

キトサンの NMR 測定に関して

2011/05/30

内容

I. 初めに	2
II. NMR とは	2
▼NMR とは?	2
▼NMR 分光法原理	3
a. 分光法原理	3
b. 装置の概要	3
c. 測定される核種	3
III. キトサンの溶解について	4
IV. キトサンの NMR 測定について	5
V. NMR 測定結果の解析	6

I. 初めに

最初に、我々の所属する天然物活性構造化学研究室の紹介を行います。

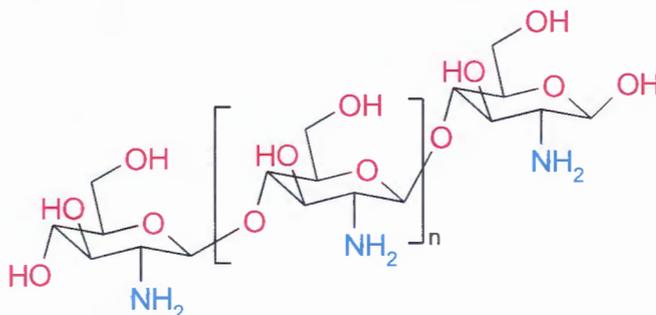
生物は自分の生命を維持するため、あるいは外敵から身を守るためにいろいろな物質(化合物)を生産しています。我々人間は昔からそれら物質を食料、医薬、農薬、あるいは化粧品等として利用して生活を豊かなものにしてきました。しかし、利用しているのはそれらのほんの一部でしかないのです。

本研究室では生物、特に植物と微生物から有用な生理活性物質を検索し、それらの化学構造を光学機器を使用し解析、研究するとともに、よりすぐれた医薬や農薬などの開発に取り組んでいます。また、植物の細胞や微生物を利用して新しい有用物質を生産させたり、それら物質の生体内での機能を化学と生物の知識を活用して解明しよう と日々研究を行っております。

主な研究テーマとして、南米産の薬草中に含まれる活性成分に関する研究、植物の成長を制御する化合物に関する研究、コケの生産する生理活性物質に関する研究を行っています。

今回、株式会社マインドエース通商様より、キトサンの構造解析に関して依頼を受け、 $^1\text{H-NMR}$ 測定を行ったので以下にその結果報告について記載します。

キトサンの化学構造を以下に示す



$n > 9$ をキトサンと称する(学術的には高分子と定義される)

有機酸を含む水溶液中においては、遊離アミノ基とカルボキシル基が電気的な結合を生じ、塩を形成して溶解する。

II. NMR とは

NMR(nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴)は有機化学にとって必須のものである。

▼NMR とは？

約 50 年ほど前核磁気共鳴現象が見出され、近年複雑な天然物や人工高分子が興味を中心であり、これらの複雑な有機化合物の分子構造解析を可能にしたものが **NMR 分光法**である。有機化合物を扱う研究をしている方なら毎日のように使っているもので、これは、一言で言うと「**スペクトルから分子を構成する原子1つ1つを区別し見ることができ、分子を構成する原子同士のつながりがわかる**」という画期的な手法である。それでは実際どのように**分子を見ている**のだろうか？

次に NMR の原理について解説する。

▼NMR 分光法原理

a.分光法原理

NMR 分光法の原理を図に示した。順を追って説明してみる。



図1 外部磁場中での核スピンの様子(図2のサンプル管の中)

※核磁気モーメント(核スピン)は形式上図のように↑で表している。

- 1 外部から何も磁場がかかっていない状態である。原子核は正電荷をもち、回転しているため磁場が発生している。その結果、原子核はある物理量と方向をもっている。これを核磁気モーメント(核スピン)という。このときは核スピンも方向はばらばらで回転している。
- 2 外部から強力な磁石により↑方向に磁場をかけた状態である。核スピンは磁場の方向↓と逆の方向↑の2種類に分かれる。
- 3 磁場と逆方向の核スピンの方が磁場に逆らっているので、エネルギーが高くなる。それに従いエネルギーの大きさに分けた。ここで、ラジオ波領域の電磁波をあててエネルギー差に相当するエネルギーを与えてやると図のように上のエネルギー順位に跳ね上がる。この電磁波の吸収・放出過程、つまり核磁気共鳴を見ているものが NMR 分光法である。

b.装置の概要

この原理を使って測定する装置の概略を図2に示した。図のような装置を使って測定する。試験管(サンプル管)に磁場をかけ、高周波発振器によってラジオ波をあてると、上記に示した原理に従って核磁気共鳴が起こり、試料を取り巻いているコイルに微小電流が放出する。この電流が、増幅器によって増幅され最終的に図2の右端のようなピークとなって記録される。

