Dynamics of water in the partially crystallized gelatin water mixture

部分的に氷結したゼラチン水溶液の水のダイナミクス

Kaito SASAKI, Masahiko MIYARA, Rio KITA, Naoki SHINYASHIKI and Shin YAGIHARA

Department of Physics, Tokai University, 4-1-1 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292, Japan

TEL: +81-463-58-1211 FAX: +81-463-59-2207 e-mail: naoki-ko@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

(Received 31 January, 2013 Accepted 20 June, 2013)

Dielectric relaxation process of water was investigated for 30 wt% gelatin-water mixture at frequencies between 1 MHz and 50 GHz in subzero temperatures down to -50 °C. Below the melting temperature T_m , part of water crystallized and another part of water, uncrystallized water (UCW), remained in a liquid state with gelatin in an uncrystallized phase. At T_m , the relaxation strength, relaxation time, and relaxation time distribution change abruptly, and their subsequent changes with decreasing temperature are larger than those above T_m . These large temperature dependences below T_m can be explained by the increase in gelatin concentration in the uncrystallized phase $C_{g,UCP}$ with decreasing temperature.

Keywords : Gelatin, Water, Partial crystalization, Dynamics, Dielectric relaxation

I. INTRODUCTION

これまでに、合成高分子水溶液やタンパク質水溶液について断熱熱量計や示差走査型熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry: DSC) などの熱分析により、水の凍結及び融解についての研究が盛んに行われてきた。¹ 様々な高分子溶液で観測される水の融解によるエンタルピー変化 ΔH は溶液中のすべての水が凍結した場合と比較して小さい値を持つ。これは融解温度 T_m 以下でも凍ることなく、液体状態を維持した不凍水と呼ばれる水が存在するためであると考えられる。しかし、これらの熱的な観測手法では不凍水を直接観測することができない。

誘電分光法 (Dielectric Relaxation Spectroscopy: DRS) は幅広い観測時間窓を持ち、分子運動を詳細に議論することができる強力な手法である。広い温度、濃度範囲における様々な合成高分子水溶液の研究² や、非水素結合性液体を溶媒とした合成高分子溶液の研究³、部分的に氷結したウシ血清アルブミンを始めとした球状タンパク質の研究^{4,5} から不凍溶液の存在が確かめられており、溶媒の部分的な凍結が系のダイナミクスを支配していることが明らかになっている。

これまでに我々はタンパク質の一種であるゼラチンを用いた水溶液のガラス転移に関する研究^{6,7} を広帯域の誘電分光法を用いて行ってきた。本研究ではより高周波領域を詳しく観測することで、水のダイナミクスを明らかにするものである。そのために溶質濃度 30 wt% のゼラチン水溶液を調整し、凍結する温度を含む -40~25 °C の温度範囲を 1 MHz~50 GHz の周波数域で誘電分光測定を行った。さらに -55~25 °C の温度範囲を昇温速度 5 °C/min で示差走査型熱量計による熱分析を行った。

II. EXPERIMENTAL

II-A. Methods

誘電分光測定は 2 つの装置を用い、周波数範囲 1 MHz~50 GHz で行った。周波数範囲 1 MHz~3 GHz の測定には Impedance/Material Analyzer (Agilent Technologies, E4991A) (IMA) を用い、周波数範囲 100 MHz~50 GHz の測定には Network Analyzer (Agilent Technologies, N5230C) (NA) を用いた。循環式恒温槽を用いて NA では温度範囲 -10~25 °C の間で、 ± 0.1 °C の範囲に温度を安定させて測定を行った。また、IMA での測定には Quatro Cryosystem (Novocontrol) を使用し、測定温度範囲 -50~25 °C の間で、 ± 0.01 °C の範囲に温度を安定させた。IMA での測定には平行平板型電極を用い、NA での測定には接触式の同軸

SAS Award was given to this paper presented as Poster Presentation at the 2012 SAS Intelligent Symposium.

