

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15464

研究課題名（和文）異性体解析による有機物の酸化原因の解明と効率的な抗酸化技術の検討

研究課題名（英文）Determination of hydrocarbon oxidation mechanisms by the analysis of the hydroperoxide isomeric structure

研究代表者

加藤 俊治 (Kato, Shunji)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：60766385

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者が観測した現象（脂質ヒドロペルオキシドをNa⁺と一緒に質量分析に供したときに、ヒドロペルオキシ基の結合位置特異的な開裂を引き起こす）によって、特に不飽和炭化水素の酸化原因を明らかにすることが可能になりつつある。一方、本現象の原理はほとんど明らかにされておらず、故に本現象を様々な有機物の酸化解析に応用するためには、何故Na⁺がそのような性質を持つのかを明らかにする必要があった。本研究では上記現象の詳細なメカニズムを明らかにすることに成功した。そして本現象を用いて飽和炭化水素の酸化解析を行った。さらに新たな光酸化機構の可能性が見出されたため、その詳細な機構解明に着手した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「酸化」は我々の身の周りの有機物（脂質や炭化水素など）に生じ、劣化や物性変化をもたらす重要な化学反応である。例えば食品脂質の酸化は品質の低下を引き起こし、化粧品や香料、医薬品脂質の酸化は重篤な副作用や使用期限の短縮をもたらす。また、潤滑剤や燃料に含まれる脂質や炭化水素の酸化はエンジンなどの劣化を引き起こす。以上のように「酸化」による健康被害や経済的損失は極めて大きいと言える。本研究によって得られる技術・知見によって様々な有機物の酸化原因を推定可能になると期待される。上述のように、これら有機物の酸化機構を理解し、真の抗酸化法を検討する医学的・経済的意義は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：Of oxidized hydrocarbon structures, the hydroperoxyl group position is important information that provides the detail about its oxidation mechanisms. While we previously reported mass spectrometric methods using Na⁺ for the highly selective determination of hydroperoxyl group positions, nothing was known except for the fact that sodiated hydroperoxide provides specific fragment ions. Thus, this study firstly investigated the mechanisms that sodiated hydroperoxide provides specific fragment ions, assuming its further application to analysis of other complex oxidized hydrocarbons. And then, this method was applied to the analysis of oxidized saturated and unsaturated hydrocarbons which were oxidized by thermal and photo oxidation. Moreover, since a novel photo oxidation was observed, the mechanism was investigated.

研究分野：分析化学

キーワード：酸化 質量分析 抗酸化 カチオンー 電子相互作用 ラジカル酸化 一重項酸素酸化 光酸化

1. 研究開始当初の背景

「酸化」は我々の身の周りの有機物(脂質や炭化水素など)に生じ、劣化や物性変化をもたらす重要な化学反応である。例えば食品脂質の酸化は品質の低下を引き起こし、化粧品や香料、医薬品脂質の酸化は重篤な副作用や使用期限の短縮をもたらす。また、潤滑剤や燃料に含まれる脂質や炭化水素の酸化はエンジンなどの劣化を引き起こす。以上のように「酸化」による健康被害や経済的損失は極めて大きく、抗酸化法の構築を目的とした研究が世界的に進められている。

申請者はこれまで「有機物の酸化原因を明らかにした上で、最適な抗酸化法を検討する」という戦略のもと研究に取り組んできた。脂質や炭化水素の場合、酸化には大きく分けて“ラジカル”、“一重項酸素”、“酵素”の「3つの酸化原因」が関与すると言われ(図1)、重要なこととして「酸化原因」によって最適な抗酸化対策は異なる(ゆえに「酸化原因」の把握が重要となる)。ところで脂質や炭化水素は酸化すると、酸化一次生成物としてヒドロペルオキシド分子(M-OOH)を生成する。申請者は「M-OOHのヒドロペルオキシ基の結合位置が、脂質の酸化原因によって決定される」ということに着目し、M-OOHのヒドロペルオキシ基の位置異性を解析する手法の構築を進めてきた。そして近年、申請者は脂質に焦点を当て、M-OOHをNa⁺と一緒に質量分析に供したときに、「M-OOHがヒドロペルオキシ基の結合位置特異的な開裂を引き起こす」という極めて興味深い“現象”を発見した。この現象によって、脂質の酸化原因を推定することが可能となり、食品や生体脂質の抗酸化の視点から本現象の有用性の実証を進めている。