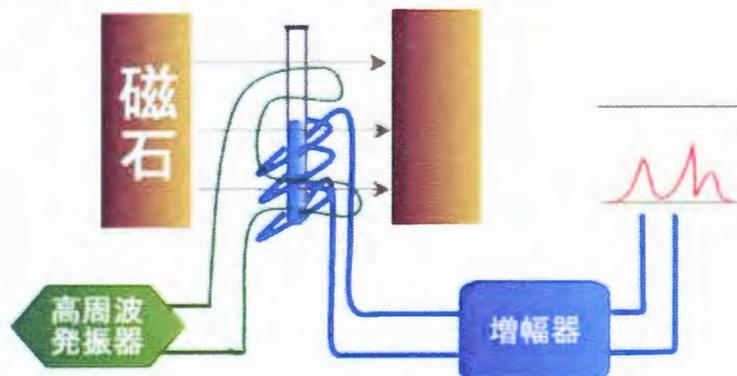


図2 NMR 装置の概念図

c.測定される核種

それではどんなものを測定するのだろうか？NMR では核種によって大きく様子のことなるスペクト

ルが得られる。有機化合物の解析の際よく用いられるのは水素核 ^1H と炭素核 ^{13}C についての NMR スペクトルである。観測している核種について、それぞれ ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR などと表記する。この二つは有機化合物においては必ず測定されており、膨大なデータが蓄積されている。水素核 ^1H は最も感度のよい核の一つであり、試料が数 mg あれば十分きれいなスペクトルが得られる。

<http://www.chem-station.com/yukitopics/nmr-kiso.htm> 参照

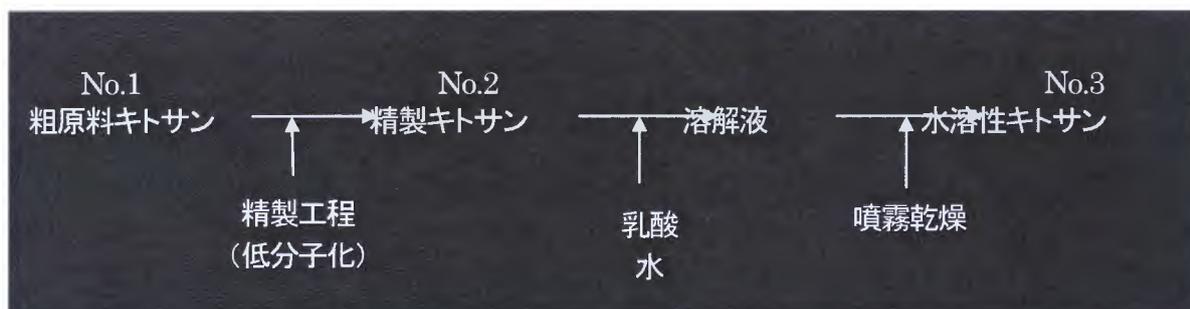
III. キトサンの溶解について

当該会社より現在販売している商品マインドエースに使用している水溶性キトサン(キトサン乳酸混合物)、その水溶性キトサンを製造する際の原料となるキトサン精製粉末およびキトサン精製粉末の原料となるキトサンの 3 種 9 検体(Tale1.Fig.1)が試供された。

	試料 No.	外観(目視による)	0.5%粘度
粗原料キトサン	No.1-1	不定形(2cm 以下)の鱗片状 やや気色味をおびている	100cps 以上
	No.1-2	不定形(2cm 以下)の鱗片状 やや気色味をおびている	100cps 以上
	No.1-3	不定形(2cm 以下)の鱗片状 やや気色味をおびている	100cps 以上
精製キトサン	No.2-1	粉末(355 μ m 以下)、褐色	10cps \pm 2
	No.2-2	粉末(355 μ m 以下)、褐色	10cps \pm 2
	No.2-3	粉末(355 μ m 以下)、褐色	10cps \pm 2
水溶性キトサン	No.3-1	粉末(221 μ m 以下)、黄色、 成分として乳酸を含む	10cps \pm 2
	No.3-2	粉末(221 μ m 以下)、黄色、 成分として乳酸を含む	10cps \pm 2
	No.3-3	粉末(221 μ m 以下)、黄色、 成分として乳酸を含む	10cps \pm 2

Table 1. 試供試料一覧

Fig. 1. 水溶性キトサンまでの製造工程



上記知見を基にして、NMR で使用する測定溶媒に対する溶解度を明らかにするために、各試料約 1.0mg 秤量し、酢酸 1.0ml を加えて溶解度の検定を行った。酢酸とキトサンのみの場合、粘稠で溶解性が悪く、物理的な操作を加えても 5 日間で完全な溶解を確認することはできなかった。そこで、酢酸の量を倍にしたが、完全溶解は行えなかった。

次に、水への溶解性を試みた。キトサン 2.0mg に対して、精製水 2.0ml を加え、約 0.1% の濃度にし、溶解性を確認した。結果は No.1 および No.2 に関する溶解は確認することができなかったが、No.3 について、溶解を確認した。