開放端電極(Agilent Technologies、85070E)を用いた。

また、示差走査型熱量計(Perkin Elmer、DSC7)(DSC)により、ゼラチン水溶液の融解に伴う熱の出入りを-55~25 °C の範囲で測定した。測定前にベンゼン、1,2ジクロロエタンを用い、測定と同じ昇温、降温速度で校正を行った。測定には、ヘリウム雰囲気下において、アルミニウムの容器に封入された 10 mg 程度の試料を、25 °C から-60 °C に 5 °C/min の冷却速度で冷却し、-60 °C で 10 分間放置した後、5 °C/min の昇温速度で 25 °C まで加熱しながら測定した。

水は過冷却状態になりやすく、結晶化温度は冷却速度によって大きく変化し、議論が困難である。そのため本研究では、昇温過程における融解を観測した。

II-B. Sample

溶質として使用したゼラチンは、PM Biomedicals 製、豚皮由来のものであり、ブルーム強度 251 bloom、分子量約 60,000 g/mol である。一般にゼラチンなどの生体高分子は電解質高分子であるため、その水溶液は溶液に含まれるイオンによる直流電気伝導成分(dc)や電極分極の寄与により、分子運動に起因する緩和が隠れてしまう。それらを軽減するためにゼラチンに対して脱イオン処理を施した。まず、ゲル化させた濃度 10 wt% 程度のゼラチン水溶液を 5 mm 角の立方体に裁断し、純水に浸す。ここで用いた純水は、蒸留後、純水製造器(Millipore, SimSimplicity UV)を用い、紫外線による滅菌や活性炭フィルターによるろ過、イオン交換樹脂による脱イオン処理などの精製を施したものであり、比抵抗は 18.2 MΩ・cm であった。ゼラチンゲル中に含まれるイオンは、純水中に分散されるため、ゼラチンからイオンを除去することができる。脱イオン処理を 5 日間行い、最初の 1 日は数時間おきに 5 回以上、2 日目以降は 1 日最低 2 回水換えを繰り返した。その後、水分を除去するために凍結乾燥を行った。溶媒には上記のものと同一純水を使用し、ゼラチン濃度 C_g が 30 wt% となるようにそれぞれ混合した後、60 °C に加熱し均一な試料を調製した。

III. RESULTS

III-A. DRS

Figure 1 に DRS 測定により得られた様々な温度での誘電率(ϵ')と誘電損失(ϵ'')の周波数依存性を示す。最も低い温度、-50 °C では、誘電損失においてブロードなピークが 10 MHz 付近に見られる。このピークは温度上昇に伴い高周波側へシフトし、25 °C では 10 GHz 付近にピークを持つ緩和へと続く。

Fig. 1. Real and imaginary parts of the complex permittivity for 30 wt% gelatin-water mixture at various temperatures: ●, -50°C; ○, -40°C; ■, -30°C; □, -20°C; ◆, -17°C; ◇, -14°C; ▲, -11°C; △, -8°C; ▼, -5°C; ▽, -2°C; ◀, 15°C; ◁, 25°C.

測定された複素誘電率からそれぞれの緩和の情報を得るため、式(1)のように 3 つの Coe-Cole の式⁸と直流電気伝導成分(dc)の寄与を重ね合わせることで複素誘電率の周波数依存性を再現した。

$$\epsilon^* = \epsilon_\infty + \sum \Delta\epsilon / (1 + (j\omega\tau)^\beta) + \sigma / j\omega\epsilon_0 \quad (1)$$

ここで ω は角周波数、 β は緩和の形を表すパラメータ、 $\Delta\epsilon$ は緩和強度、 τ は緩和時間、 σ は電気伝導度である。本研究では測定周波数範囲に明確なピークを確認することができる I 緩和にのみ注目する。

