

ガスクロマトグラフィー／質量分析計を導入した 学生実験の試み

西 内 由紀子*・野 阪 美貴子・馬 場 恒 子

*大阪市立大学医学部附属刀根山結核研究所

はじめに

ガスクロマトグラフィー／質量分析（GC/MS）は、環境、食品などの種々の試料中の成分を分離し、定性・定量する精密分析法の一つである。本法は、毒ガスのサリンの分析、冷凍餃子中の有機リン系農薬メタミドホスの分析、ゴルフ場の残留農薬分析、スポーツ競技におけるドーピングテスト分析、ダイオキシン分析、環境中の悪臭の分析、化学薬品・化粧品・食品などの品質管理など広範囲に用いられている。そのため社会においてGC/MSをはじめとする質量分析法を行える専門家の需要は増しており、食品衛生監視員・食品管理者もGC/MS法で分析する機会が増加している。従って、大学教育において、GC/MSの機器を利用できる技術者ならびに結果を解析できる分析者を養成することは、重要課題のひとつである。

しかし、本機器を学生実験で用いようとする場合、種々の問題点がある。第一に、本機器は汎用化・廉価になったといっても大変高価な機器であるため、一学科で複数台購入は困難である。一台の機器を使って、学生実験で多くの学生が実際に機器に触れて測定できるような授業内容にするにはその内容を工夫する必要がある。第二に、本機器を用いた一回あたりの測定は、ガスクロマトグラフィーによる分離時間も含まれるために長い点である。短く設定しても測定時間が20分以上かかるため、一回の授業時間内に測定できる試料数は限られてくる。第三に、食品や環境試料から実際に測定に供する検体調製にも時間がかかる点である。GC/MS法は精密分析であるため測定用検体に夾雑物が含まれるのをきらう。また、GC/MSは検体を気体にして測定する方法なので気化しやすいように誘導体化させるのが一般的である。そこで、食品や環境試料を測定するためには、試料から測定したい物質を抽出したのち抽出物を誘導体化して、測定用検体を調製する必要があるが、これに時間がかかり、かつ熟練を要することが多い。学生実験では、失敗の起こりにくい方法で短時間に抽出および誘導体化する工夫が必要である。第四に、GC/MS分析結果の解析がしばしば難しいことである。その主な原因は、GC/MS分析のデータ量が膨大で数種類のグラフに表わされるために初心者は混乱することによる。その混乱を増幅するのが、同位体を考慮して解析する必要があることと、測定する物質はしばしば分析途中で分解し異なる化合物（フラグメント）となって測定されるので、分解生成物も考慮する必要があることである。これらの問題点のため、GC/MSなどの質量分

析法を用いた測定・解析は大学院教育で研究の一環として少人数を対象として初めて利用されるのが一般的で、大学教育で授業の一環として使用されることは殆どない。そこで、大学教育においてGC/MSの機器を利用した教育方法を確立することは、今後ますます増大する社会の需要にこたえるためにも重要である。今回、GC/MSの基礎を理解し、実際に測定して得られた結果の解析法を習得するための授業計画をたて、学部学生を対象にした学生実験で実践したので報告する。

方法

受講学生

神戸松蔭女子学院大学人間科学部生活学科都市生活専攻三年次学生で、選択科目「分析化学実験」の受講生である。受講生は受講前にGC/MSなどの質量分析に関する講義を受けていなかった。受講生は2007年度15名、2008年度17名であった。

授業計画

3回の授業で質量分析の講義を行い、食用油中の脂肪酸をGC/MS測定して構成脂肪酸の種類と組成比を分析した。一回当たりの授業時間は2時間15分である。授業内容は、(1) GC/MSの測定原理、単位、データの見方、食用油と脂肪酸の化学構造の講義と、(2) 食用油から脂肪酸を抽出し、メチル化して測定用検体を調製し、(3) 「食用油や脂肪酸が健康に及ぼす影響について」の課題を与えて宿題とした。(4) 実際にGC/MS分析と測定結果の解析を行い、(5) 課題のまとめとポスター作成をし、(6) 解析結果と課題の発表という6項目を行った(表1)。

表1 授業計画

第一回目：講義	質量分析およびガスクロマトグラフィー／質量分析の基礎理論、測定原理とデータの見方 食用油と脂肪酸の化学構造
実験	食用油から脂肪酸抽出およびメチルエステル誘導体化
課題調査	食用油や脂肪酸が健康に及ぼす影響について
第二回目：実験	ガスクロマトグラフィー／質量分析と測定結果の解析
作業	実験結果と課題についての発表準備(ポスター作製)
第三回目：発表と質疑応答	実験結果と課題について

