

報 文

テラヘルツ帯の分光スペクトルを利用する
グルコース中の水和水計測阿部 香織¹, 林 伸一郎^{1,2}, 土岐 規仁³, 大谷 知行²,
川瀬 晃道^{1,2,4}, 宮澤 陽夫¹, 小川 雄一^{®1}

本研究では、テラヘルツ帯分光スペクトルを利用したグルコース中の水和水計測を試みた。グルコース水和物と脱水和物 3 種、無水物を利用し、カールフィッシャー法による水分量計測とテラヘルツ帯分光測定と比較を行った。水含量と相関が高い吸収波数を利用して水含量を推定する検量線を作成し、評価を行った結果、特に波数 60.3, 65.6, 80.5 cm^{-1} に現れる吸収ピークを利用した場合、相関係数 = 0.9509, 予測標準誤差 = 0.714 と精度の高い検量線を得ることができた。これは、従来法と比較して有機溶媒などを必要としない水和水計測技術の可能性を示している。

1 緒 言

物質とそこに含まれるわずかな水は、様々な状態で相互に影響を与えることが知られている。そのひとつが水と呼ばれる結合状態である。水和の要因としては、静電的相互作用、水素結合、ファンデルワールス力や疎水性水和などがある¹⁾。疎水性アミノ酸の水和は、タンパク質の安定性に大きな影響を与えていることから数多くの報告がなされている^{2)~4)}。また、医薬品分野では結晶多形をとる医薬品が数多く存在している⁵⁾。結晶多形をとる物質は水和物になりやすく⁶⁾、医薬品に結合した水分により、溶解性や吸収性、生理活性が異なる^{7)~9)}。このため、水和を防ぐための数々の賦形剤が使用されている¹⁰⁾。

一方、近年テラヘルツ波 (THz 波) と呼ばれる電磁周波数帯の応用開拓が進みつつある。THz 波はおおむね周波数 0.3 THz から 10 THz、波長に換算すると 1 mm から 30 μm に相当する電磁波の総称で、近年のレーザー技術や半導体デバイス技術の向上により急速な発展を遂げている電磁周波数帯である^{11)~14)}。この THz 帯において様々な物質が固有の吸収スペクトルを持つことが明らかになりつつあり、化学物質¹⁵⁾やビタミン¹⁶⁾、糖¹⁷⁾¹⁸⁾、アミノ酸¹⁹⁾に物質固有の吸収スペクトルが報告されている。THz 帯の吸収は、ファンデルワールス力や水素結合、分子間相互作用

といった低いエネルギーを反映していると考えられており、水和のような分子間相互作用の変化は、THz 帯吸収スペクトルに現れると考えられている。更に、対象となる試料が粉体の場合、赤外光や可視光では散乱や吸収の影響が大きく透過計測が困難となるが、THz 波はこれらを比較的透過しやすい性質を有することから、粉体中の水含量計測には適した電磁周波数帯であると考えられる。

現在、粉体中の水分を測定する方法には、水分を溶媒に抽出し、水分を測定する間接法や、粉体の水分を直接測定する直接法がある²⁰⁾。間接法の一つに赤外分光法や近赤分光法がある。これらの方法では、粉体の透過計測が困難なばかりでなく、試料を溶媒に溶解して測定を行う必要があるため、試料の回収が不可能である。また、直接法には粉末 X 線回折 (XRD) 法や重量法などがあるが、被曝の危険性や熱に不安定な物質も存在するため、粉体中の水分量を測定するには、用途や感度など様々な条件を考慮して測定方法を選ぶ必要がある。

本研究では、物質の安定性や溶解性、医薬品ではその効能に影響を与え、重要な役割を担っている粉体中の水和水を計測する新しい分析方法として、THz 帯分光スペクトルを利用したグルコース中の水和水計測を試みた。グルコース粉末は、水和物と無水物の状態で存在し、これらの分子間相互作用の違いは、THz 帯分光スペクトルに現れると期待される。そこでカールフィッシャー法による水分計測結果と THz 帯分光スペクトルの関係について調べ、グルコースと水分子の相互作用を利用した、THz 波による新しい水和水計測法を提案する。