Figure 2 に I 緩和の τ (a)、 $\Delta\epsilon$ (b)の温度依存性を示す。図から、 τ 、 $\Delta\epsilon$ の温度依存性について、0 °C 以上と -10 °C 以下の範囲ではゆるやかな変化が見られる。しかし、0 °C から -10 °C の範囲では劇的な変化が見られる。Figure 2 (b)の直線は 0 °C 以上のプロットから最小二乗法を用いて引いた。

III-B. DSC

Figure 3 に DSC による熱測定によって得られた熱流の温度依存性を示す。溶液中の氷の融解によるブロードな

Fig. 2. Temperature dependences of relaxation time (a) and relaxation strength (b) for 30 wt% gelatin-water mixture. Solid line is given by least-squares method from $\Delta\epsilon$ above T_m .

吸熱ピークが $-10\sim 0^\circ\text{C}$ の間で見られる。このピーク面積から融解熱 $\Delta H=164\text{ J/g}$ を得た。測定された ΔH から、以下の式(2)により不凍溶液相の濃度 $C_{g,UCP}$ を算出することができる。

$$C_{g,UCP}=C_g/(1-(\Delta H/333)) \quad (2)$$

純水 1 g の融解熱 333 J/g を用いてゼラチン水溶液の融解熱量から凍っていない水の量を算出し、 $C_{g,UCP}$ を見積ると $C_{g,UCP}[DSC]$ は $59\text{ wt\%}$ となった。

Fig. 3. DSC thermogram for 30 wt% gelatin-water mixture.

IV. DISCUSSION

25°C での I 緩和の τ が純粋な水の緩和時間⁹とよく一致することから、ゼラチン水溶液で観測された I 緩和は、低温でも結晶化しない不凍水のダイナミクスに起因するものであることが分かる。また、一般に緩和強度は温度の上昇に伴い減少するため、 $-10\sim 0^\circ\text{C}$ で見られる $\Delta\epsilon$ の不連続性は氷の融解による不凍水の増加によるものと考えられる。

融解温度、 T_m 以上での $\Delta\epsilon$ が Figure 2 (b)に示した直線のように温度の変化に対して一次関数的に変化すると仮定すれば、以下の式を用いることで T_m 以下での $C_{g,UCP}$ を算出することができる。

$$C_{g,UCP}=C_g/(C_g+(100-C_g)\Delta\epsilon/\Delta\epsilon_{all}) \quad (3)$$

ここで、 C_g は調製したゼラチン濃度、 $\Delta\epsilon_{all}$ は T_m 以下におけるそれぞれの温度で T_m 以上での緩和強度の温度依存性から推測される、すべての水が凍らなかつたと仮定した場合の I 緩和の緩和強度である。Figure 4 に式 3 から得られた $C_{g,UCP}$ と温度の関係を示す。Figure 4 から、十分低い温度で $C_{g,UCP}$ は $80\sim 85\text{ wt\%}$ 程度であることがわかる。温度の上昇にともない、 -10°C 付近から低下し始め、 0°C 以上で C_g と一致する。DSC による熱分析で得られた $C_{g,UCP}[DSC]=59\text{ wt\%}$ と比較すると、 $20\text{ wt\%}$ ほど高い値となり一致しない。この原因は、2 つの測定法で試料の温度履歴が全く異なることが考えられる。DRS 測定では各温度での測定前に最低 20 分は温度の安定化を行うが、DSC での測定は 5°C/min の速度で温度を変化させながら測定を行う。そのため、DSC での熱分析では氷の結晶が十分に成長することができず不凍水量が多くなり、不凍溶液相のゼラチン濃度が低くなると考えられる。

Fig. 4. Temperature dependence of gelatin concentration in the uncrystallized phase $C_{g,UCP}$ for 30 wt% gelatin-water mixture.