テキスト

クロマトグラフィーおよび質量分析は、近年著しく発展しているため、その基礎と応用ともに、内容は高度で難解になりやすい。短時間に理解してもらうために、GC/MSの基礎を分かりやすく説明(図示)した学生向け専用のテキストを特別に作成した。また、テキストには食用油と脂肪酸の構造式についても解説を加え、実験方法に食用油の誘導体化法を記載した。

実験試料

試料は市販のコーン油、菜種油、オリーブオイル、魚油、マーガリン、バター、亜麻仁油を用い

た。

脂肪酸の抽出と誘導体化

食用油10 mg (11 μ l) をスクリーキャップ付試験管 (A) にいれ、5 %塩酸-メタノール (東京化成、日本) を500 μ l 加えて90℃湯浴で2時間反応させた¹⁾。室温まで冷却したのち試験管にヘキサンおよび水を各1 ml 加えボルテックスを使ってよく混和した。静置して2層に分かれるまで待ち、脂肪酸メチルエステルを含む上層 (ヘキサン層) を分取して別の試験管 (B) に移した。試験管 (A) にヘキサン1 ml を加えて同様に操作して残っている脂肪酸メチルエステルを抽出し試験管 (B) に移した。この操作を2回繰り返した。試験管 (B) のヘキサン層に混入した塩酸を除くために、水を3 ml 加えよく混和した。静置して2層に分かれるまで待ち、ヘキサン層を分取し、別の試験管 (C) に移した。試験管 (C) の口をキムワイプで覆ってワゴムで留め、室温に置き乾固させた。乾固した脂肪酸メチルエステルは次回の授業まで冷蔵した。

GC/MS分析

GC/MS計はAutomass JEOL (JEOL, 日本、GC: Agilent 6890 series) を用いた。カラムはDBwax (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m, Agilent) を使い、脂肪酸メチルエステルを100 μ l の hexane で溶解し、その1 μ l を注入した。GCの分析条件は注入口温度 200℃、スプリット法 (スプリット比50 : 1) とした。オーブンの温度は初期温度 160℃とし、1分間維持しその後 5℃/分 の割合で240℃まで昇温し8分間維持した。キャリアガスはヘリウムを用いた。イオン化法は電子衝撃法 (electron ionization) を使い、イオン化電流 300 μ A、イオン化エネルギー70 eV、イオン源およびインターフェース温度は200℃とした。質量のスキャンレンジはm/z 50–500 (500 msec) とした。



図1 ガスクロマトグラフィー/質量分析計の外観

結果

第1回目授業：GC/MSと脂肪酸についての基礎講義と食用油から測定検体の調製

GC/MSの基礎的原理と測定試料に関する基礎知識の講義を行ってから、試料の抽出・誘導体化を行った。質量分析では測定原理の異なる種々の機器が開発され、それらから得られるデータの種類

や特徴が異なる。従って、初期教育では、どの質量分析法においても共通でかつ重要な基本知識と測定原理をしっかり理解させることが肝要である。そこでGC/MSの基礎講義では、質量分析に共通な基本知識として、周期表と質量表を基に原子量と質量の違い、秤量と質量分析の違いを解説した。次にすべての質量分析計に共通している測定原理をわかりやすく講義して、質量分析では同位体を区別して測定していることを理解させた。同位体測定の理解は基本的なマスペクトルの解析だけではなくMS/MSスペクトルや、プロテオミクスにおける質量分析などすべてのマスペクトル解析で重要である。質量分析では専門用語がたくさんあり、また得られるデータの種類も多い。これらの用語とデータの種類の多さが初心者混乱を招き、難しい、苦手だと感じさせる原因の一つである。専門用語のうち良く使われる単語、単位などを厳選して説明し、トータルイオンクロマトグラム、マスキロマトグラム、マスペクトルについてデータの内容と見方を解説して、学生が混乱を招かないようにした。図2は例としてマスペクトルと用いられる基本用語を図示したものである。質量分析の基礎知識をもとに、GC/MSについて解説し、その後測定試料である食用油と構成脂肪酸の構造や誘導体化の反応についても説明し、質量分析する上で必要な基本知識を理解させた。

