

糖水溶液の赤外分光分析データより得られた微視的情報

生物資源学部・生物生産機械学コース 野呂明美

【はじめに】

分子のもっている内部エネルギーには、電子エネルギー、振動エネルギー、回転エネルギーの3種類がある。このうち、我々が研究を行ってきた赤外領域では分子の振動の遷移エネルギーによる吸収スペクトルが観測される。たとえば今、物質（今回の研究では糖水溶液）に赤外線照射すると、この赤外線の振動数とその物質に固有の赤外領域における振動数と一致した時、赤外線の吸収が起こり、赤外吸収スペクトルにその物質固有の吸収帯が観測されるというしくみである。また、分子の回転運動などよりエネルギーレベルの低い現象について調べるには核磁気共鳴法（NMR法）が有効である。NMRで観測する直接の対象はあくまで核スピンの振る舞いであるが、分子を構成している核は溶液中で分子が回転したりして動くと、この分子の運動により揺り動かされる。したがって核スピンの動きを観測することにより分子の動きを推察できるわけである。そこで今回、赤外分光法から得られた蔗糖水溶液の微視的知見とNMR法にて縦緩和時間を測定した結果から分かる微視的知見をまとめたのでここに報告する。

I 赤外吸収スペクトルから得られた微視的知見について

【試料】

試料には和光純薬製試薬特級のスクロースを ISOTEC 製 99.96%の重水に溶解させたものと、純水に溶解させたものを用いた。

【実験装置】

赤外吸収スペクトル測定には、パーキンエルマー社製フーリエ変換赤外分光分析装置（FTIR Model 1600）

（走査範囲：7800 ~ 100 cm^{-1} 、分解能：2 cm^{-1} ）を使用した。サンプリング方法にはATR法を採用し、ATRセルの素材は、水に不溶で中赤外域において広い測定範囲をもつ ZnSe（使用可能波数域：20000 ~ 650 cm^{-1} ）を選択した。測定波数域は、4000 ~ 650 cm^{-1} とした。

