HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	氷を機能性材料とする分離と計測法の展開
Author(s)	高橋，さつき；田崎，友衣子；岡田，哲男
Citation	低温科学，71，29-38
Issue Date	2013-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52337
Type	departmental bulletin paper
File Information	LTS71_005.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 71 （2013） 29-38

氷を機能性材料とする分離と計測法の展開

高橋さつき[1)]，田崎友衣子[2)]，岡田　哲男[1)]

2012 年 9 月 15 日受付，2013 年 1 月 7 日受理

氷を一種の機能性材料と考えることで，アイスクロマトグラフィー，その発展系であるキラルアイスクロマトグラフィーを始め，新しい分離・計測化学を展開することができる．本稿では，著者らが最近数年間行っている，「氷ではかる」研究を紹介する．分離の他に，分光測定デバイスとしての氷，氷マイクロリアクターなどについて述べる．また，「氷ではかる」ことにより，氷が関わる現象を理解することもできる．氷界面での擬似液相，ドープ氷中の共存液相で起きる化学反応，電解質ドープ氷中でのイオンの局所構造変化などに関して言及する．

Developments of Separation and Analytical Methodologies with Ice as Functional Material

Satsuki Takahashi[1], Yuiko Tasaki[2], Tetsuo Okada[1]

We have developed a variety of analytical methods with ice as a functional material, which include ice chromatography, chiral ice chromatography, optical measurement with an ice-cladding liquid-core waveguide, microreactors, etc. These methods developed with ice are briefly reviewed. Also, the measurements with ice have allowed the exploration of interesting phenomena related to ice, involving quasi-liquid later formation at the interface between ice and an organic solvent, facilitation of some chemical reactions in the liquid phase coexistent with ice, specific ion hydration at the temperature below the eutectic point of the system etc. This clearly suggests that the measurements with ice lead to the understanding of ice.

1. はじめに

分離や計測には種々の機能性物質が利用される．単独でセンシングや分子認識能を発揮する機能性分子から，nm オーダーの量子ドットやミセルなど分子や原子の集合体，μm〜mm あるいはそれ以上の大きさを持つバルク材料など，機能性物質には種々のディメンジョンや階層のものが存在する．また，基材となる物質には特筆すべき機能がなくても，化学結合などを利用して機能性分子を導入することにより，基材物質に新たな機能を付与することも可能である．液体クロマトグラフィーの固定相や金ナノ粒子などを用いるバイオセンシングなどにはこのような手法が多用されている（Kaji et al., 2007; Sato et al., 2007）．液相での分離や計測を想定すると，均一液相内で反応を起こして最終的に何らかのシグナルとしてその反応の過程や結果を測定する場合と，液相内に固体や微粒子，分子集合体などの不均一場を形成し，その界面で計測する場合を区別することができる．後者のように界面を導入する方が，計測に多様性が生じることは明らかであろう．現在の分析化学，計測化学はこのような反応場，分離場としての界面に強く依拠している．

氷は，ありふれた物質であるが，同時に謎に満ちた魅力的な物質でもある．その基本的な物性は多方面から研究されているが，氷の表面や他相との界面については未解明，未知なことが多い．たとえば，氷表面が固体か液体か，液体の場合液層の厚さはどの位か，その温度依存性はどの程度か，などの疑問に答えるべく種々の実験的，理論的研究が試みられてきた．その結果，少なくとも融点近傍で表面液層が存在することは誰もが認めるところになっているが，液相の厚さやその温度依存性は試料や評価手法による違いが大きい．また，地球環境における物質循環に氷が深く関与していることが指摘されて

1）東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻
2）環境管理技術研究部門　独立行政法人産業技術総合研究所
[1] Department of Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Meguro-ku, Tokyo 152-8551, Japan
[2] Research Institute of Environmental Management Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba 305-8569, Japan

おり（Sodeau and O'Sallivan, 2008），氷表面や氷と共存する液相が反応場として一定の役割を果たすものと考えられているが，反応場の特性や物性は必ずしも明らかでない．

計測や分離の設計には界面をうまく利用する必要があること，一方で氷が種々の物質輪廻に関与していること，これらに着目すると，氷の界面を反応や計測に用いるという発想が生まれる．従来，氷は計測の対象ではあったが，計測のツールではなかった．したがって，「氷ではかる」という観点で行われた研究例はほとんどない．「氷ではかる」ことは当然氷を知ること，すなわち「氷をはかる」，「氷を理解する」ことにもつながる．本論文では，著者らが最近数年間行っている氷を機能性材料とした分離と計測の展開，およびそれらを通じて見える氷の化学について述べる．

2. アイスクロマトグラフィー

氷を固定相として用いる液体クロマトグラフィーの実施例が報告されている．氷の塊を粉砕して用いるものと，雪をそのまま用いるものである．しかし，いずれも分離には至っておらず，溶質によって氷との相互作用による差がありそうだと言える程度のものである（Dasgupta and Mo, 1997; Supatashvili and Kartvelistvili, 1986）．また，いずれの研究でも検出の容易さを考えて色素を溶質に用いており，氷への吸着を分子構造的観点から考慮していない．著者らが，アイスクロマトグラフィーの検討を始めて，分離法として用いるには以下の点が重要であることがわかった．一つは，安定的にグラムオーダーの氷固定相（氷微粒子）を調製すること．もう一つは適切な溶質を選ぶことである．試行錯誤の結果，水や水溶液のミストを直接液体窒素中に噴霧する方法が氷固定相の調製に最適であり，比較的再現性良く同じ状態の氷固定相を調製できるようになった（Tasaki and Okada, 2006; Tasaki and Okada, 2008B; Tasaki and Okada, 2009B; Okada and Tasaki, 2010）．また，氷固定相と溶質との相互作用についても精密な議論が可能になった．氷表面には，-OH と -O- ダングリングボンドがあり，いずれも水素結合に関わることが予想できる．水素結合サイトをもつ溶質を種々選んで検討したところ，分子内に二個の極性基をもつものが適切な保持を示すことがわかった．Fig.1 に，エストロゲンの分離例を示す．氷の溶解を防ぎ，溶質との水素結合が起きやすい非水系結合性として，媒体ヘキサンを主な移動相として選択した．また，少量の極性溶媒（THF やジエチルエーテル）を加えて溶質の保持を調節した．エストロゲンの分離では，ジエチルエーテル（DEE）の濃度の調節で，エストロンとエストラジオールの溶出は確認できたが，エストラジオールより OH 基が一つ多いエストリオールは氷カラムからの溶出が確認できなかった．エストリオールの氷への吸着が強く，溶出しなかったものと考えられる．また，エストロンの保持は小さく，エストラジオールとエストロン間の分離比は 6.1 程度であった（分離比は，保持指数または修正保持時間の比である）．一方同様に表面のシラノールへの吸着で分離が起きるシリカゲルでは分離比が 2 程度であった．エストロンとエストラジオールではカルボニル基と OH 基の違いがあるだけだが，後者の方が水素結合性は強いと考えられる．水素結合という機構は，氷とシリカゲルで同じであるにもかかわらず，氷の方が OH 基の数を強く識別していることを示唆している（Tasaki and Okada, 2009B）．