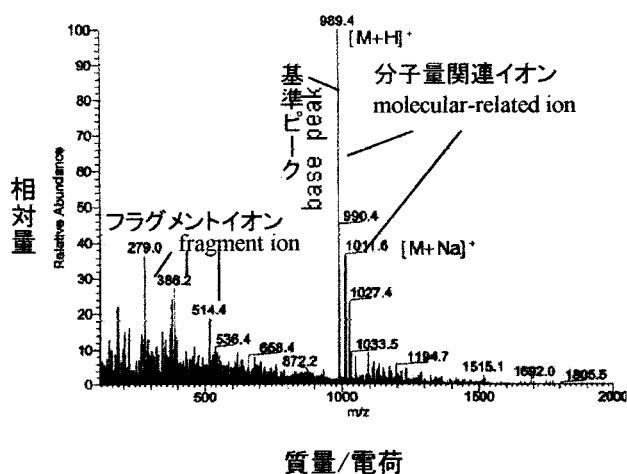


図2 マスペクトルと主な用語

測定されたイオンはそれぞれの質量（電荷あたりの質量）のイオン量で示される。このとき、もっとも大きいピークを基準ピーク（base peak）といい、これを100%としたときの相対量（relative abundance）で図示する。試料分子は水素イオンやナトリウムイオンが付加してイオン化することが多い。これらのイオンを分子量関連イオン（molecular-related ion）という。イオン化するとき分子がこわれて断片化することがある。これをフラグメントイオン（fragment ion）という。

測定用検体の調製・誘導体化は、時間がかかり熟練を要することが多いが、学生実験では1回の授業時間内に操作に不慣れな学生でも調製できるよう工夫する必要がある。食用油から測定検体を調製する一般的な方法は、食用油をアルカリまたは酸水解し、生成した脂肪酸を抽出してからジアゾメタン等を用いてメチル化し、その後、生成した脂肪酸メチルエステルを抽出・精製する。すなわち、水解、抽出、誘導体化、精製の4段階が必要である。ここでは、5%塩酸-メタノールを用いたトランスメチルエステル化法で食用油から直接脂肪酸を解離しメチルエステル化する方法¹⁾を採用した。その結果、水解・抽出および誘導体化の3段階の操作が1段階になり、授業時間内に失敗なく調製できた。精製した脂肪酸メチルエステルは、比較的安定なのでエバポレーターなどの特

別な機器を使わずに室温で自然乾固した。乾固後の検体は次回授業時の測定まで冷蔵した。

第2回目授業：GC/MS測定と課題発表の準備

この授業において最も工夫した点は、学生が実際に試料を注入しその結果を解析することによって高い教育効果を得るための、GC/MS計の利用方法と測定試料の選択である。高度な分析機器であるGC/MS計は見た目にはただの箱に過ぎない（図1）。デモンストレーションだけで終わらせれば学生には全く印象も残らない。授業では、実際に検体を注入し機器を操作して結果を得ること、またその結果を解析することが大切である。そのために授業時間内に測定する検体数をできる限り増やす工夫が必要である。1回の授業時間に測定できる回数は、1回25分間の分析系なので、次の分析に備える時間も考慮すると4回となる。そこで時間内に5回測定するために次のようにおこなった。全体を5班に分けて、各班1回測定することにした。まず始業前に助手が1班の検体をGC/MS計へ注入して測定を開始し、授業が始まってから残り4班の検体について各班の学生が順次測定した。あらかじめ測定した検体を担当している班には測定結果を授業中に渡し、最後に学生が検体を注入して測定した。その結果が得られるのは終業後になるが、測定結果は事前に渡しているので、授業時間内に5班すべての測定を行うことができた。

測定試料の選択は次の観点で行った。「分析化学実験」が「食品衛生課程」の必修科目であること、各班測定結果の異なる試料を用意できること、社会生活の中でその試料を測定することが必要とされていることの3点である。今回は食用油を測定試料として選択した。食用油はグリセロールに脂肪酸がエステル結合したトリアシルグリセリドが主成分である。食用油の種類によって構成脂肪酸の種類とその組成が異なり、その違いによってアレルギーや動脈硬化など健康に深く関わっていることがわかっている²⁾。そこで食用油中の脂肪酸を誘導体化したのちGC/MS測定し、その構成脂肪酸と脂肪酸組成比を分析することにした。測定回数が限られているので、各班主な構成脂肪酸の異なる食用油を試料とし、その結果を3回目の授業で発表学習して結果を共有することで種々の食用油を測定したのと同様の効果が得られるよう工夫した。各班が試料とする食用油の主な構成脂肪酸およびその脂肪酸の健康への影響を課題として設定し、学生に前もって調べさせた（表2）。また、待ち時間が長いので、その時間を利用して、学生は得られた結果の解析を行い、解析結果と前もって調べてきた内容を模造紙に書き込んで次回発表用のポスターを作製した。

