

論文 / 著書情報
Article / Book Information

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 題目(和文) | |
| Title(English) | Behavior of Liquid Phase Components in Frozen Aqueous Solutions. |
| 著者(和文) | 宇山允人 |
| Author(English) | Makoto Uyama |
| 出典(和文) | 学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9388号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:岡田 哲男,石谷 治,小國 正晴,火原 彰秀,塚原 剛彦 |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9388号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,, |
| 学位種別(和文) | 博士論文 |
| Category(English) | Doctoral Thesis |
| 種別(和文) | 要約 |
| Type(English) | Outline |

経言 化粧品や医薬品においては品質上、凍結安定性が要求される場合がある。しかし凍結によって薬効・機能が低下したり外観が変化したりする。薬効・機能低下の一つの原因は凍結により pH が変化することであると考えられている。凍結水溶液では凍結により緩衝成分の一部が選択的に結晶化することで pH の値に影響を及ぼすことが知られているが凍結水溶液の pH を直接評価した例は少ない。一方、エマルジョンの合一・分離が外観の変化の一つの原因である。glycerol (Gly) や 1,3-butanediol (13BD) などの多価アルコールは不凍液としての性質を有し、細胞の凍結保存液に広く研究されており、保湿・乳化助剤、更にはエマルジョンの凍結安定性の目的で化粧品や医薬品にも用いられることがある。しかしながら化粧品や医薬品ではこれら多価アルコールの配合量が低いため、これらを含む水溶液は凍結する。したがって、凍結時の氷界面でのこれら多価アルコールの挙動を分子レベルで解明することは、エマルジョンの凍結安定化メカニズムや細胞の凍結保存を議論する上で重要である。このような点を踏まえ、本研究では凍結水溶液における pH 緩衝成分および多価アルコールの挙動を多面的に評価し、凍結による溶液物性変化の分子論的理解を目指した。

凍結水溶液の pH 測定 リン酸緩衝液やフタル酸緩衝液、サリチル酸緩衝液の検討を行い、凍結による除去機構について考察した。また電位差測定から得られた pH の値の妥当性について計算及び pH 応答性の色素を用い蛍光分光法測定を行うことにより検証した。リン酸緩衝液やサリチル酸緩衝液においては凍結により、緩衝液成分が濃縮され、共焦点の高い（溶解度の低い）塩が選択的に除去されることにより pH が大きく変化する課程を明らかにした。一方フタル酸緩衝液では電位差測定ではうまく評価できず、蛍光分光法測定により、単純濃縮が起きていることを明らかにした。

多価アルコールの氷／液相界面での挙動について

(1)共存液相の形態 共焦点蛍光顕微鏡観察を行った結果、アルコールの親疎水のバランスに応じて凍結により氷相中に生じる液相の形態が異なり、氷と液相成分との親和性の違いが示唆された。具体的には Gly や 1,3-propanediol などでは共存液相が氷表面全体に広がって存在し、氷との親和性が高いことが示唆された。一方 13BD では共存液相が分散して存在し、Gly に比べて氷との親和性が高くないことが示唆された。本観察結果は Gly と 13BD では氷界面での挙動が異なることを示唆するものであった。

(2)ラマン分光法 Gly や 13BD を含む共存液相中の水の構造をラマン分光法により評価した。相図から 253 K における Gly や 13BD の共存液相を反映していると考えられる 50 wt% アルコール水溶液を用い、スペクトルの温度依存性を調べた。3050–3750 cm^{-1} に現れる OH の伸縮モードに由来するピークが観測され、水素結合の状態を反映することが知られている。いずれの試料でも 3200 cm^{-1} 付近と 3400 cm^{-1} 付近に 2 つ極大値をもったピークが観測され、それぞれ ice-like (IL) と liquid-like (LL) な水に由来すると考えた。ピーク分解により得られた 2 つの水素結合状態の割合 (α_{IL} , α_{LL}) について 298 K ではどちらのアルコール水溶液も α_{IL} , α_{LL} の値が同じであるが、低温になるにつれ 13BD 水溶液の方が Gly 水溶液よりも α_{IL} が大きく、 α_{LL} が小さくなった。このことは 13BD が Gly よりも低温において ice-like な水の構造を促進することを示唆している。シミュレーションにより Gly は

水と均一に混和することが報告されている。したがって、低温で Gly 水溶液中の α_{IL} が大きくなるのは単に水素結合が強くなるためであり、構造的な変化はほとんどないものと考えられる。対照的に 13BD 水溶液に見られた顕著な α_{IL} の変化は低温で微視的な構造の変化が起きていることを示唆している。

(3)NMR 分光法 253 K における共存液相の濃度は 48 wt% である。したがって 48 wt% 以上では未凍結状態であるのに対し、48 wt% 未満では凍結水溶液である。NMR スペクトルから未凍結状態では Gly 濃度が下がるにつれて連続的に水と Gly の OH の化学シフトが低磁場側に変化した。このことは Gly と水の環境が濃度依存的に連続的に変化していることを示している。対照的に 13BD 水溶液では 13BD の濃度によらず化学シフトが一定であった。このことは 253 K において水と 13BD が微視的に分相し、クラスター化していることを示唆している。この結果は上述のラマン分光法による結果と整合する。一方、凍結状態において液相の濃度は常に 48 wt% 一定であるため、氷の影響がなければ化学シフトに変化はないはずである。実際、13BD 水溶液では凍結状態でも化学シフトが濃度によらずほぼ一定であった。対照的に Gly 水溶液は 48 wt% 以下でさらに低磁場側にシフトした。これは Gly / 水系では氷と液相成分間に相互作用があり、氷の比界面積が大きいアルコール濃度が低い試料ほど氷の影響を強く受けるためであると考えている。凍結及び未凍結状態下での Gly や 13BD 水溶液中の分子の運動性を評価するため、自己拡散係数と緩和時間 (T_2) を測定した。自己拡散係数の測定結果を Stokes-Einstein の関係式に基づいて考察を行ったところ 13BD は Gly と比較し、低温、更に凍結するとクラスター化が促進されることを明らかにした。氷表面での分子の運動を評価するために T_2 緩和時間の測定を行った。その結果、Gly は氷との比界面積が大きくなるにつれ運動性が大きく低下するのに対し、13BD はほとんど変化がなかった。このことは Gly と氷との間の強い相互作用を示唆している。

結言 pH 緩衝液や多価アルコールを含む凍結水溶液の挙動について、多面的な角度から検討を行った。凍結による pH 変化は緩衝液成分の濃縮もしくは選択的な塩の除去によるものであることを確認した。また氷/液相界面での Gly と 13BD の挙動は全く異なるものであることを明らかにした。Gly は凍結水溶液下でも水分子と分子的に均一に混合している一方、13BD は微視的に分相し、クラスター化していることを明らかにした。