

# $\alpha, \alpha$ -トレハロース水溶液の 蒸発過程の解析

## The analysis of the evaporation process of $\alpha, \alpha$ -trehalose aqueous solution

北里大学 石井 郁子  
生命歯学部 傘 孝之

Ikuko ISHII

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

and

Takayuki KARAKASA

*Department of Chemistry, School of Life Dentistry at Tokyo  
The Nippon Dental University,*

*Fujimi 1-9-20, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-8159, JAPAN*

(2014年2月12日受理)

### Abstract

The evaporation process of  $\alpha, \alpha$ -trehalose aqueous solution were investigated by FT-IR ATR spectroscopy. We have demonstrated that the hydration number (= 8) and the dynamic hydration number (= 47) measured by the relationship of the antisymmetric stretching of the glycosidic bond and the concentration of the water in trehalose aqueous solution.

Key words : Trehalose, hydration, dynamic, FT-IR, ATR, evaporation

$\alpha, \alpha$ -トレハロース(I) (以後：トレハロース) は、乾燥保護、デンプン老化抑制、タンパク質変性抑制などを示す高機能オリゴ糖であることが知られている。<sup>1)</sup> 著者等は、以前からこれらの機能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。

その中で、トレハロースは水溶液中では Fig. 2 (II) に示すようにトレハロースの C(6)-O-H と OH-C(2') および C(6)-O-H と OH-C(2) の部分にそれぞれ1分子の水を収容できるクレフト構造(II)を有していることをトレハロース水溶液の実測<sup>1</sup>H-NMR スペクトルと計算スペクトルの比較<sup>2)</sup>

及び mid-IR 領域 (900 ~ 1200 cm<sup>-1</sup>) の実測スペクトルと計算スペクトルの比較<sup>3)</sup>により明らかにした。

更に、室温下でトレハロース二水和物結晶をメタノールに加えると、トレハロース二水和物はメタノール中に完全に溶解し、数分後に無水トレハロース結晶を析出することを報告した<sup>4)</sup>。

これは、グリコシド結合に対して2つのグルコピラノースが非対称に結合したトレハロースが作る結晶格子の隙間に水二分子が入っている構造(III) (Fig. 2)<sup>5)</sup>から、グリコシド結合に対して2つのグルコピラノースが対称に結合した構造にでき

た隙間（クレフト）に水二分子が入った構造(II) (Fig. 2)<sup>2,3)</sup>に変化することでメタノールに溶解した後、クレフト中の水分子がメタノール中に放出されることにより、メタノールに難溶な無水トレハロースが析出するためと考えられる。

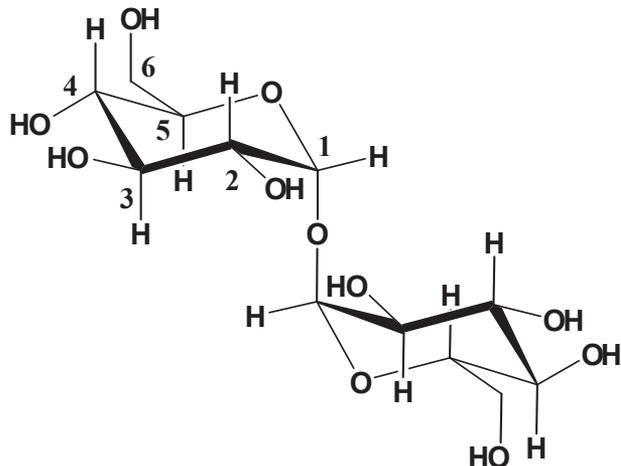


Fig. 1  $\alpha,\alpha$ -trehalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1,1)- $\alpha$ -D-glucopyranoside)(I)