¹ 東北大学大学院農学研究科: 981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

² 理化学研究所テラヘルツ光研究プログラム: 980-0845 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 519-1399

³ 岩手大学工学部応用化学科: 020-8551 岩手県盛岡市上田 4-3-5

⁴ 名古屋大学大学院工学研究科: 464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町

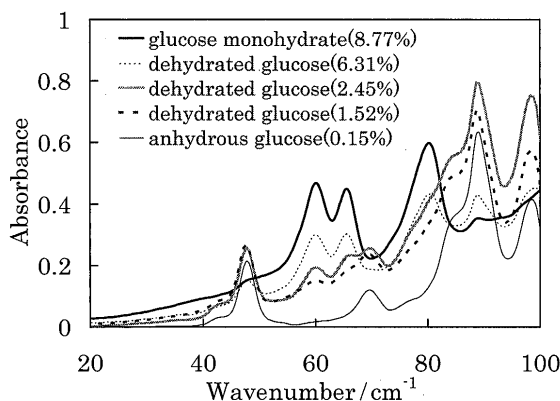


Fig. 1 THz spectra of glucose monohydrate, dehydrated glucoses and anhydrous glucose (5% w/w)

2 実験

2.1 試料の調製

試料としてグルコース無水物（ナカライテスク製，特級試薬）と一水和物（Fluka 製，生化学用），並びにその脱水和物 3 種を用意した．脱水和物 3 種は，一水和物を 80℃ の恒温器に保管し，保管時間を 4 分（脱水和物 1），9 分（脱水和物 2），10 分（脱水和物 3）と変えることにより水和量を段階的に変化させたものである．無水物と一水和物，脱水和率の異なる 3 段階の試料の計 5 種類の試料について，カールフィッシャー水分計による水分量計測を実施し，更にそれぞれの THz 帯分光スペクトルを測定した．THz 帯の分光スペクトルの測定には，この領域で透過率の高いポリエチレン（Sigma 製 13405HA，平均粒径 45 μm ）を希釈材として使用し，ペレットを作製した．ペレットの作製には，真空ポンプ（島津製，SA18-3M 型）付の加圧装置（島津製，SSP-10A 型）を用い，真空度約 7×10^{-2} Pa にて予備排気 5 分間，圧力約 2 MPa で約 10 分間加圧成形し，重量パーセント 5%，重量 200 mg，厚さ約 1.8 mm のペレットを作製した．

2.2 水分量及び分光スペクトルの測定

試料の水分量測定は，カールフィッシャー水分計（スイス・メトローム製：KF ティトリーノ 787 型）で行い，脱水溶剤は Solvent FM（林純薬製），滴定溶剤は Hydranal-Composite2（Sigma-Aldrich 製）を用いた．まず，蒸留水を用いて水 1 g を滴定する滴定溶剤の力価を求め，この力価に基づいて，試料に含まれた水分量を求めた²¹⁾．

THz 帯分光スペクトルの測定には，フーリエ変換赤外分光光度計を用いた．本分光器は，既に市販されている分光器（日本分光製：FARIS-1）を改造したものである．分光器は高圧水銀ランプを光源に，THz 帯の透過率が高いシリコンをビームスプリッターとして利用し，常温動作の

焦電素子（分光器に内蔵）あるいは低温検出器のシリコンボロメーター（Infrared Laboratories 製）によって検出する構成とすることで，THz 帯に特化した特性を有する．本分光器の測定可能領域は，検出器に本体内蔵の焦電素子を利用した場合は $20 \sim 600 \text{ cm}^{-1}$ ，低温検出器を利用した場合は，低温検出器内部の熱雑音低減のための光学フィルター特性により高波数側に帯域が制限を受け，検出可能帯域は $10 \sim 140 \text{ cm}^{-1}$ となる．実験では，試料の希釈に用いたポリエチレンが 80 cm^{-1} 以下の波数において高い透過率を示すことから，S/N よく分光スペクトルを得ることが可能な波数領域は， $20 \sim 80 \text{ cm}^{-1}$ であった．なお，分光器筐体内は，水蒸気の吸収スペクトルの影響を除くために，試料設置部分の光路長 10 mm 以外は真空引き（10 Pa 程度）してあり，この状態でシリコンボロメーターによる 100% ラインでの再現性を確認したところ， $20 \sim 80 \text{ cm}^{-1}$ の領域において $\pm 0.3\%$ 以内であった．