表2 実験に使用した食用油、その主な構成脂肪酸および課題

食用油 ¹⁾	主な構成脂肪酸	課題
コーン油	リノール酸	アレルギーと脂肪酸
亜麻仁油	リノレン酸	癌と脂肪酸
オリーブオイル	オレイン酸	動脈硬化と脂肪酸
魚油	DHAとEPA ²⁾	n-3系不飽和脂肪酸が身体にいいわけ
マーガリン	トランス脂肪酸	心臓疾患と脂肪酸

1) 上記食用油のほかに参考資料としてバター、ナタネ油、ごま油の測定結果を示して各班の学生の発表に供した。

2) DHA：ドコサヘキサエン酸 EPA：エイコサペンタエン酸

食用油由来の脂肪酸メチルエステルのGC/MS測定結果として、図3に示すようにトータルイオンクロマトグラムとマススペクトルが得られた。学生はマススペクトルの分子イオンピークとフラグメントイオンピークから各脂肪酸を同定し、その溶出時間を確認した。トータルイオンクロマトグラムのそれぞれの溶出時間のピーク面積の結果から各脂肪酸含有量を計算し、組成比のグラフを作成した。学生の測定結果をまとめた種々の食用油の脂肪酸組成比を図4に示す。

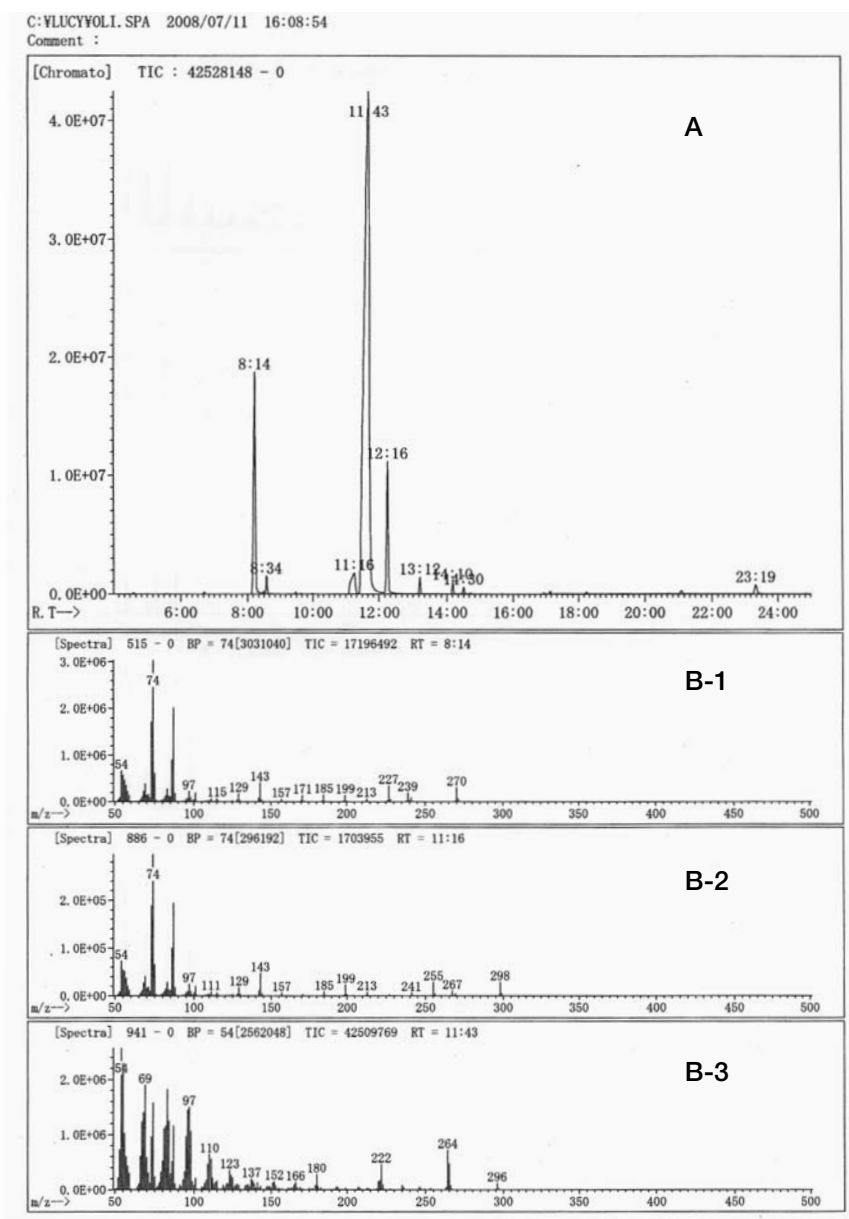


図3 オリーブ油から得られた脂肪酸メチルエステルのGC/MS分析結果

A：トータルイオンクロマトグラム 数字は各ピークの溶出時間（リテンションタイムRt=分：秒）を示す。 B-1：ピーク（Rt=8：14）のマススペクトル 分子イオンm/z=270と飽和脂肪酸に特異的なフラグメントイオンm/z=74より炭素数14個の飽和脂肪酸（C14：0）であることがわかる。 B-2：ピーク（Rt=11：16）のマススペクトル 分子イオンm/z=298とフラグメントイオンより飽和脂肪酸（C16：0）である。 B-3：ピーク（Rt=11：43）のマススペクトル、分子イオンm/z=296とフラグメントイオンm/z=69より不飽和脂肪酸（C16：1）である。

