

食品成分中の水の分析へのNMRの応用

Application of Nuclear Magnetic Resonance to Investigation of Water in Food

埼玉県工業技術センター北部研究所

小島登貴子

Saitama Industrial Technology Center — Northern Laboratory

Tokiko Kojima

Nuclear magnetic resonance (NMR) provides a rapid, sensitive, direct and a nondestructive determination of not only the quantity of water present, but also the structure and dynamic characteristics of water in complex system, such as foods. Through proton longitudinal (T_1) and transversal (T_2) relaxation times measurements, we could investigate the mobility of water. NMR techniques have been developed to observe molecules in a variety of food systems, such as starch, porotein, mixed with sucrose or salt. The use of ^{17}O NMR has been shown to be the most effective method for the observation of water mobility.

This paper reviews recent results on the application of NMR to the studies on water in food systems.

[1] はじめに

食品中の水の状態の把握は、物性や保存性はもちろんその他の特性を知る上で非常に重要である。NMRは食品のような多成分系において非破壊的に水の状態を測定するのに優れた方法である。 H_2O を対象とした生体高分子—水系のNMR測定においては、シグナル強度から不凍水（結合水）の量について、緩和時間から水分子の運動性について知ることができる。また、水の緩和挙動の研究には、 ^1H 以外に ^2H や ^{17}O などの核もプローブとして用いることができる。このようなNMR測定から、食品成分中の水について様々な情報が得られるが、ここでは食品の中でもNMRによる水の状態分析が多く報告されている、小麦粉関連成分を中心として、測定法や測定上の留意点及び応用例に関して触れてみたい。

[2] 緩和について

緩和には、吸収したエネルギーの放出過程と、核スピンの歳差運動の位相がそろった状態からばらばらになる過程があり、前者を縦緩和またはスピン—格子緩和、その緩和時間を T_1 、後者を横緩和またはスピン—スピン緩和、その緩和時間を T_2 とよぶ¹⁾。 T_1 が短いことは、スピンと格子の相互作用が強くて、エネルギーの高い状態のスピンが、すぐに格子にエネルギーを与えて、エネルギーの低い状態に戻ることを意味する。 T_1 緩和においては、分子運動の速さが共鳴周波数と同じ程度の時に最も緩和が生じやすくなる。温度が高くなると分子の運動が早くなるから、温度の関数として T_1 を考えると、ある温度に対し T_1 が最小値を持つ。一方、横緩和は磁気的な相互作用により緩和が生じることから、電子スピンを持つ不純物、鉄などの強磁性体、酸素分子などの常磁性体の存在は T_2 を短くする。また、温度が高くなり分子運動が激しくなると T_2 は増加する²⁾。

緩和の機構にはいくつかの過程があるが³⁾、 $I=1/2$ の ^1H では T_1 、 T_2 のどちらの場合も双極子—双極子相互作用が主な緩和経路として考えられる。一方 $I>1/2$ の四極子核である ^2H ($I=1$) や ^{17}O ($I=5/2$) では四極子緩和が主な経路となり緩和速度が大きくなり、線幅も広がる。

次にそれぞれの緩和時間の測定法であるが、 T_1 は主に反転回復法、すなわち $180^\circ - \tau - 90^\circ$ 法で測定される。磁化 M があるとき、時刻0で x' 軸に沿って 180° パルスをかけると M は z' 軸に沿って反転する。時間