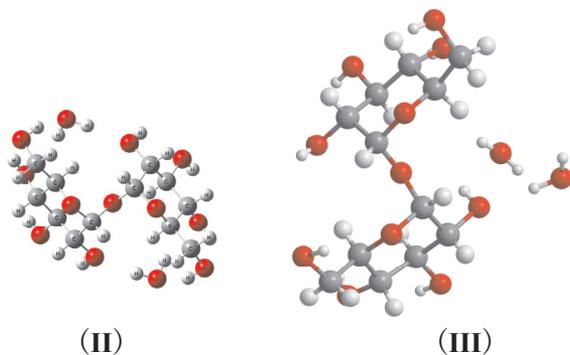


Fig. 2 Ball-stick representation of  $\alpha,\alpha$ -trehalose in aqueous solution (II) and  $\alpha,\alpha$ -trehalose dihydrate (III) crystal

前報<sup>4)</sup>では、小液滴 (10  $\mu$  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 スペクトルのインターバル測定と質量測定から明らかにした。

今回、トレハロース水溶液の乾燥過程でのモル比（水/トレハロース）の経時変化とその時のグリコシド結合の逆対称伸縮振動吸収ピークを FT-IR スペクトルから同時に測定し、このモル比とピーク位置との関係からトレハロースの水和構造について検討したので報告する。

## 実験

トレハロース二水和物は東京化成の特級試薬、グリセリンはナカライテスクの特級試薬、水は関東化学の HPLC 用蒸留水、重水はアクロスオーガニックの 99.95 atom % D を使用した。無水トレハロースは、トレハロース二水和物をメタノールで脱水して調製した<sup>4)</sup>。トレハロース 2D<sub>2</sub>O は、無水トレハロースをグリセリン：重水 = 1：2.8 の溶液の存在下デシケーター中で室温下 24 時間放置することにより調製した。

IR スペクトル測定には、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、分解能 2  $\text{cm}^{-1}$ 、積算回数 128 回で測定した。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。

### 1. 標準トレハロース水溶液の調製と検量線の作成

トレハロース二水和物と水から 6 種類のモル比（水/トレハロース）の標準トレハロース水溶液を調製した (Table 1)。

Table 1

mmol		Mol ratio
trehalose	H <sub>2</sub> O	(H <sub>2</sub> O/trehalose)
1.865	116.969	62.7
2.006	117.095	58.4
2.246	116.098	51.7
2.450	116.267	47.5
2.789	117.666	42.2
3.184	118.285	37.1

作成した 6 種類のモル比の標準トレハロース水溶液とトレハロース二水和物、無水トレハロースの FT-IR スペクトルを ATR 法で測定した。得られたスペクトルはデコンボリューション（半値幅 180）処理後ベースライン補正（直線）を行い、O-H 吸収帯(P1)と C-H 吸収帯(P2)の面積比を算出した (Table 2)。この面積比(P1/P2)とモル比（水/トレハロース）の間には  $y = 0.7816x - 6.9668$  の回帰式が成立した(Fig. 3)。

Table 2

mol ratio	Range(cm <sup>-1</sup> )			Area	Ratio (P1/P2)
	P1	P2			
62.7	P1	3689	2983	115.34	91.25
	P2	2890	2983	1.26	
58.4	P1	3689	2983	114.38	84.50
	P2	2890	2983	1.35	
51.7	P1	3689	2983	114.73	72.26
	P2	2890	2983	1.59	
47.5	P1	3689	2983	114.32	68.64
	P2	2890	2983	1.67	
42.2	P1	3689	2983	115.15	63.29
	P2	2890	2983	1.82	
37.1	P1	3689	2983	114.24	55.88
	P2	2890	2983	2.04	
2	P1	3542	2986	19.63	11.13
	P2	2834	2989	1.76	
0	P1	3545	2988	16.65	10.23
	P2	2842	2985	1.63	

