

FT-IR スペクトルを使った 糖水溶液蒸発過程の解析による水和数 Hydration number from analysis of the evaporation process of aqueous sugar solutions by the FT-IR spectra.

北里大学 石井 郁子
生命歯学部 傘 孝之

Ikuko ISHII¹ and Takayuki KARAKASA²

¹Department of Biochemistry, Kitasato University School of Medicine,
1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa, 252-0374, Japan

²Department of Chemistry, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry,
1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan

Abstract: The molar ratio (water/sugar) and the wavenumber shifts (the ether linkage) of the evaporation process of glucose, fructose, maltose, sucrose, trehalose and 1-kestose aqueous solutions were investigated by the time interval measurement of FT-IR ATR spectroscopy. A slope of a tangent of the graph of indicating the molar ratio change in the wavenumber shifts was calculated, and the hydration numbers of these sugar aqueous solutions were determined by comparison with the calculated slopes and the graph.

Key words: glucose, fructose, trehalose, sucrose, maltose, 1-kestose, hydration number, FT-IR, evaporation

(2016年3月11日 受理)

1 序論

オリゴ糖の一種である α, α -トレハロース(以下「トレハロース」という)の機能¹⁾を明らかにする目的で水溶液中でのトレハロースの構造を検討してきた。²⁾ その一環として、小液滴(10 μ L)のトレハロース水溶液の自然乾燥により、アモルファストレハロース二水和物(ガラス状態)が形成されることをFT-IRスペクトルから示した。^{3a)} 更に、トレハロース水溶液の蒸発過程(過飽和状態まで)をFT-IRスペクトルATR法で10分間隔180分インターバル測定し、各時間の水/トレハロースのモル比に対するグリコシド結合の逆対称伸縮振動吸収ピーク(グリコシド結合ピーク)の低波数シフトがモル比(水/トレハロース)47付近で変化し、このモル比がトレハロースの動的水和数と一致していることを報告した。^{3b)} 前報^{3c)}では、トレハロースおよびスクロース水溶液の蒸

発速度を制限する方法(以下「制限蒸発法」という)を開発し、この方法を使ってモル比(水/糖)とグリコシド結合ピークの時間変化を測定し、そのデータ解析からトレハロースおよびスクロースの水和数を求めた。

今回は、前報^{3c)}の制限蒸発法を単糖であるグルコース、フルクトース、二糖であるマルトース、トレハロース、スクロース、三糖である1-kestoseに適用し、これらの糖の水和数についての更なる解析を試みた。

2. 実験

トレハロース二水和物は株式会社林原、グルコース、フルクトース、スクロース、マルトース一水和物は関東化学の特級試薬、1-kestoseは和光純薬工業(株)の生化学用試薬、水は関東化学のHPLC用蒸留水を使用した。

IRスペクトルは、日本分光製FT/IR-4200に、同

じく日本分光製1回反射型ATR-PRO450-Sにダイヤモンドプリズムを取り付け、糖水溶液3 μ Lを日本分光製の液体蒸発防止蓋(質量71.2242g、容量約22mm³)で蓋をして測定した。また、インターバル測定は、液体蒸発防止蓋に付属しているバイトンリングにセラハンリング(内径10mm、外径20mm)を挟んで蓋をし、分解能2cm⁻¹、積算回数128回で4分毎20時間行った。IRスペクトルの処理は、スペクトルマネージャ(日本分光製)を用いた。FT-IR装置の試料室の温度と相対湿度(以下「湿度」という)は、佐藤商事社製温湿度・露点計HT-SDデータロガーを使用した。

2.1 標準糖水溶液の調製と検量線の作成

グルコース、フルクトース、マルトース、スクロース、トレハロース、1-ケストースについて、それぞれ異なるモル比(水/糖)30種類の標準糖水溶液を調製した。

標準糖水溶液のモル比(水/糖)は、

グルコース:23.4、28.0、32.6、37.7、41.9、47.3、50.6、54.6、60.5、63.8、68.4、72.9、77.4、81.9、86.6、90.9、95.4、100.1、104.7、108.7、113.5、118.2、123.2、127.0、131.6、136.4、140.9、145.4、150.1、153.5

フルクトース:10.0、14.9、20.0、24.9、30.0、35.1、40.0、45.0、50.1、55.1、60.0、65.2、70.2、74.9、80.1、84.9、90.1、93.8、99.8、104.6、109.3、114.9、119.4、124.6、129.0、134.9、139.5、144.7、149.6、154.9

マルトース:37.9、41.9、45.9、49.9、53.9、57.8、61.8、66.0、70.3、73.3、78.5、79.4、86.1、89.8、93.1、98.3、101.8、106.7、109.8、113.3、117.5、121.9、125.6、129.2、133.8、136.9、141.8、146.0、149.3、153.4