この事は、既知事実である、キトサンの溶解において水と有機酸の存在が不可欠であることを明らかにしているとの裏付けとなった。

以上の結果 Table2. に示す。表中に示した－は溶解を確認できなかった条件、＋は溶解を確認できた条件である。

Sample No.	Weight(mg)	HOAc 1.0(ml)	HOAc 2.0(ml)	H ₂ O 2.0(ml)
No.1-1	1.0	－	－	
	2.0			－
No.1-2	1.0	－	－	
	2.0			－
No.1-3	1.0	－	－	
	2.0			－
No.2-1	1.0	－	－	
	2.0			－
No.2-2	1.0	－	－	
	2.0			－
No.2-3	1.0	－	－	
	2.0			－
No.3-1	1.0	－	－	
	2.0			＋
No.3-2	1.0	－	－	
	2.0			＋
No.3-3	1.0	－	－	
	2.0			＋

注) HOAc は酢酸を示す。

Table 2. 試供キトサンの溶解性結果

上記結果から、酢酸と水の混合溶媒に対する溶解性を検討した。試料 10.0mg に対して、水と酢酸の混合比 5:3 とし全量を 600 μ l とした。NMR の分解能を考慮すると溶質濃度をできるだけ高く設定出来ればよいのであるが、No.1 の粘度が高いため、1.6% として、他の試料も同一濃度とした。

IV. キトサンの NMR 測定について

Ⅲ. における溶解性の結果から、測定溶媒を重水素化溶媒【重水(D₂O):重酢酸(CD₃COOD)= 4:6】を用いサンプル No.1 の NMR 測定を行った。また、No.2 および No.3 に関しては、その測定溶媒を重水素化溶媒【重水(D₂O):重酢酸(CD₃COOD)= 5:3】として測定を行った。

No.1 のキトサンに関する測定条件は以下の通りである。

測定装置: 日本電子(JEOL)LAMBDA 500

測定方法: 500MHz(^1H -NMR)

試料採取量: 10.0mg

溶解溶媒: $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{COOD} = 4:6$ 600 μl (キトサン濃度約 1.5%)