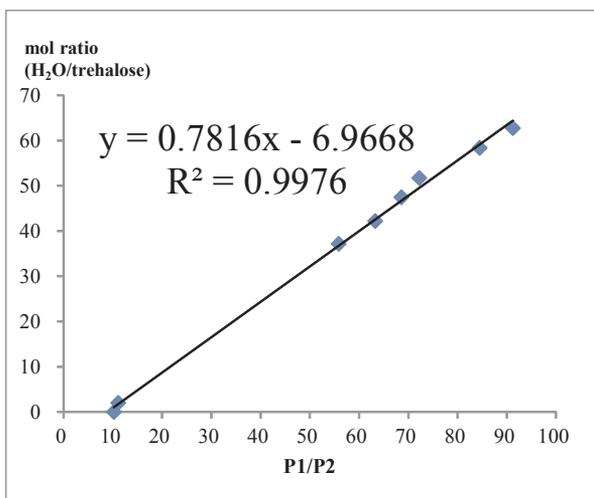


Fig. 3

## 2. 標準トレハロース重水溶液の調製と検量線の作成

トレハロース二水和物と重水から 6 種類のモル比 (重水/トレハロース) の標準トレハロース重水溶液を調製した (Table 3)。

作成した 6 種類のモル比の標準トレハロース重水溶液とトレハロース 2D<sub>2</sub>O, 無水トレハロースの FT-IR スペクトルを ATR 法で測定した。得られたスペクトルはデコンボリューション (半値幅 180) 処理後ベースライン補正 (直線) を行い, O-D 吸収帯 (P1) と C-H 吸収帯 (P2) の面積比を算出した (Table 4)。この面積比 (P1/P2) とモル比 (重水/トレハロース) の間には  $y = 1.087 x$  の回帰式が

成立した (Fig. 4)。

Table 3

mmol trehalose	D <sub>2</sub> O	Mol ratio
		(D <sub>2</sub> O/trehalose)
0.4993	32.1736	64.4
0.5448	32.8495	60.3
0.5992	32.6984	54.6
0.6767	32.9033	48.6
0.7509	33.0219	44.0
0.8588	32.9675	38.4
1.8650	116.969	62.7

Table 4

mol ratio	Range(cm <sup>-1</sup> )		Area	Ratio (P1/P2)	
	P1	P2			
64.4	P1	2155	2737	87.39	60.62
	P2	2991	2855	1.44	
60.3	P1	2139	2737	80.74	53.56
	P2	2988	2848	1.51	
54.6	P1	2155	2737	82.75	49.37
	P2	2990	2850	1.68	
48.6	P1	2162	2735	82.19	44.08
	P2	2991	2844	1.86	
44.0	P1	2178	2736	80.83	41.56
	P2	2988	2840	1.94	
38.4	P1	2144	2735	80.52	36.05
	P2	2990	2844	2.23	
2	P1	2158	2632	20.86	11.13
	P2	2986	2844	3.86	
0	P1				0.00
	P2				

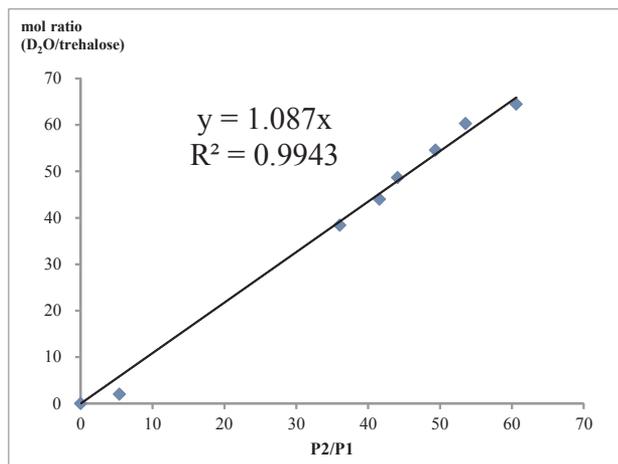


Fig. 4

## FT-IRインターバル測定

## 3. トレハロース水溶液の蒸発とその後の重水雰囲気下での変化

モル比 (水/トレハロース) 62.7 のトレハロース水溶液をダイヤモンドプリズム上に  $5 \mu\text{L}$  置き, シリカゲル乾燥下, 室温 10 分間隔で 3 時間インターバル測定を行った. 各経過時間でのモル比 (水/トレハロース) は, スペクトルをデコンボリューション (半値幅 180) 処理後ベースライン補正(直線)を行い, O-H 吸収帯(P1)と C-H 吸収帯(P2)の面積比 (x) から  $y = 0.7816 x - 6.9668$  により求めた(Table 5).

