

α, α -トレハロース水溶液の自然乾燥による アモルファストレハロース二水和物

Amorphous α, α -trehalose dihydrate by air drying of the 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

(2013年2月5日受理)

Abstract

The behaviour of air drying of α, α -trehalose aqueous solution were investigated by FT-IR ATR spectroscopy. We have demonstrated that amorphous α, α -trehalose dihydrate were generated by air-drying of microliter scale (5 and 10 μ L) of the aqueous solution.

Key words : Trehalose, amorphous, FT-IR, ATR, air drying

α, α -トレハロース(I)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。¹⁾そこで、このような機能が α, α -トレハロースのどのような構造的特徴により生み出されるのかに興味を持った。

α, α -トレハロースは、水溶液中では2つのグルコピラノース環がグリコシド結合に対して対称な構造を保っていることは¹H-NMR スペクトル²⁾の測定から明らかになっている。我々は、更に詳細な水溶液中の α, α -トレハロースの立体構造を知るために¹H-NMR スペクトルおよびIR スペクトルを使った構造解析を行った。^{3,4)}

特に、 α, α -トレハロースは水溶液中で Fig. 2 に示すように水 2 分子を α, α -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)で挟み込む構造(II)のまま、水溶液中に溶解していることを α, α -トレハロース水溶液の実測¹H-NMR スペクトルと計算スペクトルの比較³⁾ 及び mid-IR 領域 (900 ~ 1200 cm^{-1}) の実測スペクトルと計算スペクトルの比較⁴⁾により明らかにした。

今回、 α, α -トレハロースの乾燥保護の機能に注目し、 α, α -トレハロース水溶液から自然乾燥により水が失われる過程をIR スペクトルのインターバル測定を行い、 α, α -トレハロースがどのような状態変化をするか検討した。

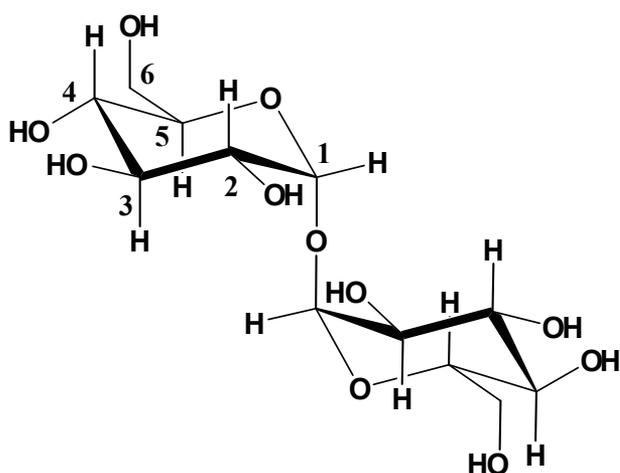


Fig. 1 α,α -trehalose (α -D-glucopyranosyl-(1,1)- α -D-glucopyranoside)(I)

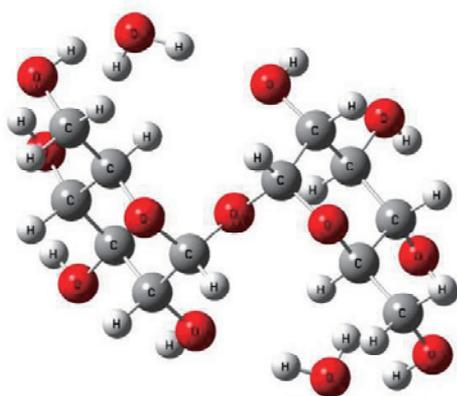


Fig. 2 Ball-stick representation of α,α -trehalose in aqueous solution (II)

実験

α,α -トレハロース二水和物は東京化成の特級試薬，水は関東化学の HPLC 用蒸留水を用いた。バランストレイは，アズワン販売のバランストレイ 10 μ L 非帯電を用いた。