τ 後に同様に 90° パルスをかけると残りの M は y' 軸に回転し、単一スペクトルを得る。 Z 軸方向の磁化成分 M_z の減衰は

$$dM_z/dt = -(M_z - M_0) / T_1$$

で与えられ、 $t=0$ のとき、 $M_z = -M_0$ で積分し、書き換えると

$$\ln(A_\infty - A_\tau) = \ln 2 A_\infty - \tau / T_1$$

A_τ : 時刻 τ にかけられた 90° パルスによって生じた自由誘導減衰信号(FID)の最初の大きさ

A_∞ : τ を充分長くとしたときの A_τ の値

を得る。従って T_1 は τ に対して $\ln(A_\infty - A_\tau)$ をプロットしたその勾配から決定される。一方 T_2 は基本的にスピンエコー法、すなわち $90^\circ - \tau - 180^\circ$ パルス系列を用い、 2τ 後にFIDの”エコー”を観測する。 90° パルスによって M は y' 軸に倒された後、時刻 τ において x' 軸方向に 180° パルスをかけ、時刻 2τ 後に $-y'$ 軸上に位相のそろった M を観測する。 T_2 は分子の拡散による影響を受け応用範囲に限界がある⁴⁾。固体、粉体では通常 T_2 が小さく、また分子の拡散を無視できるが、分子の拡散が無視できない液体では改良スピンエコー法であるCPMG法⁵⁾が用いられる。

ところで、食品のような多成分系では、様々な状態の ^1H が存在するが、含水率の多い場合、NMRで測定される ^1H は水分子による信号が優勢であることが多い。さらに水が n 種類の相からなる場合、

Zimmerman, Brittin の理論から、相の異なる水どうしの交換が非常に早いとき

$$1/T = \sum P_i / T_i$$

となり、交換が十分遅ければ、 n 個の相の T_i に分解できる⁶⁾。Derbyshire(1982)は速い交換を伴う2相モデルを用い、“bound”水(緩和速度, R_B)と“free”水(緩和速度, R_F)の存在量から実測の緩和速度(R_{obsd})を次式で表している。

$$R_{\text{obsd}} = P_B R_B + P_F R_F$$

P_B 、 P_F : 結合水と自由水のモル分率

Fanni⁷⁾らは、NaCl/ β -Lactoglobulin系の水の運動性について、自由水とタンパク質に結合した水について測定し同様の解析を行い、水分活性¹(water activity, A_w) 0.76~0.97 のこの系において、結合水量 0.18~0.6 g/g DM²を得ている。

[3] 生体高分子の水和について

生体高分子の水和はその構成要素であるアミノ酸や単糖の水和によって決められる。そしてそれぞれ特有のコンホメーションから大きな影響を受ける。そのため低分子のイオンの水和と異なり、生体高分子と水の相互作用は、協同的な特性を持つ。

単糖の持っているOH基は、水分子と水素結合することができ、圧縮率、等蒸気圧法、DSC、液化曲線、ガラス転移温度、誘電緩和等の測定から、グルコース1モル当たり、3から4モルの水が水和するとされている⁸⁾。

一方タンパク質の水和は構成要素のアミノ酸分子中の極性基との作用が大きく寄与する。そして、球状タンパクの場合、側鎖の極性基が水和の第1座であるのに対し、繊維状タンパクの場合、ペプチドのアミド基が大きな寄与を与える。また球状タンパク質の水和については、上平らが3相モデルを提案し、それぞれの回転相関時間(τ_c)を示している⁹⁾。

*1 水分活性は水溶液の蒸気圧(p)と純水の蒸気圧(p_0)との比であり($A_w = p/p_0$)、食品の A_w は蒸気圧法や一定湿度下における平行重量測定法、その他種々の方法で測定される。食品中の水が反応に利用される程度を表す良い指標と考えられ、食品の品質特性や品質保持について、この A_w から多く論じられている。

*2 g/g DM は乾燥重量当たりの割合を示す。(DMはdry matter)

〔4〕 NMRによる測定— ^{17}O による測定の優位性

生体高分子の水和量および生体系の水の物理状態は、種々の方法によって測定することができるが、測定される量が長い時間の平均値か、それともごく短い時間に起こる変化を観測しているかによって得られる水と量や水の状態は必ずしも一致しない。NMRでは $10^{-12} \sim 10^{-6}$ sの短い時間での分子の運動状態が分かる。

糖水溶液中の水のプロトンのNMRは糖分子のOH基のプロトンとの交換のため、水分子の運動を知るには不便であり、一方、アミノ酸の極性基に含まれるプロトンもまた、水のプロトンと交換可能である。この点 ^{17}O は ^1H や ^2H と異なって、溶質分子に含まれる酸素原子との交換は考える必要はないので有利である。ただし、中性付近ではプロトンとのカップリングのためスペクトルの線幅が広がる。これを避けるためには、溶液を酸性あるいはアルカリ性にするか、 ^1H 照射 (proton decoupling) を行う必要がある。