内部標準: 3-(トリメチルシリル)プロピオン酸-2,2,3,3- d_4 ナトリウム

No.2 および No.3 のキトサンに関する測定条件は以下の通りである。

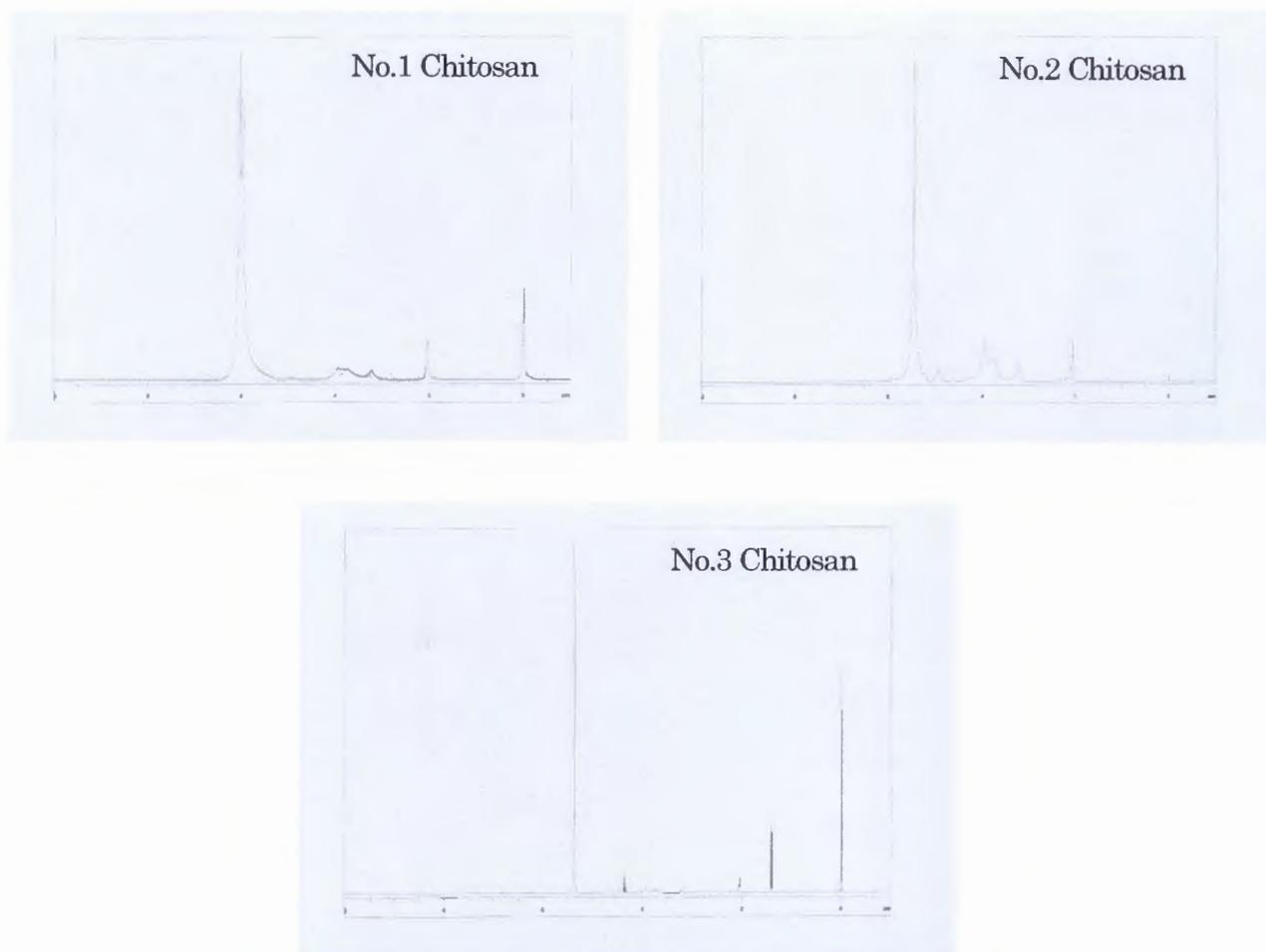
測定装置: 日本電子(JEOL)LAMBDA 500

試料採取量: 10.0mg

溶解溶媒: $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{COOD} = 5:3$ 600 μl (キトサン濃度約 1.5%)

内部標準: 3-(トリメチルシリル)プロピオン酸-2,2,3,3- d_4 ナトリウム

各キトサンの測定結果をそれぞれ以下に示す。



3種のキトサンのNMRスペクトルチャートを比較すると、No.1およびNo.2はともに処理の異なるキトサンであるが、水酸基の糖鎖の水酸基の出現周波数域である δ 3~5ppmのピークの出現がNo.2の方が綺麗なチャートであることから、No.1に比べてNo.2の方が経験的に純度の高いキトサンと推定できる。また、No.3のチャートは乳酸の存在を示すピークも存在しており、乳酸とキトサンの混合物であり、溶液中ではキトサン乳酸塩の構造が示唆される。

以下に各チャートの解析を示す。

V. NMR 測定結果の解析

No.1、No.2 および No.3 の試料について拡大チャートとそれぞれの官能基のケミカルシフトを帰属した。

キトサンは、N-Acetyl 基(CH₃COO⁻)を持つアセチルグルコサミンユニットと N-Acetyl 基を持たないグルコサミンユニットのランダムに混在した構造を有していることから、それぞれの糖ユニットに起因するピークの出現が予測できる。また、No.3 に関しては、乳酸との混合物であることから乳酸に帰属されるピークの出現もある。

