

# ラマン分光法と多変量解析を用いたオレイン酸，エライジン酸の 同時定量分析

○沼田 靖（日大工・生命） 小林 隼人（日大工・生命・院生）大波 法彦（日大工・生命・学生） 葛西 佑紀（日大工・生命・学生） 田中 裕之（日大工・生命）

## 1. 序論

### (1) なぜ脂肪酸を定量するか？

脂肪酸はカルボキシ基を持つ鎖状炭化水素である。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) 従来の脂肪酸の定量方法

滴定やガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）がこれまでに脂肪酸の

定量分析に使われていた。しかし、クロマトグラフィーでは誘導化をする必要がある。ガスクロマトグラフィーでは蒸気圧を稼ぐためメチルエステル化を行い、HPLC では、フェナシルエステル化を行い、可視紫外の発色団を結合させて定量分析を行なっている。このように従来のクロマトグラフィーではかなり手間をかけて分析しなければならず、その場定量にはなかなか難しい。

赤外線吸収分光法も脂肪酸の定量に用いられて来た。それは振動分光法であり、定性や定量分析に使われてきた。振動分光法は構造変化に関する情報を与えてくれるので、構造の異なる *cis* 体と *trans* 体の振動準位は異なることが期待される。また、IR スペクトルは吸収法なので、そのピーク強度はランベルト・ベールの法則に従う。つまり、吸光度は濃度に比例し、定量分析にも適応できる。しかしながら、IR の分解能はあまり良くないので、混合溶液では *cis* 体と *trans* 体のピークは良く分解されていない。

### (3) ラマン分光法による定量

ラマン分光法は別の振動分光法である。ラマンは励起光にレーザーを使っているので分解能は IR に比べると良い。そのため、振動エネルギーの差が小さくてもスペクトルが分解される。ラマンはこれまであまり定量分析に利用されてこなかった。なぜなら入射光のレーザーパワーが散乱強度に依存するからである。我々は一定量存在する基準物質のラマン強度と試料のラマン強度の比、すなわちラマン強度比をとることにより、レーザーパワーの補正を行った。このラマン強度比は濃度に比例することを見出した。

#### (4) 多変量解析による定量

多変量解析がスペクトルの定量分析に使われてきた。以前の定量分析法では、スペクトルに現れる一つのピークの高さや面積から定量分析を行なっている。一方、多変量解析ではスペクトル全ての値を用いる。この方法は一つのピークを用いるより良い定量性を示している。特に多成分系の試料に対して利点がある。濃度既知試料のスペクトルから Partial Least Square (PLS) 回帰を用いて、実際の濃度に対する予想値が一致するようなモデルを作り、濃度未知試料のスペクトルをそのモデルで解析することにより、定量分析を行う方法がよく用いられている。

#### (5) この研究の目的

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。

## 2. 実験

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。

多変量解析を定量分析解析法に用いた。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。

## 3. 結果と考察

Figure 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°C 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  $\text{cm}^{-1}$  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 (Figure 1b) のスペクトルとよく似ていた。

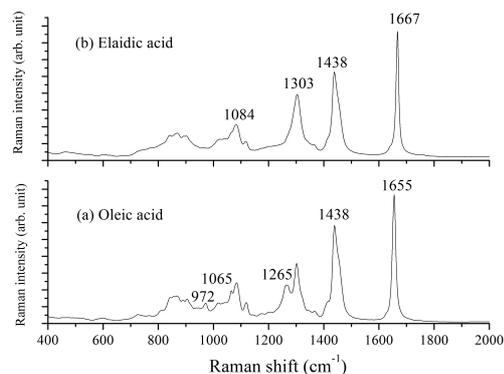


Figure 1 Raman spectra of oleic and elaidic acids.

例えば、オレイン酸の 1439, 1302, 1119, 1085 and 1065  $\text{cm}^{-1}$  のピークはエライジン酸のピークとすごく近いが一致していた。しかしながら、1265 and 972  $\text{cm}^{-1}$  のバンドはオレイン酸にしか現れていない。1660  $\text{cm}^{-1}$  付近に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 1656  $\text{cm}^{-1}$  と *trans* 体 1667  $\text{cm}^{-1}$  は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。

Figure 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。

**Table 1 Raman frequencies and assignments.**

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)