Richardsonら³⁰⁾は小麦粉懸濁液中の水の運動性を ^1H と ^{17}O から測定している。この中で ^1H 測定における問題点として、(1)水分子と高分子のプロトンの交差緩和、(2)状態の異なる水のプロトン交換による ^1H スペクトルの広幅化を上げている。一方、 ^2H NMRの緩和測定は交差緩和の影響はないが、化学交換は起こりうることをあげ、これらの影響を受けない ^{17}O 測定の優位性を指摘している。また前述のDerbyshireモデルに加え、Kumonsinskiのモデルから、活性度とNMR緩和速度の直線関係について調べた。この結果、活性度と ^{17}O の緩和時間の直線関係が明らかになった。さらに、小麦粉の H_2O と D_2O の懸濁液の ^{17}O の緩和時間を比較し、 D_2O がプロトン交換による ^{17}O スペクトルの広幅化をおさえ、四極子緩和が主な緩和機構となることを示した。また、 ^1H と ^{17}O 核それぞれの測定による緩和速度の比較を行い、絶対値では異なるものの、変化のしかたについての小麦粉濃度依存性が同様であったことから、 ^1H NMRの T_2 でも水の運動性をモニターしうると結論している。

〔5〕 結合水量 1 の測定

生体高分子中の水の状態は、定性的には結合水と自由水に分けられる。この場合の自由水は低分子水溶液中の溶媒としての水のようなものではなく、全水分量から結合水量を差し引いた残りの水分量である。結合水の量は測定法によって異なるが、不凍水の量から求める場合には測定温度によっても異なる。ここで生体高分子中の結合水量の測定例をいくつか示したい。

Toledoら¹⁰⁾はWide-Line NMRを用いて、混合物のコロイド系中の水について -18°C で凍らない不凍水を結合水 (bound water, BW) と定義し、小麦粉ドウ中の結合水量 $0.29 \pm 0.01 \text{ g/g DM}$ を得ている。この量は水分24.6%以上のドウで、水分量に依存せず、またこの結合水は -50°C まで液状を示したとしている。

一方Shanbhagら¹¹⁾は小麦粉、コーンスターチ、卵白中の結合水を室温で測定して、物質中のBW量や最大BW量を定量する方法を開発した。これは、Wide-Line NMRを用いて最も低いラジオ波周波数 (attenuation 0 dB)の時に、BWのみが強いシグナルを示すことから、新たにBWを定義している。この結果それぞれの成分について結合水含量 (Bound Water Capacity, BWC) 33.0, 26.0, 35.3%という値を得て、これまでの不凍水量の測定値、小麦粉22.5% (-18°C)、トウモロコシ33.8% (-20°C)、卵白31% (-70°C) と比較考察した。

最近の研究としては、Cornillonら¹²⁾が低分解能パルスNMRにより -40°C 結合水量を測定し、熱容量のモデル化を行っている。Heldman(1974)の仮説から -40°C における不凍水を結合水と仮定するもので、得られた結合水量は寒天 0.66 g/g DM 、ショ糖 0.05 g/g DM 、デンプン 0.26 g/g DM 、ゼラチン 0.44 g/g DM 、アルブミン 0.31 g/g DM であり、ショ糖を除きこれまでの数々の研究結果との一致を見ている。さらに各成分の熱容量を測定して、NMR測定値から得た計算値とを比較することで、食品ゲルの熱伝導率のモデルの検証を行っている。

*1 結合水の定義は研究者により異なる。一般には生体高分子に直接接触している水 (束縛水) から数層上までを含む。水分子の回転相関時間 (τ_c) で定義する方法もある。水和が強いほど τ_c は大きく、 T_1 は小さくなる。

[6] 水の運動性

食品や生体物質中の水の緩和時間の測定は、様々な情報を与える。前述のように水の運動性は ^{17}O で測定することが望ましいが、 ^1H の緩和時間測定から、水の状態について簡便に、重要な情報を得ることができる。ここではこうしたNMRの緩和時間測定の、多方面にわたる応用例について触れてみたい。