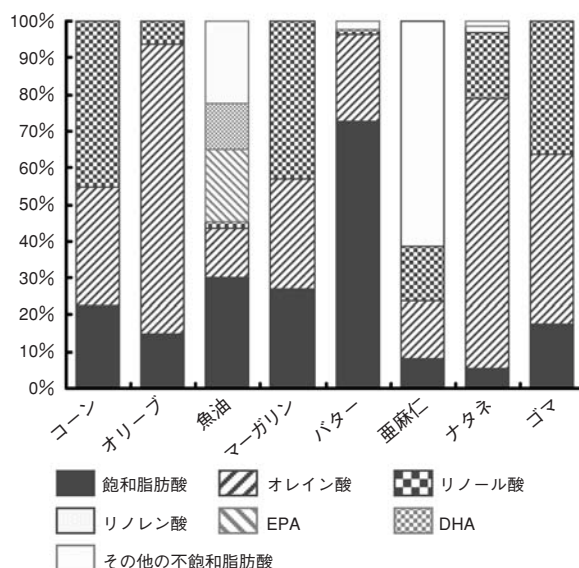


図4 種々の食用油の脂肪酸組成比

GC/MS計の維持管理のために、すべての測定終了後には溶媒であるヘキサンをGC/MS計に注入・測定してカラム内に試料が残留していないことを確認し、GC/MS計のイオン源の洗浄を行った。

第3回目授業：結果発表会

前週作成したポスターを用いて学生が班ごとに口頭発表を行った。質量分析の解析結果として、分析した脂肪酸のマススペクトル、構造式、精密質量、および試料とした食用油の脂肪酸組成について発表した。また、班ごとに調べた脂肪酸が健康に及ぼす影響についても発表した。各班とも全員が説明し、発表後に次の班の発表の司会を行った。聞いている学生には少なくとも一回は必ず質問するように指示した。各班、それぞれ工夫したポスターを用いて解析結果と調べた内容を発表し、活発な質問が繰り広げられた（図5）。

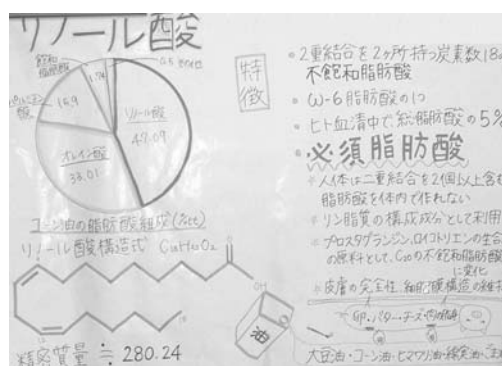


図5 学生が作成したポスターの例

考察

学部学生を対象にデモンストレーションではなく実際にGC/MS計を測定操作させる学生実験プログラムの試みは、(1) GC/MSの基礎の前講義を行う、(2) 班分けをして各班異なる試料を測定する、(3) 簡便で短時間に行える誘導体化法を採用する、そして、待ち時間を有効に利用するために(4) 班別に課題を与えて学生に調べさせ、解析結果とともに調査内容も発表することによって効果的な授業にすることができた。