溶質と氷表面で形成される水素結合の数は以下のように決定できる．THF や DEE などの移動相中の極性成分の濃度を変化させると，溶質の保持も変化する．THF や DEE は一分子当たり一つの水素結合しか形成しないので，氷表面での競争吸着を仮定すると，溶質の保持指数（k）は以下の式で表される（Tasaki and Okada, 2006; Tasaki and Okada, 2009B）．

$$k = \frac{A\Gamma_{\mathrm{OH-S}}}{V_{\mathrm{mob}}[\mathrm{S}]} = \frac{A\Gamma^{\mathrm{t}}_{\mathrm{OH}} K_{\mathrm{S}}}{1 + K_{\mathrm{PC}}[\mathrm{PC}]^{n}} \qquad (1)$$

ここで，K_{PC} および K_{S} はそれぞれ極性成分と試料の氷表面への吸着平衡定数であり，$\Gamma^{\mathrm{t}}_{\mathrm{OH}}$ は -OH サイトの全表面濃度，$\Gamma_{\mathrm{OH-S}}$ は溶質が結合した -OH サイトの表面濃度，A と V_{mob} はそれぞれ氷固定相の表面積とカラム内移動相の体積，[PC] と [S] はそれぞれ移動相中の極性成分と溶質の濃度，n は溶質と氷表面間で生じる水素結合の数を表わす．(1)式において $1 < K_{\mathrm{PC}}[\mathrm{PC}]^{n}$ が成り立つと，log k-log[PC] プロットは傾き $-n$ の直線を与えることになる．実際に，DEE 濃度を変化させて

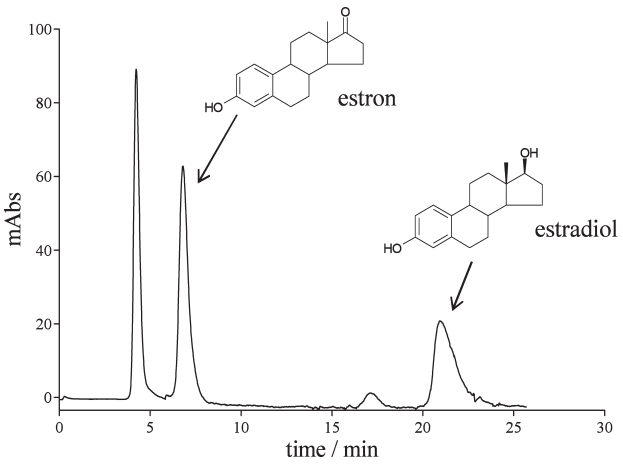


Fig.1：Ice chromatographic separation of estrogen.
Mobile phase, 5% DEE in hexane. Detection, UV (275 nm). Temperature, -10°C.
Column, 7.5 mm i.d×150 mm packed with ～75 μm ice particles as a stationary phase. Taken from Tasaki and Okada (2009B) with permission of the American Chemical Society.

いくつかの試料の保持変化を測定すると直線が得られた．Table 1 に得られた n の値を示す．フェノール類は -O- サイトへの吸着も起こり得るが，保持の DEE 濃度依存性においてエーテル類と差は見られなかった．このことから，フェノール類のように水素結合に関して両性をもつ分子でも，-OH サイトへの吸着が支配的であると考えられる．OH 基を 2 つ持つヒドロキノン（HQ）とレゾルシノール（RS）について，どちらも n ～2 であることは，上述のモデルを支持しており，2 つの OH 基がいずれも氷表面との相互作用に関わっていることを示している．ポリエーテルの n が，溶質分子内のエーテル基の数より小さく，n=1.5～2.6 であることは非常に興味深い．これは，エーテル基の数に関係なく 1 分子当たりおよそ 2 本の水素結合形成で氷表面に吸着することを示唆している．ただし，相対的な吸着の強さはエーテル基の数に依存するので，エントロピー効果や吸着に関与する極性基の配置などが副次的に働いていると考えられる（Tasaki and Okada, 2008B; Tasaki and Okada, 2009B）．

氷固定相への分子構造と吸着特性の関係がわかったことで，どのような物質の分離に利用できるかが概ね明らかになった．Table 1 にも示したように，ポリエーテル類やフェノール，アルコール類の分離が可能であったほか，アミノ酸の誘導体や葉緑素などの分離も可能であった．Fig.2 に葉緑素成分の分離例を示す．溶出成分が未知であるので，物質に関する情報を得るために連続的に溶出液の紫外可視吸収スペクトルを測定し，三次元クロマトグラムとして表示した．このように複雑な混合物の分離に氷を用いることができたが，氷粒子の融着により固定相の連続使用時間が限定される，また固定相の密な充塡が困難であるために分離能があまり高くないなどの実用上解決すべき問題が残されている．このように吸着型の固定相としての氷には分離選択性の点で既存のものとは異なる特徴があることがわかった．氷の固定相としての魅力は，以下の分配や，機能性分離材料の点でより明確に示される．

Table 1. Number of interacting points (n)

compounds	n	DEE conc .range / % (v/v)
hydroquinone	2.06	4 - 11
POE(4)-NPE	1.56	5 - 12
POE(6)-NPE	2.37	6 - 13
resorcinol	2.17	4 - 11
B18C6	1.77	4 - 11
DB24C8	2.61	7 - 14

The n values were determined based on 6-8 measurements.
Abbreviation: POE(p)-NPE, polyoxyethylene(p)nonylphenylether (p is the number of repeating oxyethylene units); B18C6, benzo-18-crown-6; DB24C8, dibenzo-24-crown-8.

3．分配と吸着のスイッチング

氷固定相の特徴の一つに，塩などをドープすると液相が生じる点がある．以下，塩などの水溶液を凍結したものをドープ氷ということにする．これを利用すると，アイスクロマトグラフィーで，吸着－分配のスイッチングや制御が可能である（Tasaki and Okada, 2009A; Tasaki and Okada, 2011）．固定相が複数の相を含んでいて，その割合を連続的に制御できる分離系はこれまで知られていない．この点で，ドープ氷はアイスクロマトグラフィーの方法論的特徴が良く現れる系である．固定相として，NaCl や KCl を含む氷を用いた例を以下に示す．KCl-水，NaCl-水系の共晶点はそれぞれ－10.6°C，－21.1°Cであり，共晶点組成よりも希薄な系では，系の融点以下・共晶点以上の温度領域で氷と濃縮された電解質溶液が共存する．また，相図に基づいて液相の割合や共存液相の塩濃度を計算することが可能である．

共存液相が存在する状態で，溶質の保持指数は以下の

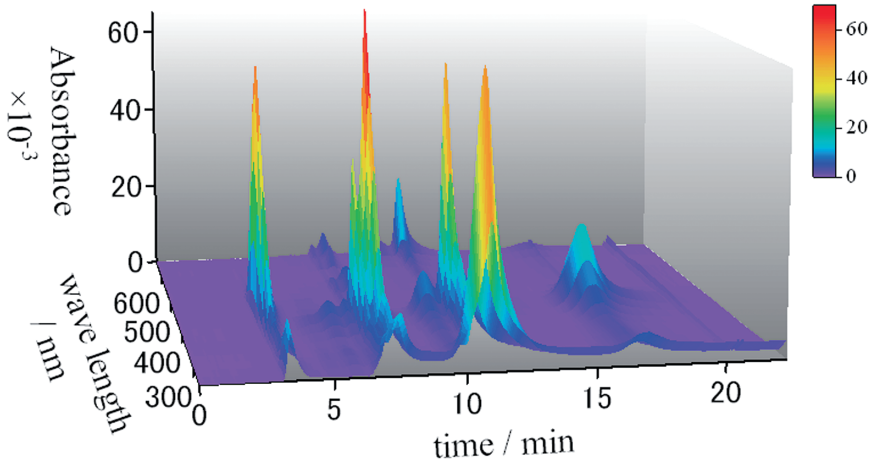


Fig.2：Three-dimensional representation of ice chromatographic separation of ingredients in green tea leaves with gradient elution.
Mobile phase, gradient from hexane (0–8.7min) to 6.0% DEE in hexane (49.0 min).
Temperature, -10°C.

式で表すことができる．

$$k = k_{ad} + k_{par} = k_{ad} + K_d V_{liq} / V_{mob} \quad (2)$$

ここで，k_{ad}，k_{par} はそれぞれ氷表面への吸着，共存液相への分配による保持指数への寄与を表す．また，後者は共存液相の体積（V_{liq}）と分配係数（K_d）によって表される．共存液相の体積は相図から計算し，分配係数はアイスクロマトグラフィー条件（温度，イオン強度，移動相組成）における分配実験から決定することができる．Fig.3 には，NaCl または KCl をドープした氷固定相を用いて得られた RS と HQ の保持指数とそれらの計算値を示す．RS は HQ に比べて氷への吸着が大きく，液相がないときには HQ よりも保持が大きい．一方で，液相が生じると，水に分配されやすい HQ の保持の方が RS より大きくなる．温度変化，塩濃度変化いずれに対しても，実験値と計算値は良く一致しており，これらの実験パラメータを変化させることで共存液相体積を変化させ，それにより保持を制御できることが明らかになった．しかし，プローブ物質により実験と計算の一致が必ずしも良くない例もある．一般に水への分配が小さな物質ほど氷と共存している液相にはよく溶ける傾向があり，共存液相の物性がバルク水とは異なることを示唆している．このようなデータの集積とその機構の解明は今後の課題である．

4．キラルアイスクロマトグラフィー

塩は氷中に液相を生じさせる機能をもつが，通常の塩では構成成分であるイオンの特徴が強く現れることはない．一方，機能をもつ溶質の水溶液を凍結すると，その機能が氷上で発揮されることが期待できる．氷に分離機能を持たせるために，氷にキラル認識能を付与することを考えた．キラルセレクタの水溶液を凍らせると，キラルセレクタを氷上に固定することができる．通常のキラル分離は，合成反応を駆使してシリカゲルなどの固体上にキラルセレクタを導入する．高温ではラセミ化によりキラルセレクタのキラル認識能が失われることがあり，この合成には労力と時間，高い合成技術や能力が求められる（Ward and Baker, 2008）．そのため，市販のキラル固定相は大変高価である．したがって，新たなキラルセレクタをキラル固定相として手軽に試してみることもできない．水溶液の凍結で固体上にキラルセレクタを導入することができれば，合成なしに，凍結だけでテーラーメイドのキラル固定相調製が可能になる．このような考えに基づいてキラルアイスクロマトグラフィーを考案した．

Fig.4 は (R, R)-*N*, *N*'- ジイソプロピル酒石酸アミドの水溶液を凍結して得られたキラルアイス固定相によるキラル分離例である．分離能があまり高くないので，円偏光二色性検出によるピークを示す．正方向と負方向のピークが現れておりキラル分離が起きていることがわか

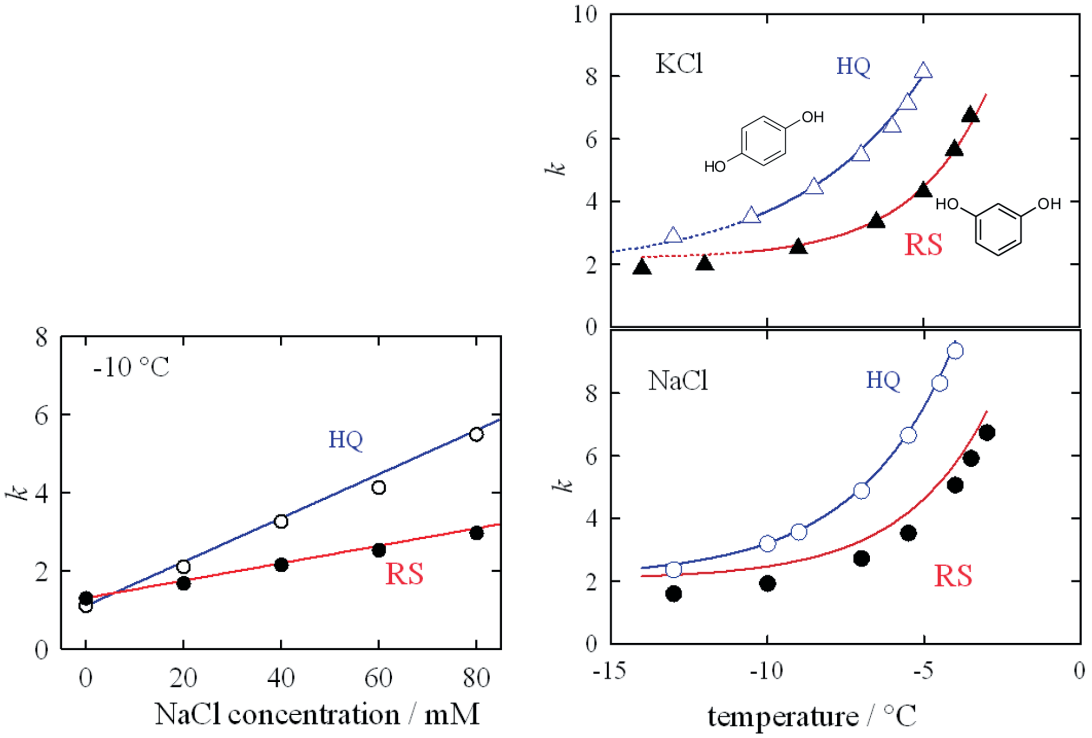


Fig.3：Changes in *k* for hydroquione (HQ) and resorcinol (RS) with the NaCl concentration at -10 °C (left) and with temperature at the constant NaCl or KCl concentration (40 mM) (right). Mobile phase, 20 % (V/V) butyl ether in hexane. Curves were calculated from the liquid phase volumes and the partition coefficients. Taken from Tasaki and Okada (2011) with permission of the American Chemical Society.

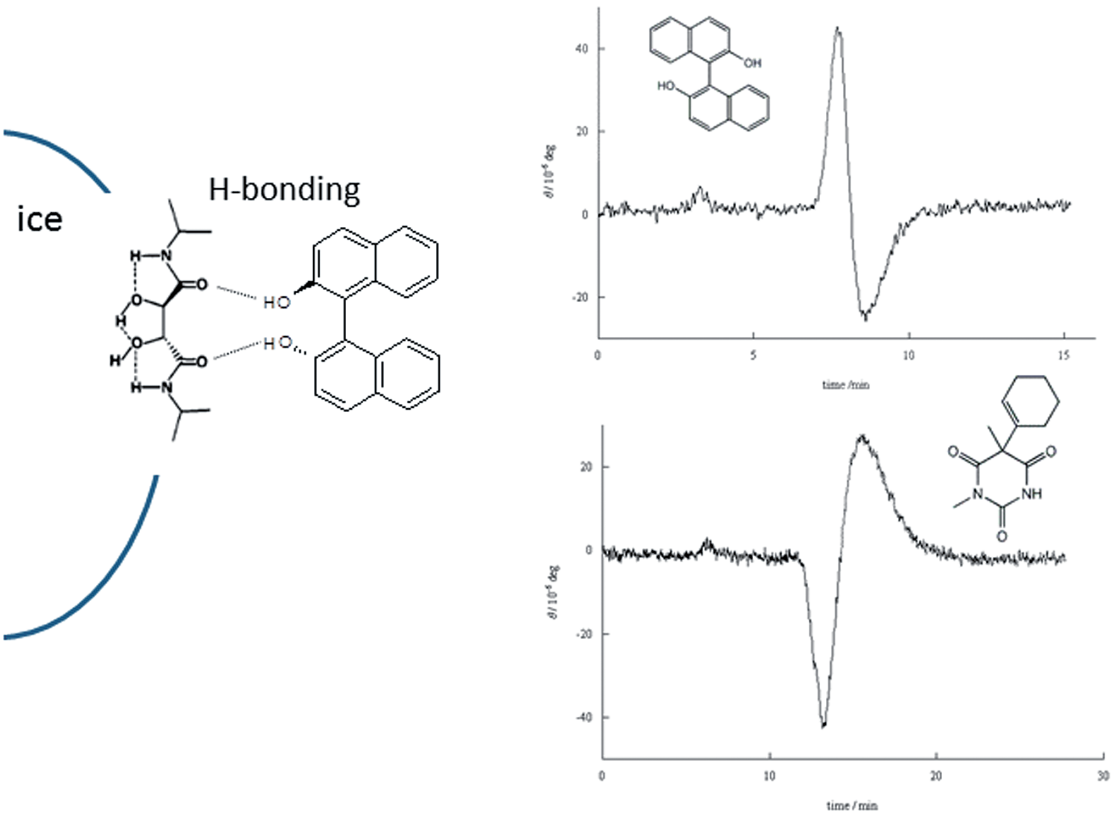


Fig.4：Chiral ice chromatographic separation of 1,1'-bis-2-naphthol (upper) and hexobarbital (lower) with diisopropyl-tartamide (DIPTA) doped ice stationary phase.
Left, expected separation mechanism.
Chiral separation of binaphthol; 5 mM DIPTA-doped ice stationary phase with hexane as the mobile phase at -5 ˚C.
Separation of hexobarbital; 10 mM DIPTA-doped ice stationary phase with 0.5 % THF in hexane as the mobile phase at -10 ˚C.

る．Fig.4 中に模式図を示したように，(R, R)-*N*, *N*'- ジイソプロピル酒石酸アミドは，水素結合によりキラル認識する（Dobashi et al., 1991）．したがって，認識はヘキサンを主成分とする移動相を媒体として起きている，つまり氷と移動相の界面に(R, R)-*N*, *N*'-ジイソプロピル酒石酸アミドが存在することを示唆している．このように，凍結だけで，機能性固体材料を調製することができるという概念を明確に示すことができた．

一方，キラル認識を共存液相で起こすことも可能である．Fig.5 に β-シクロデキストリン（βCD）と KCl を同時にドープした氷固定相を用いたキラル分離の例を示す（Shamoto et al., 2010）．βCD はバケツ型の分子であり，分子開口部の大きな側からゲスト分子を取り込み，包接化合物を形成する．βCD を氷の表面に固定すると，βCD が様々な方向を向いてしまい，キラル認識に最適な分子配向をとることができない．その結果，キラル認識できる βCD 分子は限定される．実際に βCD だけをドープした氷では Fig.5 のような分離はできなかった．一方，塩を同時にドープすると共存液相が生じる．βCD は共存液相に溶解し，キラル認識は共存液相中で起きる．この場合，溶質は移動相から共存液相に分配し，そこで βCD と包接化合物を形成する．Fig.5 の結果はこの機構に基づいて説明できることがわかっている．しかし，バルク水溶液中よりも，共存液相では数倍キラル認識能が大きくなっていることがわかった．このことからも共存液相をバルク水溶液の延長と考えることは必ずしも正しくないことがわかる．

5．界面擬似液層の検出

アイスクロマトグラフィーは，新しい分離場を提供し，また氷上での相互作用をプローブする上で有効であることがわかった．さらに，この方法は氷の界面擬似液相の評価にも適用できた（Tasaki and Okada, 2008A）．Fig.6 はプローブとして用いた HQ と RS の保持の温度依存性である．低温域では温度上昇と共に保持が若干弱くなっている．これは水素結合生成が一般に発熱的であることと一致する．一方，氷の融点直下の温度で保持が急速に大きくなっており，これは氷の界面が液体的にふるまうために，主要な保持機構が吸着から分配に変化したことを示唆する．このように生じた擬似液体層は通常のバルク水とは異なる性質を持つ可能性があると思われるが，第一近似としてプローブ物質の分配係数に基づいて融点直下での急速な保持変化を(2)式に従って説明す

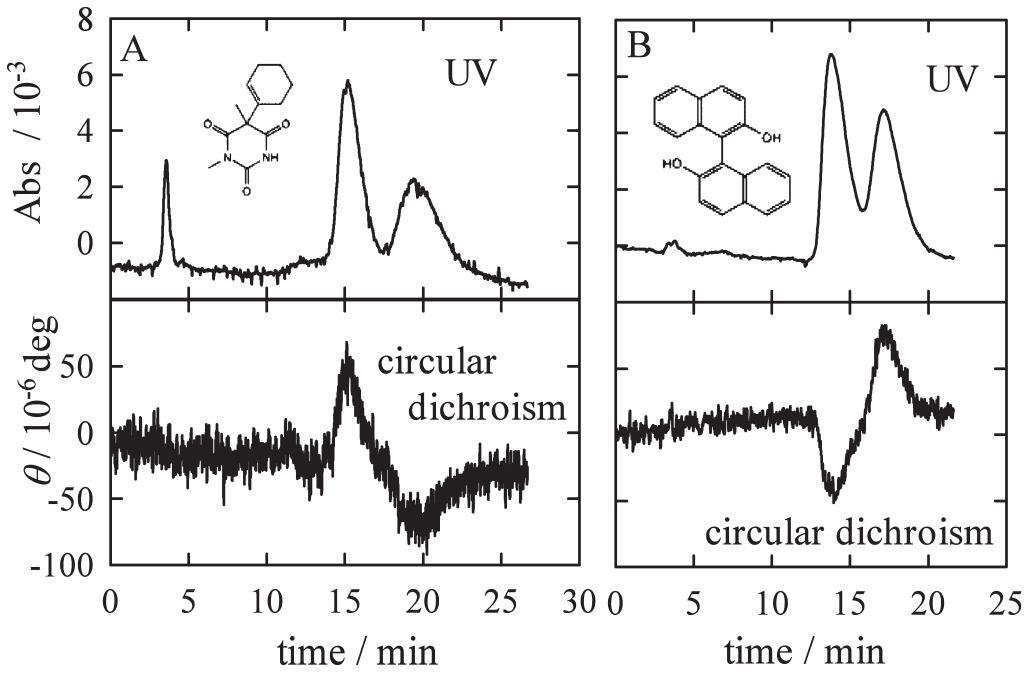


Fig.5：Chiral ice chromatographic separation of hexobarbital (A) and 1,1'-bis-2-naphthol (B) with UV detection (upper) and circular dichroism detection (lower).
(A) Stationary phase: ice doped with 0.5mM β-CD and 75mM KCl, Mobile phase, 0.5% (v/v) THF in hexane. Temperature, -8 °C. Detection at 230 nm. (B) Stationary phase: ice doped with 10 mM β-CD and 100 mM KCl. Mobile phase, 0.1% (v/v) THF in hexane. Temperature, -8 °C. Detection at 280 nm. Taken from Shamoto et al. (2010) with permission of the American Chemical Society.

ることを試みた．未知数は氷界面の液層体積のみであることがわかる．したがって，固定相の表面積から液層の厚さを算出することが可能である．結果を Fig.7 に示す．均一な厚さの液層が生じると仮定すると，厚さは nm から 10 nm のオーダーである．ここで求めた液層の厚さは，これまで氷表面に関して報告されている擬似液体層厚さに比較的近い値であるが，その温度依存性は報告値より極端に大きい（Sadtchenko and Ewing, 2003; Ewing, 2004）．このことは，アイスクロマトグラフィーが氷と移動相の界面を扱っていること，移動相成分の THF が関与して界面液相の発達を促していることなどによるものと考えられる．より高濃度の THF を含む系では液相の発達する温度帯で THF ハイドレートが成長することを顕微ラマン測定により直接検出している（Muro et al., 2012）．アイスクロマトグラフィーの測定時間内にはハイドレートの成長は無視できると考えられるが，界面融解がハイドレートの成長に深く関与していることを示している．Fig.7 から，プローブにより算出される液層の厚さに若干の差があることがわかる．これは界面液層をバルク水と同じ物性を持つものとして扱うことの問題点，別の言い方をすると界面液層への分配特

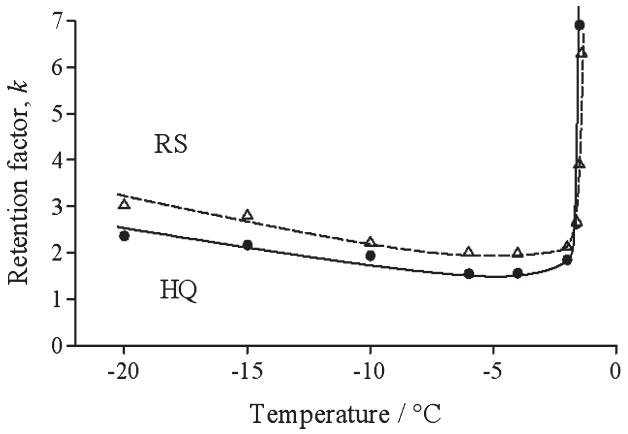


Fig.6：Temperature dependence of ice chromatographic retention factors for hydroquinone and resorcinol.
Mobile phase, 3 % THF in hexane.

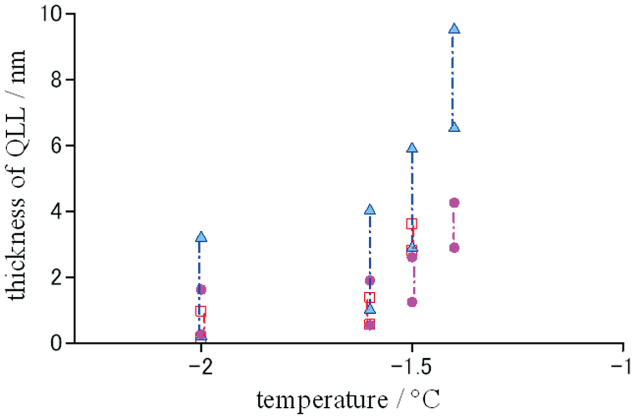


Fig.7：Temperature dependence of the quasi liquid layer (QLL) developed at the interface between ice and 3 % THF in hexane as determined by ice chromatography. Taken from Tasaki and Okada (2008A) with permission of the American Chemical Society.

性がバルク水への分配特性とは異なることを示唆している．

6．共存液相濃縮による高感度計測と金属錯体の蛍光特性変化

電解質溶液を液体窒素などで急速凍結すると，氷の中に電解質結晶が分散した状態になる．この電解質ドープ氷を共晶点以上の温度にすると，電解質は周辺の氷を融かして溶液となり，その体積は温度と共に大きくなる．Fig.8 はフルオレセインと KCl をドープした氷の共焦点蛍光顕微鏡画像である．明るく見えるところが液相，暗い部分が氷である．塩濃度が 60 mM を越えると，液相同士がつながり，徐々にチャンネル構造へと変化するが，それ以下の濃度では離散的なほぼ球状の液相が生成する．液相の大きさを個々の液相からの蛍光強度を測定することで決定した．結果を Fig.9 に示す（Hashimoto et al., 2011）．温度とドープする塩の濃度を変化させることにより 0.3〜4 μm 程度（体積として aL〜fL レベル）の範囲で，一つの液相の大きさを制御することが可能であった．電解質水溶液を凍結するという極めて単純な方法であるが，生じる液相の大きさは比較的再現性が高く，径の相対標準偏差は 10%以下であった．また，ペルチェ素子上で−15°C程度で凍結させると液体窒素凍結に比べてやや大きさのばらつきが大きくなったが，調製できる液相ポアのサイズはほぼ同じであった．

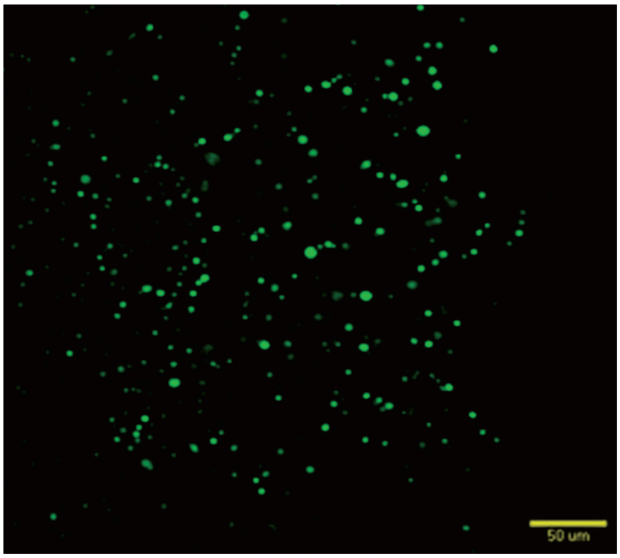


Fig.8：Confocal fluorescence image of KCl-doped ice. The concentration of KCl in an unfrozen solution was 10 mM. Concentration of fluorescein, 0.6 μM. Temperature, -8 °C.

この液相を微小空間測定場として利用することで，液相への濃縮と濃縮による平衡シフトを利用して高感度化や高選択性化を図れると考えた．また，共存液相は内部が液体の水，それを取り囲む壁は固体の水という他に類のない制御空間である．また，温度により連続的にサイズ制御できる点もユニークである．氷中の液相を反応場や測定場として利用するには，反応物の混合が必要であるが，自由に氷中で物質を混合することは容易ではない．そこで，第一段階として混合物の凍結による反応を検討した．Mg^{2+} はヒドロキシキノリン類と蛍光性の錯体を形成する．これを利用して，共存液相の測定場としての有効性を検証した．配位子にはヒドロキシキノリン-5-スルホン酸（HQS）またはオキシン（ox）を用いることで，錯体の外部構造等の違いによる効果を期待した．

HQS を用いて得られた氷共存液相からの蛍光強度の濃度依存性を Fig.10 に示す．HQS 過剰条件では nM レベルの Mg^{2+} が測定できることがわかる．このような高感度は，凍結濃縮により Mg^{2+} 濃度が高くなる効果に加えて，Mg^{2+} と HQS が共存液相中に濃縮されたことに

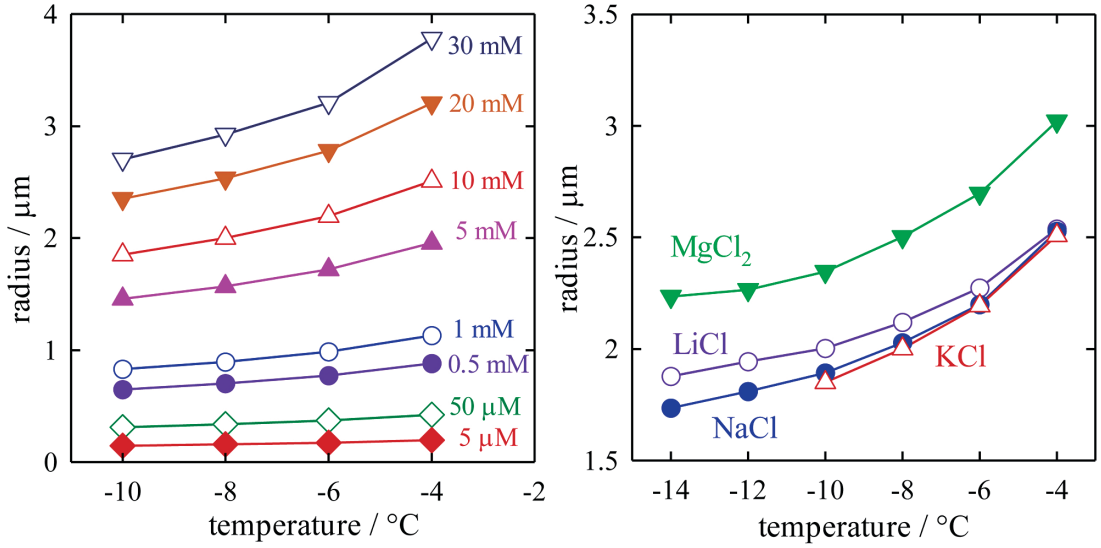


Fig.9：Size of a liquid phase developed in salt-doped ice as functions of temperature and salt concentration. Taken from Hashimoto et al. (2011) with permission of the American Chemical Society.

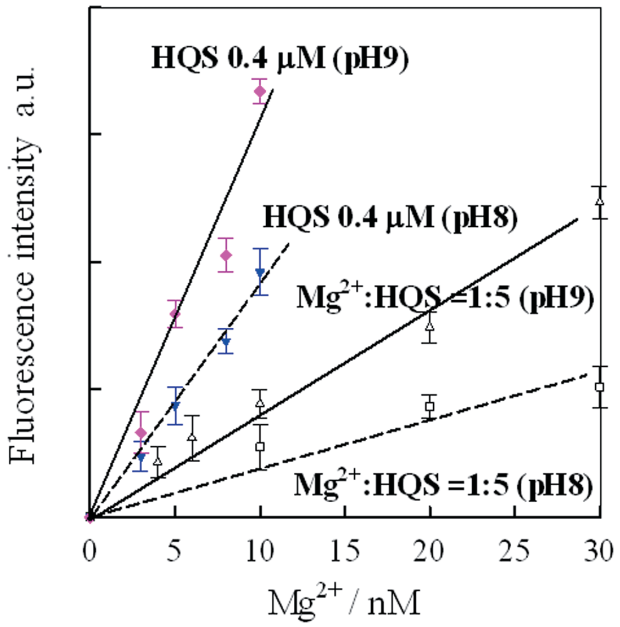


Fig.10：Fluorescence intensity from a liquid phase disolving Mg^{2+} and HQS.
Taken from Hashimoto et al. (2011) with permission of the American Chemical Society.

より錯生成が進む方向に平衡シフトしたことによる．1 nM は一つの液相当たり約 10^3 個の Mg^{2+} を含んでいることに相当する．したがって，凍結するだけで 1000 個程度の金属イオンが検出できたことになる．

一方，濃縮の効果を考慮すると HQS 錯体の蛍光強度増加は解釈できたが，ox 錯体では予想される蛍光強度よりも強い発光が計測された．ox 錯体は元々HQS 錯体に比べて蛍光強度が小さいが，凍結状態ではこの関係が逆転し，ox 錯体の方が強い蛍光を発するようになった．Mg^{2+} の HQS 錯体では 1：1 錯体の方が 1：2 錯体より蛍光強度が高いのに対し，ox 錯体では 1：2 錯体の方が強い蛍光を発する．このことを考慮すると，共存液相中で，1：2 の Mg^{2+}-ox 錯体生成が促進されていると考えられる．錯体の外部構造を考慮すると，水中では安定に存在しない化学種が共存液相中では安定に存在することを示唆しているように思える．

7．氷の分光特性を生かした計測

氷の屈折率は n_D＝1.309 であり，固体としては特筆すべき小さい値である．この値は一般的な多くの液体の屈折率より小さい．光ファイバーの光導波の原理（コアの屈折率がクラッドより小さく，コア/クラッド界面で光が全反射する）に従うと，屈折率の小さな固体で液体を囲むと，液体コア光導波路を形成できる．分光計測において，液体コアの光導波路は界面計測や長光路に基づく高感度測定に有効であり，蛍光，ラマン（Holts et al., 1999），紫外可視分光測定（Pan et al., 2010）やキャピラリー電気泳動などに利用されている（Wada et al., 2006; Okada, 2007）．しかし，液体コア導波路の調製に適した低屈折率の固体材料は限られており，アモルファステフロンの Teflon AF2400（n_D＝1.29）が知られている程度である．しかし，Teflon AF2400 は表面に傷や汚れが付きやすく，かつ高価な材料である．氷の屈折率は Teflon AF2400 より若干大きいが，液体コアの光導波路のクラッドとして利用できる数少ない固体材料である．