スクロース:10.0、14.9、20.0、24.9、29.9、35.0、39.9、44.9、50.0、55.0、59.8、64.8、69.6、74.6、79.5、84.7、89.8、94.4、99.5、104.3、109.5、114.3、119.5、124.4、129.4、134.3、139.3、144.1、148.9、154.2

トレハロース:36.9、40.9、45.0、49.0、51.9、57.0、61.2、65.2、69.2、73.3、77.0、82.1、83.3、87.6、92.0、95.8、98.0、104.0、106.2、112.7、115.3、121.9、125.8、129.0、134.1、136.6、141.5、145.4、149.7、153.3

1-ケストース:37.9、41.8、45.9、50.0、53.8、57.8、61.8、65.7、69.6、73.9、77.8、81.8、86.0、89.6、93.7、97.7、101.4、105.6、109.8、113.9、117.5、121.5、125.4、129.5、133.9、137.7、141.6、146.0、

150.5、153.4

である。

作成した異なるモル比(水/糖)30種類の標準糖水溶液をATR法で測定した。得られたスペクトルはBinomial方式99回の反復でスムージング処理し、水の吸収領域(P1)と指紋領域(P2)(表1)の面積比(P2/P1)を算出した。この面積比(P2/P1)=xとモル比(水/糖)=yの間の近似曲線式と決定係数R²(表2)を求めた。この近似曲線を、蒸発経過時間ごとのモル比(水/糖)を求める検量線として使った。

2.2 FT-IR インターバル測定

ダイヤモンドプリズム上に糖水溶液(モル比(水/糖)が最も大きい標準糖水溶液を用いた)を3 μ L置いた後、セラハンリングを液体蒸発防止蓋のバイトンリングが接触するATR装置の位置に置き、液体蒸発防止蓋をかぶせて、4分間隔で20時間インターバル測定を行った。同時に、FT-IR装置の試料室の温度と湿度を10分間隔で測定した。各糖水溶液の制限蒸発測定中の平均湿度と平均温度を表3に示した。

各経過時間でのモル比(水/糖)は、スペクトルをBinomial方式99回の反復でスムージング処理し、吸収ピーク領域とP1とP2の面積比(P2/P1)を算出し、この面積比(P2/P1)から検量線を使って求めた。時間変化に対するモル比(水/糖)とエーテル結合のシフト値(測定中最も低波数に観測されるエーテル結合の波数を規準としたときの値:以下「シフト値」という)のグラフは、グルコース(glucose-1, glucose-2)を図1、フルクトース(fructose)を図2、マルトース(maltose)を図3、スクロース(sucrose)を図4、トレハロース(trehalose-1, trehalose-2)を図5、1-ケストース(1-kestose)を図6に示した。各糖のエーテル結合ピークのシフト範囲は、グルコース(glucose-1, glucose-2):1016-1035cm⁻¹、フルクトース(fructose):1048-1064cm⁻¹、マルトース(maltose):1011-1035cm⁻¹、スクロース(sucrose):984-996cm⁻¹、トレハロース(trehalose-1, trehalose-2):982-993cm⁻¹、1-ケストース(1-kestose):985-995cm⁻¹の範囲であった。また、モル比(水/糖)に対するシフト値のグラフは、グルコース(glucose-1, glucose-2)を図7、フルクトース(fructose)を図8、マルトース(maltose)を図9、スクロース(sucrose)を図10、トレハロース(trehalose-1, trehalose-2)を図11、1-ケストース(1-kestose)を図12に示した。

表1 各糖のP1とP2の波数範囲

糖	P1 (cm ⁻¹)	P2 (cm ⁻¹)
グルコース	1497.45-1750.08	967.126-1180.7
フルクトース	1497.45-1750.08	992.678-1206.26
マルトース	1497.45-1750.08	960.377-1180.7
スクロース	1509.99-1760.21	955.555-1180.7
トレハロース	1497.45-1750.08	965.198-1180.7
1-kestose	1497.45-1750.08	965.68-1183.6

表2 P2/P1に対するモル比の散布図の近似曲線式と決定係数R²

糖	近似曲線式/R ²
グルコース	$y = -0.8512x^2 + 23.187x + 6.656$ R ² = 0.9976
フルクトース	$y = -0.4983x^2 + 16.617x + 3.5772$ R ² = 0.9969
マルトース	$y = -2.9485x^2 + 59.903x + 2.0352$ R ² = 0.9993
スクロース	$y = -4.180x^2 + 52.771x - 1.0954$ R ² = 0.9995
トレハロース	$y = -3.2911x^2 + 55.525x - 1.2867$ R ² = 0.997
1-kestose	$y = -6.5714x^2 + 77.7242x - 3.6458$ R ² = 0.9938

表3 糖水溶液蒸発時の平均湿度、平均温度

糖		平均湿度 (%)	平均温度 (°C)
グルコース	glucose-1	27	25
	glucose-2	37	34
フルクトース	fructose	27	25
マルトース	maltose	22	25
スクロース	sucrose	22	24
トレハロース	trehalose-1	23	24
	trehalose-2	29	34
1-kestose	1-kestose	18	25