1) 水の多相性

Langら¹³⁾は、パルスNMRを用いて、高分子（デンプン、カゼイン）と添加物（ショ糖、NaCl）及びその混合物（デンプン-ショ糖、カゼイン-NaCl）系の、 A_w が0.75~0.95における ^1H の T_1 と T_2 を測定した。緩和曲線の傾き、つまり T_1 が、デンプンとカゼインでは小さく、ショ糖と食塩では大きく、混合物ではその中間を示した。食品中ではこのような高分子に水和した水と溶質に水和したが混在するとしている。

Chinachotiら¹⁴⁾もデンプン-ショ糖系の、 A_w 0.86~0.97における ^1H の T_1 と T_2 測定を行っているが、 T_2 については、不均一な磁場により引き起こされる分子拡散のために算出ができなかった。測定される T_1 はスピン拡散と交差緩和の影響を受けるとしているが、同時に測定された試料中の水の量との関連性が明らかにされたことから、 T_1 値を用いて高分子に結合した水(polymer water)と添加物に結合した水(solute water)のモデル式を得ている。

Beltonら¹⁵⁾は、小麦グルテンの高分子サブユニットについて、 D_2O 置換したサンプルの ^1H - T_2 から交換不可なタンパク質中のプロトンについての情報を、 D_2O と水和したサンプルの ^2H - T_1 、 T_2 から、交換可能なプロトンについての情報を得ている。この結果、それぞれについて T_2 値が異なる3つの成分が確認されている。このことは食品などの物質中には多種類の環境におかれた水が混在していることを示している。

2) 水の運動性と物性

食品の物性には、含水量はもとより、水の状態、成分との相互作用が大きな影響をを与えられ考える。従って物性を評価するために水分やその状態について把握することは大きな意味を持つ。NMRによる緩和時間測定は、非破壊で水についての情報が得られることから、物性を捉えていく上で非常に有利な方法であるといえる。そこでNMR測定と物性の関連性を示した研究例を示す。

Richardsonら¹⁶⁾は、小麦粉懸濁液についてレオロジーとNMR分析を行いその関係を調べている。小麦粉の H_2O 及び D_2O 懸濁液中の ^{17}O の緩和時間は、15~20%の小麦粉の濃度で水の運動性の変化が生じており、他の高分子についての比較から（リゾチームで5~10%、牛の血清アルブミンで10%）とタンパク質分子と近接した水の作用によるとしている。また、懸濁液は物性測定から3つの領域に分けられ（ニュートン流体的、プラスチック擬似体的、粘弾性的）それぞれの領域中で水の運動性と粘性の間に負の直線関係が得られたとしている。

Cherianら¹⁷⁾は小麦粉グルテン中の水の動きをみるために、 D_2O と ^{17}O 標識水（0.1% ^{17}O -enriched）で水和したグルテンをそれぞれ ^2H と ^{17}O NMRで測定した。その一方ガラス転移の変化を物性と示差熱分析(DSC)測定から得て、水の運動性と物性値の比較を行った。 ^2H シグナル強度は、物性測定によるガラス-ゴム転移変化に平行して変化し、系の物理的な状態に強く依存した。一方 ^{17}O NMRは0.15 g / g DM以上で測定可能であり、吸着等温線の自由水域に対応した。

筆者ら¹⁸⁾は ^1H - T_1 および ^{23}Na - T_1 、 T_2 の測定を行い、生麺の乾燥工程中の変化を追跡した。これについて、次節で述べる。

3) デンプンの糊化

Chinachotiら¹⁹⁾はデンプンの糊化温度(T_p)におけるショ糖とNaClの影響を ^{17}O NMRにより調査した。 T_p - T_2 の関係をみると、高濃度のNaCl添加はショ糖添加と同様の効果を示したのに対し、低濃度のNaClはイオン効果により複雑化し、溶媒の運動性がデンプンの糊化を説明するのに有効であることを示した。さらにこれらデンプンの糊化へ同影響の研究に、高分解能 ^{13}C 、 ^{17}O 、 ^{23}Na NMRの応用を検討し²⁰⁾、 ^{13}C シグナル強度が糊化において大きく増加し、炭素鎖の運動性が増加したこと、 ^{17}O - T_2 が糊化温度範囲で急激

