

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00519

研究課題名(和文) 脂肪酸の超簡易誘導体化法の開発：脂肪酸安定同位体比を用いた環境動態の理解へ向けて

研究課題名(英文) A rapid derivatization method for measuring the stable isotope ratios of fatty acids in the study of biogeochemical cycles

研究代表者

後藤 晶子 (GOTO, Akiko)

金沢大学・自然システム学系・博士研究員

研究者番号：00422791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪酸の水素、炭素の安定同位体比は、脂質の供給源や過去の環境復元、生産/消費プロセスなどを知るための有用なツールとして様々な分野での活用が期待されるが、現在その利用は、前処理、特に誘導体化に関わる難しさによって妨げられている。本研究では、アルコールとクロロギ酸エステルを用いた新たな脂肪酸の誘導体化(エステル化)法によってこの問題を解決することを試みた。この方法では、容器中で脂肪酸と試薬とをしっかりと混合することのみで、室温下、数分間で、安全かつ簡便に反応が進行する。また、反応時にいくらかの水の混入を許容できることから、湿度が高い環境下でも湿気を気にすることなく作業ができる利便性を有している。

研究成果の概要(英文)：Stable isotope ratios (D/H, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) analysis of fatty acids have been widely employed as a powerful tool for tracing biological sources and production/consumption processes of lipids in diverse studies. However, enough to benefit from this isotope analysis, we must reduce inconvenience in the derivatization method in the current procedure. In this study, we replace the standard acid-alcohol derivatization by the chloroformate derivatization, to much modify and reduce this inconvenience. Unlike the standard derivatization (which requires toxic reagents at high temperature for a few hours under hydrophobic condition), the chloroformate derivatization well work less-toxic reagents at room temperature for a few minutes. Moreover, this new derivatization does not strictly require hydrophobic condition (where water content by ~2% is permitted), resulting in that great care on the hydrophobicity is unnecessary for the derivatization, for example, even in rainy season.

研究分野：地球化学

キーワード：脂肪酸のエステル誘導体化

1. 研究開始当初の背景

ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析計 (GC-IRMS) の開発で、注目する有機分子に特化した安定同位体比分析が可能になったことから、個々の有機分子の安定同位体比を用いた研究が環境学、地学、生態学、医療、食品科学など多くの分野でおこなわれるようになってきている。脂肪酸は、細胞膜の主要成分であることに加えて環境中で普遍的に見いだされる脂質であり、その供給源や過去の環境復元、生産/消費プロセスなどの情報を有していることから、多くの分野でそれらの情報が活用できることが見込まれる。しかしその一方で、脂肪酸の安定同位体比を利用するための前処理である誘導体化の作業には化学的な操作が多く含まれており、化学の知識や操作に習熟している必要があることが、多くの分野の研究者にとって脂肪酸の安定同位体比を利用する際の大きな妨げとなってきた。そこで、簡便かつリスクが少ない誘導体化法を確立することができれば、これまでの技術的な問題が解消され、より多くの分野で脂肪酸の安定同位体比を利用した研究が容易になって、各分野での研究の発展に寄与できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪酸の水素と炭素の安定同位体比分析を念頭に、その前処理として必要な誘導体化の操作を簡便かつ安全におこなうための超簡易誘導体化 (エステル化) 法を検討することである。様々な分野で脂肪酸の安定同位体比をツールとして活用することができるようになることを目指して、化学に関する高度な知識や熟練した技術を習得しなくても誰でもが簡単に操作できる誘導体化法を検討した。現在一般的に使用されている誘導体化法は、反応のために数時間の高温での加熱が必要であるほか、水の混入による反応の阻害や毒性試薬の使用など多くの困難さを有している。本研究では、特に、安全性と簡便性、汎用性の観点から、室温条件下で数分間反応させることで誘導体化が達成できる新たな手法を検討した。

