

令和元年6月15日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07754

研究課題名(和文) ラマン分光による不飽和脂肪酸のシス-トランス異性化の反応機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of cis-trans isomerization mechanism by Raman spectroscopy

研究代表者

沼田 靖 (Numata, Yasushi)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：10218266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：不飽和脂肪酸はシス脂肪酸とトランス脂肪酸に分類される。天然に存在する不飽和脂肪酸はほとんどcis体であるが、シス体からトランス体が生成されることがある。このトランス脂肪酸は、動脈硬化をはじめとする様々な疾患を引き起こすといった人体への悪影響がある。そこで、本研究ではラマン分光法による不飽和脂肪酸のその場定量分析を行う方法を開発し、熱による異性化反応メカニズムの解明を行うことを目的とした。その結果、オレイン酸とエライジン酸の同時定量する方法を確立できたが温度を上げてトランス体のピークを検出することができず熱異性化の反応機構を解明するところまでは至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランス脂肪酸は成人病の原因となる物質と言われており、2023年までに全廃することが勧告されている。そのため、迅速な分析方法が必要となるが、これまでの方法ではその場定量が困難であった。そこで本研究では不飽和脂肪酸のシス体とトランス体の定量分析方法として、ラマン分光法を用いた。その結果、スペクトルを二階微分し、統計学的方法である多成分分析を用いることにより、精度良く同時定量することができた。

研究成果の概要(英文)： There are two forms of unsaturated fatty acids, namely, cis and trans. Although almost all natural unsaturated fatty acids are in the cis form, fatty acids with trans configuration are produced during hydrogenation to make margarine and shortening. However, these trans fatty acids are known to promote adult diseases such as arteriosclerosis. The elucidation of the isomerization mechanism of unsaturated fatty acids is important to reduce the quantity of the trans isomer. In the purpose of the present study is the development of the simultaneous determination method with Raman spectroscopy and the elucidation of the isomerization mechanism. We found Raman spectroscopy is valuable to determine the cis and trans fatty acids simultaneously.

研究分野：分子分光学

キーワード：ラマン分光 不飽和脂肪酸 異性化反応 定量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪酸はカルボキシ基を持つ鎖状炭化水素である。これは食品中などに含まれ、細胞膜の生成や活動の際のエネルギー源に使われるなど、人間が生命活動を行う上で重要な成分である。脂肪酸は二重結合を持たない飽和脂肪酸と二重結合を持つ不飽和脂肪酸に分類でき、さらに不飽和脂肪酸は二重結合を構成する炭素に結合する水素の向きによってシス脂肪酸とトランス脂肪酸に分類される。天然に存在する不飽和脂肪酸はほとんど *cis* 体であるが、マーガリンやショートニングなどの固形油を製造する際の水素添加過程でシス体からトランス体が生成されることがある。このトランス脂肪酸は血中の悪玉コレステロール増加、善玉コレステロール減少を招き、動脈硬化をはじめとする心筋梗塞や脳梗塞などの様々な疾患を引き起こすといった人体への悪影響がある。このことからアメリカでは 2006 年から食品ラベルへのトランス脂肪酸の量の表示が義務付けられている。さらにアメリカ食品医薬品局 (FDA) は 2015 年にトランス脂肪酸を含む部分水素添加油脂の食品への添加を 3 年以内に全廃すると発表した。また、世界保健機関 WHO はトランス脂肪酸を 2023 年までに全廃することを勧告している。そのため、製造現場で使用できる定量分析法が必要となる。

### 2. 研究の目的

本研究では不飽和脂肪酸の *cis* 体のオレイン酸と *trans* 体のエライジン酸のラマンスペクトルを測定し、それぞれの濃度を求める方法を開発した。その際、スペクトルの解析には PLS 回帰を用いた。この研究で、ラマンスペクトルと多変量解析が定量分析に有用であることを示す。

### 3. 研究の方法

ラマンスペクトルはレニショー社製 in Via Raman microscope を用いて測定した。励起光は 532 nm を 15L の対物レンズで集光して試料に照射した。散乱光はレイリー散乱をエッジフィルターでカットした後、分光器で分光し、CCD で検出した。1 秒間の測定を行い、50 回積算することでスペクトルを得た。

オレイン酸は Wako pure chemical industries から、エライジン酸は Sigma-Aldrich からそれぞれ購入し、精製せずそのまま使用した。エライジン酸をオレイン酸中に溶かすことで混合溶液を作成した。エライジン酸の質量分率は 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 および 0.50 とした。

スペクトルを使った定量分析には多変量解析法を用いた。PLS 回帰計算は Camo software 社の The Unscrambler X を用いた。PLS 検量線は濃度に対して予想される値をプロットすることで得た。この検量線の健全性を確かめるため、別濃度の溶液のスペクトルを測定し、先に作成したモデルから濃度を予測した。