に減少し、水がとらえられた様子を示していること、 $^{23}\text{Na}-T_2$ の減少から、Naとデンプンの相互作用が示された等の結果を得た。

Limら^{21) 22)}は小麦デンプン-糖-水系の運動性を ^{17}O の緩和速度 $R_2 = 1/T_2$ から測定している。 R_2 の最高値及びそのときの温度が糖の濃度、分子量の上昇に伴い上昇、つまり水の運動性が減少することが示された。またデンプンの糊化が R_2 が最高値を示した温度付近から直後に生じることから、デンプンの糊化開始温度に与える糖の影響について知見を得ている。

中沢ら²³⁾は、米と米デンプンの老化過程における水の挙動をパルスNMRを用いて定量的に追跡し、含水量と T_1 、 T_2 の変化の関連を調べている。特に含水量の少ない、 $0.6\sim 0.7\text{g/g DM}$ の糊化デンプンにおいて、 T_1 は1日後に増加しその後ほぼ一定になったのに対し、 T_2 は経時的に減少し、またデンプンの種類による値や変化の違いが大きかった。さらに含水量と結合水量の関係から、もち米デンプンとうるち米デンプンの違いを示した。

4) その他

Sato²⁴⁾は、パルスNMRによる簡易水和能力測定法を用いて、食物繊維をその T_2 成分の構成比から水溶性和不溶性に分類し、水和に寄与する官能基を推察している。そして水和能力の高い多糖間での官能基の比較から、6位のカルボキシラート基が多糖類の水和に大きく関与していると推察している。

Kulik²⁵⁾らは、固体NMRの2次元 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 異原子核広幅分離(WISE)法により、A型とB型のトウモロコシデンプン中の多糖鎖の運動性と水の構成を測定している。A型とB型の多糖類で約28%の水が結合すると見積もられたが、グルコース環の結合部位特異性は見られなかった。また、スピン拡散過程の速さから、A型における水分子の運動性がB型に比べ速いと結論され、A型デンプンの糊化温度が低いことを説明するとしている。

[7] NMRによる乾燥工程中の麺の状態分析

筆者らは、麺の製造工程の適正化をはかる目的から、食塩添加量の異なる生麺を作り、乾燥工程中の麺について ^1H および ^{23}Na NMR測定を行った¹⁸⁾。麺の製造においては、使用する小麦粉の性質に応じて食塩添加量や加水量が異なり、これらは温度や湿度の影響を強く受ける。そこで、 ^1H および ^{23}Na の緩和時間について麺の状態を示す指標としての可能性を検討した。この結果、NaCl水溶液中の ^{23}Na の T_1 、 T_2 は濃度依存性があり、高濃度であるほど値が小さくなるのに対し、麺の中の ^{23}Na の T_1 、 T_2 は添加した食塩量に関わらず、麺の水分量を反映していた (Fig. 1)。一方 ^1H の T_1 は緩和の速い成分と遅い成分の2成分に分けて解析されること (Fig. 2)、麺の乾燥による水分の減少に伴いその成分比が変化し、それぞれの成分の緩和速度も変化することなど (Fig. 3) から、乾燥に伴い、麺に含まれる糖質とグルテンの水和構造が変化していることが推察された。さらに麺の物性測定値との比較を行い、食塩添加量による麺の物性の変化とNMR測定結果の関連性等について若干の知見を得ている。

