

報 文

2-ニトロフェニルヒドラジド誘導体化による中鎖脂肪酸の
高速液体クロマトグラフィー/質量分析法平田 沙織¹, 蒲生 啓司^{®1}

本研究では、中鎖脂肪酸の定量を目的として、有機酸や短鎖脂肪酸の高速液体クロマトグラフィーに用いられてきた2-ニトロフェニルヒドラジド(2-NPH)誘導体を適用し、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)法による分析を検討した。この際、反応の収率向上と操作の簡略化をねらって、電子レンジ(600 W, 10 秒)を用いたところ、1.2~1.5 倍の収率向上が観察され、固相抽出法との併用で誘導体化が大幅に簡略された。固相抽出による分析前処理について検討したところ、MS イオン源を汚染すると思われる成分を十分に排除し、中鎖脂肪酸 2-NPH を回収する条件を確立した。これら 2-NPH 誘導体を正イオン化モード及び負イオン化モードで分析したところ、正イオン化モードでは明瞭なマススペクトルを得ることができなかったが、負イオン化モードでは $[M-H]^-$ イオンを分子関連イオンとして、非常に明瞭なマススペクトルを得ることができた。コーン電圧の最適化を図り、中鎖脂肪酸 2-NPH 混合試料を分析したところ、鎖長ごとに保持時間の異なるマスキログラムを得ることができた。これらの条件を用いて柑橘類の果皮汁を分析したところ、 C_6 及び C_{10} の中鎖脂肪酸の存在を確認することができたことから、中鎖脂肪酸 2-NPH 誘導体化法による LC/MS 法の有効性が示唆された。

1 緒 言

中鎖脂肪酸は、一般的に $C_5 \sim C_9$ 程度のアルキル鎖を持つカルボン酸である。母乳や牛乳、乳製品に数パーセント含まれるほか、ヤシ油やパーム核油、エゴマ(しそ)油等にも含まれている。近年は体脂肪がつきにくい特徴を持つ食油成分として脚光を浴びているが、その他にも、大腸菌に対する殺菌作用¹⁾や魚類寄生虫に対する殺虫作用²⁾、植物の細胞毒性³⁾などが明らかになっており、それらの有用性は大きく、多方面で注目されている。このような中鎖脂肪酸を天然資源や廃棄物中に見いだし、有効利用できないかと考え、地元高知県で栽培が盛んな柑橘類に着目した。柑橘類は食品加工等により、果皮や搾汁かすが大量に排出され、中には更に別の食品や肥料等に有効利用されている場合もあるが、利用されずに廃棄されるものもある。そうした果皮廃棄物中の中鎖脂肪酸存在量を確かめるべく、より高選択的で高感度な分析法を開発することにした。

従来の脂肪酸の分析法は、ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)法での分析が一般的であるが、今日の機器の性能向上により、紫外可視(UV)や蛍光(FL)誘導体化による高速液体クロマトグラフィー(HPLC)^{4)~8)}や液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)法での定

性・定量⁹⁾が進展しつつある。著者らはこれまで、水系での反応が可能でカルボン酸と選択的に反応をする2-ニトロフェニルヒドラジン¹⁰⁾に注目し、低分子有機酸や短鎖脂肪酸を分析対象とする誘導体化に適用し、生成した有機酸及び脂肪酸2-ニトロフェニルヒドラジド(2-NPH)誘導体をLC/MS法で分析する方法を報告してきた¹¹⁾。2-NPH誘導体としてLC/MS法で分析を行うことは、誘導体化反応の官能基選択性のみならず、マススペクトル上誘導体由来の質量数が観察されることで、有機酸及び脂肪酸の定性をより確実なものにする利点が考えられ、更に高感度な検出が可能になることが示された。