【実験結果】

図1にスクロースを純水に溶解さ

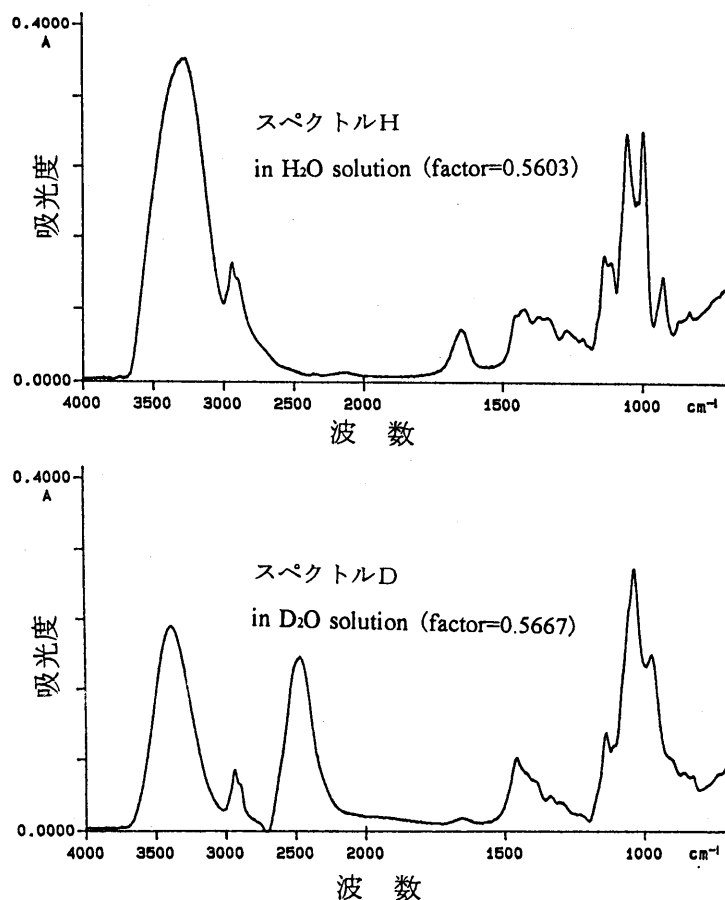


図1 スクロース（2M）の赤外吸光度スペクトル

せた試料（スペクトルH）と、スクロースを重水に溶解させた試料（スペクトルD）のスペクトルを示す。スペクトルはリファレンスにそれぞれの溶媒をとり、溶媒の重量に応じたファクターを乗じたスペクトルを試料溶液から差し引いた差スペクトルである。濃度は共に 2 M である。スペクトルHでは 3280cm^{-1} に水酸基 (OH) の伸縮振動, 2935cm^{-1} にメチレン (CH_2) の逆対称伸縮振動, 1400cm^{-1} 近傍に水酸基とメチレンの変角振動, 1150cm^{-1} にエーテル (C-O-C) の逆対称伸縮, $1200 \sim 900\text{cm}^{-1}$ の指紋領域にはアルコール (C-OH) の伸縮振動・エーテルの対称伸縮振動が観測される。スペクトルDではスペクトルHに比べ溶媒の水素原子の質量が 2 倍と重いため官能基 OD の伸縮振動は低波数側にシフトし、スクロースの水酸基の OH 伸縮振動と溶質と溶媒の水素結合に帰属される OD 基の伸縮振動とに分離され観測することができた。指紋領域では溶媒の物性が異なるためか同一のスペクトルとしては観測されなかった。スペクトルH, Dの 1150cm^{-1} 付近にある 2 つのピークはスペクトルH, Dの間のケミカルシフトがみられない。したがって、この 2 つのピークはアルコール C-OH, C-OD の関与しない C-O-C 逆対称伸縮振動であると帰属される。

図 2 にスクロース重水溶液の CH 伸縮と C-OH 伸縮の検量線を示す。CH 伸縮の検量線は相関係数 0.999 の直線となったが、C-OH 伸縮の検量線は高濃度域で上方にそれた。OD 伸縮と OH 伸縮の頂点吸光度による検量線は相関係数 0.9997 の直線となった。

図 3 (a)(b)にスクロース水溶液の CH 伸縮と C-OH 伸縮の検量線を示す。CH 伸縮の検量線は相関係数 0.999 の直線となったが、C-OH 伸縮の検量線は高濃度域で上方にそれ 2 つの検量線はそれぞれ重水溶液における検量線と同様の傾向を示した。OH 伸縮の頂点吸光度による検量線は、直線となった。