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， α,α -トレハロース水溶液をダイヤモンドプリズム上に置き，分解能 2 cm^{-1} ，積算回数 64 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。

α,α -トレハロース水溶液 A :

α,α -トレハロース二水和物 (MW=378.33) と水

(MW=18) のモル比 1 : 5.6 の水溶液を調製し α,α -トレハロース水溶液 A とした。

α,α -トレハロース水溶液 A の自然乾燥 :

FT-IR 測定

α,α -トレハロース水溶液 A をバランストレイ中に 5 μ L ずつ 6 カ所に置き，自然乾燥 (24 $^{\circ}\text{C}$ ，相対湿度 31%) で 3 時間放置後，そのうちの 3 個の試料 (sample 1-3) の IR スペクトルを，25.5 時間後に残りの 3 個 (sample 4-6) の IR スペクトルを測定した。同様の条件下， α,α -トレハロース水溶液 A をバランストレイ中に 10 μ L ずつ 6 カ所に置き，3 時間放置後，そのうちの 3 個の試料 (sample 7-9) の IR スペクトルを，28 時間後に残りの 3 個 (sample 10-12) の IR スペクトルを測定した。

FT-IR インターバル測定

α,α -トレハロース二水和物が析出した場合 :

α,α -トレハロース水溶液 A をダイヤモンドプリズム上に 10 μ L 置き，24 $^{\circ}\text{C}$ ，相対湿度 31% で自然乾燥させながら 15 分間隔で 10 時間インターバル測定を行った。

α,α -トレハロース二水和物が析出しない場合 :

α,α -トレハロース水溶液 A をダイヤモンドプリズム上に 10 μ L 置き，24 $^{\circ}\text{C}$ ，相対湿度 31% で自然乾燥させながら 5 分間隔で 3 時間インターバル測定を行った。

質量測定

α,α -トレハロース水溶液 A をバランストレイに 10.41 mg 秤量し，25 $^{\circ}\text{C}$ ，相対湿度 24% で自然乾燥させながら，10 分間隔で 110 分間，最後に 1020 分後に質量を測定した。1020 分経過時に試料部分のバランストレイを切り取り ATR プリズム上に圧着し IR スペクトルを測定した。更に ATR プリズム上に 35 分間圧着し続けた後，IR スペクトルを測定した。

結果と考察

α,α -トレハロース水溶液が自然乾燥する過程を FT-IR スペクトルから検討した。

まず，ATR プリズム上に α,α -トレハロース水溶液 A を 10 μ L 置き，自然乾燥下，15 分間隔で 10 時間測定したスペクトルのうち 0 分から 105 分の指紋領域 (900-1200 cm^{-1}) の IR スペクトルを Fig. 3 に示した。

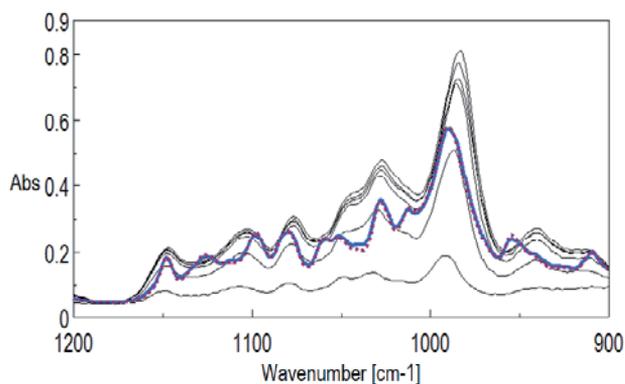


Fig. 3 ATR-IR spectra of α, α -trehalose aqueous solution in the mid-IR region at intervals of 15 min.