本研究では、中鎖脂肪酸に焦点を当て、それらの2-NPH誘導体化法とLC/MS法による高選択的かつ高感度な分析法を検討した。その際、誘導体化反応の収率向上と操作簡略化を目指して、電子レンジを用いた操作を行ったほか、固相抽出による分析試料の前処理を検討し、LC/MS分析条件の最適化を行った。また、本法の実試料への応用として、柑橘類の果皮汁を用いて分析を行い、中鎖脂肪酸の存在を確認したので報告する。以下、中鎖脂肪酸の2-ニトロフェニルヒドラジド誘導体を中鎖脂肪酸2-NPHと略す。

¹ 高知大学教育学部理科教育講座: 780-8520 高知県高知市曙町2-5-1

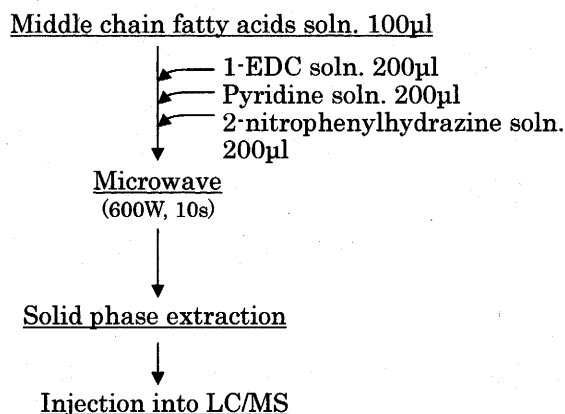


Fig. 1 Flow diagram of 2-NPH derivatization of middle-chain fatty acids (MFA) using microwave

2 実 験

2.1 試 薬

本研究で対象とした中鎖脂肪酸は、ペンタン酸 (n -C₅)、イソペンタン酸 (iso -C₅)、イソヘキサン酸 (iso -C₆)、ヘプタン酸 (n -C₇)、オクタン酸ナトリウム (n -C₈)、ノナン酸 (n -C₉) は和光純薬製、ヘキサン酸ナトリウム (n -C₆) 及びデカン酸ナトリウム (n -C₁₀) は SIGMA 製を用いた。これらをエタノール又は MilliQ 水に溶解して 100 mM の原液として調製し、適宜混合して希釈し、エタノール水溶液として用いた。2-ニトロフェニルヒドラジン塩酸塩 (東京化成製) 及び 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (1-EDC) 塩酸塩 (SIGMA 製) は、それぞれ 20 mM 及び 250 mM のエタノール溶液とし、ピリジン (和光純薬製) は 3% (v/v) のエタノール溶液として調製した。水酸化カリウム (和光純薬製) は 15% (w/v) のメタノール水溶液 (80:20) として調製した。エタノール、メタノール及び、移動相溶媒など他の試薬は、すべて市販の試薬特級を用い、水については Milli-Q システムにより精製したものを用いた。固相抽出用カラムは、2-NPH 誘導体の精製時には Waters 製の Sep-Pak® Plus (C18, 360 mg/cartridge) を用い、90% アセトニトリル水溶液、続いて水各 1 ml を 2 回ずつ通してコンディショニングを行い、中鎖脂肪酸の精製時にはバリアン製の Bond Elut® (C18, 100 mg/catridge) を用い、90% エタノール水溶液、続いて水各 1 ml を 2 回ずつ通してコンディショニングを行った。

2.2 誘導体化

2-NPH 誘導体化法は既報¹¹⁾に従い、反応補助剤である 1-EDC·HCl 溶液とピリジン溶液各 200 µl の存在下、適宜希釈調製した中鎖脂肪酸混合溶液 100 µl (各 100 µM) に