3. 研究の方法

本研究では、一般的におこなわれてきたアルコールと酸による誘導体化を、アルコールとクロロギ酸エステルによる誘導体化に置き換えて、使用するアルコールの種類、反応に必要な時間、危険性の高い試薬の使用量の限定、水の混入の影響について、脂肪酸の混合試薬 (炭素数 16~31 の飽和脂肪酸を 10 種類混合したもの) を使用して検討した。

アルコールとして、それぞれメタノール、エタノール、1-プロパノールを用いて誘導体化の作業をおこなって、反応の進行状況と操作性を確認した。具体的には、脂肪酸の混合試薬をアルコールに溶解して、ピリジンとクロロギ酸エステル (それぞれクロロギ酸メチ

ル、クロロギ酸エチル、クロロギ酸プロピル) を添加して攪拌、反応させた。アルコール：ピリジン：クロロギ酸エステルの容量比は、おおよそ 1:0.08:0.03 である。また、操作性の高かったメタノール/クロロギ酸メチル、エタノール/クロロギ酸エチルを用いた方法において、反応に必要な時間を把握するために、1分~30分の反応時間、10秒~60秒の攪拌時間の組み合わせで実験した。さらに、ピリジン量を段階的に減少させた系 (クロロギ酸エステルに対して 2.5 倍、1.8 倍、1.25 倍、0.625 倍) で反応の進行状況を検討して、人体に有害で、危険性の高いピリジンの減量を目指した。一般的にエステル化において反応系への水の混入は反応を阻害する要因とされ厳禁である。本方法において、系に水が混入することによる反応への影響を評価するために、アルコールの容量のうち 0%~50% を意図的に水に置き換えた実験をおこなった。

アルコール/クロロギ酸エステルによる誘導体化で得られる脂肪酸誘導体化物で、脂肪酸の同位体比が正確に測定できるかを確認するために、水素と炭素の安定同位体比が既知の脂肪酸の混合試薬 (炭素数 16~31 の飽和脂肪酸を 9 種類混合したもの) をそれぞれメタノール、エタノール、1-プロパノールを用いて誘導体化して、水素と炭素の安定同位体比を GC-IRMS で測定した。また、同じ脂肪酸混合試薬について水が混入した状況下でエタノール/クロロギ酸エチルで誘導体化して、その同位体比を測定することで本方法における水の混入による同位体比への影響を評価した。水素と炭素の安定同位体比の分析に使用した GC-IRMS は、サーモサイエンティフィック社製 Trace GC Ultra/GC Isolink/Delta V Advantage である。GC カラムは、アジレント社製 DB-5ms (60m x 0.25mm x 0.10 μm) を使用している。

4. 研究成果

アルコールとクロロギ酸エステルを用いた誘導体化法について、アルコールの種類、必要な反応時間、危険性の高い試薬の使用量の限定、水の混入の影響を検討した。安全性と操作性を担保するために、反応温度は室温条件 (22 前後) とした。反応には蓋つきの 7mL バイアルを使用し、各反応試薬はシリンジで計量している。



本誘導体化法での実験の様子

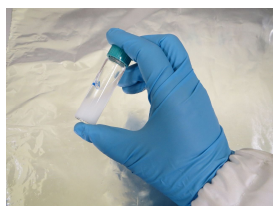
検討項目ごとの詳細と結果を以下に示す。

= アルコールの種類について =

メタノール/クロロギ酸メチル、エタノール/クロロギ酸エチル、1-プロパノール/クロロギ酸プロピルの3種類の組み合わせで、室温条件下において5分間の反応をおこなった。これらのアルコールでは、1-プロパノールを使用したときに最も高い回収率で誘導体化物が得られ、エタノール、メタノールの順に回収率が低下する結果となった。しかしその一方で、1-プロパノールは沸点が97と高く揮発しにくいことに加えて、誘導体化物を液-液抽出する際にメタノールやエタノールに比べて抽出溶媒に多く溶け込む傾向が見られ、それらを除去するために溶媒の吹き付け時に、吹き付けを強くする、サンドバスの温度を高めにする、時間をかけるなどの対処が必要となった。このことは、作業効率の低下と操作性の悪さを生み、さらに誘導体化され揮発しやすくなった脂肪酸を揮発させ失うリスクを伴う。1-プロパノールが溶け込みにくい抽出溶媒を工夫するなど改善の余地はまだあると思われるが、操作性の良い誘導体化法を目指すという点を踏まえて、本研究では、この後の様々な検討をメタノールとエタノールで進めることとした。