### 4. 研究成果

図 1 に (a)オレイン酸と(b) エライジン酸のラマンスペクトルを示す。エライジン酸の融点は 45

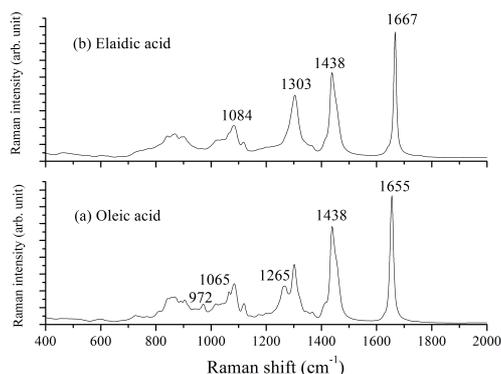


図 1 オレイン酸 (a) とエライジン酸 (b) のラマンスペクトル

表 1 ラマンピーク位置と振動帰属

Raman shift (cm <sup>-1</sup> )	Assignment
970	C-H out of plane bend
1064	C-C antisym. str.
1085	C-C sym. str. (COOH side)
1122	C-C sym. str. (CH <sub>3</sub> side)
1655	C=C stretching ( <i>cis</i> form)
1667	C=C stretching ( <i>trans</i> form)

なので、加熱して溶かしてすぐにスペクトルの測定を行なった。オレイン酸の目立ったピークは 1655, 1438, 1300, 1265, 1065, and 972 cm<sup>-1</sup> であった。このスペクトルはいくつかのピークを除いてエライジン酸 (図 1b) のスペクトルとよく似ていた。

例えば、オレイン酸の 1438, 1302, 1119, 1085 and 1065 cm<sup>-1</sup> のピークはエライジン酸のピークとすごく近いか一致していた。しかしながら、1265 と 972 cm<sup>-1</sup> のバンドはオレイン酸にしか現れていない。

1660 cm<sup>-1</sup> 付近に共通して現れているバンドは C=C の伸縮振動と帰属される。この領域のバンド、*cis* 体で 1656 cm<sup>-1</sup> とであり、*trans* 体では 1667 cm<sup>-1</sup> であり、わずかに異なっている。表 1 にピークとその振動帰属を示す。

図 2 に種々の濃度におけるエライジン酸オレイン酸混合溶液のラマンスペクトルを示す。オレイン酸の質量分率として 1.0, 0.95, 0.90, 0.80, 0.70, 0.60 と 0.50 である、すなわちエライジン酸では 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 と 0.5 となる

クロロホルムを基準物質として使い、同時測定している。667 と 370 cm<sup>-1</sup> のピークがクロロホルムの振動ピークである。どのスペクトルでもクロロホルムのピーク高さは同じであった。このことは入射光の

レーザーパワーは変化していないことを示している。それゆえ、ラマン強度は濃度だけに依存している。

図 2 に見られるように、オレイン酸の  $1655\text{ cm}^{-1}$  のピークはオレイン酸の濃度の増加によって大きくなり、エライジン酸の  $1669\text{ cm}^{-1}$  のピークはその濃度の増加に従って大きくなっている。それらのピークを用いて検量線を作成することにした。図 3 に  $1660\text{ cm}^{-1}$  付近のスペクトルの拡大図を示す。ピークはよく分離されているが、ピークのテールが別の物質のピークに重なっている。それゆえさらに明瞭にスペクトルを分離するため、スペクトルの二階微分を行なった。

図 4 (a) にスペクトル全体図の二階微分スペクトルと (b) に  $1600\text{ cm}^{-1}$  を拡大したスペクトルを示す。図 4 は極めてシャープなスペクトルになり、各ピークそれぞれがよく分離されている。特に、図 4b ではオレイン酸の  $1656\text{ cm}^{-1}$  とエライジン酸の  $1667\text{ cm}^{-1}$  が完全に分離されているのが見てとれる。それゆえ検量線作成には二階微分スペクトルを用いることにした。

次に The Unscrambler X を用いて PLS 検量線を作成した。図 5 にオレイン酸とエライジン酸の PLS 検量線を示す。上の縦軸は PLS から得られたエライジン酸の予想値で横軸は測定した質量から求めた質量分率である。どちらも  $R^2$  値は 1.000 になり、予想値と実測値がよく一致していることがわかる。次に濃度既知試料のスペクトルからこのモデルを用いて定量を行なった。( 図中 )

