

ATP, ADPのガラス形成能と安定性

東京水産大学 食品生産学科

川井 清司, 鈴木 徹, 萩原 知明, 高井 陸雄

Glass Forming Ability of ATP and ADP and Their Stability

Kiyoshi KAWAI, Toru SUZUKI, Tomoaki HAGIWARA and Rikuo TAKAI

Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries

4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477

The stability of amorphous ATP, ADP and trehalose were examined from enthalpy relaxation process below the T_g by DSC. The enthalpy relaxation amount (ΔH) was obtained from the endothermic peak area on DSC heating curve that was appeared after aging for 2 to 48 hours below the T_g . The ΔH of every sample increased with aging time through the increasing rate showed significant variation depending on the kind of materials and aging temperature. The ΔH vs. aging time relation was analyzed to obtain a mean relaxation time constant τ by using Kohlrausch-Williams-Watts (KWW) equation. Then the aging temperature dependency of the τ was evaluated by Vogel-Fulcher-Tammann (VFT) equation. Judging from the obtained parameters in KWW and VFT equations, the amorphous state for ATP and ADP below T_g was suggested to be more stable than for trehalose and sucrose, and that the temperature dependency of the enthalpy relaxation rate below T_g were found to be non-Arrhenius type.

1. 緒 言

生体内にはDNA, ATP, リン脂質など, 多くのリン酸化合物が存在する. 更には微生物から哺乳類すべての細胞質内に100以上の重合層をもつ無機ポリリン酸も見出されている¹⁾. 近年, それが大腸菌のアミノ酸欠乏ストレスを回避する重要な役割を果たしていることが報告された²⁾. このようにリン酸化合物は生化学的には多くの知見が確立されているが, それらの物性, 特に低温における挙動は十分に把握されてこなかった. 筆者らは前報³⁾で, ニリ

ン酸, 三リン酸ナトリウムやATP関連化合物の水溶液が低温 (0℃以下) にて共晶をもたず, 比較的高い温度でその凍結濃縮物がガラス化する事, 更にそれらの凍結乾燥粉末もガラス状態にあることを報告した.

一方, 凍結, 及び凍結乾燥によって生成したガラス状態の安定性が食品や乾燥製剤の安定性に影響を及ぼす可能性があることから^{4,5)}, 近年では T_g 付近及び, 以下での分子運動性に関する議論が盛んに行われている. Angellらは過冷却からガラスに至る温度変化に伴う分子運動性の低下の割合をfragilityとして表現し, ガラス形成物質をstrongとfragileの2種類に分類した^{6,7,8)}. 一方Hancockらはガラスの等温エイジング過程より生じたエンタルピーの減少量から T_g 以下の温度低下に伴う分子の協同運動性の変化を求め, 物質間の相違を示した⁹⁾. 更にこの T_g 以下の

第47回低温生物工学会研究報告 6.

[Key words : ATP, Glass transition, Enthalpy relaxation, KWW, VFT ; ATP, ガラス転移, エンタルピー緩和, KWW, VFT]

(28)

分子協同運動性の変化はAngellらの示すfragilityと密接な関係にあることが示唆されており^{10,11)}, fragileなガラスほどT_g以下においても分子運動性の低下の割合が高く, 故に, 臍形剤や安定剤としての有効性が期待される. このような情報をポリリン酸塩化合物に関しても得るため, 本研究では上記の内, ATP, ADP⁻に関して, それらが形成する凍結乾燥ガラスのT_g以下における分子運動性の変化についてHancockらの方法に従って検討した. また比較としてトレハロースについても同様に検討した.

2. 方 法

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) disodium salt (SIGMA ultra minimum 99%), adenosine 5'-diphosphate (ADP) sodium salt (SIGMA 95-99%), D (+) trehalose dihydrate (SIGMA), の数10%水溶液を調製し, 凍結乾燥によりそれらのガラス化させた粉末試料を生成した. 各々約5mgの試料をDSCアルミニウムセルに封入し, DSC (SIMADZU DSC50)にて以下に示す手順でエイジング及び熱分析を行った. まず, 試料の熱履歴を消すため, T_g+30°Cまで昇温後, すぐにT_g-50°Cまで冷却, その後T_g-10°C~-45°Cの各エイジング温度まで昇温した. 続けてDSC内にて2~48時間エイジング後, T_g-50°Cまでいったん冷却, 再度T_g+30°Cまで昇温走査した際にT_g付近にて検出される吸熱ピーク面積よりエンタルピー緩和量(ΔH)を求めた. 全ての走査は5°C/minで行い, 温度, 熱量はインジウムにて校正した.