2-ニトロフェニルヒドラジン塩酸塩水溶液 200 µl を加え、60℃ で 20 分間反応させた後、反応停止剤である水酸化カリウムを 100 µl 加え、更に 60℃ で 20 分間反応させた。室温まで冷却した後、リン酸水溶液 (20 mM) 2.4 ml とエーテル 5 ml を加えて遠心分離し、上層を 4 ml 取ってエーテルを蒸発させた。最後に残留物をアセトニトリル 1 ml に溶解して固相抽出用試料とした。誘導体化後の試料中には試薬由来の不純物が多く含まれるため、LC/MS への注入前に前処理を施した。ここでは、固相抽出カラムとして Sep-Pak® Plus C18 を用い、固相抽出用試料を水で 4 倍希釈した後、洗浄液及び溶出液に 40, 50, 60 及び 90% アセトニトリル水溶液を用い、夾雑成分の除去と中鎖脂肪酸 2-NPH を回収する条件を検討した。洗浄後 90% アセトニトリル水溶液 (1 ml) で 2-NPH 誘導体を回収し、LC/MS 用の分析試料とした。その 10 µl を注入した。

更に本研究では、上記の通常操作に代わる方法として、最近報告された電子レンジを用いる方法¹²⁾を適用した。すなわち、遠沈管に中鎖脂肪酸溶液、1-EDC 溶液、ピリジン溶液及び 2-ニトロフェニルヒドラジン水溶液を入れ、ラップフィルムでシールした後電子レンジ (600 W) で 10 秒間処理した。以下通常操作と同じく反応停止剤を加え、エーテル抽出及び固相抽出を経て分析試料を得た。この電子レンジ処理を用いた試料調製法を [マイクロ波操作 I] とする。

一方、電子レンジ処理を行って得られた反応液については、Fig. 1 に示したように、反応停止剤やエーテル抽出を行わず、反応液を水で 4 倍希釈した後直接固相抽出に供して 2-NPH 誘導体を回収した。この試料調製法を [マイクロ波操作 II] とする。

2.3 LC/MS 装置及び分析条件

送液部は、日本分光製の PU-980 を用い、分離カラムとして資生堂製の CAPCELL PAK C₁₈ (UG120Å, 5 µm, 2.0 mmφ × 250 mm) を用いた。カラム恒温槽として資生堂製の NANOSPACE SI-1 2004 を用い、カラム温度を 55℃ に設定した。検出器は Micromass 製の質量分析計 VG Quattro II を用いた。移動相にはアセトニトリル/20 mM ギ酸アンモニウム (70/30) を流量 0.15 ml/min で用いた。MS 部のイオン化法として、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用い、イオン源温度 100℃、キャピラリー電圧 3.2 kV で、コーン電圧は各試料の最適値を検討して設定し、正及び負イオン化モードで分析した。マススペクトルの測定には全イオンモニタリング (TIM) モードを用い、測定質量範囲は m/z 100~500 とした。

2.4 文旦の分析試料調製

実試料として、土佐文旦から取り外した果皮を用い、圧

Table 1 Examined methods of the solid phase extraction for 2-nitrophenylhydrazides (2-NPHs) of middle-chain fatty acids sample and their recovery

Method	Cleaning liquid	Solvent for elution	Recovery of 2-NPHs of MFA, %					
			C5	C6	C7	C8	C9	C10
①	—	90% CH ₃ CN	93	89	83	76	67	53
②	40% CH ₃ CN	90% CH ₃ CN	87	92	87	80	87	92
③	50% CH ₃ CN	90% CH ₃ CN	80	97	99	99	96	83
④	60% CH ₃ CN	90% CH ₃ CN	36	67	79	76	81	78

縮して搾汁し, 50% エタノール水溶液を同量加えて希釈した. 遠心分離後, 上澄み 0.5 ml を用いて Bond Elut[®] による固相抽出を行い, 5% エタノール水溶液 (1 ml) を通じて夾雑成分を除き, 90% エタノール水溶液 (0.5 ml) で中鎖脂肪酸を回収した. 回収した中鎖脂肪酸画分 100 μ l を用いて [マイクロ波操作 II] による分析試料の調製を施した.