その結果、よく検量線に乗っていた。表 2 に実際の質量分率と PLS で予想された値を示す。

この PLS 回帰を用いて定量が成功したことがわかる。

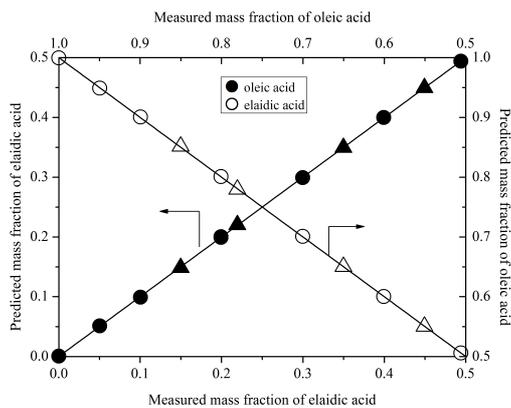


図 5 PLS 回帰と既知試料の濃度予想

表 2 オレイン酸とエライジン酸の質量分率

Oleic acid		Elaidic acid	
Measured mass	Predicted mass	Measured mass	Predicted mass
1.000	0.9994	0	0.0005
0.8502	0.8515	0.1498	0.1485
0.8007	0.8008	0.1993	0.19910
0.7805	0.77967	0.2195	0.2203
0.6502	0.6504	0.3498	0.3497
0.5506	0.5504	0.4494	0.4496

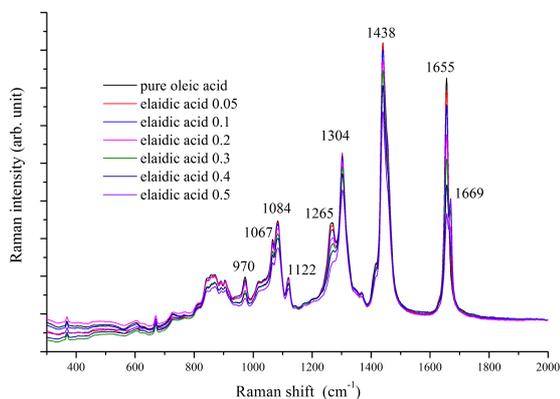


図 2 エライジン酸-オレイン酸混合溶液のラマンスペクトル

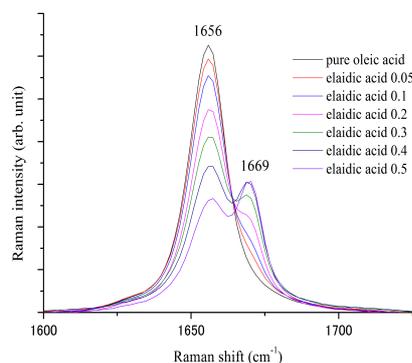


図 3  $1600\text{ cm}^{-1}$  付近の拡大図

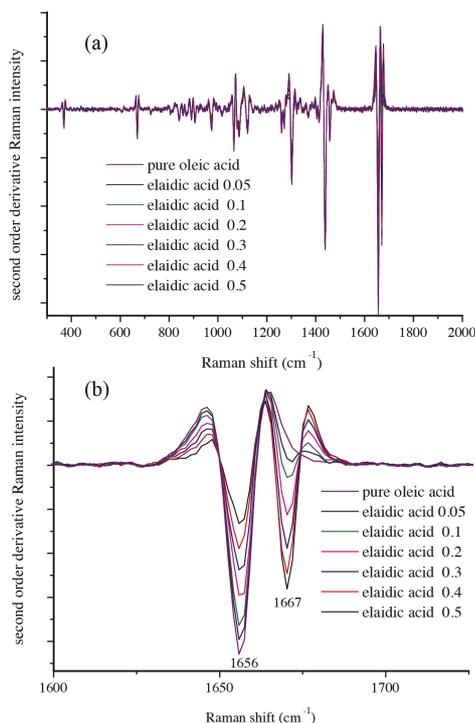


図 4 ラマンスペクトルの二階微分スペクトル。(a) 測定した全領域、および、(b)  $1660\text{ cm}^{-1}$  領域

以上の結果より，脂肪酸のシストランス体の定量分析にラマンスペクトルと多変量解析を用いることで混合溶液から各成分の定量が可能であることが示された。

## 5．主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yasushi Numata, Hayato Kobayashi, Norihiko Oonami, Yuki Kasai, Hiroyuki Tanaka, Simultaneous determination of oleic and elaidic acids in their mixed solution by Raman spectroscopy. Journal of Molecular Structure, 査読有 . Vol. 1185, 2019, pp200–204. DOI: 10.1016/j.molstruc.2019.02.110

### 〔学会発表〕(計 3 件)

Yasushi Numata, Hayato Kobayashi, Hiroyuki Tanaka, Simultaneous determination of oleic and elaidic acids by Raman spectroscopy with multivariate analysis, 日本化学会春の年会, 平成 31 年 3 月, 兵庫

Yasushi Numata, Hayato Kobayashi, Norihiko Onami, Yuki Kasai, Hiroyuki Tanaka , Simultaneous determination of oleic and elaidic acids in their mixed solutions by Raman spectroscopy, XXXIV European Congress on Molecular Spectroscopy, 平成30年8月Coimbra, Portugal.

沼田 靖, 赤間 佑希・大波 法彦・葛西 佑紀・田中 裕之, ラマン分光法によるオレイン酸-エライジン酸混合溶液の定量分析, 分析化学討論会, 平成29年5月, 京都

### 〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ <http://ch.ce.nihon-u.ac.jp/~numata/index.html>

## 6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし