

近赤外分光法による毛髪中の自由水、結合水の非破壊構造解析

関西学院大学 理工学部

尾崎 幸洋

Near-infrared (NIR) diffuse reflectance (DR) spectra in the 12000-4000 cm^{-1} region were measured for keratin powder. At the initial stage of NIR measurement the keratin powder contained some water. The sample was placed in a vacuum oven at 50°C for 30 minutes and then its spectrum was measured. After that the sample was kept in the oven at 50°C for 5 minutes and then a spectrum was collected again. In this way 11 spectra were obtained. We analyzed two spectral regions, the 7050-6000 and 5350-4090 cm^{-1} regions, where bands due to free and bound water are expected to appear. For example, in the latter region we found a band at $\sim 5180 \text{ cm}^{-1}$ due to weakly hydrogen-bonded free water and a band at 5050 cm^{-1} ascribed to the overlap of strongly hydrogen bonded water and bound water. Probably, by taking the intensity ratio of these two bands, one may be able to explore the relative variation of free and bound water in keratin. The NIR spectra of keratin powder are so close to those of human hair, so that one may use the same technique to estimate the relative contents of free and bound water in human hair.

1. 緒言

毛髪は、主としてケラチンタンパクからなる非常に複雑な構造を持った複合素材である。通常環境下において、毛髪は吸着水として水を保持しており、含まれる水の量は毛髪の物理的性質を大きく変化させ、毛髪の感触や外観、ヘアスタイル維持などに影響を与える。

これまで、毛髪の水分率を測定する方法としては、カールフイッシャー法、重量法が多用されてきた。また、毛髪水分の非破壊測定法については、高周波容量式、電気伝導度法などが提案されている。しかしながら(1)水分率の絶対値評価、(2)非破壊計測、(3)他の化粧品成分に影響されない、(4)広範囲の水分測定が可能、といった条件を全て満足する毛髪水分率測定法は、これまで見当たらない。本研究の目的は、近赤外分光法を用いて非破壊的に毛髪の水分率を測定する方法を開発するとともに、毛髪中の自由水、結合水の区別あるいは構造について研究することにある。

近赤外分光法は非破壊的に生体物質、薬品、農産物、ポリマーなどの水分の定量、水の構造解析ができる方法として注目を集めている¹⁻⁶⁾。コスメトロジーの分野では毛髪のみならず、皮膚やツメの水分定量が近赤外分光法を用いて試みられている。

近赤外分光法を用いた毛髪中の水分率の非破壊的定量については、国内外数ヶ所(海外ではアメリカ、ベルギー、

ドイツ、韓国など)において行われており、特許も申請されている。毛髪の近赤外スペクトル測定専用のセルの提案、水分率測定に関する従来法と近赤外法の比較などが行われている。しかしながらこれらはいずれも単なる水分率の定量をめざしたもので、水の構造や自由水や結合水については議論していない。また毛髪のダメージと水分率との関係についての研究も限られている。自由水や結合水の状態や毛髪中のケラチンの水和、さらにはケラチンそのものを用いたタンパク質の自由水や結合水の研究などは例がなく、本研究の独創的な点といえる。

筆者は1992年世界で初めて毛髪の近赤外スペクトルに関する論文を発表し、その中で毛髪のスペクトルのバンドの帰属、水分定量の可能性について言及した⁷⁾。またこの実験は光ファイバプローブを用いて行われたため、将来のポータブル型近赤外毛髪水分計の開発を示唆するものとなった。一方において筆者はタンパク質等の生体物質の水和の研究を行ってきた。この研究は固体タンパク質とタンパク質水溶液の両方に関するもので、タンパク質の二次構造と水和、結合水と自由水などについて研究を進めた⁸⁻¹³⁾。筆者はこれらの研究の基礎となる“水”そのものの研究についても温度変化に伴う水素結合の変化などについて詳しい研究を行っている¹⁴⁾。さらに二次元分光法、ケモメトリックス法などいろいろな最新のスペクトル解析法を駆使し、タンパク質等の近赤外スペクトルのバンドの帰属を行った。本稿では固体のケラチンタンパク質を近赤外スペクトルを水分含有量を変化させて測定し、自由水、結合水のバンドに帰属及び強度変化について研究した結果について報告する。