3 結果及び考察

3.1 分析試料の前処理

Sep-Pak カートリッジに試料液を通し, Table 1 に示した方法① から④ の洗浄液を用いて洗浄し, 夾雑成分を除いて中鎖脂肪酸 2-NPH のみを回収する検討を行った. 検討した洗浄液と溶出溶媒の組み合わせ及び中鎖脂肪酸 2-NPH 回収率を Table 1 に示す. この際, 後述するが, C₅ 及び C₆ のイソ体は各々分離しないので, ここでの回収率はそれらを併せた値である. その結果, 方法① で洗浄の段階を踏まずに 90% アセトニトリル水溶液で溶出させると, 夾雑成分は当然除けないが, 同等に C₉ と C₁₀ の回収率が極めて低い. しかしながら, 洗浄操作を介すると, 方法② 以降, 夾雑成分をほぼ排除できることが分かり, 中鎖脂肪酸 2-NPH の回収率を見ると, 方法② では各 2-NPH によって回収率にばらつきがあり, 方法④ では洗浄時のアセトニトリル濃度が高すぎるために, C₅ ~ C₇ までの 2-NPH が同時に溶出してしまうために回収率が悪かった. 方法③ では, 各 2-NPH が 80% 以上の回収率で得られ, ほとんどが 95% 以上回収できることが分かった. よって分析試料の前処理として, 方法③ を用いることにした.

3.2 誘導体化操作の検討

通常操作と電子レンジ処理操作を行った試料を分析し, 得られたクロマトグラムを比較したところ, 電子レンジ処理でも中鎖脂肪酸 2-NPH が十分に生成しており, 通常操作よりも約 1.2 倍以上の生成量が認められた. このことより, マイクロ波が 2-NPH 誘導体化のような水系の化学反応を促進する可能性が明らかとなった. 通常操作における反応収率を算出しているわけではないが, 電子レンジ処理によって通常操作よりも中鎖脂肪酸 2-NPH 生成量が多か

ったことは, 熱よりもマイクロ波が反応をより促進していると考えられる. 更に電子レンジ処理時間を 20 秒及び 30 秒に延ばして比較したところ, 10 秒での中鎖脂肪酸 2-NPH 生成率が最も高く, 20 秒以上で生成率が 20 ~ 30% 程度低下することが分かった. これは, いったん生成した 2-NPH 誘導体が分解していると考えられるが, 詳細は不明である. このことから, 電子レンジ処理の最適時間が分かるとともに, 長時間の電子レンジ処理は適さないことが分かった. すなわち, 生成量の上昇が水の蒸発によるものではなく, 明らかにマイクロ波による反応促進効果であるといえる.

更に [マイクロ波操作 II] においては, 通常操作に比べて 2-NPH 生成量が約 2 倍になることが分かった. このことは, マイクロ波による反応効率の上昇に加えて, 反応停止剤や抽出操作による誘導体の損失をなくしたためと考えられる. [マイクロ波操作 II] では, 誘導体化試薬由来の成分が若干出現するなどの現象も見られたが, 定量の際に問題となるものではなかった. 以上のように, 電子レンジ処理と固相抽出の組み合わせによって, 2-NPH 誘導体化の反応効率の上昇のみならず誘導体化操作の大幅な簡略化が達成された.

3.3 イオン化モードの選択とマススペクトル

中鎖脂肪酸 8 種の 2-NPH 誘導体を, 前述の分析条件に沿って正及び負両イオン化モードで分析した. その結果, 正イオン化モードでは, いずれの試料からも $[M+H]^+$ のスペクトルが得られたものの, フラグメントイオンが非常に多く, 定量に適さないことが分かった. 一方, 負イオン化モードにおいては, $[M-H]^-$ がベースピークとして得られ, その他の関連イオンが相対強度数% ほどしか見られないシンプルなスペクトルが得られた. C₅ 及び C₆ のイソ体は, 各々 n -体と分離できなかったため, マススペクトルの測定に際しては個別に測定を行ったが, イソ体と n -体をマススペクトル的に区別できるものではなかった. Fig. 2 に n -体のみ 6 種の 2-NPH 誘導体のマススペクトルを示した.