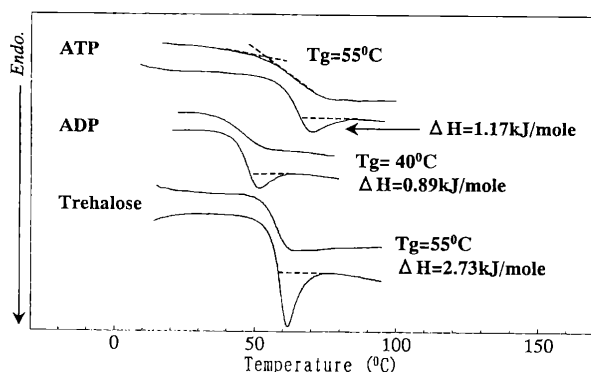


Fig. 1. Typical DSC heating curves of fresh and aged glassy ATP, ADP and trehalose. The aging for these samples was performed for 48h at T_g-15°C.

3. 結 果

本研究においては, 昇温過程でガラス転移のためDSC曲線上のベースラインが傾き始める温度, 即ち傾きの接線とベースラインの接線の交点をT_gとし, このT_gを基準として各温度にてエイジングを行った. 例としてT_g-15°C, 48hエイジング前後のDSC昇温曲線をFig. 1に示す. どのDSC曲線においてもT_g付近にてベースラインのシフトではなくエンタルピー緩和による吸熱ピークを示し, このピーク後のベースラインの接線からはみ出したピーク面積をエンタルピー緩和量(ΔH)とした. ここで, エンタルピー緩和とは, ガラス化する全ての物質に共通の自発的減少であり, 非平衡状態の高いエンタルピーにある分子がある速度をもってより安定なエンタルピーの低い平衡状態へと移行する過程を意味する. このエンタルピーの緩和したガラスを昇温するとガラスからラバーになる際, 減少したエンタルピーを取り戻すべく, 通常のガラス-ラバー転移より多くのエネルギーを吸収する事から, DSC曲線上ではT_g付近にて吸熱ピークとなって検出され, このピーク面積がエンタルピーの緩和した量として求められる. Fig. 1はすべて同じエイジング温度, 時間であるが, 明らかにトレハロースと比較しATP, ADPの緩和量は少ない事が分かる. その他のエイジング条件においても同様の傾向が確認された. ΔHとエイジング時間の関係をFig. 2に示すが, いずれの物質でもΔHはエイジング時間の増加と共に単調に増加する傾向を示した. また, ここでは示さないが, エイジン

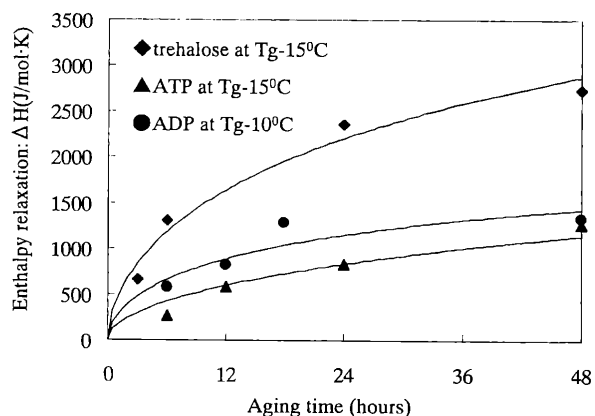


Fig. 2. Enthalpy relaxation-aging time course at various aging temperature. The solid lines were obtained by fitting to KWW equation.

