Jr., Analysis of Triacylglycerols and Whole Oils by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass spectrum.*, **10**, 983–991, 1999.
- 9) Pittenauer E. and Allmaier G., The Renaissance of High-Energy CID for Structural Elucidation of Complex Lipids: MALDI-TOF/RTOF-MS of Alkali Cationized Triacylglycerols. *J. Am. Soc. Mass spectrum.*, **20**, 1037–1047, 2009.
- 10) Picariello G., Paduano A., Sacchi R. and Addeo F., MALDI-TOF Mass Spectrometry of Polar and Nonpolar Fractions in Heated Vegetable Oils. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 5391–5400, 2009.
- 11) Vichi S., Lazzez A., Grati-Kamoun N. and Caixach J., Modifications in virgin olive oil glycerolipid fingerprint during olive ripening by MALDI-TOF MS analysis. *LWT-Food Sci. Tech.*, **48**, 24–29, 2012.
- 12) Black C., Poile C., Langley J. and Herniman J., The use of pencil lead as a matrix and calibrant for matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 1053–1060, 2006.