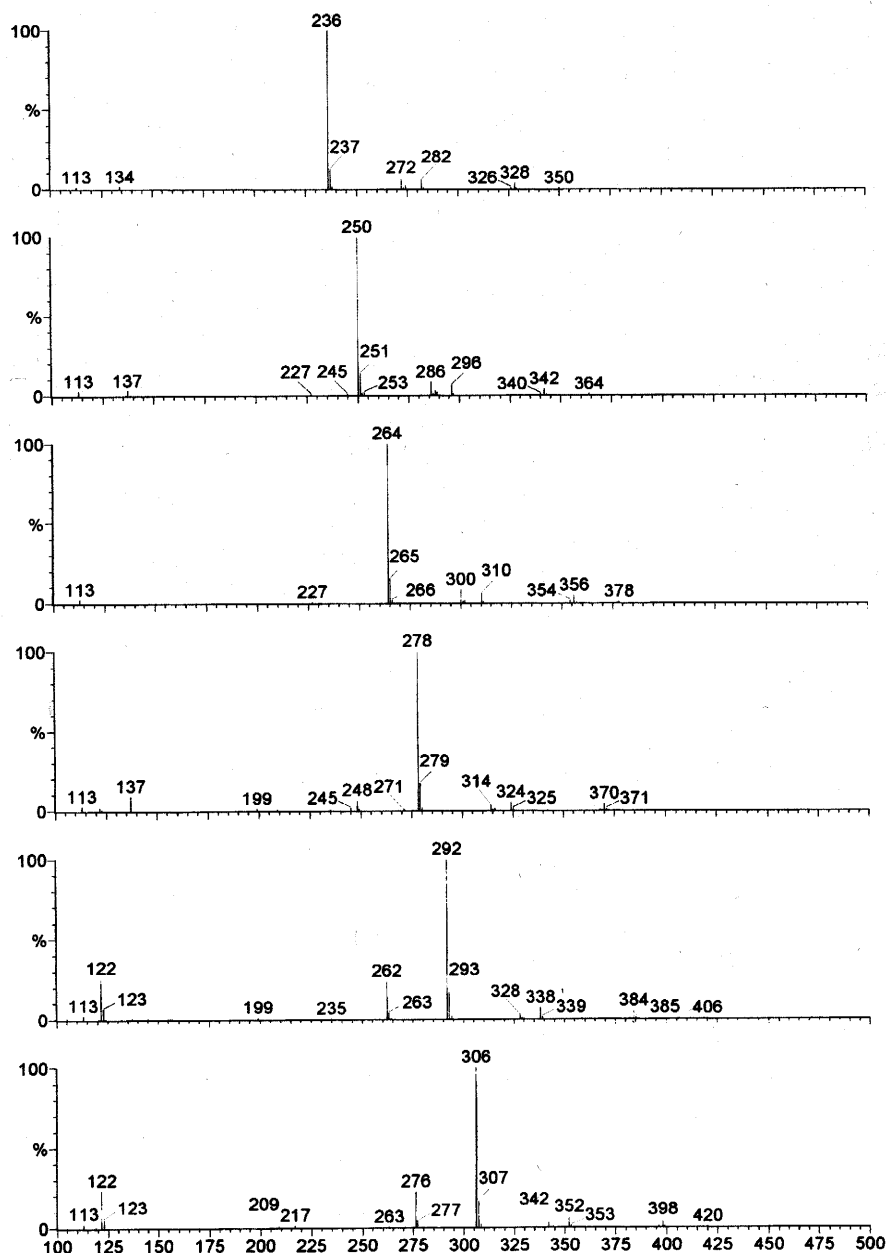


Fig. 2 Mass spectra of six 2-NPHs of MFA

LC conditions: column, CAPCELLPAK C18; column temperature, 55°C; mobile phase, acetonitrile/20 mM ammonium formate (70 : 30); flow rate, 0.15 ml/min. MS conditions: ESI-MS interface in the negative mode; source temperature, 100°C; capillary voltage, 3.2 kV; cone voltage, 20 V