グ温度の低下と共に ΔH は相対的に減少した。Fig. 2中に示した近似曲線はKohlrausch-Williams-Watts (KWW) Eq.1へのフィッティングにより得られたものである。KWW式は多くのアモルファス物質の初期エンタルピー緩和過程を最も良く表現する式として知られ^{9,12,13}、以下のように定義される。

$$\Phi_t = \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta\right] \quad (\text{Eq.1})$$

ここで τ は緩和時間定数を、 β は緩和時間の分布を示すパラメータ、 t はエイジング時間を示す。 Φ_t はエンタルピー緩和関数を意味し、Eq.2式より求められる。

$$\Phi_t = 1 - \left(\frac{\Delta H_t}{\Delta H_\infty}\right) \quad (\text{Eq.2})$$

ΔH_t は実験で求められた t 時間のエイジングにおけるエンタルピー緩和量を示し、 ΔH_∞ は最大エンタルピー緩和量としてEq.3より求められる。

$$\Delta H_\infty = (T_g - T) \cdot \Delta C_p \quad (\text{Eq.3})$$

T はエイジング温度、 T_g はガラス転移温度、 ΔC_p はガラス転移に伴う熱容量変化をそれぞれ意味する。実測された ΔH と測定条件からEq.2,3より ϕ_t を求め、 τ と β にベストフィットする値を外挿することでFig. 2の様な近似曲線が得られた。他のエイジング温度の結果に関してもまた、その挙動はKWW式によく従い、それぞれのエイジング温度での τ と β が求められた。更にここで得られた τ を温度 T_g/T に対しAngellタイプにプロット^{6,7,8}したものをFig. 3に示す。また図中の近似曲線はVolgel-Fulcher-Tammann (VFT) Eq.4へのフィッティングにより求められたものである。本来VFT式は T_g 以上の過冷却から T_g を経て、構造エントロピーが0となる T_0 への分子運動の変化を予測する式として知られているがHancockらは T_g 以下の分子運動性に関するデータにもまたVFT式を適応した⁹。

$$\tau = \tau_0 \cdot \exp\left(\frac{T_0 \cdot D}{T - T_0}\right) \quad (\text{Eq.4})$$

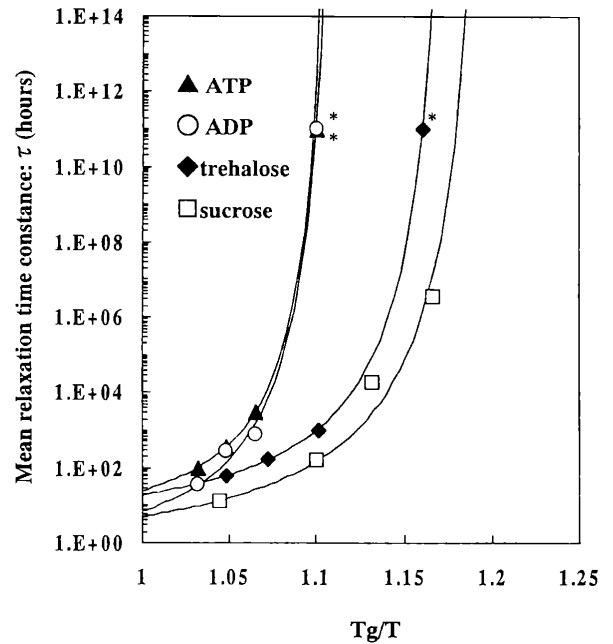


Fig. 3. The relation between mean relaxation time constant τ and T_g/T . The solid lines were obtained by fitting to VFT equation. The point denoted by subscript * means that at the point no enthalpy recovery has been observed at least within 48h. The plots for sucrose were taken from ref.9, and the fitting curve was recalculated in this study.

ここで τ_0 は、ある分子が他の分子から一切の影響を受けない、完全に解放されたときの緩和時間定数、 D はAngellによりstrengthパラメータと定義され、fragilityと密接な関わりを持つもので、 D の値が高いほどstrongな、低いほどfragileなガラスに分類される^{6,7,8}。また T_0 はガラス化する物質に固有な値で、0 K以上の温度で見積もる事のできる分子運動が完全に抑制された、系の構造エントロピーが0になる温度として定義される^{7,10}。これらの定数にベストフィット値を与える事でFig. 3に示した近似曲線が得られた。比較のため、文献よりスクロースのデータも同図に掲載したが、明らかにATP、ADPはトレハロース、スクロースと比べ、 T_g 以下において急激に分子運動性は低くなることが伺え、またその挙動は非アレニウスのことが示唆された。以上の結果により得られたその他のパラメータをTable 1にまとめた。

4. 考 察

β は緩和時間の分布の狭さを示す尺度であり0～1の範囲で、ほとんどの高分子において0.5の値を

(30)

Table 1. The parameters in KWW and VFT equations.