グルコースの検量線は、どの特性吸収波数においても相関係数 0.9998 前後の非常に高い直線性を示した。

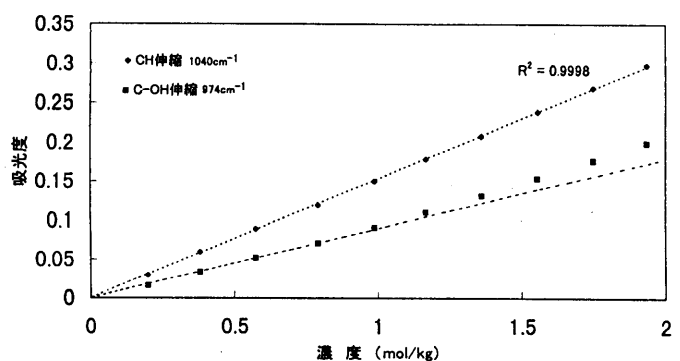


図 2 スクロース重水溶液の検量線

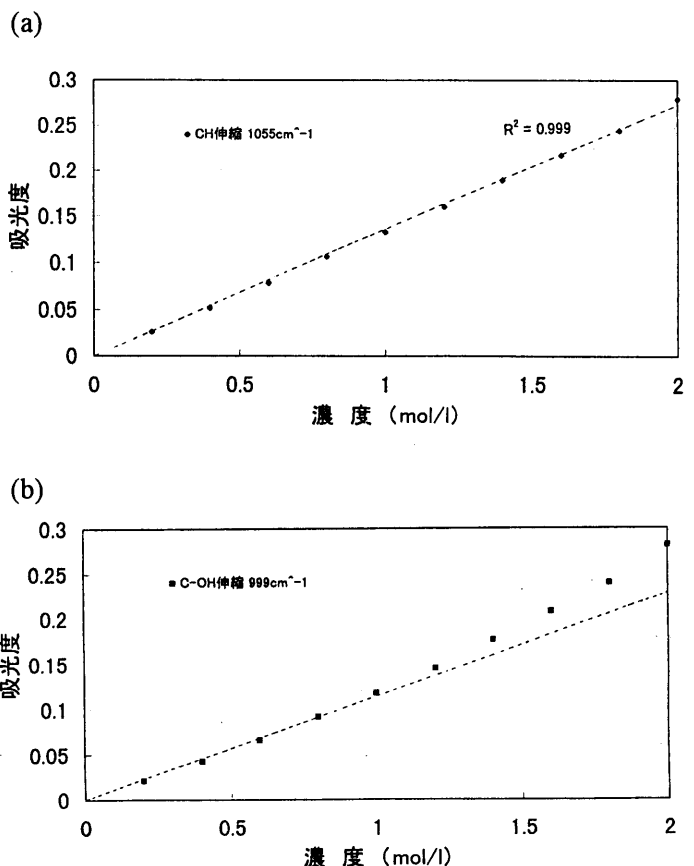


図 3 スクロース水溶液の検量線

II NMR法による縦緩和時間から得られた微視的知見

【試料】

試料には和光純薬製試薬特級のスクロースを ISOTEC 製 99.96%の重水に溶解させたものを用いた。内部標準物質として TSP (3-トリメチルシリルプロピオネイトソディウム) を添加した。

【実験装置および方法】

NMRスペクトル測定には、日本電子製核磁気共鳴装置 (JNM-A500) (磁場：超電導磁石 500MHz/11.7T) を用いた。表 1 に示した測定条件で縦緩和時間の測定を行った。

【実験結果】

図 4 にスクロースの重水水溶液の NMR スペクトルを示す。図中の記号は、図 5 に示すスクロースのプロトンの帰属を示したものである。図 4 のスペクトルを高磁場側 (右側) から順番に説明する。3.47ppm を中心とする 3 重線に g4 プロトン、次の 4 重線に g2 プロトン、3.68ppm に f1 プロトン、3.76ppm の 3 重線に g3 プロトン、3.81 ~ 3.91ppm には g6, f6, g5, f5 プロトンがそれぞれ重なったシグナル、4.05ppm の 3 重線に f4 プロトン、次の 2 重線

に f3 プロトン、4.75ppm にスクロースの水酸基のプロトンと交換した溶媒中の HDO のプロトン、5.4ppm の 2 重線に g1 プロトンが観測される。高濃度域 (1.0M 以上) の試料では 5.5 ~ 6.0 ppm に水酸基のプロトンのブロードなシグナルが観測された。スクロースの水酸基のプロトンは溶媒中の D⁺ と非常に速い速度で交換しており、NMR 時間の測定限界 (10^{-12}