2. 実験

2-1. 試薬

ケラチンは和光純薬から購入したものをそのまま用いた。



Non destructive Analysis of Free and Bonded Water in Human Hair by Near Infrared Spectroscopy

Yukihiro Ozaki

Department of Chemistry, Kwansai Gakuin University

水は2回蒸留水を用いた。

2-2. 分光装置

近赤外スペクトルの測定はVECTOR22/N, FT-NIR分光器 (Bruker Optics Inc.) を用いて分解能 32cm^{-1} で行った。スキャン回数は32回、測定領域は $12000 - 4000\text{cm}^{-1}$ であった。

2-3. スペクトルのデータ処理

微分スペクトルはサビツキーゴレー法 (12 gap sizes, 2 polynomial) によった。

3. 結果

図1 (a)、(b)はそれぞれケラチンの固体粉末と水溶液の近赤外スペクトルである。粉末のスペクトルは毛髪スペクトルに非常によく似ている¹⁵⁾。 $8700 - 8200\text{cm}^{-1}$ 領域のバンドはケラチンの CH_3 、 CH_2 、 CH 基の第二倍音あるいは結合音に帰属される。 $7000 - 6300\text{cm}^{-1}$ 付近のブロードなバンドは CH_3 、 CH_2 、 CH の結合音、 NH 振動の倍音、結合音に水の結合音 (OH 対称伸縮振動と逆対称伸縮振動) が重なったものである。この領域は含まれる水分の量によって水のバンドの強度が変化するために全体としても変化する。 $6000 - 5750\text{cm}^{-1}$ のバンドは、 CH_3 、 CH_2 、 CH の第一倍音、結合音によるものである。 $5200 - 5000\text{cm}^{-1}$ の領域のバンドもタンパク質のバンドと水のバンド (OH 変角振動と OH 伸縮振動の結合音) の重なりである。ケラチンの水溶液のスペクトル (図1 (b)) と粉末のスペクトル (図1 (a)) を比較すれば、水のバンドの寄与がよくわかる。タンパク質の自由水や結合水の研究も $7000 - 6300\text{cm}^{-1}$ と $5200 - 5000\text{cm}^{-1}$ の領域のバンドを用いて行うことができる。 $4900 - 4000\text{cm}^{-1}$ に観測されるバンドはいずれもケラチンのアミド基あるいは CH_3 、 CH_2 、 CH 基によるバンドである。

図2は水を含んだケラチンの乾燥過程を近赤外拡散反射スペクトルで追跡したものである。図2で1) と印したスペクトルは、ケラチン水溶液を真空中に置き 50°C で30分加熱した後測定したスペクトルである。他のスペクトルはそれに続いて5分ずつ加熱した後測定したものである。全部で11個のスペクトルが示されている。このように一連のスペクトルを測定することにより、ケラチンの自由水、結合水のバンドを帰属し、その強度変化を研究できると考えた。

図3は図2のスペクトルの二次微分の $9000 - 4000\text{cm}^{-1}$ の領域である。この図からわかることは水分の蒸発に伴い $7300 - 6200\text{cm}^{-1}$ の領域と $5350 - 4890\text{cm}^{-1}$ の領域が大きく変化するのに対し、他の領域、例えば $6000 - 5700$ 、 $5000 - 4000\text{cm}^{-1}$ の領域はほとんど変化しないことがわかる。このことは CH_3 、 CH_2 、 CH 、アミド基によるバンドは結合水や自由水の量によってほとんど変化しないことを示してい

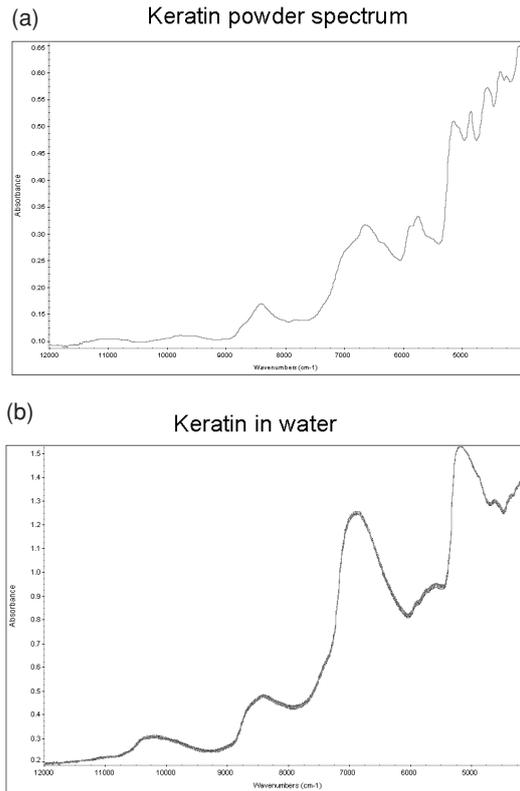


Figure 1 (a) NIR spectrum of keratin powder (b) NIR spectrum of keratin in an aqueous solution.