一方でこの現象は食品に含まれる代表的な脂質への応用に留まっている。もしこの現象がその他の有機物の酸化原因の推定に応用できれば、我々の身の周りの様々な有機物の抗酸化にも繋がると考えた。上述のように、これら有機物の酸化機構を理解し、真の抗酸化法を検討する学術的・経済的意義は極めて大きい。

2. 研究の目的

申請者が観測した現象(M-OOHをNa⁺と一緒に質量分析に供したときに、M-OOHはヒドロペルオキシ基の結合位置特異的な開裂を引き起こす)によって、特に不飽和炭化水素の酸化原因を明らかにすることが可能になりつつある。一方、本現象の原理はほとんど明らかにされていなかった。故に本現象を様々な有機物(有機物是不飽和炭化水素だけでなく飽和炭化水素によっても構成される)の酸化解析に応用するためには、先ず何故Na⁺がそのような性質を持つのかを明らかにする必要がある。そこで本研究では先ず(1)Na⁺がヒドロペルオキシ基の結合位置特異的な開裂を誘導する原理を明らかにすることを目的とした。次に幅広い有機物酸化原因の解析を目指し、(1)の技術を応用して(2)飽和炭化水素の酸化物解析を試みることにした。

上述のように有機物の酸化にはラジカル、一重項酸素、酵素の3つの機構が関与する。これらのうち一重項酸素の主な発生源の一つとして、光増感剤の存在下での光照射が挙げられる。しかし近年我々は光増感剤の“非存在下”で青色光により有機物の酸化が亢進する可能性を見出した。このことは白色LEDに移り変わる現在、白色LEDに含まれる青色光が多くの有機物を酸化させる可能性を示している。そこで本研究ではこの可能性を精査するため、(3)青色光によって亢進する光酸化の詳細な機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 質量分析によるヒドロペルオキシド - アルカリ金属付加体分析法の構築

これまでの申請者の研究(様々な脂肪酸ヒドロペルオキシド(オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸を用いた解析)でM-OOHのNa⁺付加体がヒドロペルオキシ基の位置特異的なフラグメントイオンを生じるという現象を見出してきた。本研究ではこのフラグメンテーションをより詳細に解析するため、安定同位体リノール酸のヒドロペルオキシド(¹³C-LAOOH)を調製し、そのフラグメントイオンを解析し、¹²C-LAOOHから得られるフラグメントイオンと比較した。また、この現象はH⁺などを使用した場合には見られないことから、申請者はこの現象が「Na⁺に特有の性質“Cation- π 電子相互作用”によって生じている」と予測した。そこでこのことを証明するため、Cation- π 電子相互作用の強さが異なるアルカリ金属(Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺)を用い、フラグメンテーションの変化を観察した。

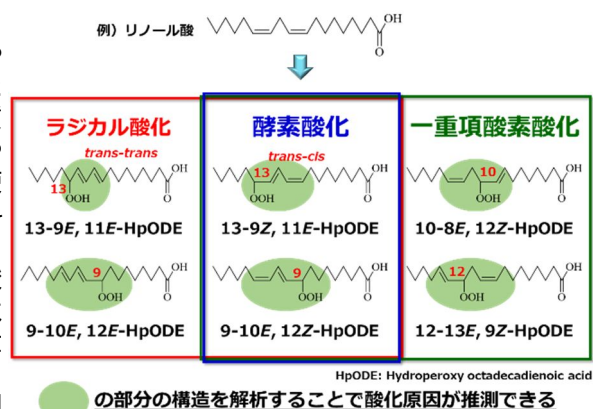


図1 脂質酸化機構と生じる酸化脂質異性体

(2) 飽和炭化水素の酸化機構の解明

不飽和炭化水素は酸化安定性の低さから、その酸化機構に関してこれまで多くの研究が報告されてきた。一方で飽和炭化水素も過酷な条件では確かに酸化が亢進する。そこで本研究では、幅広い有機物の酸化機構の理解に向け、飽和炭化水素の酸化機構解析に取り組んだ。飽和炭化水素としてパルミチン酸を使用した。パルミチン酸を 110 ~ 180°C で 12 時間酸化させ、酸化物の構造を化学発光 HPLC、ガスクロマトグラフィー (GC-MS) および (1) を応用した質量分析等を用いて解析した。