Fig. 3 に示されたスペクトルから、青太線で示された 90 分経過後と茶太点線で示された 105 分経過後のスペクトルは、0, 15, 30, 45, 60, 75 分の各黒細線のスペクトルとは、異なっていることが分かる。90 分と 105 分のスペクトルは、トレハロース二水和物結晶標準品スペクトルとの比較からトレハロース二水和物であると同定した。結果として、ATR プリズム上で α, α -トレハロース水溶液 A が自然乾燥することで、トレハロース二水和物が析出したと考えられる。

詳しい蒸発過程を検討するために、(1,1)- α -グリコシド結合に由来する 990 cm^{-1} 付近に観測される逆対称伸縮振動と 950 cm^{-1} 付近に観測される対称伸縮振動の 2 つのピーク⁵⁾に注目し、この 2 つの伸縮モードが自然乾燥過程でどのように変化したかを検討した。

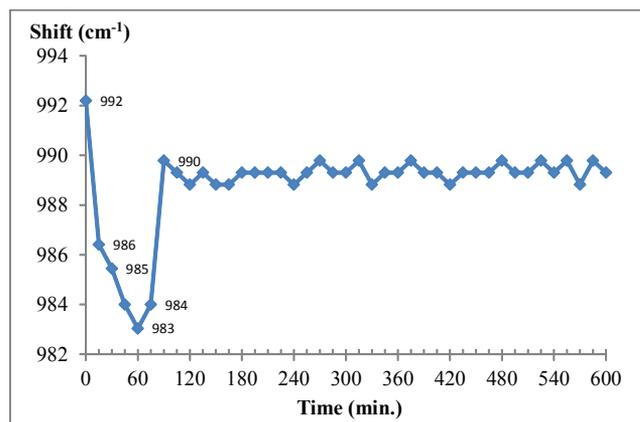


Fig. 4 Antisymmetric stretching of the α -(1,1)-glycosidic bond at intervals of 15 min.

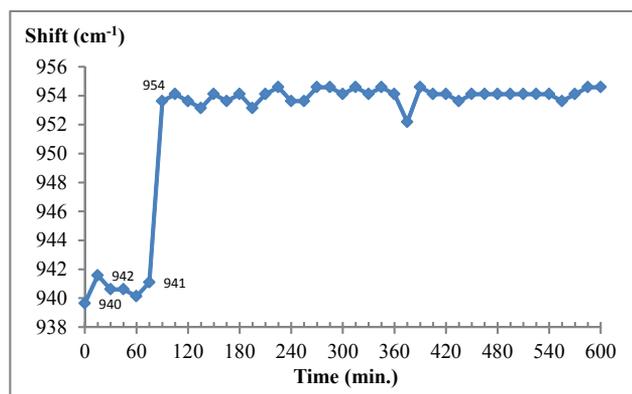


Fig. 5 Symmetric stretching of the α -(1,1)-glycosidic bond at intervals of 15 min.

逆対称伸縮振動の結果を Fig. 4 に、対称伸縮振動の結果を Fig. 5 に示した。Fig. 4 から逆対称伸縮振動は、0 分では 992 cm^{-1} に観測され、徐々に水が蒸発することにより 60 分後には 983 cm^{-1} まで低波数側にシフトしている。そして、90 分後にトレハロース二水和物が生成すると高波数側 990 cm^{-1} (トレハロース二水和物のグリコシド結合の特性吸収⁵⁾) にシフトしている。また、Fig. 5 から対称伸縮振動は、0 から 75 分までは、 940 cm^{-1} 付近に観測されているが、トレハロース二水和物が生成すると高波数側 954 cm^{-1} (トレハロース二水和物の特性吸収⁵⁾) にシフトしている。まとめると、トレハロース水溶液の濃度が上昇してもグリコシド結合の対称伸縮振動は変化しないのに対して、逆対称伸縮振動は 9 cm^{-1} 低波数側にシフトする。

そこで、この低波数側にシフトする現象を詳細に観察するため、 α, α -トレハロース水溶液の自然乾燥過程を 5 分間隔で 3 時間インターバル測定を行った。指紋領域 ($900\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$) の IR スペクトルを Fig. 6 に示した。