Table 5

Time [min]	Range( $\text{cm}^{-1}$ )	Area	Ratio (P1/P2)	mol ratio
0	P1	2985 3692 116.73	81.7	56.9
	P2	2891 2985 1.43		
10	P1	2985 3693 118.47	37.3	22.2
	P2	2887 2985 3.18		
20	P1	2985 3692 120.56	24.4	12.1
	P2	2885 2985 4.95		
30	P1	2985 3691 120.11	21.2	9.6
	P2	2882 2985 5.67		
40	P1	2984 3691 121.56	19.5	8.3
	P2	2881 2984 6.22		
50	P1	2986 3690 121.08	18.1	7.2
	P2	2881 2986 6.69		
60	P1	2983 3692 122.64	17.7	6.9
	P2	2880 2983 6.91		
70	P1	2985 3692 122.19	17.4	6.6
	P2	2880 2985 7.03		
80	P1	2985 3692 123.18	16.9	6.2
	P2	2877 2985 7.29		
90	P1	2983 3692 123.36	16.2	5.7
	P2	2874 2983 7.59		
100	P1	2983 3691 123.54	16.1	5.6
	P2	2875 2983 7.67		
110	P1	2984 3692 123.72	16.1	5.6
	P2	2877 2984 7.69		
120	P1	2982 3690 124.33	16.0	5.6
	P2	2878 2982 7.75		
130	P1	2982 3692 124.18	15.6	5.2
	P2	2873 2982 7.98		
140	P1	2983 3690 123.83	15.4	5.1
	P2	2873 2983 8.05		
150	P1	2983 3690 124.86	15.3	5.0
	P2	2874 2983 8.14		
160	P1	2983 3689 124.73	15.2	4.9
	P2	2874 2983 8.19		
170	P1	2982 3690 125.28	15.0	4.8
	P2	2869 2982 8.34		
180	P1	2983 3689 125.04	15.3	5.0
	P2	2874 2983 8.17		

次に 3 時間インターバル測定を行った試料とグリセリンと重水のモル比 (グリセリン:重水 = 1:2.8) の溶液  $50 \mu\text{L}$  入れた容器を共に容量 4.3 mL の蓋で密閉し, 室温下 80 分間隔で 4 時間イン

ターバル測定を行った.

各時間の (水/トレハロース) のモル比は, スペクトルをデコンボリューション (半値幅 180) 処理後ベースライン補正(直線)を行い O-H 吸収帯 (P1)と C-H 吸収帯(P2)の面積比 (x) から  $y = 0.7816 x - 6.9668$  により (Table 6), (重水/トレハロース) のモル比は, O-D 吸収帯(P1)と C-H 吸収帯(P2)の面積比 (x) から  $y = 1.087 x$  によりそれぞれ求めた (Table 7).

Table 6

Time [min]	Range( $\text{cm}^{-1}$ )	Area	Ratio (P1/P2)	mol ratio
0	P1	2983 3697 126.38	15.4	5.1
	P2	2874 2983 8.18		
80	P1	2982 3697 126.12	15.3	5.0
	P2	2877 2982 8.23		
160	P1	2983 3697 120.47	14.2	4.1
	P2	2871 2983 8.51		
240	P1	3700 2985 113.46	11.1	1.7
	P2	2832 2985 10.21		