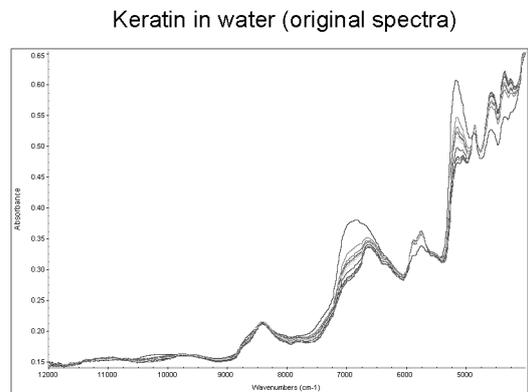


Figure 2 Time-dependent variations in NIR spectra of keratin powder.

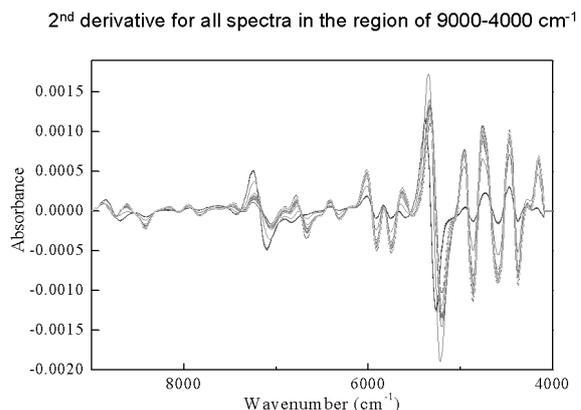


Figure 3 The second derivatives of the spectra shown in Figure 2.

る。言い換えればこれらのバンドは水和の影響をほとんど受けない。

図4 (a)、(b)は図2、3の7500-6150 cm^{-1} の領域の拡大である。

7300-6150 cm^{-1} の領域を見ると二次微分スペクトルから5本のピークが存在することがわかる。このうち~6970、~6880 cm^{-1} のバンドは水分の減少とともにほぼ平行して弱くなっている(図4 (a))。一方、~6700、~6530、~6310 cm^{-1} のバンドの強度はあまり大きくは変化しない。

筆者は水の近赤外スペクトルについて水のスペクトルの温度変化測定からバンドの帰属を試みた¹⁴⁾。帰属には二次微分、差スペクトル、二次元相関分光法、ケモメトリックス法など非常に多くの手法を用いて徹底して解明を試みた。その結果、水(自由水)の構造はわずか2種類で、強い水素結合したものと弱い水素結合をした2種類のものである。ここではそれらをSHB (strongly hydrogen-bonded) 水とWHB (weakly hydrogen-bonded) 水と呼ぶことにする。WHBとSHBはそれぞれ7080と6700 cm^{-1} 付近にバンドを与える¹⁴⁾。この水のスペクトルと図4 (a)のスペクトルを比較するといくつかの興味深いことがわかる。図4 (a)を見ればわかるように、水のスペクトルに比べケラ

チンのスペクトルは~6900 cm^{-1} にもう1本余分のバンドが現れる(普通の水でも現れるがその強度は弱い)。そして重要なことは、~7080と~6900 cm^{-1} のバンドがともに水分の蒸発とともに平行して弱くなっていくことである。したがってこれら2本のバンドはともに自由水のバンドに帰属される。おそらく~7080 cm^{-1} のバンドは自由水のWHBによるものである。~6900 cm^{-1} は普通の水では非常に弱いバンドとして観測されるものでその強度がここではかなり強くなっている点が注目される。おそらくこのバンドは自由水のSHBとWHBの中間的なもので、この相対強度が時間的に~7080 cm^{-1} バンドに比べ弱くなっていることから(図4 (a))、二次結合水的なものではないかと考えられる。~6580 cm^{-1} のバンドは自由水のSHBと結合水のバンドが重なったものである。時間とともにこのバンドはいくぶん弱くなる。おそらく自由水がなくなる分だけ弱くなるのであろう。ただこの領域にはタンパク質によるバンドも観測されるので、結合水についてこの領域から知見を得るのはややむずかしいことがわかった。つぎに5350-4890 cm^{-1} の領域について検討した。この領域のスペクトル変化も毛髪的水分含量変化にともなうスペクトル変化ときわめてよく似ている。この領域で4880 cm^{-1} 付近