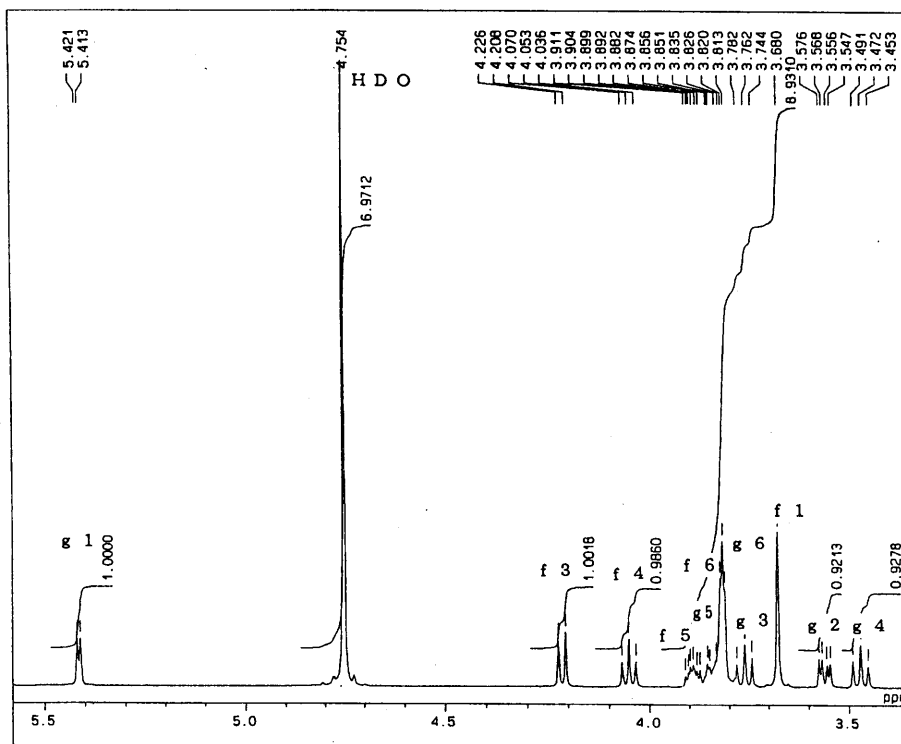


図 4 スクロース(0.2M)の 1D-NMR スペクトル

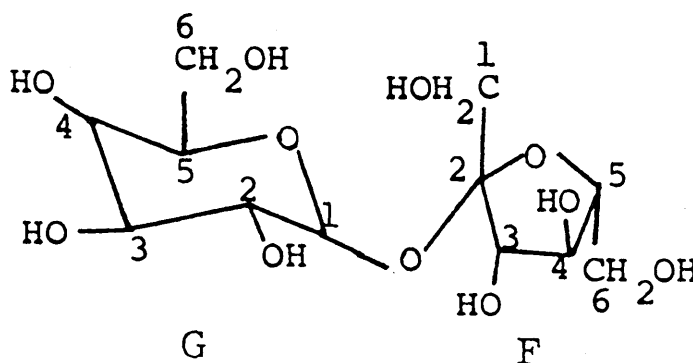
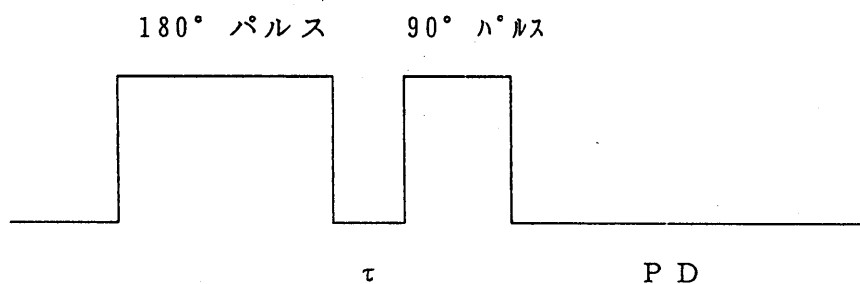


図 5 スクロースの構造と NMR スペクトルに帰属されたプロトンの位置

表 1. 測定条件

観測核種	^1H	
測定モード	D B L T 1 (T 1 緩和)	
照射モード	N O N	
サンプル・リング・ポイント数	1 6 3 8 4	
積算回数	4	
ダミー	SUCROSE: 4 WATER: 2	
P D	1 5 sec	
τ 値 (sec)	SUCROSE	0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.6, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0
	WATER	1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 11.0, 15.0, 20.0
測定温度	2 5 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ (温度コントロールなし)	
90° パルス幅 R G A I N	サンプルにより異なる	