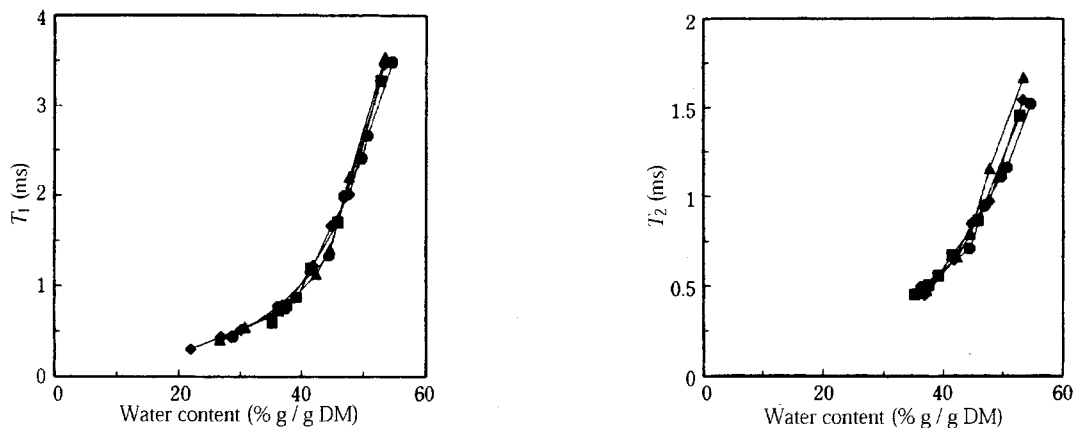


Fig.1 Changes of ^{23}Na relaxation times (T_1 and T_2) during drying

■, 4% salt, 35°C ; ◆, 4% salt, 30°C ; ▲, 2% salt, 30°C ; ●, 8% salt, 30°C

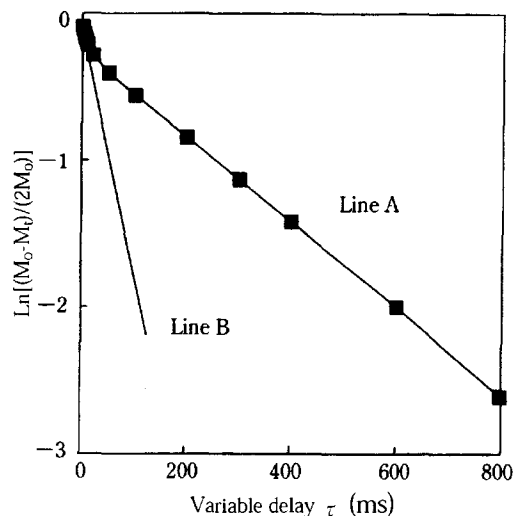


Fig.2 Longitudinal relaxation time (T_1) plots of ^1H illustrating biphasic behavior for raw noodles at 54.2% moisture dry basis M_0 , maximum signal value ; M_t , signal value for value ' τ ' Line A, Long component ; Line B, Short component

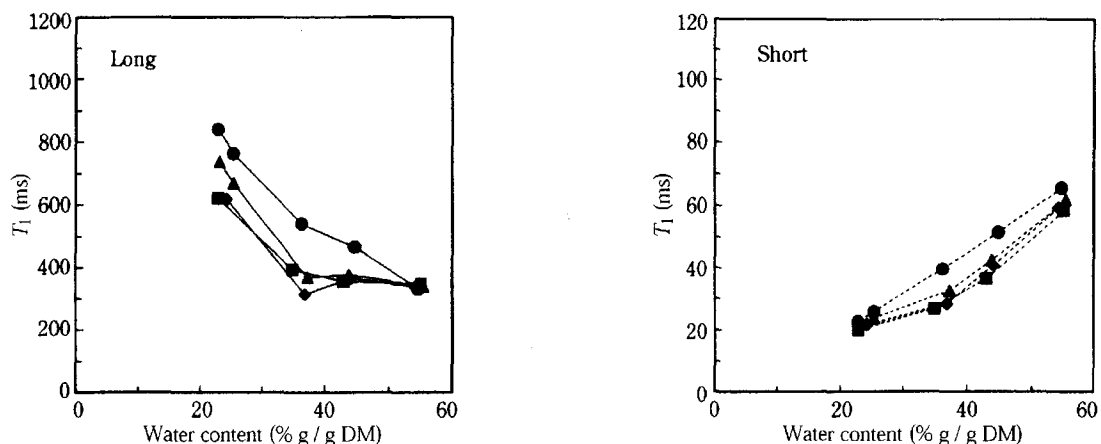


Fig.3 T_1 of ^1H vs. water content in raw noodles
■, 2% salt ; ◆, 4% salt ; ▲, 6% salt ; ●, 8% salt
——, Long component ; - - - - , Short component