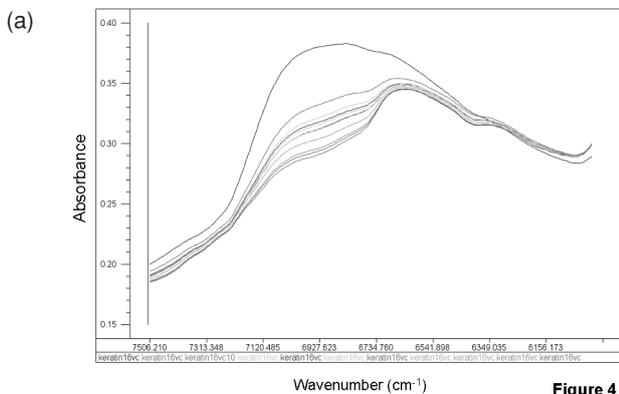


Figure 4 (a)

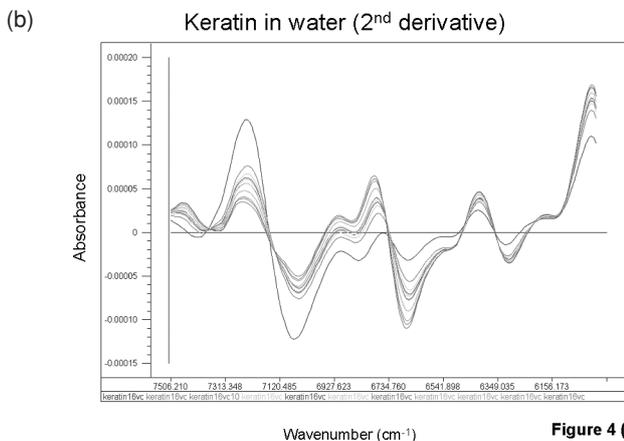


Figure 4 (b)

Figure 4 (a) The enlargement of the 7500-6150 cm^{-1} region of the spectra shown in Figure 2

(b) The second derivatives of the spectra shown in (a)

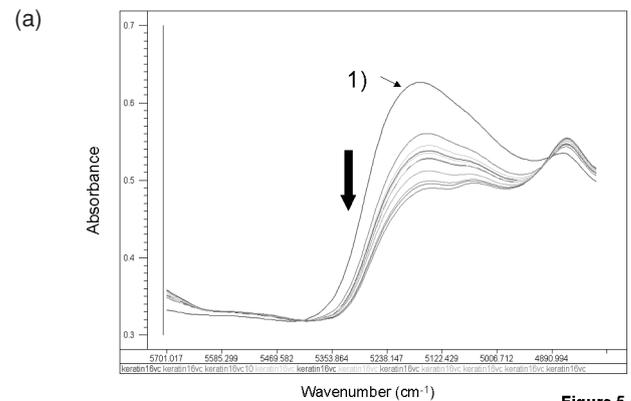


Figure 5 (a)

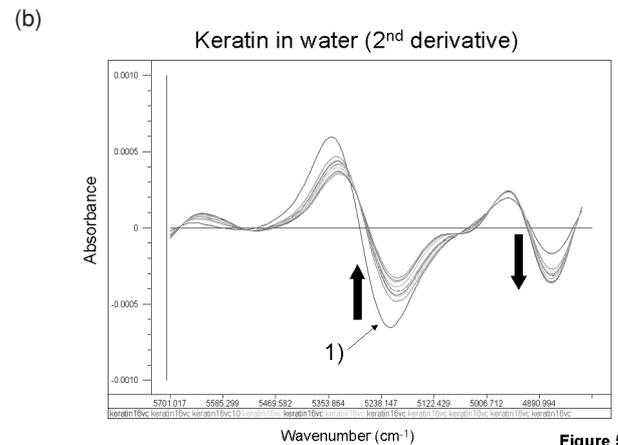


Figure 5 (b)