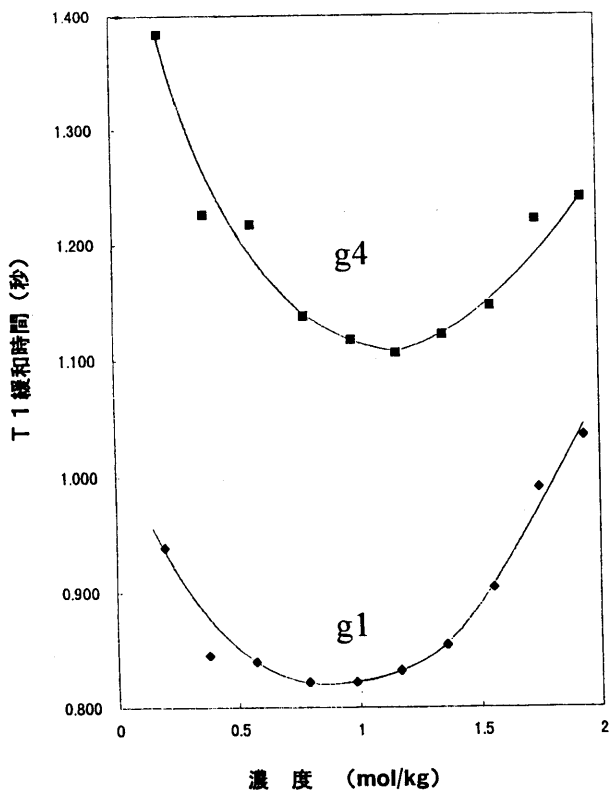


図 6 (a) スクロースの縦緩和時間

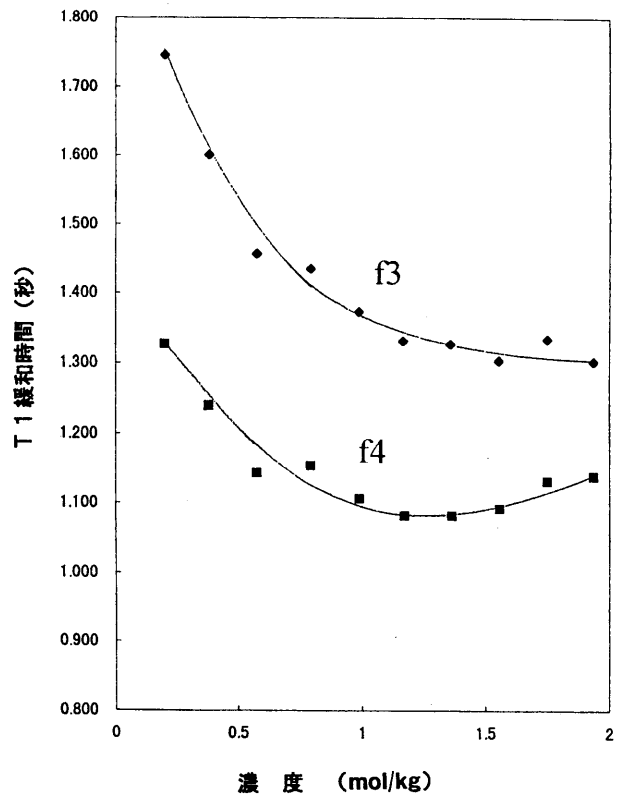


図 6 (b) スクロースの縦緩和時間

sec のオーダー) を超えるため低濃度域では全く観測されず、HDO プロトンとして観測された。

図 6 (a)~(c)に縦緩和時間の測定結果を示す。図 6 (a)はピラノース環の C1 と C4 に付いているプロトンの縦緩和時間の変化の様子を示したものであるが、1M 前後で極値を持つことがわかる。図 6 (b)はフラノース環の C3 と C4 に付いているプロトンの縦緩和時間の変化の様子を示したものである。図 6 (c)は溶媒中のプロトンの縦緩和時間の変化の様子を示したものである。高濃度になるにつれ縦緩和時間は短くなっているのが分かる。

図 7 上にグルコース NMR スペクトル、図 7 下にグルコースの縦緩和時間を示す。このデータは基礎生物学研究所の牧野技官に測定していただいたものである。使用したグルコースは α 型グルコース、 β 型グルコースの未分離な試料である。 α 型の C1 のプロトン、