Table 7

Time [min]	Range( $\text{cm}^{-1}$ )	Area	Ratio (P1/P2)	mol ratio
0	P1	2259 2619 2.39	0.3	0.3
	P2	2875 2983 8.19		
80	P1	2259 2623 3.34	0.4	0.4
	P2	2877 2983 8.22		
160	P1	2274 2630 10.55	1.2	1.3
	P2	2871 2982 8.50		
240	P1	2265 2635 15.77	1.5	1.7
	P2	2831 2985 10.20		

## 4. トレハロース重水溶液の蒸発

モル比 (重水/トレハロース) 64.4 のトレハロース重水溶液をダイヤモンドプリズム上に  $5 \mu\text{L}$  置き, シリカゲル乾燥下, 室温 10 分間隔で 3 時間インターバル測定を行った. 各経過時間でのモル比 (重水/トレハロース) は, スペクトルをデコンボリューション (半値幅 180) 処理後ベースライン補正(直線)を行い O-D 吸収帯(P1)と C-H 吸収帯(P2)の面積比 (x) から  $y = 1.087 x$  により求めた (Table 8).

Table 8

Time [min]		Range(cm <sup>-1</sup> )	Area	Ratio (P1/P2)	mol ratio
0	P1	2168	2735	84.71	52.8
	P2	2848	2992	1.60	
10	P1	2175	2733	73.83	24.7
	P2	2848	2990	2.99	
20	P1	2182	2727	61.52	12.3
	P2	2847	2990	5.01	
30	P1	2178	2723	57.51	9.6
	P2	2847	2987	5.97	
40	P1	2162	2723	57.37	8.5
	P2	2843	2986	6.73	
50	P1	2180	2724	55.09	7.7
	P2	2841	2985	7.18	
60	P1	2172	2720	53.99	7.3
	P2	2846	2988	7.44	
70	P1	2176	2720	54.07	7.0
	P2	2841	2988	7.71	
80	P1	2176	2723	54.60	7.0
	P2	2847	2985	7.85	
90	P1	2172	2720	53.73	6.7
	P2	2844	2985	8.02	
100	P1	2172	2718	51.84	6.3
	P2	2842	2986	8.21	
110	P1	2174	2722	53.17	6.4
	P2	2842	2985	8.24	
120	P1	2168	2719	53.64	6.4
	P2	2842	2985	8.32	
130	P1	2173	2721	53.85	6.5
	P2	2848	2986	8.25	
140	P1	2167	2718	53.62	6.4
	P2	2842	2986	8.39	
150	P1	2172	2718	51.78	6.0
	P2	2844	2986	8.57	
160	P1	2165	2718	52.48	6.1
	P2	2844	2986	8.54	
170	P1	2172	2718	51.88	6.0
	P2	2842	2986	8.72	
180	P1	2170	2718	51.60	6.0
	P2	2846	2986	8.66	

結果と考察

前報<sup>5)</sup>で、トレハロース水溶液を自然蒸発させると 992 cm<sup>-1</sup> に現れるグリコシド結合の逆対称伸縮振動の吸収が低波数シフトすることを報告した。

今回、この低波数シフトがトレハロースの水和と密接に関係しているのではないかと考えた。そこで、まずトレハロースの濃度 [モル比 (水/トレハロース)] とグリコシド結合の逆対称伸縮振動の吸収ピークの同時測定を行った。

モル比 (水/トレハロース) 62.7 のトレハロース水溶液をシリカゲル乾燥下、室温 10 分間隔で 3 時間インターバル測定を行った時のモル比 (水/トレハロース) とグリコシド結合の逆対称伸縮振動の吸収位置の変化を FT-IR ATR 法で測定し、その結果を Table 9 と Fig. 5 に示した。Fig. 5 中に示した白抜き黒矢印は、飽和トレハロース水溶液

のモル比 (水/トレハロース) 27.6 を示している。Table 9 のデータでは、0 分から 50 分の間にトレハロース 1 分子あたりの水分子が 57 個から 7 個へと 50 個減少している間に、グリコシド結合の逆対称伸縮振動の吸収は 7 cm<sup>-1</sup> 低波数側にシフトしている。