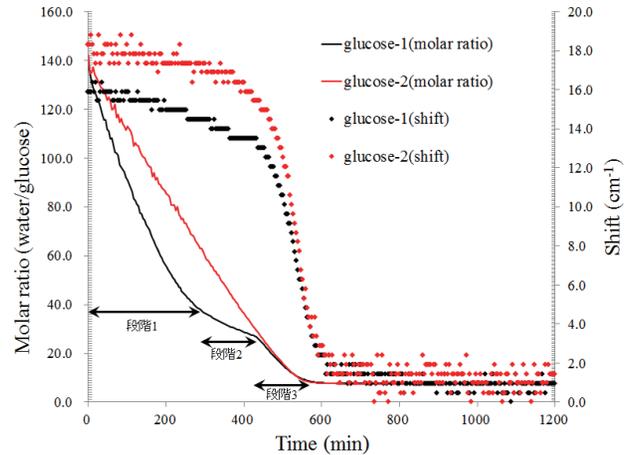


図1 グルコースの蒸発時間に対するモル比とシフト値の散布図

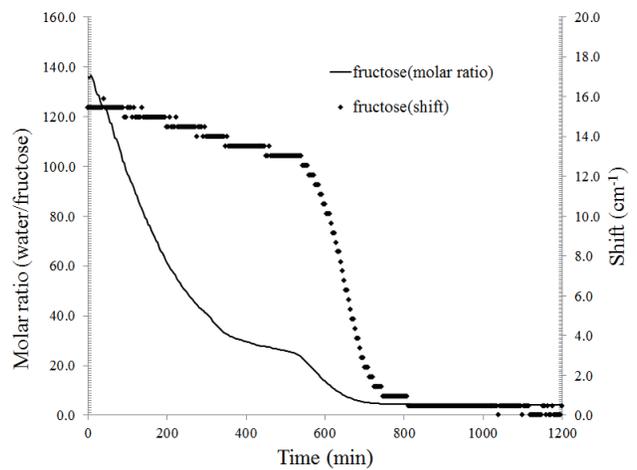


図2 フルクトースの蒸発時間に対するモル比とシフト値の散布図

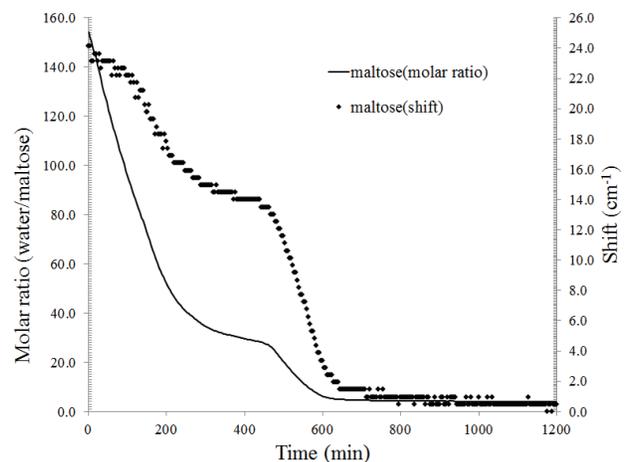


図3 マルトースの蒸発時間に対するモル比とシフト値の散布図

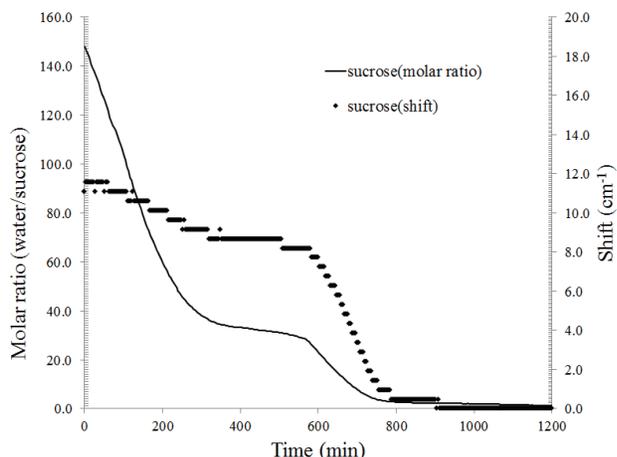


図4 スクロースの蒸発時間に対するモル比とシフト値の散布図

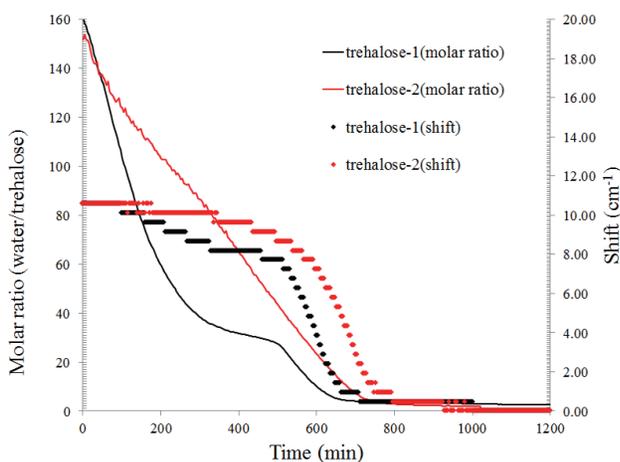


図5 トレハロースの蒸発時間に対するモル比とシフト値の散布図

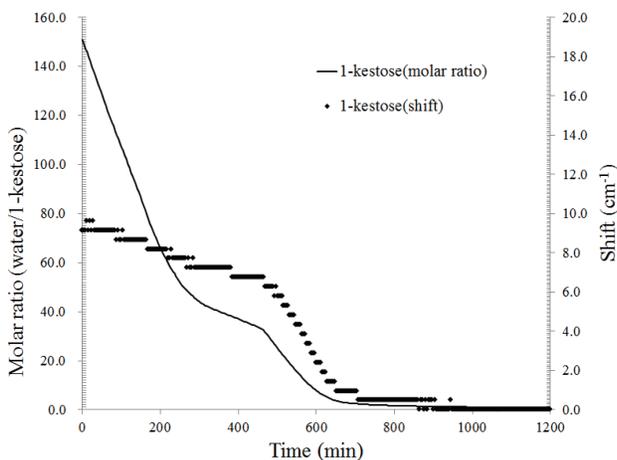


図6 1-ケストースの蒸発時間に対するモル比とシフト値の散布図

3. 結果と考察

前報^{3c)}の糖水溶液制限蒸発法に従い、濃度の異なる30種類の標準グルコース水溶液の中でモル比(水/グルコース)が最も大きい標準グルコース水溶液の蒸発過程を、4分間隔20時間のインターバルモードでFT-IRスペクトルを測定した。同時に試料室の温度と湿度を10分間隔で測定した。インターバル測定時の温度と湿度は、厳密に制御できなかったため、平均温度と平均湿度を算出し、蒸発過程の温度と湿度とした。蒸発過程の温度と湿度は、表3に示した。また、グルコース水溶液(glucose-1, glucose-2)の蒸発時間に対するモル比(水/glucose-1, 水/glucose-2)とエーテル結合の吸収ピーク(データ間隔 0.48 cm^{-1})のシフト値のグラフを図1に示した。シフト値は、インターバル測定中最も低波数に表れたピーク値を規準にして算出した。同様の方法で、フルクトース、マルトース、スクロース、トレハロース、1-ケストース水溶液(fructose, maltose, sucrose, trehalose-1, trehalose-2, 1-kestose)を測定した結果を図2-6に示した。

図1の 25°C でのグルコース水溶液(glucose-1)の蒸発過程のモル比(水/glucose-1)の変化のグラフから

段階1: 液体蒸発防止蓋内の空間の蒸気圧が糖水溶液と準平衡状態(セロハンリングを通してゆっくりと空気の入出が可能)になるまで自由水が蒸発している状態。