(3) 有機物の光酸化に関わる波長の解析

一般に有機物の光酸化には、光増感物質の存在が必要となる。申請者はごく最近、光増感剤の存在無しで有機物の酸化が亢進する可能性を見出した。そこでこの有機物の新たな光酸化機構を明らかにするため、この酸化を惹起する波長の探索を行うこととした。解析にあたり先ず波長別光源の作製を行った。光源には 365 ~ 850 nm (10 ~ 30 nm 間隔、半値幅 10 ~ 40 nm) の LED を用いた。装置の有効性を確認するため、代表的な光増感剤であるクロロフィルを用いてリノール酸を酸化させた。加えて増感剤無しでリノール酸を酸化させ、これらの光酸化で生じた酸化物を (1) の原理に基づき解析を行った。

4. 研究成果

(1) 質量分析によるヒドロペルオキシド - アルカリ金属付加体分析法の構築

^{13}C -LAOOH と ^{12}C -LAOOH を解析・比較したところ、 Na^+ によるフラグメントイオンは α -開裂によって生じていることがわかった。加えてフラグメントイオンの生じやすさは生成するフラグメントイオンの安定性 (共役構造や共鳴構造など) に大きく依存することがわかった。さらに種々のアルカリ金属 (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) を用いた解析では、フラグメントパターンが付加する金属によって大きく変化することが明らかとなった (図 2)。すなわち、 Li^+ 付加体からは α -開裂の他、Hock fragmentation が観測された。また Na^+ と K^+ 付加体は α -開裂のみを生じたが、 Na^+ 付加体の方がフラグメントイオンの生成量が多かった。そして Rb^+ , Cs^+ 付加体からはフラグメントイオンが観測されなかった。これらの知見は申請者の予想通り、アルカリ金属によるフラグメンテーションが Cation- π 電子相互作用によるものであることを示唆した。

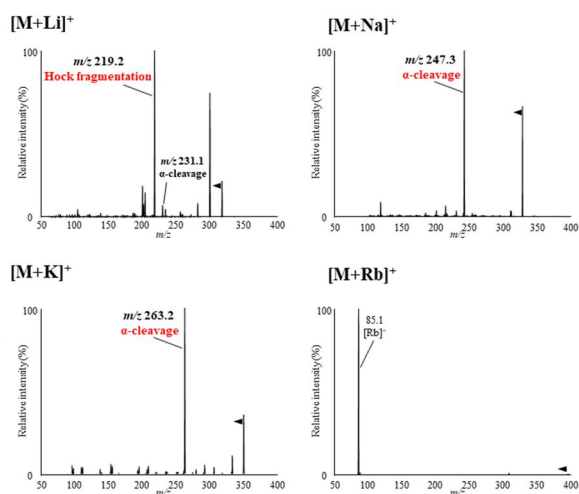


図 2 付加する金属の種類とフラグメンテーションの変化

これらの知見により様々な M-OOH のフラグメントイオンの予測が可能となり (図 3)、幅広い有機物の酸化評価が期待される。本知見は *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **32**, 2399–2409 (2021) に掲載された。

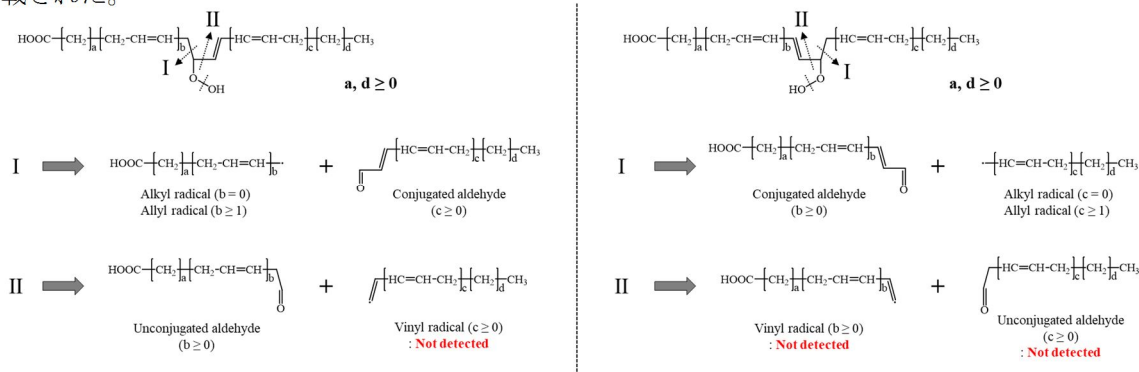
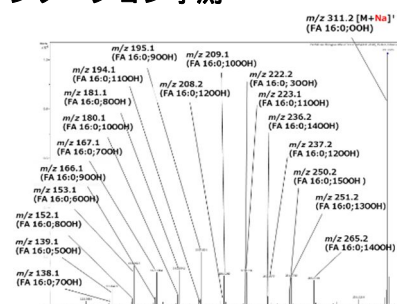