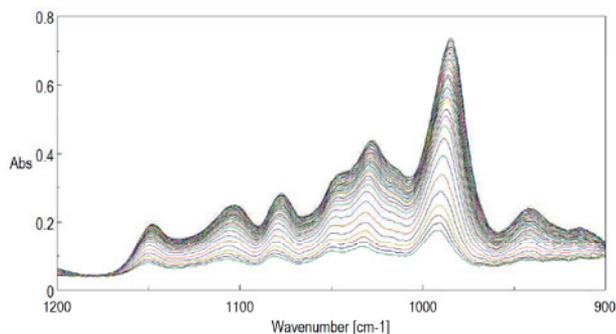


Fig. 6 ATR-IR spectra of α, α -trehalose aqueous solution in the mid-IR region at intervals of 10 min.

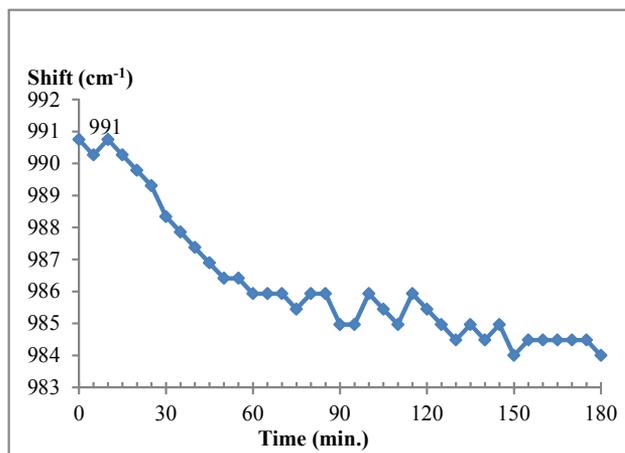


Fig. 7 Antisymmetric stretching of the α -(1,1)-glycosidic bond at intervals of 10 min.

Fig. 7 に逆対称伸縮振動の波数の時間変化, Fig. 8 に対称伸縮振動の波数の時間変化を示した。Fig. 6, 7, 8 から明らかなように, 5 分間隔, 3 時間インターバル測定では, トレハロース二水和物が生成していなかった。

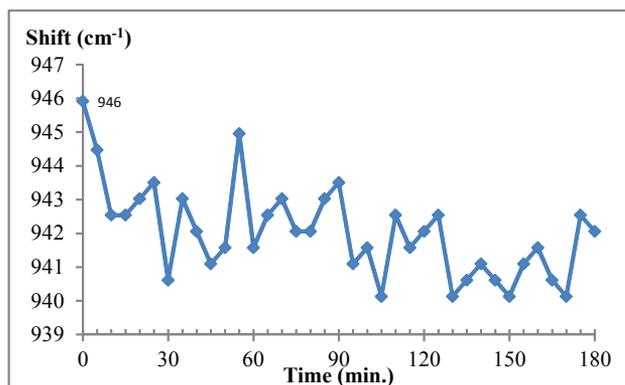


Fig. 8 Symmetric stretching of the α -(1,1)-glycosidic bond at intervals of 10 min.

トレハロースの過飽和溶液は, 室温下ではきわめて不安定で容易にトレハロース含水結晶の析出を起こす⁶⁾ことが知られている。

そこで, 複数個のサンプルを同じ条件下, 同時に自然乾燥するとどのようになるかを検討した。 α , α -トレハロース水溶液 A をバランストレイ中に $5 \mu\text{L}$ ずつ 6 カ所に置き, 自然乾燥 (24°C , 相対湿度 31%) で 3 時間放置後, そのうちの 3 個の試料 (sample 1-3) の IR スペクトルを, 25.5 時間後に残りの 3 個 (sample 4-6) の IR スペクトルを測定した。同様の条件下, α , α -トレハロース水溶液 A をバ