3・4 コーン電圧の検討と検出下限

イオン化効率にかかわるパラメーターのうち重要なものの一つであるコーン電圧の検討を行った。各中鎖脂肪酸 2-NPH を負イオン化モードにおいて、10～40 V の間で 10 V ごとに変化させ、検出された基準イオン $[M-H]^-$ のマス chromatogram におけるピークの面積値を調べた。その結果 Fig. 3 に示すように、各中鎖脂肪酸 2-NPH において 20 から 30 V で最も感度が良いことが分かり、また鎖長間での最適電圧値にほぼ差がないことも分かった。このことから、中鎖脂肪酸においては、鎖長にかかわらず同電圧で

感度差のない分析が可能であることが分かった。

負イオン化モード、コーン電圧を 30 V に設定し、中鎖脂肪酸 8 種混合 2-NPH を分析したところ、異性体の分離には問題が残るものの、鎖長ごとに保持時間が異なるマス chromatogram が得られた (Fig. 4)。8 種の中鎖脂肪酸 2-NPH について個別に検量線を作成したところ、ほとんどについて 0.05～10 μ M の間で直線性の高い検量線 (相関係数: 0.997) が得られた。選択イオンモニタリング (SIM) モードでそれぞれの検出限界 ($S/N=3$) を求めたところ、反応に用いる中鎖脂肪酸濃度として 5.0～10.5

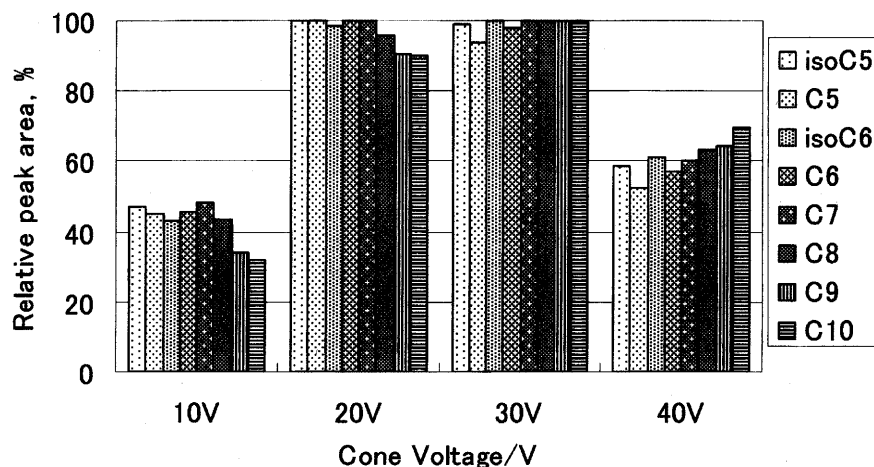


Fig. 3 Effects of cone voltage on ion currents of base peak of 2-NPHs of MFA
LC conditions and MS conditions were same as Fig. 2 except for cone voltage.