Figure 5 (a) The enlargement of the 5700-4850 cm^{-1} region of the spectra shown in Figure 2

(b) The second derivatives of the spectra shown in (a)

に観測されるバンドはケラチンによるものである。5350-4900 cm^{-1} には2つのバンドが観測される。~5190 cm^{-1} 付近のバンドは自由水のWHBによるもの、~5060 cm^{-1} のバンドは自由水のSHBと結合水の重なり合ったものである。5200と5060 cm^{-1} のバンドの強度を比較すると前者が大きく強度減少するのに対し、後者の減り方が少ないところが注目される。このことも上の帰属を指示する。この領域の場合も自由水と結合水を完全に分けることはできなかったしかしこの2本のバンドの強度比をとれば自由水と結合水の含量の比を見積もることができるであろう。

5700-4890 cm^{-1} の二次微分で注目されるのは、5200 cm^{-1} 付近のバンドの波数がかなり低波数側へシフトすることである。これは乾燥が進むと弱い水素結合をもつ完全に自由水的なものが少なくなるからと考えられる。

5350-4890 cm^{-1} の領域の変化は、同じ領域の毛髪の変化と非常によく似ている。したがって毛髪の場合も同じ方法で自由水と結合水の相対含量を見積もることができるであろう。

(参考文献)

- 1) 尾崎幸洋、河田聡編著：近赤外分光法、学会出版センター
- 2) 岩元陸夫、河野澄夫、魚住純著：近赤外分光法入門、幸書房
- 3) Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S, Heise HM: Near-Infrared Spectroscopy-Principles, Instruments, Applications, Wiley-VCH, 2002.
- 4) 尾崎幸洋編著：近赤外分光法、アイピーシー
- 5) 尾崎幸洋著：分光学への招待、産業図書、1997
- 6) 尾崎幸洋、宇田明史、赤井俊雄著：化学者のための多変量解析-ケモトリックス入門、講談社サイエンティフィック、2002.
- 7) Ozaki Y, Miura T, Sakurai K, Matsunaga T: Nondestructive Analysis of Water Structure and Content in Animal Tissues by FT-NIR Spectroscopy with Light-Fiber Optics. Part 1: Human Hair, Appl. Spectrosc., 46, 875-876, 1992.
- 8) Cho RK, Lee JH, Ozaki Y, Iwamoto M: The applicability of near infrared reflectance spectroscopy for determining solubility of heated protein under high pressure, J. Near. Infrared Spectrosc., 3, 73-79, 1995.
- 9) Wang J, Sowa MG, Ahmed MK, Mantsch HH: 98, 4748-4755, 1994.
- 10) Miyazawa M, Sonoyama M, J Near Infrared Spectrosc., 6, S253, 1998.
- 11) Wang Y, Murayama K, Myojo Y, Tsenkova R, Hayashi N, Ozaki Y: Two-Dimensional Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy Study of Heat Denaturation of Ovalbumin in Aqueous Solution, J. Phys. Chem B, 102, 6655-6662, 1998.
- 12) Wu. Y, Czarnick-Matsusewicz B, Murayama K, Ozaki Y: Two-Dimensional Near-Infrared Spectroscopy Study of Human Serum Albumin in Aqueous Solution: Using Overtones and Combination Modes Monitor Temperature-Dependent Changes in the Secondary Structure, J. Phys. Chem B, 104, 5840-5847, 2000.
- 13) Murayama K, Czarnick-Matsusewicz B, Wu. Y, Tsenkova R, Ozaki Y: Comparison between Conventional Spectral Analysis methods, Chemometrics, and two-Dimensional Correlation Spectroscopy in the Analysis of Near-Infrared Spectra of Protein, Appl. Spectrosc., 54, 978-985, 2000.
- 14) Segtnan VH, Sasic S, Isaksson T, Ozaki Y: Studies on the Structure of Water Using Two-Dimensional Near-Infrared Correlation Spectroscopy and principal Component Analysis, Anal. Chem., 73, 3153-3161, 2001.
- 15) 尾崎幸洋：未発表データ