= 反応、攪拌時間について =

室温、短時間で誘導体化が進行することが本方法の最大の利点であることから、反応時間と攪拌の程度に対する反応の進み具合を検討した。反応時間は1分間から30分間の各段階で変化させ、混合した試薬を攪拌する時間として10秒、30秒、30秒×2回のいずれかと組み合わせで反応の進行状況を実験した。なお攪拌は、試料と反応に必要な試薬が入った蓋つきのバイアルを手で振り混ぜる方法をとっている。



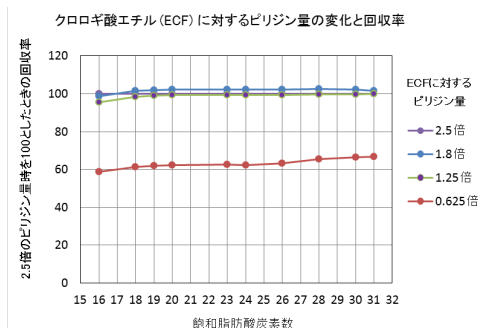
反応のための攪拌をおこなっている様子

実験では、メタノール、エタノールともに反応時間や攪拌時間の違いにおける大きな差は見られなかった。攪拌時間が10秒と短かったものについては、反応時間5分、攪拌時間30秒のものに比べて回収率がやや低くなる傾向がみられたが、いずれの組み合わせにおいても反応時間5分、攪拌時間30秒のものに比較してほぼ90%~110%の回収率が得られる結果であった。このことから、本方法による誘導体化では、非常に短時間で反応が進んでいることが明らかになり、反応時間が1分間程度でも5分間反応させたものに遜色ない結果が得られると考えられる。ただし、

操作性の観点からは、攪拌と反応の時間を1分間程度で進めた場合、作業が非常に慌たしくなり、ミスを誘発する可能性が高いように思われた。

= ピリジン量について =

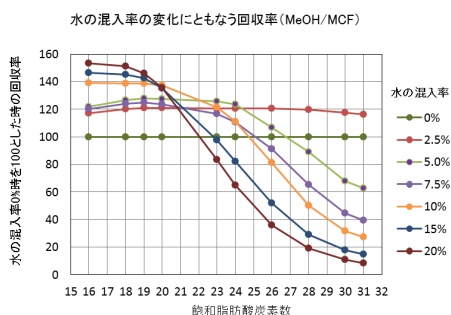
ピリジンは、本方法において触媒として働くが、異臭をもち、引火性であるほか、人体への毒性が指摘される薬品であり、安全性の観点から使用量は最小限に留めたい。クロロギ酸エステル量に対して、反応に用いるピリジン量をそれぞれ2.5倍、1.8倍、1.25倍、0.625倍としてエステル化反応の進行への影響を検討した。実験により、ピリジン量がクロロギ酸エステル量の2.5倍、1.8倍、1.25倍の量の時にはほぼ同等の回収率が得られることが明らかになった一方で、0.625倍の量の時には、十分なピリジン量が確保されているときと比較しておおよそ60%~70%の回収率に留まることが明らかになった。