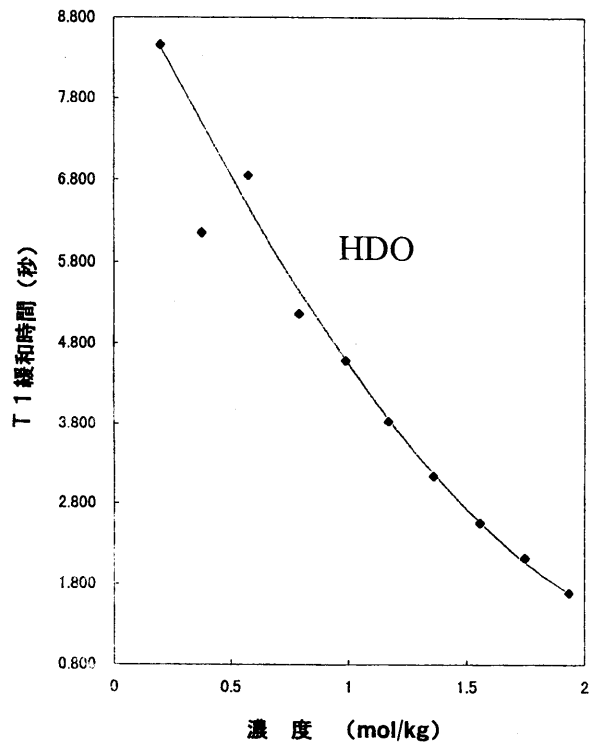


図 6 (c) 水 (溶媒) の縦緩和時間

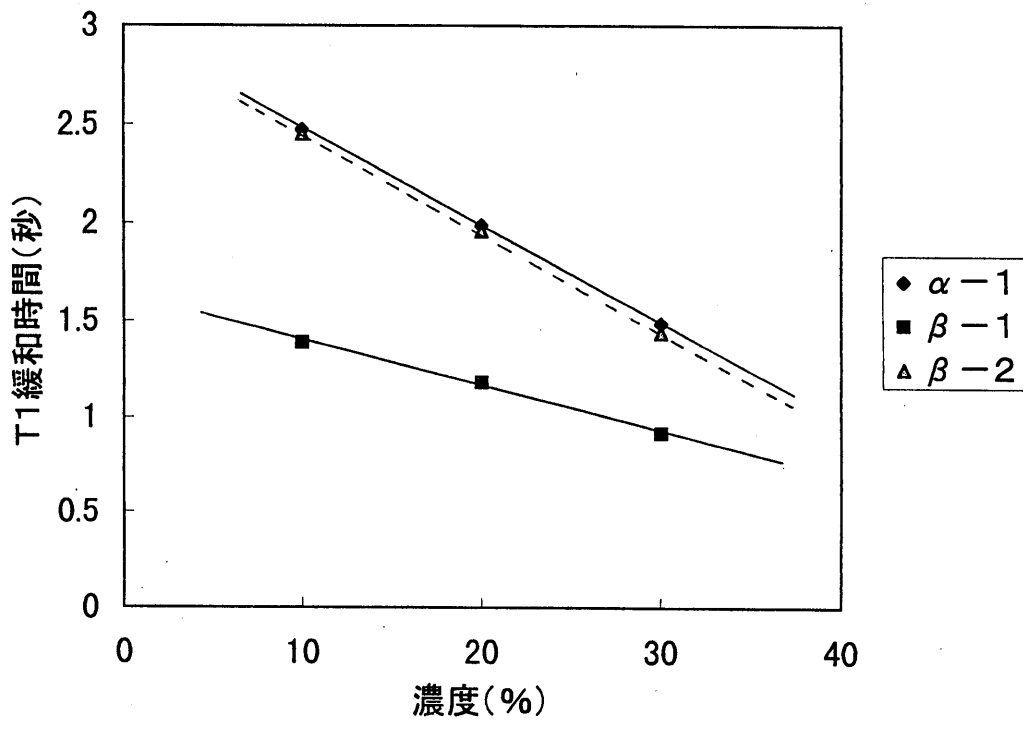
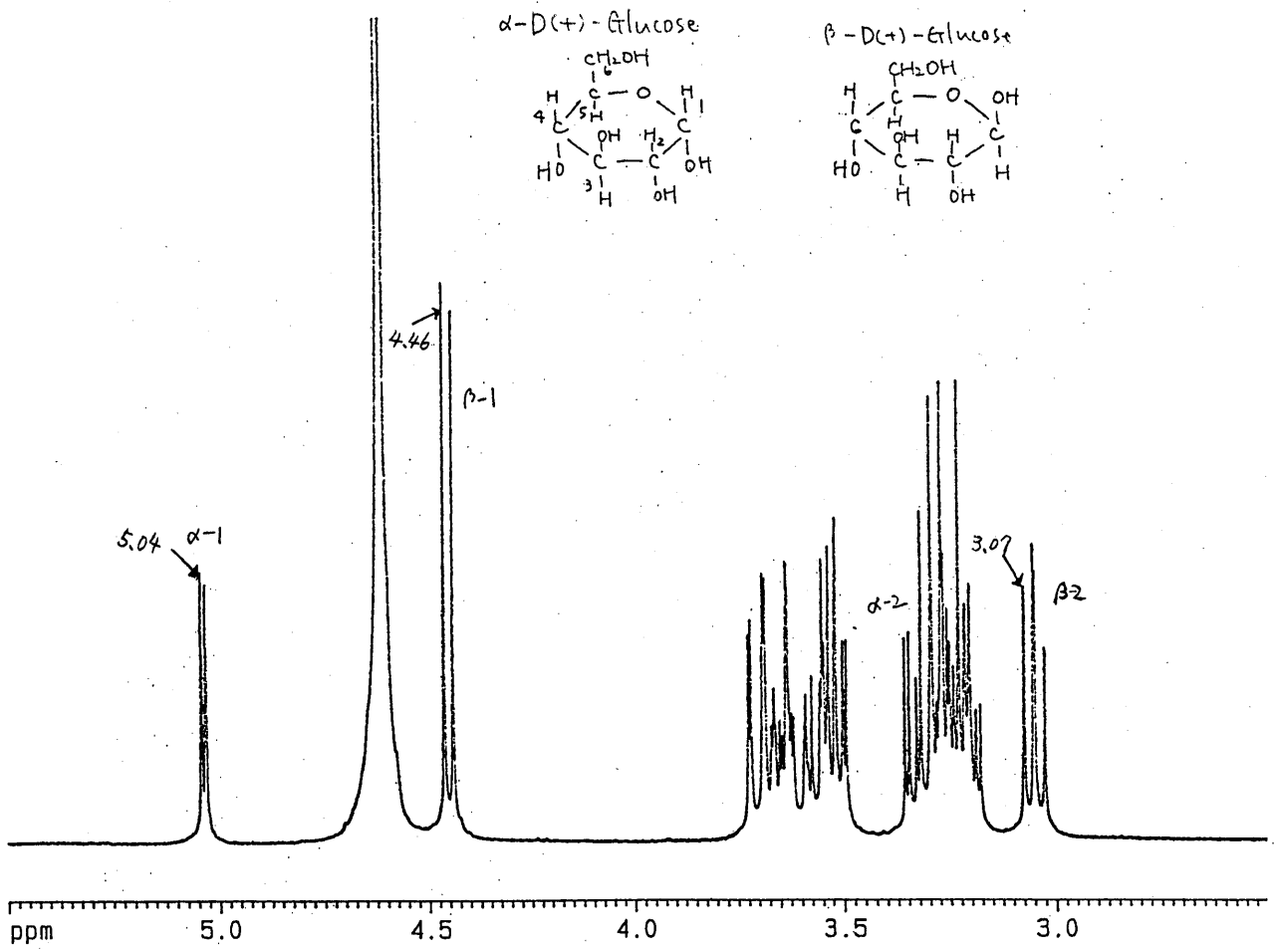