各糖ユニットおよび乳酸の構造式を Fig2~4 に示す。

Figure 2 N-アセチルグルコサミンユニット構造式

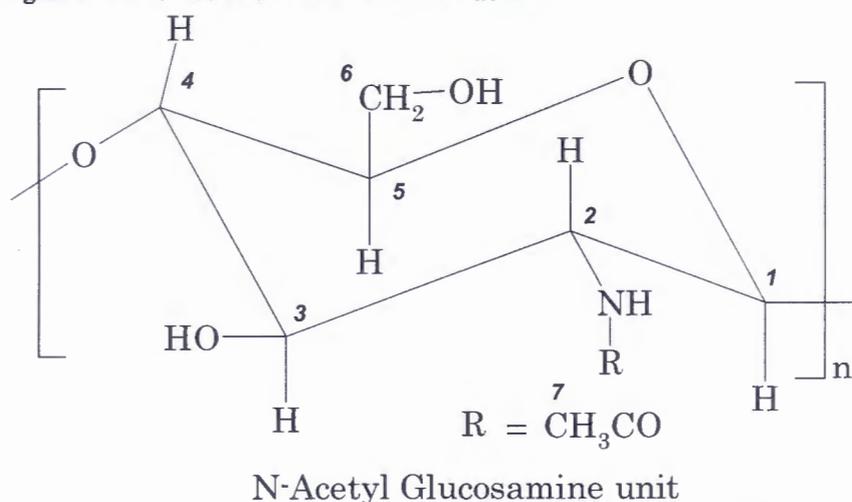


Figure 3 グルコサミンユニット構造式

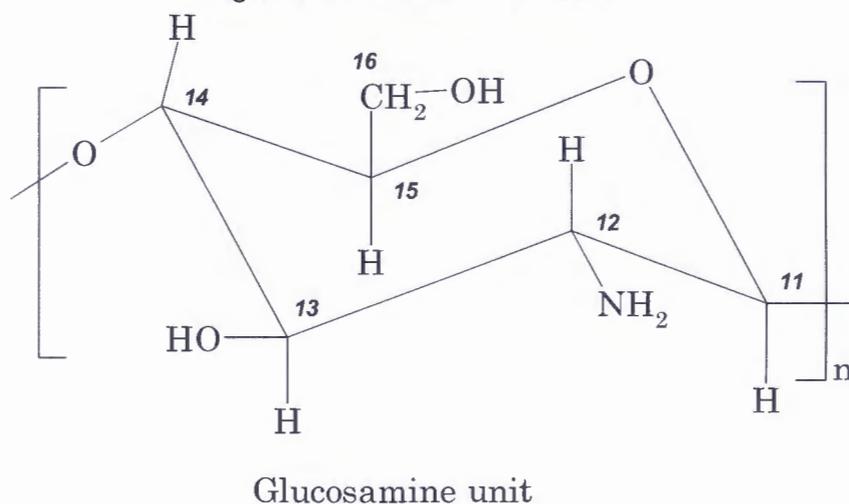
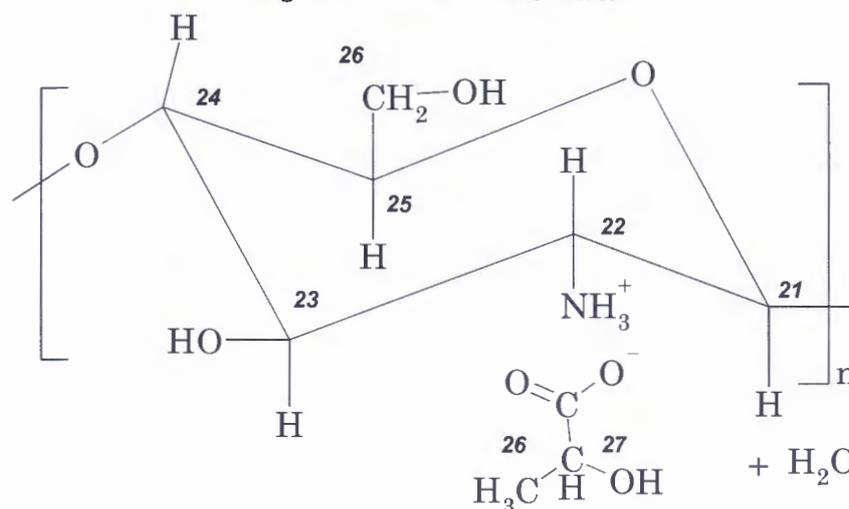


Figure 4 マインドエース原料粉体



Chitosan-Lactic acid complex

No.1 のチャート

δ ppm	水素 No.
0.00 (s)	内部標準品 3-(トリメチルシリル)プロピオン酸-2,2,3,3- <i>d</i> ₄ ナトリウム
2.04 (s)	N-アセチルグルコサミン残基のアセチル基 7
3.24 (m)	糖ユニット 2、12、22
3.71 (m)	糖ユニット 6'、16'、26'、5、15、25
3.93 (m)	糖ユニット 6、16、26、4、14、24、3、13、23
4.95 (m)	アセチルグルコサミンユニット及びグルコサミンユニット 1、11、21
5.99 (m)	D ₂ O(重水)
6.05	

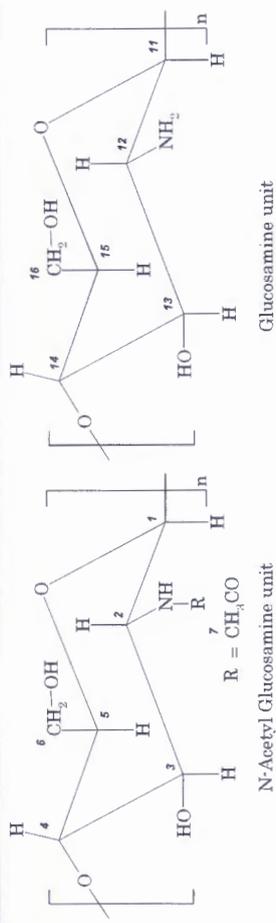
No.2 のチャート

δ ppm	水素 No.
0.00 (s)	内部標準品 3-(トリメチルシリル)プロピオン酸-2,2,3,3- <i>d</i> ₄ ナトリウム
2.06 (s)	N-アセチルグルコサミン残基のアセチル基 7
3.22 (m)	糖ユニット 2、12、22
3.74 (m)	糖ユニット 6'、16'、26'、5、15、25
3.94 (m)	糖ユニット 6、16、26、4、14、24、3、13、23
4.91 (m)	糖ユニット 1、11、21
5.45 (b)	D ₂ O(重水)

上記2種の試料はともにキトサン単体の試料であるが、粘度および他の要因によるものであろうか、明らかにピークの明瞭さが異なっている。この事は、キトサンの純度、粘度あるいは分子量に影響されるのではないかと推察する。