ランストレイ中に $10 \mu\text{L}$ ずつ 6 カ所に置き, 3 時間放置後, そのうちの 3 個の試料 (sample 7-9) の IR スペクトルを, 28 時間後に残りの 3 個 (sample 10-12) の IR スペクトルを測定した (Fig. 9)。

Fig. 9 のスペクトルから, $5 \mu\text{L}$ と $10 \mu\text{L}$ の試料のうち $5 \mu\text{L}$, 25.5 時間後の sample 5 のみがトレハロース二水和物を生成していることが分かった。

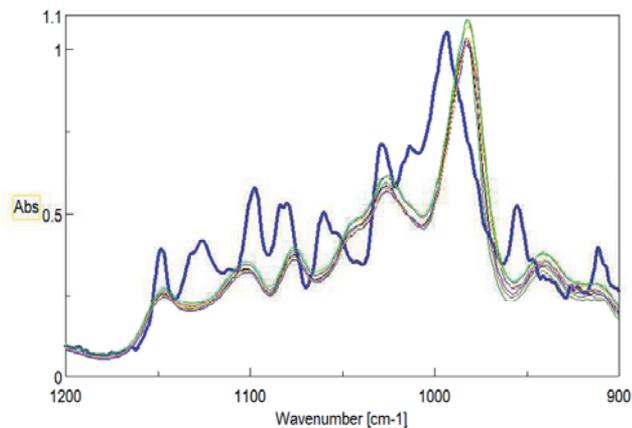


Fig. 9 ATR-IR spectra of sample 1 - 12

残りの 11 種類の sample は, (1,1)- α -グリコシド結合に由来する 990 cm^{-1} 付近に観測される逆対称伸縮振動と 950 cm^{-1} 付近に観測される対称伸縮振動の 2 つのピークのシフト位置の違いを除いて, トレハロース水溶液のスペクトルと一致していた。この結果は, $5 \mu\text{L}$ や $10 \mu\text{L}$ の様な小液滴の自然乾燥では, 過飽和溶液になってもトレハロース二水和物が析出しにくいことを示している。

そこで, α , α -トレハロース水溶液 A 中の水とトレハロースのモル比が, 自然乾燥の時間経過と共に, どのように変化するかを検討した。 α , α -トレハロース水溶液 A をバランストレイに置き, 25°C , 相対湿度 24 %, 10 分間隔で 110 分間, 最後に 1020 分後に質量を測定した表を Table 1 に示した。

Table 1

Time (min.)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	1020
Mole ratio (water/trehalose)	56	42	31	21	11	9	7	6	6	5	5	5	2

Table 1 から 1020 分経過後のトレハロースと水のモル比は 1 : 2 (ほぼトレハロース二水和物の状態) でシロップ状であった。この 1020 分経過後の試料を ATR プリズム上に圧着し IR スペクトルを

測定した(Fig. 10 緑線のスペクトル)。このスペクトル(緑線)は、2900-3000 cm^{-1} のC-H伸縮振動がブロード現れ、指紋領域(900-1200 cm^{-1})の吸収ピークもグリコシド結合の対称伸縮振動および逆対称伸縮振動の吸収位置の違い以外は水溶液のスペクトルと近似していた。また、無水アモルファストレハロース(Fig. 10の黒線)⁵⁾のスペクトルとは、非常に類似していた。以上から、1020分経過後の試料のスペクトル(Fig. 10の緑線)は、アモルファストレハロース二水和物であると帰属した。

更に、この試料をATRプリズム上に35分間圧着し続けた後のIRスペクトルをFig. 10の青線で示した。このスペクトル(青線)は、トレハロース二水和物であることがトレハロース二水和物結晶標準品スペクトルの比較から同定された。