段階2: 自由水が蒸発した後、糖の水和殻を構成している水分子がゆっくりと蒸発している状態。

段階3: 水和殻を構成する必要最小限の水分子が蒸発して、水和殻が崩壊する。

の3段階で進行していることが分かる。これは、前報^{3c)}の $28\text{-}30^{\circ}\text{C}$ でのトレハロース及びスクロース水溶液の蒸発過程と一致していた。そして、段階2から段階3に移行するときのモル比(水/糖)とシフト値が一致するところが水和数である(以下「前法」という)。

同様に、 $24\text{-}25^{\circ}\text{C}$ でのフルクトース(fructose)(図2)、マルトース(maltose)(図3)、スクロース(sucrose)(図4)、トレハロース(trehalose-1)(図5)、1-ケストース(1-kestose)(図6)の蒸発過程のモル比(水/糖)も3段階で進行していた。

一方、 34°C でのグルコース水溶液(glucose-2)の

蒸発過程では、シフト値が段階 2 から段階 3 に移行するときの変化（減少）は観測できるが、モル比（水/glucose-2）は、段階 1 から段階 3 の間ほぼ直線的に減少し、段階 2 から段階 3 に移行するときの変化（減少）は観測できなかった（図 1）。同様に、34°Cでのトレハロース水溶液（trehalose-2）の蒸発過程もグルコース水溶液（glucose-2）と同じ傾向を示していた。

グルコース水溶液（glucose-2）もトレハロース水溶液（trehalose-2）も 34°Cでの蒸発過程のモル比（水/糖）は、直線的な減少のため、モル比（水/糖）とシフト値の関係から糖の水和数を読み取ることが困難であった。また、シフト値は、データ間隔が 0.48 cm^{-1} であるため、グラフのシフト値のみで水和数を読み取ることが難しかった。表 4 に、前法に従い図 1-6 の散布図のモル比（水/糖）とシフト値の時間変化から読み取った各糖（glucose-1, glucose-2, fructose, maltose, sucrose, trehalose-1, trehalose-2, 1-kestose）の水和数と水和シフト値（水和水がほぼなくなるまでの波数変化）を示した。ただし、34°Cでのグルコースとトレハロースの水和数と水和シフト値は読み取れなかった。

