

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・報告

ラマン分光法による診断法の開発

田中裕之・沼田靖・小林 厚志 (日大工・生命)

我々のグループでは疾病関連物質の定量分析をラマン分光法で行うことを目標としている。これまでの研究で、アミノ酸¹⁾や脂質、糖のラマン強度比が濃度に比例することを見いだした。そこで、構造類似化合物の混合試料において、定量の精度を向上させるため、多変量解析による分析手段を取り入れた。

1. 不飽和脂肪酸の定量分析

1-1 序論

脂肪酸は食品中に含まれ、細胞膜の生成やエネルギー源に使われるなど、生命活動を行う上で重要な物質である。この脂肪酸には二重結合をもつ不飽和脂肪酸と単結合しかもたない飽和脂肪酸がある。さらに不飽和脂肪酸の構造にはシス体とトランス体が存在する。天然の脂肪酸はほとんどシス体であるが、ショートニングやマーガリンの製造の際、水素添加の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動脈硬化等の疾病を引き起こす原因物質とされている。そのため、アメリカでは3年以内にトランス脂肪酸を全廃することが決められている。これまでの研究において、ラマン分光法による脂肪酸定量分析を行い、シス体であるオレイン酸とそのトランス体(エライジン酸)の定量分析を行い、ラマン強度比が濃度に比例することが分かった。しかしながら、シス-トランス体の混合物には、スペクトルが似ているため、ピーク強度を使う方法では良い定量性が得られなかった。そこで、本研究ではスペクトルの解析方法として、多変量解析を用いて混合物における定量分析を多なした。

1-2 実験

今回の実験で用いた脂肪酸はシス体のオレイン酸とトランス体のエライジン酸である。ラマンスペクトルの測定は Renishaw 社 inVia Raman microscope を用いた。励起光には、532 nm のグリーンレーザーをサンプルに照射し、散乱光を検出部に導き、励起光をエッジフィルターで除去した後、分光器で分散した後、CCD で検出した。照射時間 1 s、積算回数を 50 回でスペクトルを得た。まず、濃度既

知のオレイン酸のラマンスペクトルを測定し、同時測定した基準物質であるアセトニトリルの 921 cm^{-1} のラマン強度に対する脂肪酸のラマン強度比を求めた。検量線はこのスペクトルを二階微分した後、多変量解析で解析して得た。混合物のラマンスペクトルを測定して、先ほど得た検量線で回帰することでシスおよびトランス体の濃度を求めた。

1-3 結果と考察

Fig. 1 にオレイン酸とエライジン酸由来のラマンスペクトルを示す。

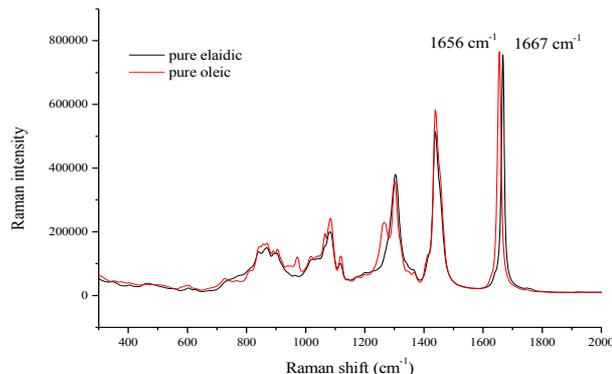


Fig. 1 Raman spectra of oleic and elaidic acids.

ふたつの脂肪酸のスペクトルは非常によく似ているのが分かる。しかし、 1660 cm^{-1} 付近に現れている C=C 二重結合の伸縮振動に帰属されるピークは 12 cm^{-1} 離れて観測される。このピークを使って定量分析を行うわけだが、図にみられるようにこれらのピークのテールは重なっていて、混合物になると定量するのは困難である。そこで、二階微分することで、スペクトルのピーク分離を行った。

Fig. 2 に二階微分をしたスペクトルを示す。Fig. 2 (a)は全体図で、(b)は 1660 cm^{-1} 付近を拡大した図である。Fig. 2b で見られるように、ふたつのピークはよく分離されているのが分かる。この二階微分したスペクトルを PLS 回帰を用いて解析した。実際仕込んだ濃度を横軸に、予測される濃度を縦軸に示した図を Fig. 3 に示す。この回帰モデルを用いて、混合試料の濃度既知試料のスペクトルから、シス体とトランス体の濃度を求めたところ、仕込み濃度と計算値が非常によく一致した。(図中の△、▲)