得られた試料の分光スペクトルはすべて吸光度に変換した後，差分法による二次微分を行った．回帰分析及び検量線作成には表計算ソフト（Microsoft Excel 2002，MicroSoft Inc.）を用いた．

3 結果と考察

3.1 グルコース水和物の THz 帯分光スペクトル

一水和物と無水物の割合を前述の方法で変化させたグルコース一水和物並びに脱水和物 1～3，グルコース無水物試料の水分含有量をカールフィッシャー法によりそれぞれ測定した結果，重量パーセントで 8.77%（一水和物），6.31%（脱水和物 1），2.45%（脱水和物 2），1.52%（脱水和物 3），0.15%（無水物）であった．無水物の測定結果から，水和せずに含まれる水分が 0.15% 程度であると考えられた．また，グルコース一水和物の 1 分子当たりの水分量は，グルコースと水分子の分子量の比率から，約 9% と見積もることができるため，一水和物試薬の測定結果から，ほぼすべてのグルコースが一水和物であることが期待される．しかし，水分子がどのような形態でグルコース中に存在しているかはカールフィッシャー法で判断することはできない．

Fig. 1 に，上記 5 種類の試料の THz 帯分光スペクトルを示す．全体的な傾向として，スペクトルは高波数になるにつれて吸収係数が増加し，右肩上がり傾向を示した．これは，周波数が高くなるにつれて光の性質である散乱や吸収の影響が大きくなるためと考えられる．また，すべての試料における THz 帯分光スペクトルに明確な吸収ピークが現れている．この帯域では，水のみ分光スペクトルには特徴的な吸収ピークが見られず，ブロードなスペクトルを示すため，これらの明瞭な吸収ピークは水分子とグルコースの相互作用に起因するものと推測できる．吸収ピー

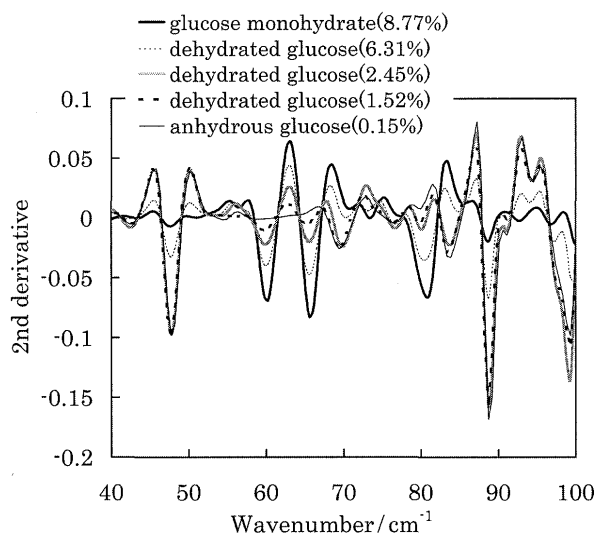


Fig. 2 Second derivative THz spectra of glucose hydrates and anhydrous glucose

クは、一水和物の場合、60.3, 65.6, 80.5 cm^{-1} に現れ、無水物では、47.7, 69.4, 89.1, 98.3 cm^{-1} に現れている。脱水和物の場合、一水和物と無水物の両方のスペクトルの特徴を併せ持つが、水分量が少なくなるにつれて、一水和物に特徴的な 47.7, 80.5 cm^{-1} の吸収ピークが減少し、無水物に特徴的な 69.4, 89.1, 98.3 cm^{-1} のピークが増加していく様子が観測された。このような水分の減少に伴う明瞭なスペクトル形状の変化が観測されたのは、加熱による水の乖離により水和物の分子全体の大きな振動モードや水素結合などの分子間の相互作用、フォノンモードが変化したためと考えられる^{15)~17)}。この結果から、THz 帯で見られる分光スペクトルの変化は、グルコース分子内の水和水による影響によるものであると考えられる。