表 4 糖水溶液蒸発時の平均湿度、平均温度と前法での水和数と水和シフト値

糖	平均湿度 (%)	平均温度 (°C)	水和数	水和シフト値 (cm^{-1})	
グルコース	glucose-1	27	25	27	14
	glucose-2	37	34	-	-
フルクトース	fructose	27	25	24	13
マルトース	maltose	22	25	27	14
スクロース	sucrose	22	24	27	8
トレハロース	trehalose-1	23	24	27	8
	trehalose-2	29	34	-	-
1-kestose	1-kestose	18	25	33	7

通常、ATR 測定での濃度に対するエーテル結合ピークの変化は、溶媒効果^{4,5,6}、屈折率⁷、水和構造の変化などと密接に関係している。そこで、蒸発過程の時間情報を除いた、各糖水溶液のモル比（水/糖）に対するエーテル結合の吸収ピークのシフト値の変化から水和数と水和シフト値を求

める方法を検討した。図 7-12 に各糖水溶液（glucose-1, glucose-2, fructose, maltose, sucrose, trehalose-1, trehalose-2, 1-kestose）の散布図を示した。

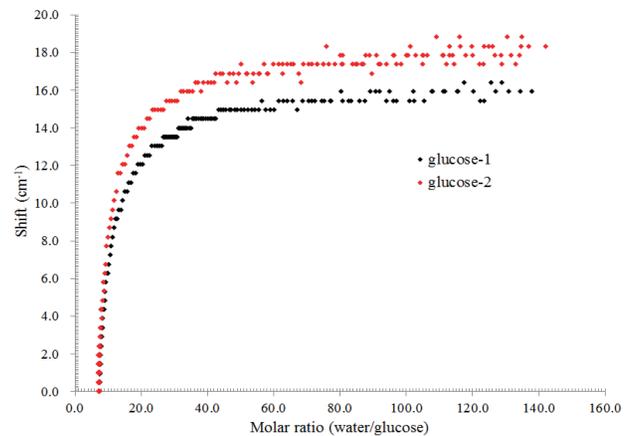


図 7 グルコースのモル比に対するシフト値の散布図

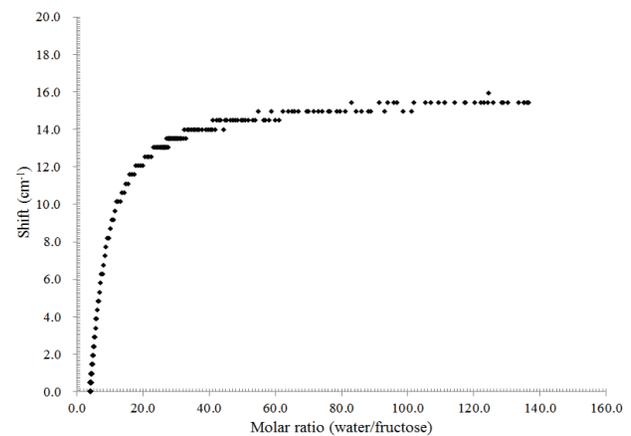