Table 9

Time [min]	Antisymmetric stretching of the glycosidic bond (cm <sup>-1</sup> )	mol ratio
0	992	57
10	989	22
20	987	12
30	986	10
40	985	8
50	985	7
60	985	7
70	985	7
80	984	6
90	984	6
100	984	6
110	984	6
120	984	5
130	984	5
140	984	5
150	984	5
160	984	5
170	984	5
180	984	5

他方、50 分～180 分の 130 分間に水分子が、7 個から 5 個へと 2 個減少している間に、グリコシド結合の逆対称伸縮振動の吸収は 1 cm<sup>-1</sup> 低波数シフトしている。次に、モル比 (水/トレハロース) と逆対称伸縮振動の吸収位置との関係を Table 10 と Fig. 6 に示した。

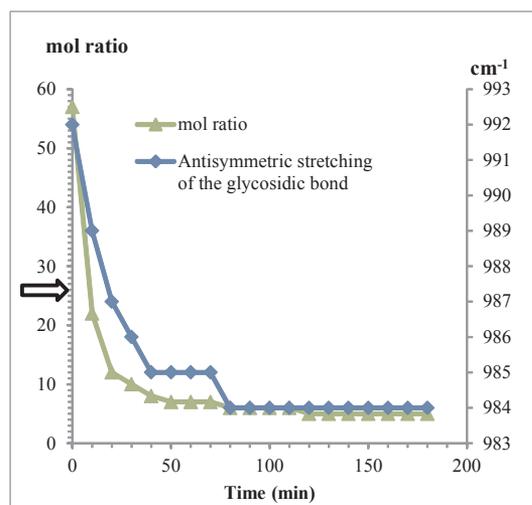


Fig. 5

Table 10

mol ratio (H <sub>2</sub> O/trehalose)	cm <sup>-1</sup>
63	992
58	992
57	992
52	992
47	992
42	991
37	991
22	989
12	987
10	986
8	985
7	985
6	984
5	984

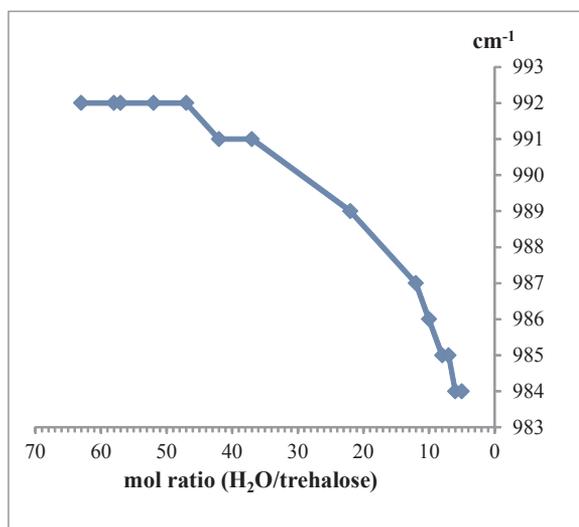


Fig. 6

Fig. 6 から、グリコシド結合の低波数シフトがモル比 (水/トレハロース) 47 を境にして始まるのがわかる。このモル比 (水/トレハロース) 47 は、トレハロースを構造的・動的に強く拘束している水分子数であることは、この水分子数が少なくなるとグリコシド結合の逆対称伸縮振動が低波数シフト (トレハロース分子の拘束が弱まる) することから明らかである。言い換えると、この 47 の値は、動的水和数を示しており、この値は文献値<sup>9)</sup>と良い一致を示していた。

Table 9 から 40 分～180 分の 140 分間では、モ

ル比 (水/トレハロース) が 8 から 5 の変化に対して、グリコシド結合の逆対称伸縮振動の低波数シフトは、1 cm<sup>-1</sup> であることがわかる。これは、トレハロース分子を拘束していた水分子が消失したことを示している。そして、残りの水分子は、トレハロース分子を強く拘束しない水和分子であり、モル比 (水/トレハロース) 8 がトレハロース分子の水和数であると考えられる。この値は、文献記載<sup>9)</sup>のトレハロースの水和数と良い一致を示している。