3.2 水分量推定の検量線の作成及びその評価

THz 帯分光スペクトルの高波数領域では物質の透過性が低くなり、散乱に伴うベースラインの上昇が確認された。THz 帯分光スペクトルにおけるベースライン変動を除去し、ピークの極大吸収波数を明確にするために、Fig. 1 のスペクトルに二次微分を行った。得られた二次微分スペクトルを Fig. 2 に示す。水分量と二次微分値の相関分析を行ったところ、Fig. 3 に示すように、47.7, 60.3, 65.6, 80.5 cm^{-1} の相関係数の絶対値が 0.9 以上と高い相関を有していたため、この 4 つの波数を利用して検量線を作成することとした。二次微分スペクトルを利用した重回帰分析の計算結果を Table 1 に示す。すべての検量線において重相関係数が 0.98 以上の高い相関が得られ、model 1, 2 のとき最高の重相関係数 0.9918 が得られた。

次に、検量線作成時以外の検量線評価用試料を用いて、

検量線の評価を試みた²²⁾。Table 2 に検量線の評価結果を示す。最も低い予測標準誤差が得られるものは 60.3, 65.6, 80.5 cm^{-1} の波数を用いて検量線を作成した Model 5 であり、重相関係数は 0.9521, 予測標準誤差は 0.736 であった。Model 5 を評価用試料により評価したときの試料散布図が Fig. 4 である。Model 5 では、推定値と化学分析値の関係(散布図)はほぼ直線関係となった。

本手法では、検量線の作成に二次微分スペクトルを用いているため、自由水によるブロードな吸収の影響は受けず、推定される水分量はすべて水和水に起因していると考えられる。そのため、水和水の検出限界は、主にスペクトルの変化量と分光器の精度によって決まり、本研究においては、Fig. 1 から Fig. 4 の結果から 1% 以下であると見積もられる。

次に THz 帯分光スペクトルの帰属について考える。THz 領域における吸収スペクトルは、分子間の相互作用に起因していると考えられるため¹⁷⁾¹⁸⁾、今回見られたような水和水から無水物の変化に伴う分光スペクトル変化を結晶学的に考察する。まず、Hough らのグルコース一水和物結晶に関する報告²³⁾から、グルコース一水和物結晶の水分子は、4 つのグルコース分子に水素結合によって捕らえられていることが考えられる。この条件下で一分子モデルでの量子計算 {B3LYP/6-31G(d,p), B3LYP/6-311++G(d,p)} を行った結果、c-c 結合の周りの内部よじれ振動が、主に今回の実験結果でスペクトルが大きく変化した 60.3, 65.6, 80.5 cm^{-1} に現れ、このうち、65.6 cm^{-1} は等価な 2 つの振動であることが分かった。また、最も水分子が抜けやすいと考えられるのは、キャビティーの大きい b 軸と考えられる。この b 軸から優先して抜けた場合、4 つのグルコースと順次水素結合（そのうち 2 つは等価な振動）が脱離し、相互作用の変化が THz 帯分光スペクトルに現れると考えられる。このことから、本研究で見られた THz 帯分光スペクトルの変化は、水の脱離に伴う分子間相互作用の変化を反映したものと考えられる。また、多分子モデル(結晶構造モデル)においても、格子振動の吸収ピークが THz 帯にあることも量子計算 {B3LYP/6-31G(d,p)} によって予言されていることから、分子内と分子間の両振動に起因する吸収ピークであると思われるが、現在のところそれらの分離はできていない。しかしながら、内部よじれ振動及び格子振動の変化は、水の脱離によるため、本実験で得られた、水分の減少に伴う 60.3, 65.6, 80.5 cm^{-1} の吸収ピークの減少には、水素結合の減少が影響していたものと推察される。