図7 (上) グルコースの1D-NMRスペクトル
 (下) グルコースの縦緩和時間
 基礎生物学研究所 牧野技官 測定データ

β 型の C1 および C2 のプロトンについて縦緩和時間を調べた結果、直線性を示した。

【縦緩和時間測定のポイント】

緩和時間の良いデータを得るためのポイントを以下に挙げる。

- ① 正確な 90° パルス幅を設定すること。最も正確な 180° パルス幅を探り、その $1/2$ の値を 90° パルス幅として設定する。
- ② シム調整はオートで出来るが、より均一な磁場状態を得るためチューニングをサンプルが変わる毎に行うこと（サンプルの濃度によりチューニングが変わってくる）。
- ③ 待ち時間 (τ) を最適値に設定するためヌルポイントを調べることで、 $T1 = \text{ヌルポイント} \times 1.44$ であるからこの $T1$ 値を目安に τ 値およびパルス遅延時間 (PD: 約 $T1 \times 5$) を設定すると良い。つまり、 τ 値は目的とするプロトンによって設定値が異なるということである。
- ④ 積算回数については、マニュアルにはプロトンの $T1$ 緩和の測定には、積算回数は 8 または 16 回、ダミーは 8 回と記載されている。しかし、糖水溶液のようなサンプルの場合は、積算回数を多くとらなくても十分良いデータが得られるはずであり、積算回数を多くとることによって温度コントロールをしていない場合は核の温度が上昇し、かえってデータが悪くなることもある。そこで、スクロースのプロトンについては積算回数 4 回・ダミー 4 回、HDO のプロトンについては積算回数 4 回・ダミー 2 回で測定した。