そこで、この状態の水和水が結晶水のように構造の中に束縛されている水分子なのか、あるいは、水溶液中の様に自由に動き回っている水分子なのかを知るために、この 3 時間蒸発させたトレハロースを水換算で相対湿度約 70 % となるモル比 (グリセリン: 重水 = 1 : 2.8) のグリセリン重水混合溶液存在下に置き、引き続き、室温下 80 分間隔で 3 時間インターバル測定をした。このときのスペクトルを Fig. 7 に示した。Fig. 7 に示されたように 0 分 (黒線)、80 分 (緑線)、160 分 (青線)、240 分 (赤線) と時間が経過すると 2500 cm<sup>-1</sup> 付近の水の吸収強度が増加しているのが分かる。

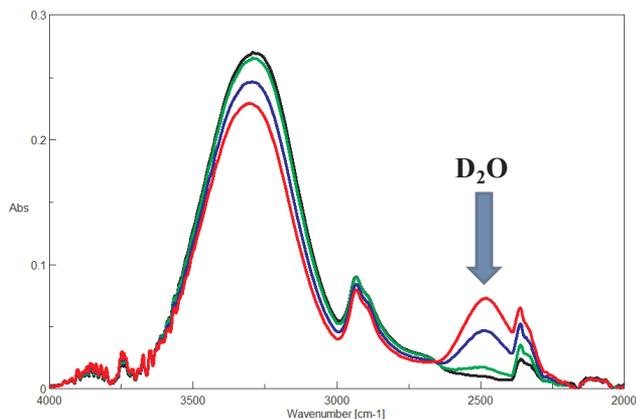


Fig. 7 ATR-IR spectra of  $\alpha,\alpha$ -trehalose D<sub>2</sub>O solution at intervals of 80 min. (black line: 0 min., green line: 80 min., blue line: 160 min., red line: 240 min.)

また、Table 6 と Table 7 から、180 分までは水と重水の総和は 5.4 と一定であるが、時間の経過と共にトレハロースに対する水の量は減少し、反対に重水の量は増加している。そして、240 分では水と重水の総和が 3.4 と減少しているなかで、トレハロースに対する水の量は減少し、反対に重水の量は増加している。これは、蒸発した水の代わりに重水が入っていくのではなく水分子と重水分

子の交換が行われていることを示している。従って、トレハロースに含まれる水分子が、結晶水というより溶媒としての水分子に近い性質を有しているためであると推定できる。

次に、トレハロース重水溶液についての水和構造を検討した。モル比（重水/トレハロース）64.4のトレハロース重水溶液をシリカゲル乾燥下、室温10分間隔で3時間インターバル測定を行った時のモル比（重水/トレハロース）とグリコシド結合の逆対称伸縮振動の吸収位置の変化をFT-IR ATR法で測定し、その結果をTable 11とFig. 8に示した。Table 11のデータでは、0分から30分の間にトレハロース1分子あたりの水分子が57個から10個に急激に失われているのに対して30分～180分の150分間には5個しか変化していない。同時に、0分から30分の間では、グリコシド結合の逆対称伸縮振動の吸収は4 cm<sup>-1</sup>低波数シフトしているのに対して、30分から180分の150分間では、2 cm<sup>-1</sup>低波数シフトしている。次に、トレハロース水溶液の場合と同様に、モル比（重水/トレハロース）と逆対称伸縮振動の吸収位置との関係をTable 12とFig. 9にした。

このTable 12とFig. 9から、動的水和数が38、水和数は8であることがわかった。

以上、トレハロースの動的水和数と水和数は、トレハロース水溶液の蒸発過程をトレハロース：水のモル比と逆対称伸縮振動（グリコシド結合）の吸収位置のシフト値の関係から測定できることが分かった。また重水の場合も同様の測定から動的水和数と水和数を測定できることがわかった。