一方で、一水和物から無水物結晶に構造が変化している可能性も考えられる²⁴⁾。無水物の結晶構造を構成しているグルコース分子と、一水和物結晶を構成しているグルコース分子を比較した場合、C5-C6-O6-H12 の二面角が異なる。

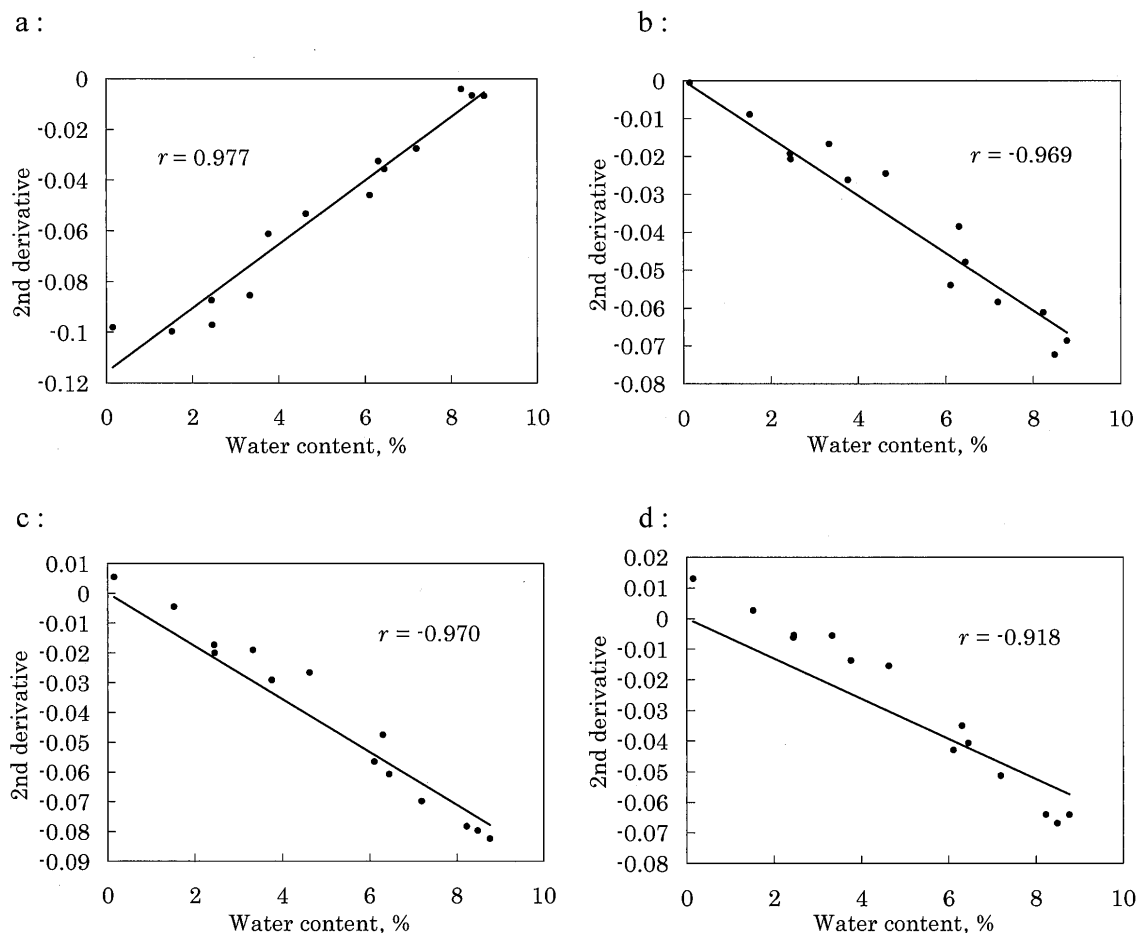


Fig. 3 Relationships between water content and second derivative at a: 47.7 cm^{-1} , b: 60.3 cm^{-1} , c: 65.6 cm^{-1} , d: 80.5 cm^{-1}

r : coefficient of correlation

Table 1 Results of calibration using feature wavenumber for determining water content of glucose