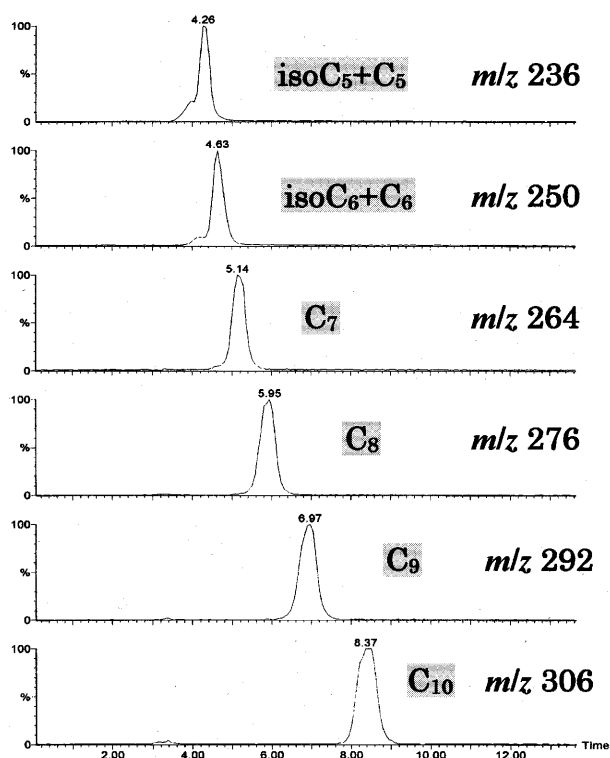


Fig. 4 Mass chromatograms obtained by total ion current (TIC) profile for the eight 2-NPHs of MFA
LC conditions and MS conditions were same as Fig. 2.

nM の範囲であることが分かった。電子レンジ処理と固相抽出を組み合わせた本誘導体化法の繰り返し再現性は比較的高く、5.0 μ M の中鎖脂肪酸を用いた際のピーク面積の相対標準偏差 ($n = 5$) は、C6 で 2.8%, C10 で 0.9%, 0.1 μ M の C6 で 4.1%, C10 で 1.6% であった。

3.5 実試料の分析

本研究で検討した 2-NPH 誘導体化法及び LC/MS 法を

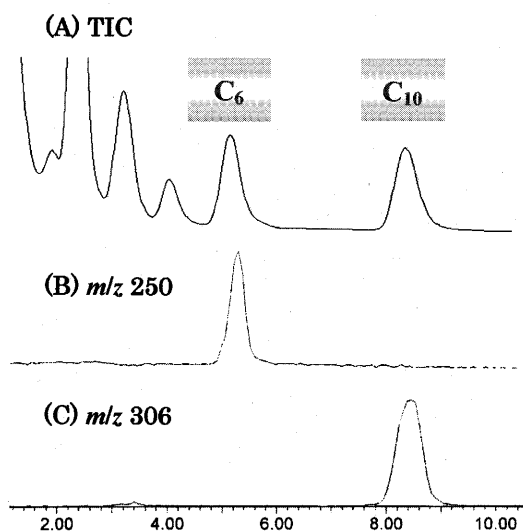


Fig. 5 (A) Total ion chromatogram and mass chromatograms obtained by TIC profile for the 2-NPHs of
(B) m/z 250, hexanoic (C6) and (C) m/z 306, decanoic (C10) acids in Tosa Buntan peel juice extracted by solid phase extraction

LC conditions and MS conditions were same as Fig. 2.

用いて、土佐文旦（高知県産）の果皮汁の中鎖脂肪酸の分析を試みた。その結果、ヘキサン酸（C6）とヘプタン酸（C10）が検出された（Fig. 5）。果皮からの脂肪酸抽出についてはまだ検討段階であり、中鎖脂肪酸が十分に抽出されているとは言えないため、正確な定量には至っていないが、簡単な抽出操作で中鎖脂肪酸の存在を確認することができたことは、本誘導体化法が中鎖脂肪酸の定量に適用可能であることを示唆している。誘導体化をしない場合に比べて、本誘導体化法による中鎖脂肪酸分析の選択性及び感度がどの程度向上したかについては、質量分析的には 4 倍ほど検出感度が高いと判断できる。また、選択性という点では、実試料について顕著であるように、中鎖脂肪酸

の遊離型、すなわち非誘導体では夾雑成分が多く、マスクロマトグラムの見ても定量は困難であるため、その点で本誘導体化法は優れているといえる。

本研究では、水を含んだ中鎖脂肪酸の試料に対して、中鎖脂肪酸 2-NPH 誘導体化法と組み合わせた LC/MS 法が有用であることを明らかにし、土佐文旦果皮汁中の中鎖脂肪酸の存在を確認することができた。また、従来の誘導体化操作の簡略化を図り、その可能性が高いことも明らかにした。今後、本法による定量性の確立や実試料からの抽出法等の検討が必要であるが、前報の 2-NPH 誘導体化法による低分子有機酸の分析結果と併せると、種々の試料中の中鎖脂肪酸のみならず低分子有機酸も含めた一斉分析法として、本法の有用性を追求していきたいと考えている。

文 献

- 1) M. Fukuda, Y. Tsujino, T. Fujimori, K. Wakabayashi, T. Böger: *Pesticide Biochem. Physiol.*, **80**, 143 (2004).
- 2) M. K. M. Nair, P. Vasudevan, T. Hoagland, K.