図 3 様々な構造を持つ M-OOH のフラグメンテーション予測

(2) 飽和炭化水素の酸化機構の解明

加熱したパルミチン酸をヒドロペルオキシ基を特異的に検出できる化学発光 HPLC により解析した。その結果、複数のピークが検出され、飽和炭化水素も確かにヒドロペルオキシドが形成されることが明らかとなった。そこで (1) で観測された現象に基づき

図 4 (1) の現象の応用 (飽和炭化水素の構造解析)



ヒドロペルオキシ基の挿入位置を解析したところ、構成している炭素ほぼ全てにヒドロペルオキシ基が付加されていることがわかった（パルミチン酸ヒドロペルオキシド異性体の生成）（図4）。次に個々のパルミチン酸ヒドロペルオキシド異性体を単離精製し、さらに加熱分解に供した。分解物の解析結果から飽和炭化水素はヒドロペルオキシ基の挿入位置に依存した、種々の揮発性炭化水素を生成することが明らかとなった（図5）。パルミチン酸ヒドロペルオキシドの加熱によって更なるヒドロペルオキシ基の形成も観察されたが、興味深いことに、2つ目のヒドロペルオキシ基の挿入箇所は無作為ではなく、最初のヒドロペルオキシ基の位置に依存することがわかった。

以上の結果から、飽和炭化水素の酸化機構が明らかになりつつあると考えられ、今後、有機物のより効果的な抗酸化法の探索に繋がると期待される。

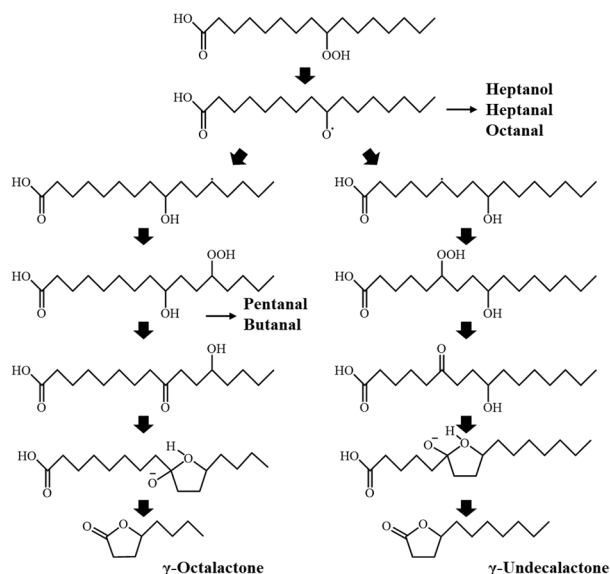


図5 飽和炭化水素の酸化と分解経路（例）

（3）有機物の光酸化に関わる波長の解析

図6に示すようにサンプルに個々の波長の光を照射できる波長別光源（試作型）を作成した。これを用いてクロロフィル添加リノール酸を酸化させ、酸化物を解析したところ、酸化物は主に450 nmと700 nm弱に生成され、その酸化機構は一重項酸素酸化であった（図7）。クロロフィルの吸収極大は主に450 nmと700 nmであり、本装置の有効性が確認できた。そこで、本装置を用いて光増感剤無しでリノール酸を酸化させたところ、500 nm以上の波長では酸化がほとんど見られなかった一方で、500 nm以下では波長が短くなるにつれて酸化物が増加することがわかった。また、この酸化物はラジカル酸化によって生成していることがわかった。



図6 波長別光源（試作型）

500 nm以下の波長（可視光）は白色LEDのメインの波長と重なるため、このことは我々の身の回りの有機物がLEDによって酸化されることを示唆している。今後、本現象の更なるメカニズム解明と効率的な抗酸化法の構築が必須であると考えられる。