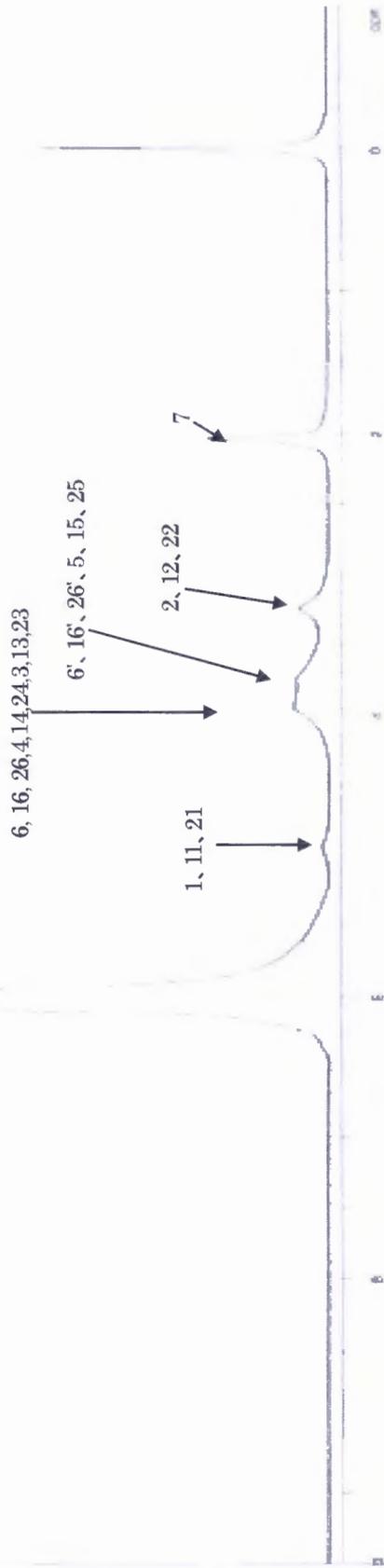
N-アセチルグルコサミン単位およびグルコサミン単位に関係するピークは出現していることが明らかになった。