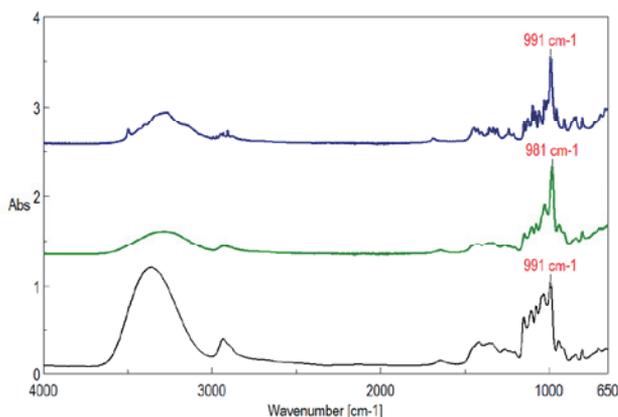


Fig. 10 ATR-IR spectra of the amorphous trehalose dihydrate (green line), the amorphous trehalose anhydrate⁵⁾ (black line) and the trehalose dihydrate (blue line)

以上のことから、トレハロース水溶液の小液滴が室温下で自然乾燥するとアモルファストレハロース二水和物が生成し、アモルファストレハロース二水和物は、圧力などの機械的刺激により α, α -トレハロース二水和物結晶に変化することが分かった。

水溶液中の α, α -トレハロースは、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、その構造にできた隙間(クレフト)に水二分子が取り込まれた構造(II)(Fig. 2)^{3,4)}で存在している。一方、 α, α -トレハロース二水和物結晶は、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構造のトレハロースが結晶格

子を作り、その格子の隙間に水二分子が入っている構造(III)(Fig. 11)⁷⁾をしている。

α, α -トレハロース水溶液を自然乾燥すると α, α -トレハロースは、水溶液中の構造(II)を保ったまま(クレフト中に2分子の水を保持)、溶媒の水だけが消失し不安定なアモルファス α, α -トレハロース二水和物状態になる。しかし、圧力などの外的刺激が加わると二水和物構造(II)が安定な結晶(III)状態へ変化する。

これは、 α, α -トレハロースが水溶液中でクレフトに2分子の水分子を保持した構造(II)であるため、自然乾燥により溶媒の水が失われてもクレフトに残った水分子が急激な結晶(III)化を妨げているためと言える。

以上の結果は、この α, α -トレハロースの構造(II)が乾燥保護機能の重要な要因になっていることを示している。

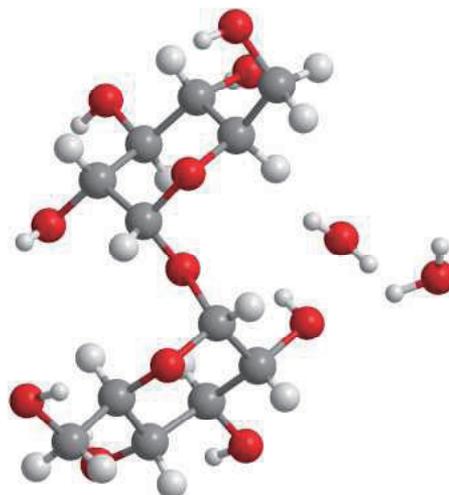


Fig. 11 Ball-stick representation of α, α -trehalose dihydrate (III)

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. V. S. R. Rao, P. K. Qasba, P. V. Balaji, R. Chandrasekaran, *Conformation of Carbohydrates*. Harwood Academic Publishers, (1998), pp. 118と引用文献
3. 石井郁子, 傘 孝之, 日本歯科大学紀要, **36**, 33-37 (2007)
4. 石井郁子, 傘 孝之, 日本歯科大学紀要, **38**, 39-43 (2009)
5. K. Akao, Y. Okubo, N. Asakawa, Y. Inoue and M.

Sakurai, *Carbohydrate Research*, **334**, 223-241 (2001)

6. 特開平10-165118 (JP, A); 山本修一, 食品と技術, 2007-05; 山本修一, 日本食品工学会誌, **7** (4), 215-224 (2006).
7. T. Taga, M. Senma and K. Osaki, *Acta Crystallogr., Sect. B : Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.*, **28**, 3258 (1972)