クロロホルムを基準物質として用い、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。

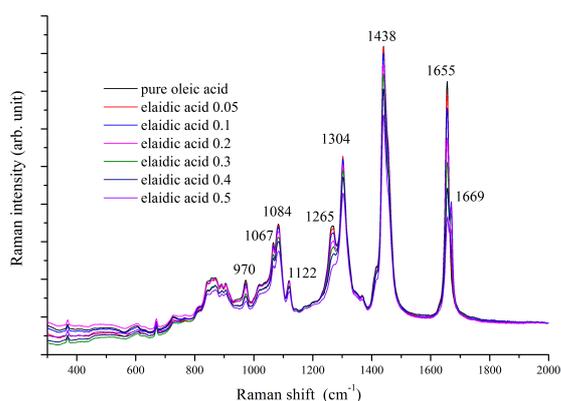
**Figure 2 Raman spectra of oleic and elaidic acids in their mixed solutions.**

Figure 2 に見られるように、オレイン酸の 1655 cm<sup>-1</sup> 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 cm<sup>-1</sup> 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ことにした。Figure 3 に 1660 cm<sup>-1</sup> 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。

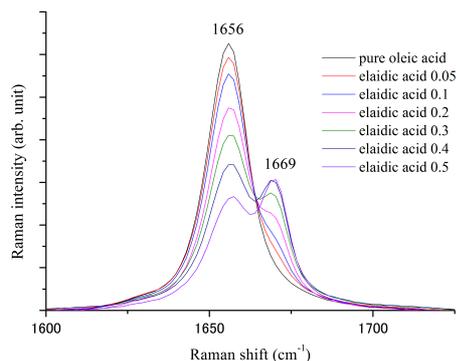
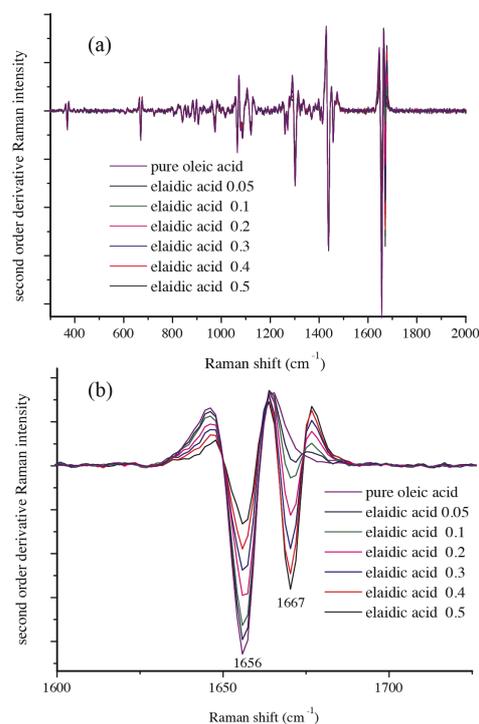
**Figure 3 Enlarged Raman spectra of Figure 2 at around 1650 cm<sup>-1</sup>.****Figure 4 Second order differential Raman spectra of the mixed solution of oleic and elaidic acids.**

Figure 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 cm<sup>-1</sup> を拡大したスペクトルを示す。Figure 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、Figure 4(b)ではオレイン酸の 1656 とエライジン酸の 1667 cm<sup>-1</sup> 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。Figure 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。その結果、よく検量線に乗っており、この PLS 回帰を用いて定量が成功した。Table 2 に実際の質量分率と PLS で予想された値を示す。

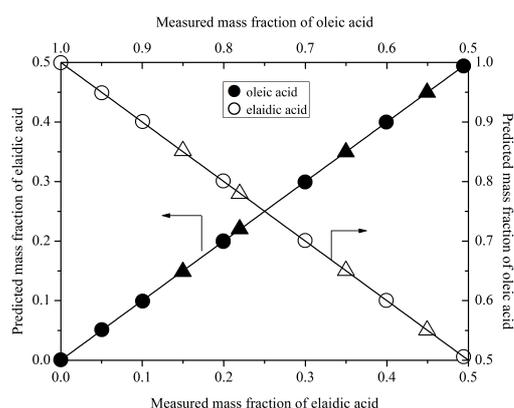


Figure 5 PLS calibration curves.

Table 2 Mass fractions of oleic and elaidic acids.

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

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。

#### ぬ研活動 in 2018

1. 分析化学討論会（山口）  
赤間，長鈴 発表 2 件
2. European Congress on Molecular Spectroscopy, Coimbra, Portugal 沼田発表 発表 1 件
3. 分析化学会年会（仙台）  
赤間，長鈴，古澤 発表 3 件
4. 化学系学協会東北大会（秋田）  
赤間，長鈴，古澤，発表 3 件