質量分析はGC/MSだけでなく、種々の分析方法が開発されている。それぞれの方法によって機器、測定原理が異なり、得られるデータの特徴も異なる。従ってその測定原理とデータの特徴についての基礎講義は少なくとも数時間を要する。1回の授業時間内に学生に理解させるために、本実験では、GC/MSを含む質量分析の基礎のすべてを講義することを避け、各種の質量分析に共通な基本部分に絞って丁寧に解説した。これは、必要に応じてGC/MS以外の質量分析やプロテオミクスなどの複雑な解析にも応用できる学生の育成をねらっている。今回の学生実験では、前もって重要点だけをまとめた独自のテキストを作成し、質量分析と秤量の違いや測定原理のうちすべての質量分析に共通している基本原理をわかりやすく説明した。実際に測定してその測定結果を読み取ることを通して、学生は質量分析の基礎を理解し、データの解析方法を身につけることができたと思われる。

測定試料は、測定回数が限られている点を補うために、各班異なる食用油を担当し、発表を通してその結果を共有することで、全体をとおして複数試料のデータ解析になるようにした。測定は順次1試料ずつ行うため班ごとに結果が出てくる時間が異なるが、どの班の試料もすべて脂肪酸メチルエステルを分析しているので、早く結果が出た班が遅い班に結果の読み方、解析法を教える姿も見られて教育効果が一層あがったと思われる。今回は「食品衛生課程」の実験科目であったので、食用油を使用したがる、学生の専門分野によって試料も変えられる。例えば薬学部では尿中の薬品の代謝産物を経時的に測定し、全体でひとつのデータとなるように工夫することも可能であろう。

試料の誘導体化はトランスメチル化法を採用したことで、短時間に誘導体化ができ、その後の抽出・精製・洗浄を数回繰り返したことで、夾雑物の少ない検体を調製することができた。学生が調製した試料はすべて良好な結果が得られた(図4)。

質量分析計は微量を測定する機器であるので、濃い試料を使用することは極力避ける必要がある。学生実験においても、予備実験をきちんと行い、調製した誘導体の適正な希釈率をきちんと定めておくことが大切である。全班の試料を時間内に測定するために、安易に濃い目の試料を測定することは禁忌である。濃い試料を使用すると、試料がカラム内に残留し、次の試料測定に影響して正しい結果が得られない。さらに、GC/MS計のカラムの劣化、イオン源の汚染につながり、維持費がかさむ原因となる。授業終了後に溶媒を注入してカラム内に試料が残留していないことを確認し、その後GC/MS計のイオン源を洗浄するなどの維持管理が必要である。

課題調査・発表は、待ち時間を有効利用でき、自ら実験試料について調べることによって理解を

深め、GC/MSの社会での有用性についても実感してもらうために行った。すなわち、食用油の構成脂肪酸組成は、GC/MSによって解析することができること、種々の食用油によってその組成比が異なること、その違いが健康にさまざまな影響を与えることを理解させた。また、学生はリノレン酸はリノール酸より二重結合の数が1つ多いだけであることを構造式に描くことで納得し、その違いを機器が認識して分離分析できることを経験し、課題調査で私たちの身体も認識して異なる作用が現れることを理解できるよう促した。発表は模造紙に手書きしてポスターを作製させた。最近インターネットを利用することで調査が簡単に行える。パワーポイントを使った発表は、調査した内容のコピー/ペーストをするだけの安易なものになりかねない。また、班内の一人が作製し、他の学生は関与しないことも考えられる。そこで、あえて模造紙に手書きすることで、発表内容を吟味しながら全員が協力して作製するようにしむけた。図5に示すように、箇条書きされ、イラストも添えられており、見る側に興味をもたせるよう工夫されたポスターが多くみられた。課題のテーマは脂肪酸が健康に及ぼす影響という点で各班に共通しているので、各自調べた内容と比較して聞くことができ、発表後の質問や討論が活発で、よい質問がいくつも見られた。このような課題調査・発表は、学生が積極的に参加しておこなう授業形態で、教育効果がいっそう上がることが期待される。また、学生の発表能力の向上にも寄与すると思われる。

参考文献

- 1) 川口 昭彦 (1993) 「新生化学実験講座 4 脂質 I 中性脂質とリポ蛋白質 脂肪酸の分離・同定法」日本生化学会編 東京化学同人 東京 p 9-24
- 2) 鹿山 光編 (1995) 「AA, EPA, DHA-高度不飽和脂肪酸」 恒星社厚生閣 東京