次に $C_{g,UCP}$ と T_m 以下での τ の関係を Figure 5 に示す。図中の黒塗りのプロットは 0°C のデータである。図から、 τ は溶液中の氷の融解による不凍溶液相の濃度低下に伴い、黒の×で示した 0.2°C での純粋な水のプロット⁹に近づいていることが分かる。ことから、不凍溶液相の水の τ の急激な変化は、 T と $C_{g,UCP}$ によって決定されることが考えられる。これらを部分的に凍結した合成高分子水溶液中の不凍水のダイナミクス²と比較すると非常によく似ていることがわかった。

Fig. 5. Relaxation time against the gelatin concentration in the uncrystallized phase $C_{g,UCP}$ for the 30 wt% gelatin-water mixture. The “×” symbol is the τ for pure water at 0.2°C taken from Ref. 9 and the filled symbol indicate data at above T_m .

V. CONCLUSION

周波数範囲 1 MHz~50 GHz、温度範囲 $-50\sim 25^\circ\text{C}$ 、濃度 30 wt% のゼラチン水溶液の昇温過程による DRS 及び DSC 測定により、氷の融解に伴う水のダイナミクスの変化を観測した。その結果を以下の項目にまとめる。

- 1) 30 wt%ゼラチン水溶液においても 0°C 以下でも凍らない水が存在することが DRS 測定で確かめられた。
- 2) 液体状態の水の緩和強度の温度依存性から、 -10°C 以下での不凍溶液相のゼラチン濃度は 80~85 wt% であることがわかった。
- 3) $-20\sim 0^\circ\text{C}$ の τ の急激な変化は、部分的な凍結による不凍溶液相のゼラチン濃度の増加に支配されることがわかった。
- 4) DRS 測定と DSC 測定では、算出された不凍溶液相

のゼラチン濃度が異なった。

現段階では測定結果のばらつきも大きく、また、他のタンパク質水溶液での報告がないため、明確でないことも多い。しかし、DRS 測定からは誘電緩和パラメータを通して、ダイナミクスや不凍水量などの情報を得ることができる。

ACKNOWLEDGEMENTS

本研究の一部はJSPS科研費22540420、東海大学プロジェクト研究「水構造プロジェクト」、科学技術振興機構研究成果展開事業・先端計測分析技術プログラムの支援を得て遂行された。関係各位に深謝する。

REFERENCES

- ¹ F. Franks, *Water, A Comprehensive Treatise*, (Plenum Press, New York), Vol. 7, Chapter 3, 1982.
- ² N. Shinyashiki, M. Shimomura, T. Ushiyama, T. Miyagawa and S. Yagihara, *J. Phys. Chem. B*, 111, 10079 – 10087, (2007).
- ³ N. Shinyashiki, M. Asano, M. Shimomura, S. Sudo, R. Kita and S. Yagihara, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 21, 1937 – 1946, (2010).
- ⁴ A. Panagopoulou, A. Kyritsis, R. Sabater i Serra, J.L. Gómez Ribelles, N. Shinyashiki and P. Pissis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1814, 1984 – 1996, (2011).
- ⁵ N. Shinyashiki, W. Yamamoto, A. Yokoyama, T. Yoshinari, S. Yagihara, R. Kita, K. L. Ngai and S. Capaccioli, *J. Phys. Chem. B*, 113, 14448 – 14456, (2009).
- ⁶ K. Sasaki, K. Hujita, Y. Hikita, W. Yamamoto, N. Kuriyama, R. Kita, N. Shinyashiki and S. Yagihara, *Proc. School Sci. Tokai Univ*, 47, 89 – 101, (2012)
- ⁷ K. Sasaki, A. Panagopoulou, M. Miyara, K. Fujita, W. Yamamoto, P. Pissis, A. Kyritsis, R. Kita, N. Shinyashiki, and S. Yagihara, *AIP Conf. Proc.* (in press).
- ⁸ K. S. Cole and R. H. Cole, *J. Chem. Phys.*, 9, 341 – 351, (1941).
- ⁹ R. Buchner, J. Barthel and J. Stauber, *Chem. Phys. Lett.*, 306, 57 – 63, (1999).