= 水の混入の影響について =

使用するアルコールの量の0%~50%までを意図的に水に置き換えることで、水の混入が本方法による誘導体化の進行においてどの程度影響するのかを考察した。水の混入率が異なる以外はすべての試料で同様の操作(室温条件、5分間の反応)をおこない、脂肪酸を誘導体化した。その結果、メタノール、エタノール共に水の混入量の増加に伴って、特に炭素数が大きい(炭素数23以上)脂肪酸で回収率が低下する傾向が認められた。水の混入量が同程度の場合には、より炭素数の大きい脂肪酸ほど顕著に回収率が低くなる傾向が見られる。メタノール/クロロギ酸メチルによる誘導体化では、2.5%程度の水の混入で、すべての炭素数の脂肪酸で水が混入していない場合よりも高い回収率となった。また、混合試薬に含まれる最も長鎖の炭素数31の脂肪酸では、誘導体化において5%程度の水が混入すると、水が混入していない場合と比較して、その回収率は60%程度に低下した。今回の実験では、炭素数の小さい脂肪酸(炭素数16から20の脂肪酸)では水の混入による回収率の大きな低下は観察されなかった。本方法で特に炭素数の大きい脂肪酸を誘導体化する際には、水の混入量によっては大きく回収率が低下する場合がありますので注意が必要であると思われるが、一般的な環境下での高い

湿度による水の混入程度であれば許容できる可能性が高く、このことは疎水条件が厳密であったこれまでの方法と比べた際に、利便性の点における本方法の大きな利点であるといえる。



アルコールとクロロギ酸エステルを用いた本方法による誘導体化（エステル化）は、メタノール/クロロギ酸メチル、エタノール/クロロギ酸エチルの組み合わせが、特に操作性の観点から簡易法として適していると思われ、回収率の比較から、エタノール/クロロギ酸エチルによるエチル化が、現時点では最も効率よく誘導体化ができる方法であると考えられる。室温の条件下で 30 秒以上の攪拌をおこなった後、数分間（1 分、3 分間程度）で十分に反応が進むことが確認でき、このことは、本誘導体化法が、短時間で加熱などの工程を含まず安全に、そして試薬を投入して振り混ぜるのみの簡単な作業でおこなえることを示したといえる。また、ピリジンの使用量を抑制することで、試薬の危険性を最小限に留めてより安全に作業を進めることができる。本方法において数%程度の水の混入は回収率に大きな影響を与えない可能性があり、湿度の高い時期でも湿気の混入を気にすることなく本方法を利用できることは、本誘導体化法の利便性に繋がる成果であると考えている。

本誘導体化法による安定同位体比への影響を確認するために、メタノール/クロロギ酸メチル、エタノール/クロロギ酸エチル、1-プロパノール/クロロギ酸プロピルの各組み合わせによって誘導体化した同位体比が既知の脂肪酸混合試薬について、水素と炭素の安定同位体比を測定し、再計算の後に推奨値と比較した。その結果、炭素同位体比についてはいずれの組み合わせにおいてもおおむね測定誤差の範囲内で推奨値と一致する結果が得られた。一方、水素同位体比については、いずれの組み合わせでも推奨値と 10‰ 以上の値の差がみられる脂肪酸が確認された。

また、意図的に水を混入（アルコール量に対して 0%、10%、30%の混入）した状況下でエタノール/クロロギ酸エチルでの誘導体化を脂肪酸混合試薬に対しておこなった実験では、水を 30%混入させた場合においても炭素

同位体比では再計算された脂肪酸の値と推奨値とのずれは測定誤差範囲内であることが確認できた。水素同位体比については、水の混入が 10%の時には多くの脂肪酸の再計算値と推奨値との差が 10‰程度であるものの、30%の時には 30‰を超える差異を示す脂肪酸が見られるなど、水の混入率が高くなるほど誘導体化後の脂肪酸の値は推奨値から大きく離れていくことが明らかになった。これらの結果から、本誘導体化法では数%程度の水の混入であれば誤差の範囲を大きく逸脱するような同位体比の変化を生じない可能性が高く、脂肪酸の安定同位体比測定を視野に入れた誘導体化法として、非常に優位な方法であると思われる。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

取得状況 (計 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 晶子 (GOTO, Akiko)

金沢大学・自然システム学系・博士研究員

研究者番号：00422791

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

力石 嘉人 (CHIKARAI SHI, Yoshito)

独立行政法人海洋研究開発機構・

生物地球化学研究分野・主任研究員

研究者番号：50455490

(4) 研究協力者

()