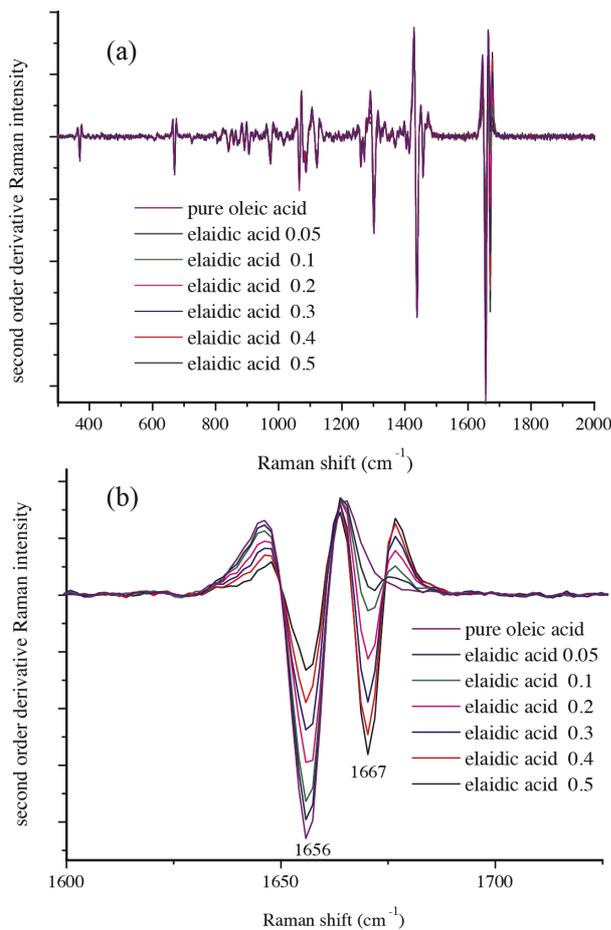


Fig. 2 Second derivative Raman spectra at several concentrations.

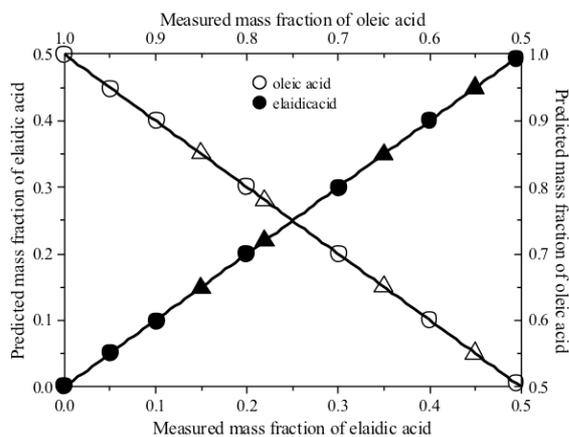


Fig. 3 PLS calibration curves of oleic and elaidic acids.

2. ビタミン C の定量分析

ビタミン C は、人間にとって欠かせない栄養素の一つとされている。ビタミン C は、還元型の L-アスコルビン酸と酸化型のデヒドロアスコルビン酸の 2 種類があり、人の体内ではビタミン C の 95 % は還元型で存在している。ビタミン C は、水溶性ビタミンであり強い抗酸化作用を有することから、動脈硬化やガンなどの予防に有効で

あると期待され、食品、飼料および医薬品などにも利用されている。そのため、生体内におけるビタミン C の定量は重要である。本研究では、純成分の L-アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸の定量を検討した。次に L-アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸から成る 2 成分系混合溶液の定量を行った。

結果と考察

Fig.4 に L-アスコルビン酸水溶液、デヒドロアスコルビン酸水溶液及びこれらの試料から成る 2 成分系混合溶液のラマンスペクトルを示す。L-アスコルビン酸は 1687 cm^{-1} に C=C 伸縮振動、デヒドロアスコルビン酸は 1793 cm^{-1} に C=O 伸縮振動のピークを確認した³⁾。これらのピークを用いて質量分率に対するラマン強度比をプロットすることで検量線を得た。

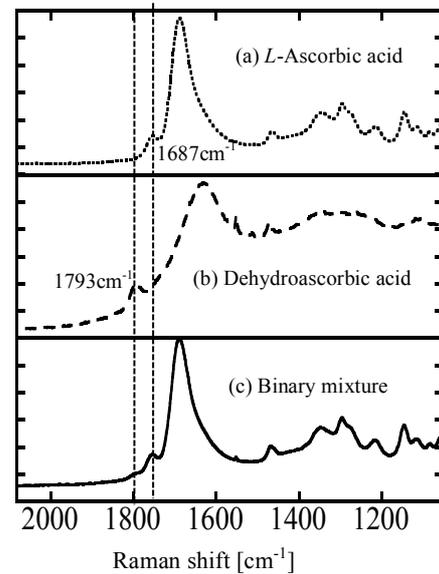


Fig. 4 Raman spectra of vitamin C.

純成分のラマン強度比は質量分率に対して、比例していることがわかった。一方、混合溶液は 1793 cm^{-1} のピークが純成分に比べて非常に小さくなっており、質量分率が 0.005 以下では検出できなかった。これは、混合溶液中では反応によって、還元型から酸化型に変化していると考えている。

【参考文献】

1) Numata, Otsuka and Tanaka, “Quantitative Determination of Glycine, Alanine, Aspartic acid, Glutamic acid Phenylalanine, and Tryptophan by Raman Spectroscopy”, *Analytical Letters*, 50(4), 651-662, (2017).