No.1 Chitosan

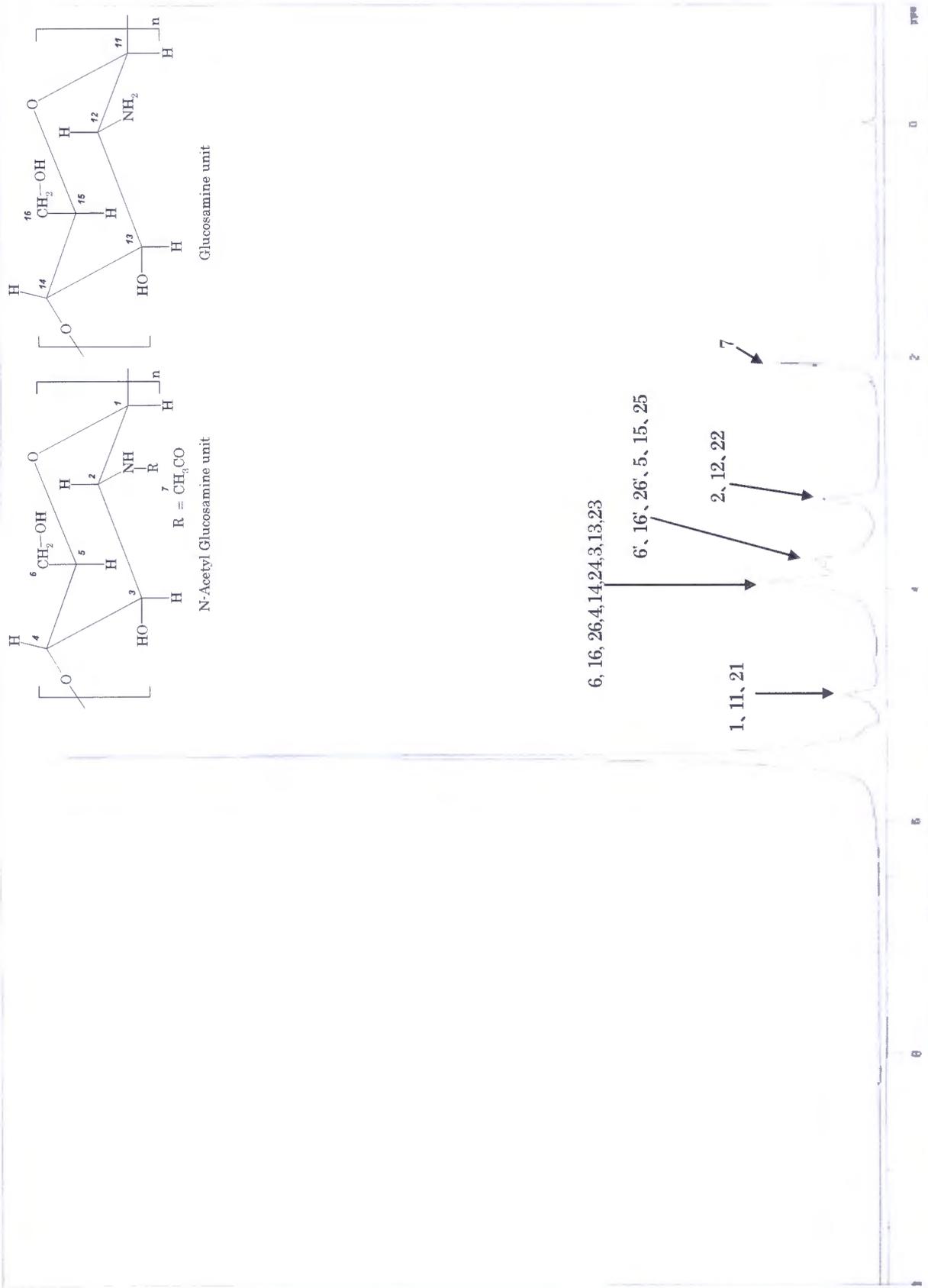


Glucosamine unit

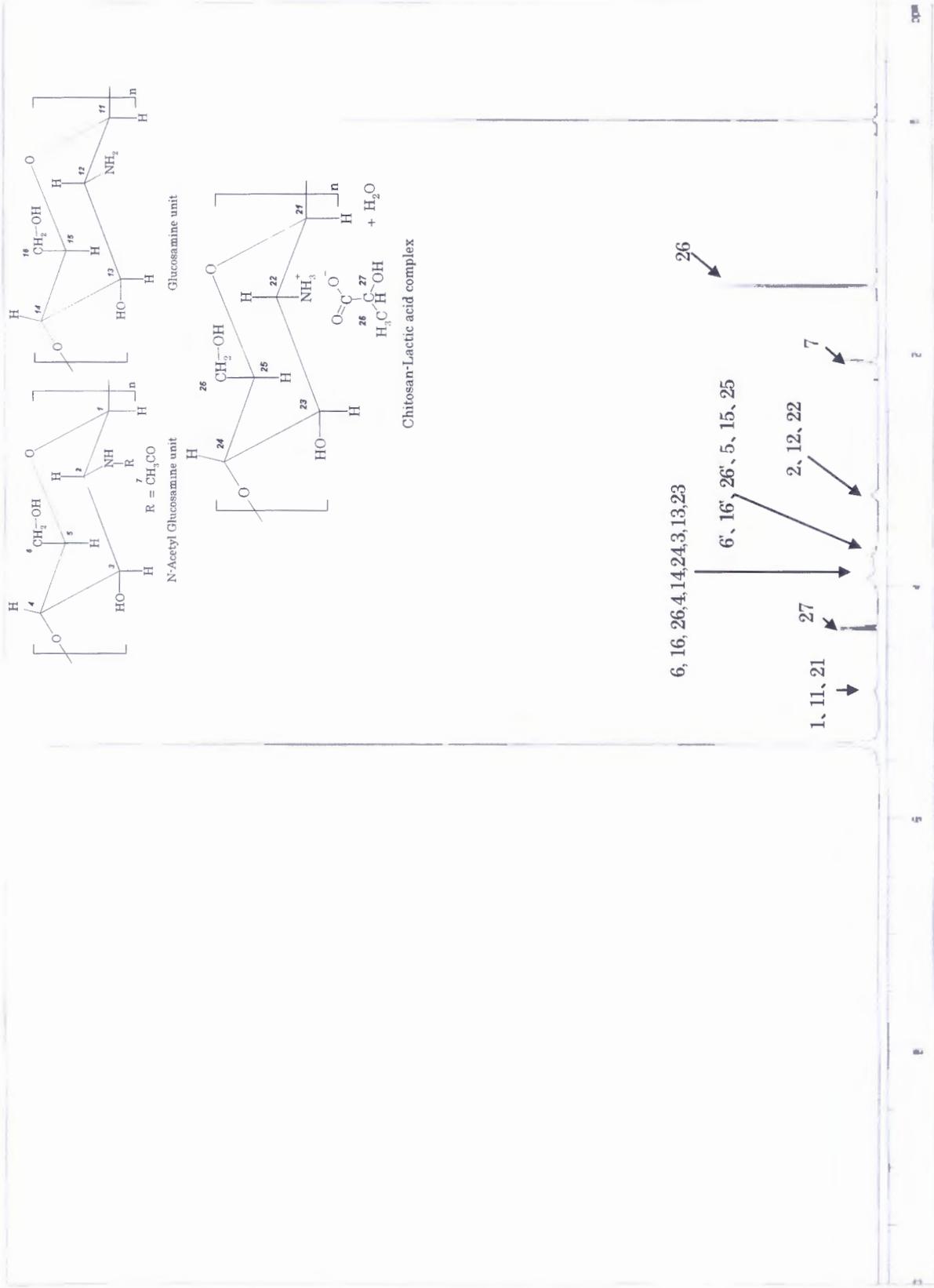
N-Acetyl Glucosamine unit



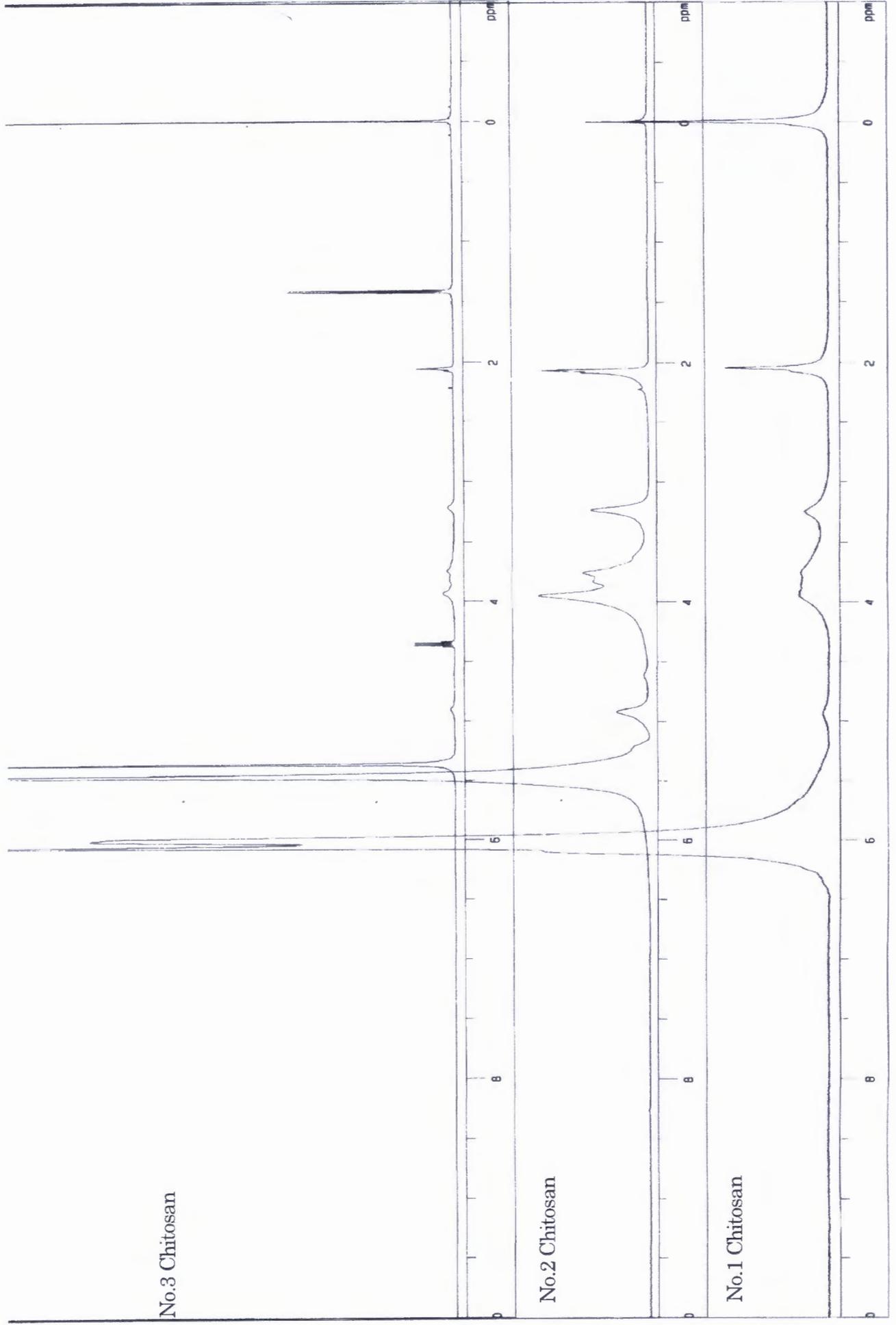
No.2 Chitosan



No.3 Chitosan



三種試料の比較



No.3 のチャート

試料 No.3 のキトサンは、現在株式会社マインドエース通商において販売されている商品の原料として利用されているキトサンと乳酸の混合物である。

チャート中に見られる各ピークのケミカルシフトは以下のとおりである。

$\delta_{\text{H ppm}}$	水素 No.
0.00 (s)	内部標準品 3-(トリメチルシリル)プロピオン酸-2,2,3,3- <i>d</i> ₄ ナトリウム
1.41 (d)	乳酸の CH ₃ -基 26
2.05 (t)	N-アセチルグルコサミン残基のアセチル基 7
3.21 (b)	糖ユニット 2、12、22
3.73 (b)	糖ユニット 6'、16'、26'、5、15、25
3.92 (b)	糖ユニット 6、16、26、4、14、24、3、13、23
4.35 (q)	乳酸 27
4.90 (b)	アセチルグルコサミンユニット及びグルコサミンユニット 1、11、21
5.36 (s)	D ₂ O(重水)

マインドエースの原料に使用されているキトサンの乳酸含有粉体は、水溶液中では乳酸塩を形成していることが、この NMR から推測される。

以上が測定結果である。No.1～No.3 のチャートを重ねた時、水に関してのケミカルシフトが、純度が上がることで、高磁場にシフトしていることは、分子中の結晶構造に起因するものとする。

以上