【考 察】

図 8 に水のトリジマイト構造とグルコースの構造、および水のトリジマイト構造の中に水素結合により固定されたグルコースを图示する。グルコースはその分子サイズが水のトリジマイト構造の中にぴったり填る大きさであること、ピラノース環に水酸基が付いており水と水素結合を結んでトリジマイト構造の中に固定されるため理想溶液となり、水との相互作用が出ない。このため赤外分光分析データ、NMR データ双方から得られた検量線が共に極めて相関係数の良い直線となった。

スクロースはグルコースと構造、分子サイズが異なるため非理想溶液となる。したがって溶質と溶媒、溶質と溶質の水素結合による相互作用が現れる。赤外分光分析では C-OH 伸縮に相互作用による影響が観察される。NMR データにも溶

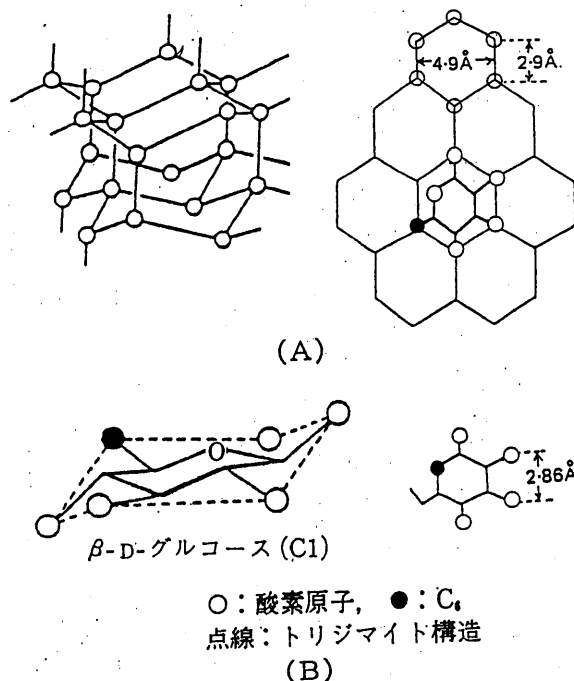


図 8 (A) 水のトリジマイト構造
(B) グルコースの構造

質プロトンの縦緩和時間にこの影響が観察されたのであろうと推察される。

自然界においてグルコースのように理想溶液となる物質は極めて希である。スクロースのように非理想溶液となる物質の方が遙かに多い。NMR法を食品中の成分の定量分析に応用するには、今回の縦緩和時間測定の実験データの中で、低濃度域では比較的直線性を示した水に着目すべきであると思う。今回観測された水のプロトンはスクロースの水酸基のプロトンと溶媒である重水の重水素が交換したために偶然観測された水のプロトンのデータである。今後、スクロースを純水に溶解させた試料の水のプロトン、または水の¹⁷Oの縦緩和時間および横緩和時間の測定などを試みれば新たな展望が開けると思われる。

【参考文献】

- 1) Silverstein 著, 荒木 峻ら訳, 有機化合物のスペクトルによる同定法 (第5版), (株)東京化学同人 (1992).
- 2) 赤坂一之著, NMRの生化学への応用, 化学増刊67, 化学同人 (1976).
- 3) 大河内正一ら, NMR分光法による水評価, 水環境学会誌, **66**, 409-415 (1993).
- 4) 上平 恒, 水の物性と構造, 材料科学, **30**, 221-227 (1993).
- 5) 久保田昌治著, 知っておきたい新しい水の基礎知識, オーム社 (1993).
- 6) 茅 幸二, 西 信之著, クラスタ, 産業図書(株) (1994).
- 7) カウズマン, アイゼンバーグ著, 水の構造と物性, みすず書房 (1975).
- 8) 上平 恒, 逢坂 昭著, 生態系の水, (株)講談社 (1989).