図 8 フルクトースのモル比に対するシフト値の散布図

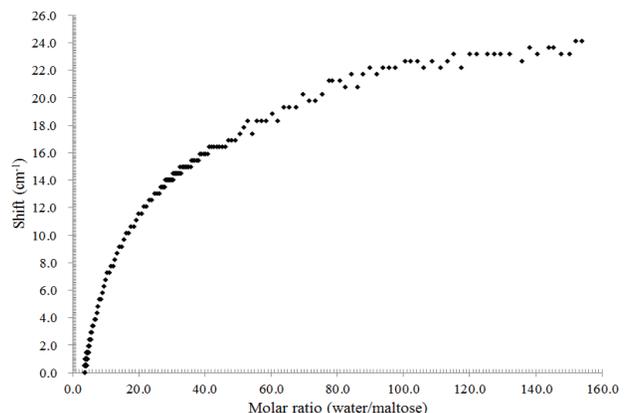


図 9 マルトースのモル比に対するシフト値の散布図

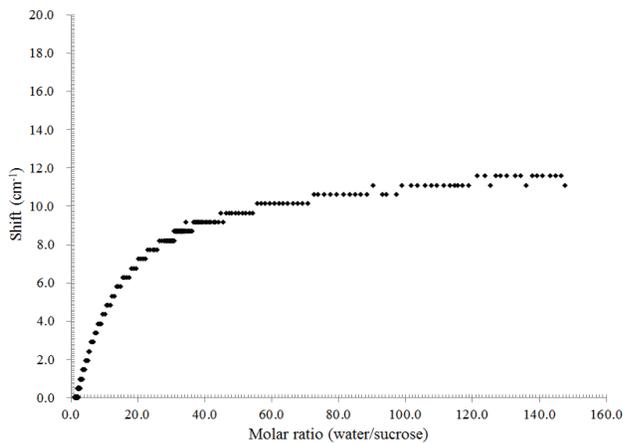


図10 スクロースのモル比に対するシフト値の散布図

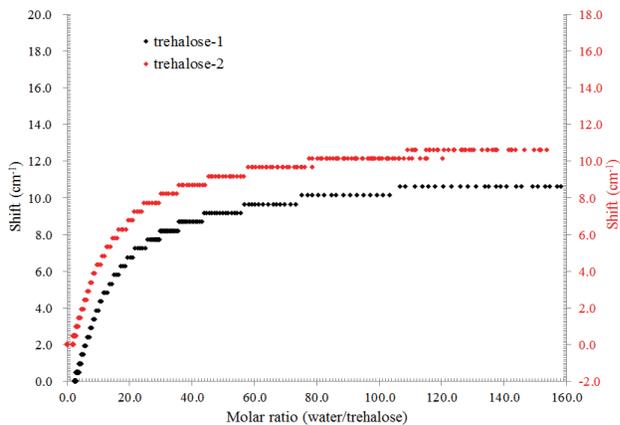


図11 トレハロースのモル比に対するシフト値の散布図

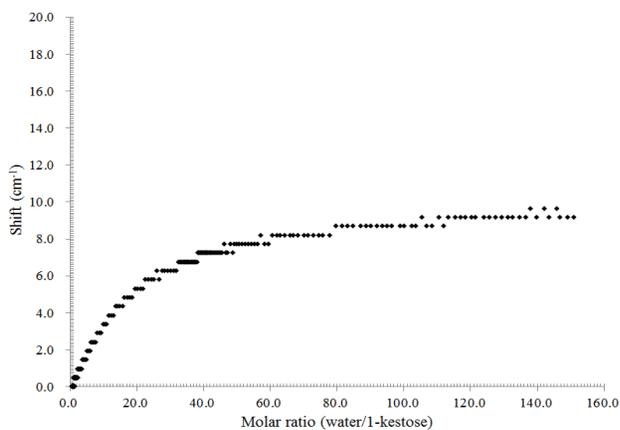


図12 1-ケストースのモル比に対するシフト値の散布図

全ての散布図(図7-12)には、モル比(水/糖)の減少と共にエーテル結合の吸収ピークのシフト値が急激に減少する(折れ曲り)位置が一ヶ所あ

る。そして、この折れ曲り位置が、糖水和構造が壊れる位置(水和数)と考え、この折れ曲り位置のモル比(水/糖)と水和シフト値を求めた。図1-6の各糖水溶液(glucose-1, glucose-2, fructose, maltose, sucrose, trehalose-1, trehalose-2, 1-kestose)の散布図の5点ずつの傾きを順次計算し(図13-20)、傾きが大きくなる最初の点(図13-20中の緑の矢印)を折れ曲がり位置とし、この位置のモル比(水/糖)を水和数、シフト値を水和シフト値として表5に示した。