Compound	β	τ_0 (hour)	T_0 (K)	Tg- T_0	D	moisture content (wt%)
ATP	0.53-0.55 (Tg-10- -20°C)	0.81	294.2	34	0.39	6.7
ADP	0.54-0.62 (Tg-10- -20°C)	0.12	278.2	33	0.48	11.2
Trehalose	0.56-0.87 (Tg-15- -30°C)	1.10	274.5	51	0.52	8.2
Sucrose ⁹⁾	0.40-0.80 (Tg-15- -45°C)	0.25	290.0	60	0.62	

有すると報告される^{9,12,13)}。一般に分子量の小さいもの程 β の値は大きくなると報告されるが¹³⁾、本研究においてもADPやトレハロースと比べやや分子量の高いATPの β は両者と比べ高い値を示した。このように物質間の相違を明確に示すことから、 β はガラス状物質の状態を把握するの一つの手がかりと思われる。しかしTable 1に示す様に、 β はエイジング温度の低下と共にわずかな増加を示しているが、一般的には低下の傾向を示すとされており¹³⁾、今後より詳細な検討が必要とされる。

VFTパラメータに関して T_0 はほとんどの高分子においてはTgより50°C低い温度とされるが¹³⁾、近年ではfragilityの高い物ほどTg- T_0 値は小さいと考えられている^{7,10)}。Fig. 3にも示した様にATP, ADPのTg- T_0 値はトレハロース, スクロースと比較して非常に低い値を示した。しかし、その他のVFTパラメータ、即ち τ_0 やDは一般に報告される値⁹⁾、 τ_0 は 10^{-9} オーダー、Dはfragile glass formerで10以下から大きく外れた値を示した。即ち、 τ_0 は高く、Dは低い結果であった。これは前述したようにVFT式は過冷却から T_0 への分子運動性を評価するのに適した式で、Tg以上の温度でそれらのパラメータが一般的に求められている。本研究のようにガラス状物質のTg以下におけるデータに適用したものと単純に比較できないのかもしれない。また、ある水分含量の範囲内においてはそのfragilityにも影響を及ぼす事が報告されているが⁶⁾、今回用いた試料はどれも異なる水分含量である事もふまえ、Tg以下の分子運動性に関しては多くの議論の余地を残すが、おおよそ、本研究より判断した場合、disaccharideと比較して、ATP, ADPは高いTg³⁾と共に高い T_0 を有し、Tg以下において安定な

fragileガラスに属すると考えられ、故に、賦形剤や安定剤として非常に有効である可能性を期待できるものと思われる。何故ATP, ADPがこのような特異な傾向を示すのか、構造的解釈は得られていないが、糖と比較した場合、マイナスに荷電したリン酸基、カチオンを多く持つ事などが影響しているのかもしれない。

文 献

- 1) Kornberg, A.: *J. Bacteriol.*, **177**, 491 (1995).
- 2) Kroda, A., K. Nomura, R. Ohtomo, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kornberg: *Science*, **293**, 705 (2001).
- 3) Kawai, K., T. Suzuki, T. Hgiwara and R. Takai : *Cryobiol. Cryotechnol.*, **46**, 60 (2000).
- 4) Franks, F.: *Cryo-Lett.*, **11**, 93 (1990).
- 5) Slade, L. and H. Levine: *In "In water relationships in food"* H. Levine and L. Slade, ed., Plenum Press, New York, p.29 (1991).
- 6) Angell, C. A., R. D. Bressel, J. L. Green, H. Kanno, M. Oguni and E. J. Sare: *J. Food Eng.*, **22**, 115 (1994).
- 7) Angell, C. A.: *J. Non-Cryst. Solids*, **131-133**, 13 (1991).
- 8) Angell, C. A.: *Science*, **267**, 1942 (1995).
- 9) Hancock, B.C., S. L. Shamblin and G. Zografi: *Pharmaceut. Res.*, **12**, 799 (1995).
- 10) Hatley, R. H. M.: *Pharm. Dev. Tech.*, **2**, 257 (1997).
- 11) Haward, R. N. and R. J. Young: *In "The Physics of Glassy Polymers*, 2nd ed." J. M. Hutchinson, ed., Chapman & Hall, London, p.85 (1997).
- 12) Champion, D., M. L. Meate and D. Simmatos: *Trends Food Sci. Tech.*, **11**, 41 (2000).
- 13) Matsuoka, S. *In "Relaxation Phenomena in Polymers"* S. Matsuoka, ed., Oxford University Press, New York, p.42 (1992).