- Venkitanarayanan: *Food Microbiol.*, **21**, 611 (2004).
- 3) N. Hirazawa, T. Ohtaka, K. Hata: *Aquaculture*, **188**, 1 (2000).
- 4) P. Prados, T. Fukushima, T. Santa, H. Homma, M. Tsunoda, S. Al-Kindy, S. Mori, H. Yokosu, K. Imai: *Anal. Chim. Acta*, **344**, 227 (1997).
- 5) H. C. Zhi, T. Santa, K. Imai: *Analyst*, **127**, 741 (2002).
- 6) 中原理恵, 稲村勝志, 渡邊 彦, 太田 伸, 嶋健次, 大和 進: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 161 (2004).
- 7) 新井 隆, 細井康江: 薬学雑誌, **125**, 229 (2005).
- 8) 松倉 潮, 金子成延, 門間美千子: 日食工誌, **51**, 633 (2004).
- 9) 西村一彦, 鈴木敏之, 桂 英二, 板橋 豊: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 533 (2004).
- 10) H. Miwa, C. Hiyama, M. Yamamoto: *J. Chromatogr.*, **321**, 165 (1985).
- 11) 齋藤尋輝, 蒲生啓司: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 923 (2003).
- 12) B. Bravo, G. Chávez, N. Piña, F. Ysambertt, N. Márquez, A. Cáceres: *Talanta*, **64**, 1329 (2004).

High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometric Analysis of Middle-Chain Fatty Acids by 2-Nitrophenylhydrazide Derivatization

Saori HIRATA¹ and Keiji GAMOH¹

¹ Faculty of Education, Kochi University, 2-5-1, Akebono-cho, Kochi-shi, Kochi 780-8520

(Received 3 October 2005, Accepted 16 December 2005)

In chromatographic analysis, a suitable derivatization of the functional groups has sometimes been used to enhance the sensitivity and selectivity for detection. Transforming low-molecular organic acids to the corresponding 2-nitrophenylhydrazide derivatives has been more extensively used as a suitable derivatization method for liquid chromatography/mass spectrometric (LC/MS) detection. In the present study, LC/MS detection with electro spray ionization (ESI) was successfully applied to the analysis of middle-chain fatty acids (MFA): pentanoic, hexanoic, heptanoic, octanoic, nonanoic and decanoic acid, as their 2-nitrophenylhydrazide derivatives (2-NPHs). At the point of derivatization, microwave irradiation was successfully used to prepare 2-NPH derivatives. Of a range of analytical conditions that were examined, the optimum results were obtained by using reversed-phase liquid chromatography and a mixture of acetonitrile/ammonium formate. The effects of the chromatographic and ionization parameters, ionization mode and cone voltage on the sensitivity of 2-NPHs of MFA were examined. The negative-ion spectra of 2-NPHs of MFA showed molecular-related ions, $[M - H]^-$, whose ions were the most abundant. Linear plots of the peak area versus the concentration were obtained for MS detection over the range 0.05 ~ 10 μ M for most 2-NPHs of MFA. The limits of detection of 5.5 ~ 10.5 nM (signal-to-noise ratio 3) were attained in a selected-ion monitoring (SIM) mode. These results showed that 2-NPHs of MFA contribute to the enhancement of LC/MS detection, and the 2-NPH derivatization using microwaves has a potential to simplify the conventional analytical method for MFA.

Keywords : middle-chain fatty acid; 2-nitrophenylhydrazide(2-NPH) derivatization; microwave irradiation; LC/MS; electro spray ionization.