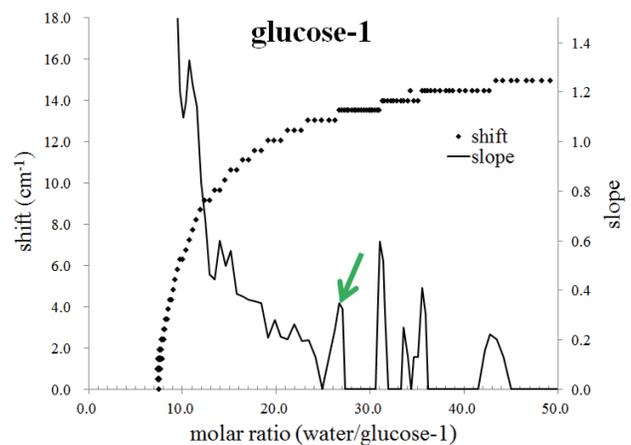


図13 モル比(水/glucose-1)に対するシフト値と傾きの散布図

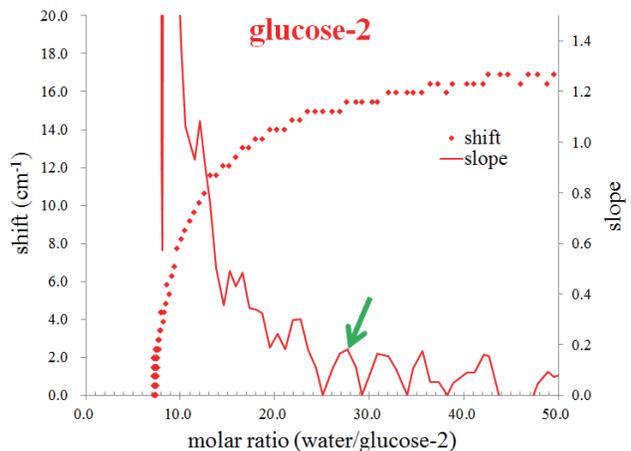


図14 モル比(水/glucose-2)に対するシフト値と傾きの散布図

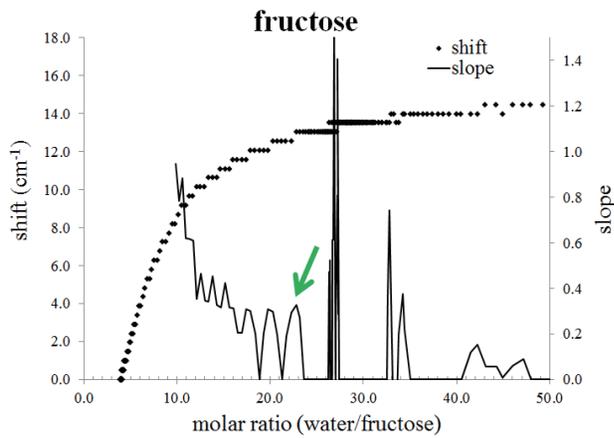


図 15 モル比 (水/fructose) に対するシフト値と傾きの散布図

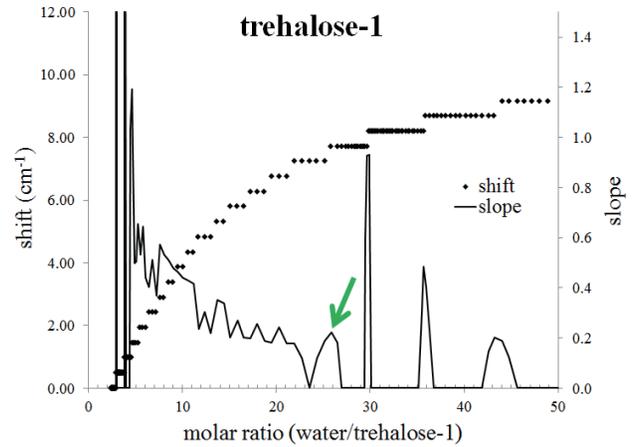


図 18 モル比 (水/trehalose-1) に対するシフト値と傾きの散布図

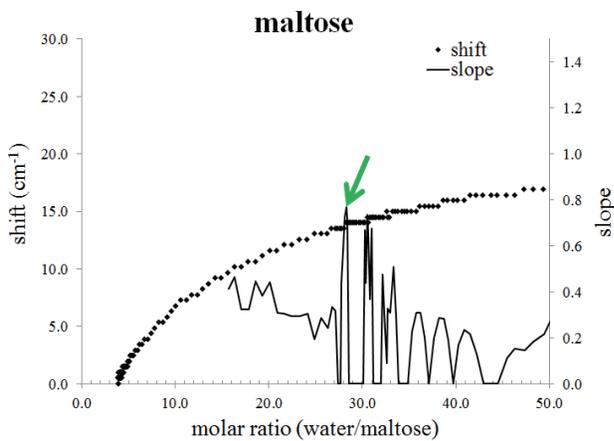


図 16 モル比 (水/maltose) に対するシフト値と傾きの散布図

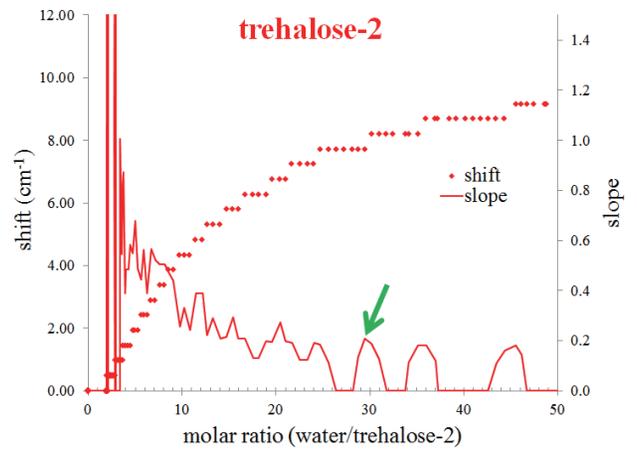


図 19 モル比 (水/trehalose-2) に対するシフト値と傾きの散布図

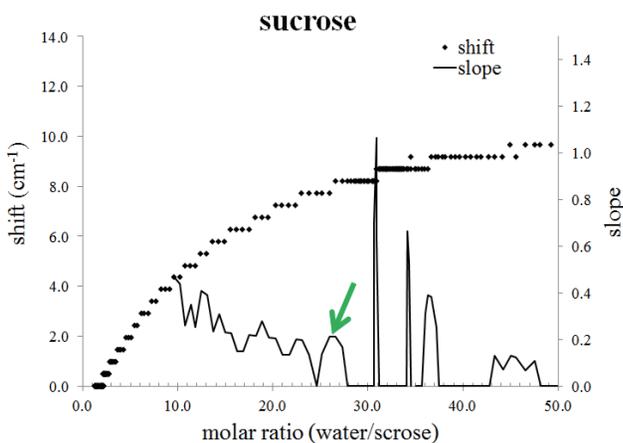


図 17 モル比 (水/sucrose) に対するシフト値と傾きの散布図

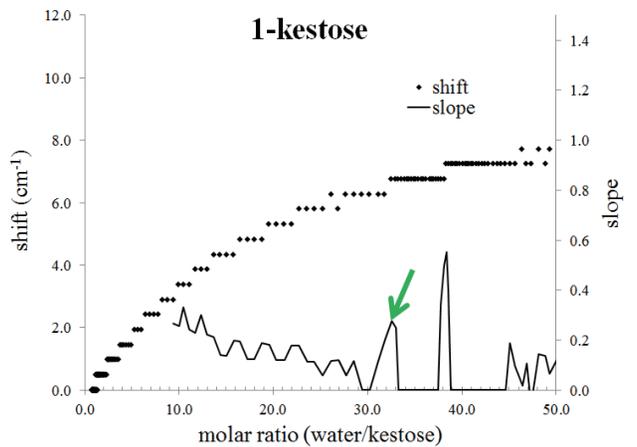


図 20 モル比 (水/1-kestose) に対するシフト値と傾きの散布図

表5 糖水溶液蒸発時の平均湿度、平均温度と本法での水和数と水和シフト値

糖	平均湿度 (%)	平均温度 (°C)	水和数	水和シフト値 (cm ⁻¹)	
グルコース	glucose-1	27	25	27	14
	glucose-2	37	34	28	15
フルクトース	fructose	27	25	23	13
マルトース	maltose	22	25	28	14
スクロース	sucrose	22	24	27	8
トレハロース	trehalose-1	23	24	26	8
	trehalose-2	29	34	29	8
1-kestose	1-kestose	18	25	33	7

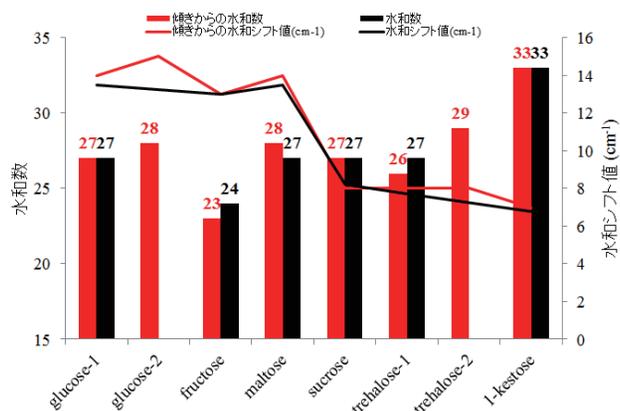


図21 水和数、水和シフト値の前法と本法の比較