[8] おわりに

このように、食品のような多成分系における水の状態について、NMRは非破壊的に重要な情報を与えてくれる有用な手段である。さらに、磁気共鳴画像法 (MRI)からは2または3次元的な水の分布や拡散のしかたを測定ことができる。固体NMRといった手法からは、対象となるサンプルの幅が広がるだけでなくそれぞれの状態を反映したデータの取得が可能となることと思われる。今後、食品の種々の特性の解明や品質管理のために、NMRの応用がさらに期待される。

[9] 文献

- 1) 安藤喬生, 宋宮創”これならわかるNMR”, 化学同人, 京都, 43(1997)
- 2) 中沢文子: 調理科学, 27, 214(1994)
- 3) ファラー・ベッカー”パルスおよびフーリエ変換NMR”, 吉岡書店, 京都, 69(1976)
- 4) E. D. Becker, 齊藤, 神藤訳, ”高分解能NMR”, 東京化学同人, 東京, 200(1983)

- 5) W・ケンプ, 山崎訳”やさしい最新のNMR入門”, 培風館, 東京, 176(1988)
- 6) 森島績編”NMRの生化学への応用”, 化学同人, 京都, 157(1976)
- 7) J. Fanni, D. Cant, K. Elbayed, J. Hardy : *J. Food Sci.*, **54**,909(1989)
- 8) 上平恒, 逢坂昭”生体系の水”, 講談社, 東京, (1989)
- 9) S. J. Richardson, I. C. Baianu, M. P. Steinberg : *J. Agric. Food Chem.* **36**,17(1986)
- 1 0) Toledo R., Steinberg M. P., Nelson A. I. : *J. Food Sci.* **33**,315(1968)
- 1 1) Shanbhag S., Steinberg M. P., Nelson A. I. : *J. Food Sci.* **35**,612(1970)
- 1 2) P. Cornillon, J. Andrieu, J. C. Duplan, M. Laurent : *J. Food Eng.* **25**,1(1995)
- 1 3) K. W. Lang, M. P. Steinberg : *J. Food Sci.* **48**,517(1983)
- 1 4) P. Chinachoti, M. P. Steinberg : *J. Food Sci.* **54**,691(1989)
- 1 5) P. S. Belton, I. J. Colquhoun, J. M. Field, A. Grant, P. R. Shewry, A. S. Tatham : *J. Cereal Sci.* **19**,115-121(1994)
- 1 6) S. J. Richardson, I. C. Baianu, M. P. Steinberg : *J. Food Sci.* **50**,1148(1985)
- 1 7) G. Cherian, P. Chinachoti : *Cereal Chem.* **73**,618(1996)
- 1 8) 小島登貴子, 関根正裕, 杉山純一, 石田信昭, 永田忠博 : 日食工誌, **43**,1098(1996)
- 1 9) P. Chinachoti, V. A. White, L. Lo, T. R. Stengle : *Cereal Chem.* **68**,238(1991)
- 2 0) P. Chinachoti, M.-S. Kim-Shin, F. Mari, L. Lo : *Cereal Chem.* **68**,245(1991)
- 2 1) H. Lim, C. S. Sester, J. V. Paukstelis, D. Sobczykka : *Cereal Chem.* **69**,382(1992)
- 2 2) H. Lim, C. S. Sester, J. V. Paukstelis : *Cereal Chem.* **69**,387(1992)
- 2 3) 中沢文子, 野口駿, 高橋淳子, 高田昌子 : 家政学雑誌, **34**,566(1983)
- 2 4) Y. Sato : *J. Home Econ. Jpn.* **45**,689 (1994)
- 2 5) A. S. Kulik, J. R. C. de Costa, J. Haverkamp : *J. Agric. Food Chem.* **42**,2803(1994)