Model	Wave number used/ cm^{-1}				R	SEC
Model 1	47.7	60.3	65.6	80.5	0.9918	0.4266
Model 2	47.7	60.3	65.6		0.9918	0.4047
Model 3	47.7	60.3		80.5	0.9895	0.4556
Model 4	47.7		65.6	80.5	0.9917	0.4057
Model 5		60.3	65.6	80.5	0.9888	0.4724

R: multiple correlation coefficient; SEC: standard error of calibration

この面が変化する場合、それに伴って多くの振動が影響され、THz帯分光スペクトルの吸収ピークのプロード化及び吸収ピーク数の増加が見られていたであろうと考えられる。しかし、実験結果にそのような変化は見られないため、コンフォメーション変化はほとんどなかったものと思われる。

4 結 言

本報ではTHz波による、グルコースと水分子の相互作用

を用いた水和水計測法を提案した。水和量の異なるグルコースを用いてTHz帯の分光スペクトルとカルフィッシャー法の分析結果を比較し、水和量を予測する検量線を作成した。その検量線を評価した結果、相関係数は0.9509、予測標準誤差は0.714と高い精度を得ることができた。

また、一水和物モデルにおける量子計算により、一水和物からの水分子脱離による水素結合の減少が反映されるTHz帯の波数を求め、実験結果とのよい一致を見た。今

Table 2 Calibration and validation results for determining water content of glucose

Model	SEP	BIAS
Model 1	0.8524	0.318
Model 2	0.8526	0.318
Model 3	0.8070	0.218
Model 4	0.8622	0.347
Model 5	0.7138	0.097

SEP: standard error of prediction; BIAS: the average of difference between actual value and predicted value

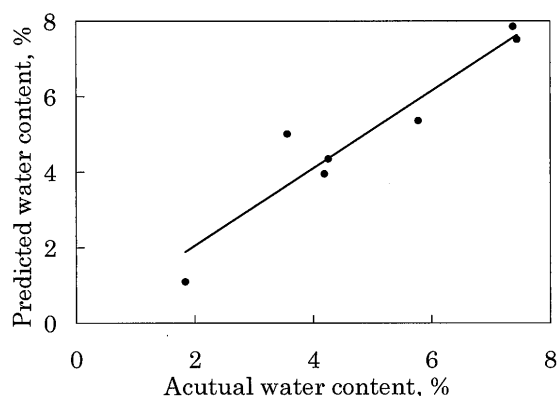


Fig. 4 Prediction results of validation glucose hydrate samples by using the water calibration model 5 ($R = 0.9509$, $SEP = 0.714$)

後シミュレーション技術の向上により, 分子間相互作用の解析や各吸収スペクトルの帰属が進むと, 従来の計測方法では困難であった自由水と水和水の分析や結晶構造の複雑な変化が分光スペクトルの利用により理解可能となることが期待される。また, 本研究において, THz 帯分光スペクトルを精度よく観測するために低温検出器を利用したが, 本手法は水含量の変化に伴う吸収ピークの位置の違いを利用しているので, 原理的には室温動作の焦電素子型検出器を利用することも可能であると考えられた。

THz 帯分光は, カールフィッシャー法で用いたような有機溶媒などの化学薬品を必要とせず, THz 帯において透過性の高いビニル袋などに試料を入れて測定することも可能であり, 本手法が新しい水和水計測法になり得ると期