前法での水和数と水和シフト値と折れ曲がり位置から求めた本方法の水和数と水和シフト値の比較を図21に示した。本方法で求めた24-25°Cの各糖水溶液 (glucose-1, fructose, maltose, sucrose, trehalose-1, 1-kestose) の水和数と水和シフト値は、前法で求めた水和数と水和シフト値に良く一致していた。また本方法は、前法で読み取れなかった34°Cでのグルコース (glucose-2) とトレハロース (glucose-2) の水和数と水和シフト値も求めることが可能であった。

文献

- 1) 第1回～第18回トレハロースシンポジウム記録集.
- 2) 石井郁子, 傘孝之, 日本歯科大学紀要, **36**, 33-37 (2007); **38**, 39-43 (2009); **39**, 37-41 (2010); **40**, 35-39 (2011); **41**, 31-36 (2012).
- 3) a: 石井郁子, 傘孝之, 日本歯科大学紀要, **42**, 11-16 (2013). b: 石井郁子, 傘孝之, 日本歯科大学紀要, **43**, 27-34 (2014). c: 石井郁子, 傘孝之, 日本歯科大学紀要, **44**, 31-36 (2015).
- 4) 狩野幹人, 中西健一, 橋本篤, 亀岡孝治, 日本食品科学工学会誌, **50**, 57-62 (2003).
- 5) Kanou M., Nakanishi K., Hashimoto A., and Kameoka T., Appl Spectrosc. **59**, 885-92(2005).
- 6) Kanou M., Hashimoto A., and Kameoka T.(2014). Infrared spectroscopic analysis of food carbohydrates. In F. J. Moreno & M. L. Sanz (Eds)Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity. Wiley-Blackwell, pp.300-319.
- 7) 落合周吉. “赤外分光測定法—基礎と最新手法第II部 各種測定法 11. 全反射吸収測定法”. 赤外分光測定法—基礎と最新手法. 田隅三生. 株式会社エス・ティ・ジャパン, 2012, p. 84-92.