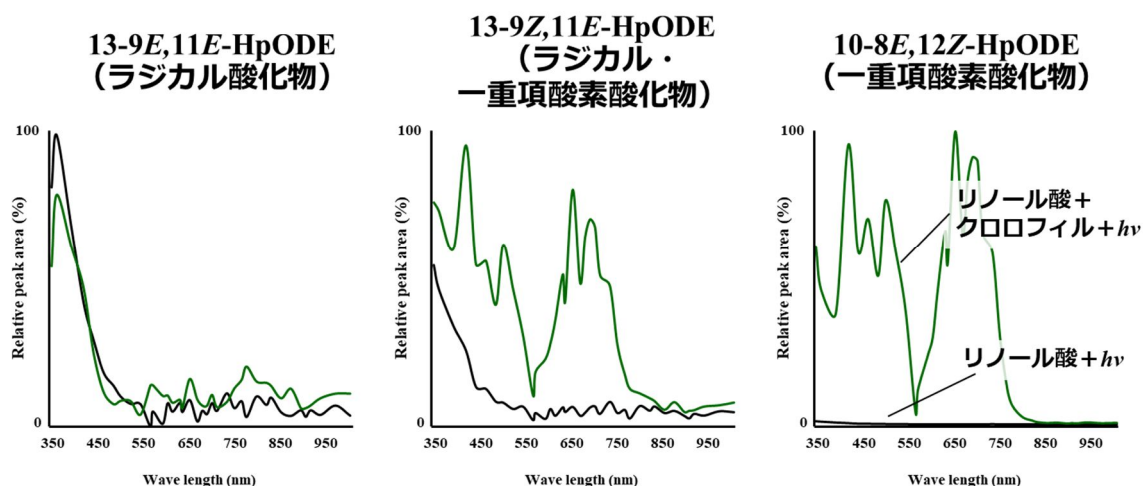


図7 光増感剤（クロロフィル）の存在・非存在下でのリノール酸の波長別酸化機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Shunji, Shimizu Naoki, Ogura Yusuke, Otoki Yurika, Ito Junya, Sakaino Masayoshi, Sano Takashi, Kuwahara Shigefumi, Takekoshi Susumu, Imagi Jun, Nakagawa Kiyotaka	4. 巻 32
2. 論文標題 Structural Analysis of Lipid Hydroperoxides Using Mass Spectrometry with Alkali Metals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Society for Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 2399 ~ 2409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jasms.1c00039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Shunji, Osuka Yusuke, Khalifa Saoussane, Obama Takashi, Itabe Hiroyuki, Nakagawa Kiyotaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Investigation of Lipoproteins Oxidation Mechanisms by the Analysis of Lipid Hydroperoxide Isomers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1598 ~ 1598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox10101598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 加藤俊治, 大須賀佑輔, 仲川清隆
2. 発表標題 質量分析を用いたヒト血中リポタンパク質の酸化メカニズムの推定
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会第20回日本NO学会 合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤俊治, 乙木百合香, 伊藤隼哉, 境野真善, 佐野貴士, 今義潤, 仲川清隆
2. 発表標題 様々な油脂酸化評価に向けたトリアシルグリセロールヒドロペルオキシド標準品の調製法
3. 学会等名 日本油化学会第59回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shunji Kato, Kiyotaka Nakagawa
2. 発表標題 Structural analysis of lipid oxidation products using mass spectrometry
3. 学会等名 International symposium on lipids and food ingredients for health promotion (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤俊治, 乙木百合香, 仲川清隆
2. 発表標題 脂質の光酸化に影響する波長の評価
3. 学会等名 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunji Kato
2. 発表標題 Structural analysis of lipid oxidation products using mass spectrometry
3. 学会等名 2021 AOCs Annual Meeting & Expo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunji Kato, Naoki Shimizu, Yurika Otoki, Kiyotaka Nakagawa
2. 発表標題 Alkali metals induce the hydroperoxyl group position specific fragment ions in mass spectrometry.
3. 学会等名 FACSS SciX (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤俊治, 高橋隼登, 乙木百合香, 伊藤隼哉, 境野眞善, 佐野貴士, 竹内茂雄, 今義潤, 仲川清隆
2. 発表標題 オリブオイル酸化機構(熱・光)の数値化と光酸化に影響する波長の解析
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大坪研一、久保田真敏、加藤俊治、乙木百合香、Halida Rahmania、仲川清隆、松木翠、澤田一恵、橋本博之、清水稔仁	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Informa markets	5. 総ページ数 104
3. 書名 食品と開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------