待される。

文 献

- 1) 上平 恒, 多田羅恒雄: “水の分子生理”, 第 1 版, p. 20 (1998), (メディカルインターナショナル).
- 2) M. Ishimura, H. Uedaira: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 1 (1990).
- 3) S. Okouchi, T. Moto, Y. Ishihara, H. Numajiri, H. Uedaira: *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **72**, 1853 (1996).
- 4) Y. Nozaki, C. Tranford: *J. Biol. Chem.*, **246**, 2211 (1971).
- 5) H. G. Brittain (Ed.): “*Polymorphism in pharmaceutical solids*”, (1999), (Marcel Dekker, New York).
- 6) H. P. Stahl: “*Towards Better Safety of Drugs and Pharmaceutical Products*”, Edited by D. D. Braimar, p. 265 (1980), (Elsevier, Amsterdam).
- 7) N. Khalafallah, S. A. Khalil, M. A. Moustafa: *J. Pharm. Sci.*, **63**, 861 (1974).
- 8) A. A. Ali, A. Farouk: *Int. J. Pharm.*, **9**, 239 (1981).
- 9) A. J. Aguiar, J. E. Zelmer: *J. Pharm. Sci.*, **58**, 983 (1969).
- 10) A. K. Salameh, L. S. Taylor: *J. Pharm. Sci.*, **95**, 446 (2006).
- 11) D. H. Auston, K. P. Cheung, P. R. Smith: *Appl. Phys. Lett.*, **45**, 284 (1984).
- 12) B. Ferguson, X. C. Zhang: *Nature Mater.*, **1**, 26 (2002).
- 13) P. H. Siegel: *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, **50**, 910 (2002).
- 14) K. Kawase, J. Shikata, H. Ito: *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **35**, R1 (2002).
- 15) M. Walther, P. Plochocka, B. Fischer, H. Helm, P. U. Jepsen: *Biopolymers*, **67**, 310 (2002).
- 16) M. Walther, B. Fischer, M. Schall, H. Helm, P. U. Jepsen: *Chem. Phys. Lett.*, **332**, 389 (2000).
- 17) P. C. Upadhyay, Y. C. Shen, A. G. Davies, E. H. Linfield: *J. Biol. Phys.*, **29**, 117 (2003).
- 18) M. Walther, B. M. Fischer, P. U. Jepsen: *Chem. Phys.*, **288**, 261 (2003).
- 19) B. Yu, F. Zeng, Y. Yang, Q. Xing, A. Chechin, X. Xin, I. Zeylikovich, R. R. Alfano: *Biophys J.*, **86**, 1649 (2004).
- 20) 国吉 実, 村上次雄, 溝田忠人: 資源と素材, **118**, 191 (2002).
- 21) H. D. Isengard, H. Präger: *Food Chem.*, **82**, 161 (2003).
- 22) 岩元睦夫, 河野澄夫, 魚住 純: “近赤外分光法入門”, 第 2 版, (1994), (幸書房).
- 23) E. Hough, S. Neidle, D. Rogers, P. G. H. Troughton: *Acta Cryst.*, **B29**, 365 (1973).
- 24) G. M. Brown, H. A. Levy: *Science*, **147**, 1038 (1965).

Measurement of Hydrated Water in D-Glucose Powder Using THz-Wave Spectroscopy

Kaori ABE¹, Shin'ichiro HAYASHI^{1,2}, Norihito DOKI³, Chiko OTANI²,
Kodo KAWASE^{1,2,4}, Teruo MIYAZAWA¹ and Yuichi OGAWA¹

¹ Graduate school of Agricultural Science, Tohoku University, 1-1, Amamiyamachi, Tsutsumidori, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 981-8555

² Terahertz-Wave Research Program, Riken, 519-1399, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-0845

³ Department of Chemical Engineering, Iwate University, 4-3-5, Ueda, Morioka-shi, Iwate 020-8551

⁴ Graduate school of Engineering, Nagoya University, Furocho, Tikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi 464-8603

(Received 29 January 2007, Accepted 22 June 2007)

In this paper, we introduce a new method to measure the amount of water of crystallization in D-glucose powder using terahertz (THz) wave spectroscopy. We measured five crystalline D-glucose samples: one anhydrous, one monohydrate, and three in various states of partial dehydration, whose water content was measured independently by using Karl Fischer's method. By analyzing the THz absorption spectra, particularly the absorption peaks at 60.3, 65.6, and 80.5 cm^{-1} , which are strongly correlated with the hydration ratio, we could obtain a highly reliable analytical curve, with a correlation coefficient of 0.9509 and a standard error of prediction of 0.714. This study suggests the possibility of measuring the water of crystallization nondestructively, without using an organic solvent.

Keywords : terahertz spectroscopy; Karl Fischer's method; hydrate; glucose.