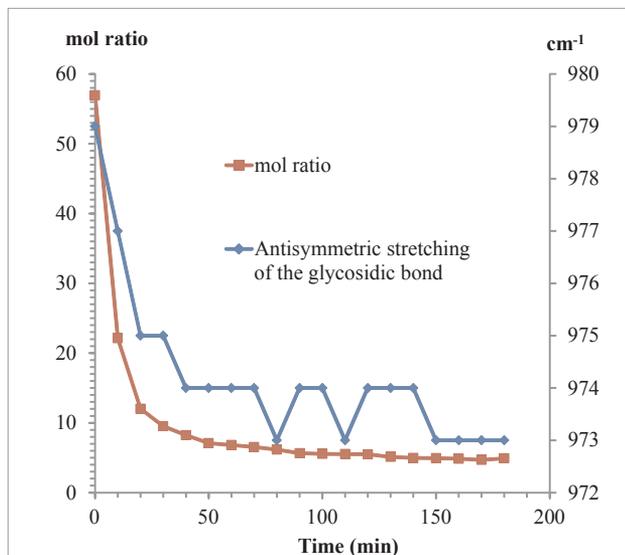


Fig. 8

Table 11

Time [min]	Antisymmetric stretching of the glycosidic bond (cm <sup>-1</sup> )	mol ratio
0	979	57
10	977	22
20	975	12
30	975	10
40	974	8
50	974	7
60	974	7
70	974	7
80	973	6
90	974	6
100	974	6
110	973	6
120	974	5
130	974	5
140	974	5
150	973	5
160	973	5
170	973	5
180	973	5

Table 12

mol ratio (D <sub>2</sub> O/trehalose)	cm <sup>-1</sup>
64	982
60	980
57	979
55	981
49	980
44	980
38	980
22	977
12	975
10	975
8	974
7	974
6	974
5	973

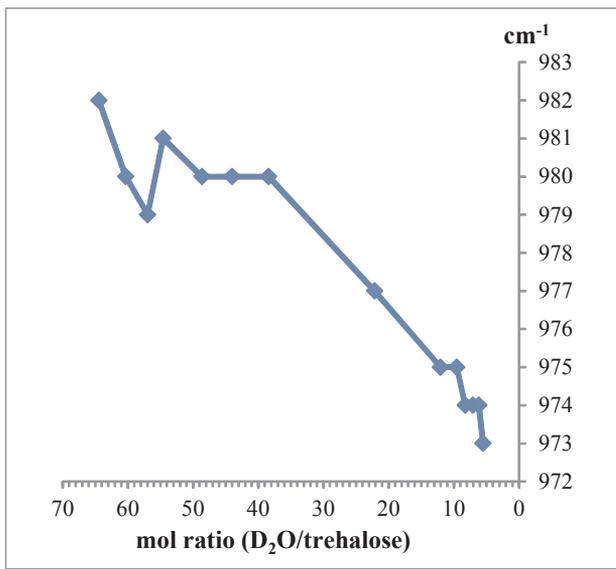


Fig. 9

## 文献

1. 第1回～第12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)
3. 石井郁子, 傘 孝之, 日本歯科大学紀要, **38**, 39-43 (2009)
4. 石井郁子, 傘 孝之, 日本歯科大学紀要, **42**, 11-16 (2013)
5. T. Taga, M. Senma and K. Osaki, *Acta Crystallogr., Sect. B : Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, **28**, 3258 (1972)
6. 櫻井実, トレハロースシンポジウム記録集, **1**, 31-43 (1997); 櫻井実, トレハロースシンポジウム記録集, **15**, 1-10 (2011)に記載されている値; 動的水和数( $N_{DHN}$ ) 48.3、水和数; 粘度測定 8.0、DSC(示差走査熱量)測定 8.0、QENS(中性子準弾性散乱)測定 9.0