Fig.11 に氷の中に曲がったトンネル構造内に NaCl 水溶液を満たしたときと空のときの光の導波の状況を写真で示す．トンネルが空のときにはレーザー光が入り口付近ですべて散乱しているのに対し，水溶液で満たされると出口に届いていることがわかる．壁が滑らかでないために氷と水溶液の界面で散乱が起きているが，液体コアの光導波路が形成できている．この原理を利用して，氷

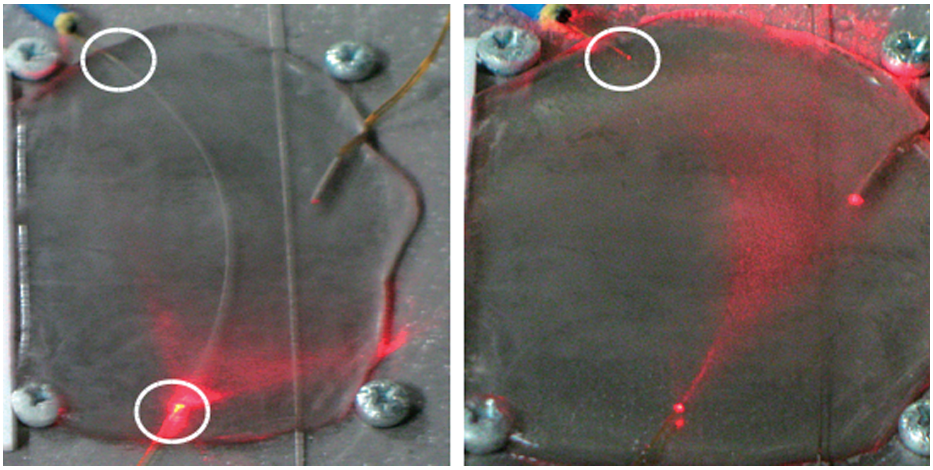


Fig.11：Ice-cladding liquid-core waveguide.
Left, empty tunnel in ice plate.　Right, the tunnel filled with aqueous NaCl solution. We can see laser light scattering at the inlet of the empty tunnel, whereas the scattering occurs at the entire inner wall of a liquid-filled tunnel and can also be seen at the outlet of the tunnel, suggesting the successful waveguiding of the latter.

をクラッド，ヘキサンをコアとする光導波路分光セルを作製し，5 cm 程度の長光路セルとして利用可能であることを示した（Sugiya et al., 2009）．さらに光路長を長くするには氷と液体の界面を滑らかにする方法が必要である．

8．ドープ氷中の電解質の状態

Fig.9 の液相の体積から，一つの液相に溶解している電解質の物質量を見積もることができる．凍結溶液中の電解質濃度が高いほど，液相体積が増加しており，液相の種になっている電解質の物質量も大きくなっていると考えられる．一つの液相が電解質の単結晶から生じると仮定すると，共晶点以下で氷中に存在する電解質結晶の大きさは 1 mM KCl では約 0.2 μm，10 mM では約 0.8 μm と見積もることができる．一方，小角X線散乱を用いて同じ電解質ドープ氷を測定すると，電解質結晶の大きさは約 2 nm であり，濃度依存性はほとんどないことがわかった．また，散乱強度は電解質濃度に比例して大きくなることから，以下の描像が考えられる．凍結時には臨界結晶核のサイズに近い 2 nm 程度の小さな結晶のみが生じ，氷の結晶化に伴って氷結晶のグレインバウンダリーに蓄積される．これらが溶ける際に，小さな液滴は不安定であるためにある程度の数が集合し，最終的にサブマイクロメーター程度の液相を生じる．この液相の数密度は塩の種類や濃度によらずほぼ一定であった．つまり，液相ができやすい場所は氷結晶の都合で決まること，そのような場所の数密度は一定であることがわかった．

電解質ドープ氷を試料として，共晶点付近を中心にX線吸収微細構造（XAFS）による構造解析を行った．典型的な測定結果を Fig.12 に示す．α と β は，それぞれ RbBr 中の Br^- および水和 Br^- の割合を表す．α には 0.2 程度の誤差があるために，$\alpha+\beta$ が 1 を越えている温度もあるが，共晶点以下で電解質（RbBr）を形成していた Br^- が，共晶点付近を境に水和することがよくわかる．一方，熱力学では解釈できない現象も見つかっている（Tasaki et al., 2010; Harada et al., 2012）．

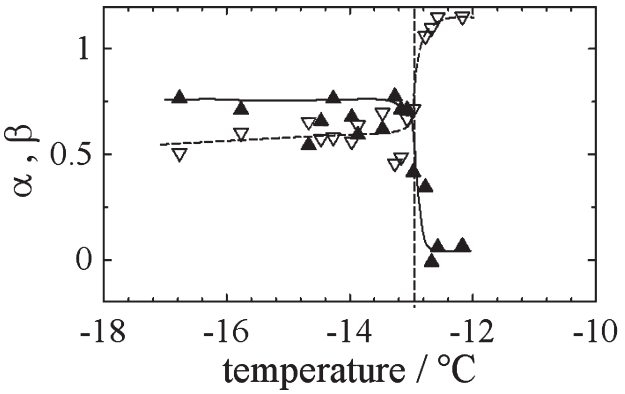


Fig.12：Temperature dependence of the ratios of hydrated Br^- (blue) and that in the RbBr crystal (red) in 1 mM RbBr ice as determined by X-ray absorption fine structure at the Br-K edge.

① 低濃度の電解質を凍結すると，共晶点以下で水和構造が相当な割合で維持される

② 条件によって①の水和構造が時間変化し，最終的に電解質結晶の構造に変化する

③ イオンの水和の観点からは，イオンの水和に関与できる自由な水分子が氷表面で不足している．

④ 氷表面では一次元結晶構造が生じ，その陽イオン側から水和が起こる．

①と②については，上述の臨界結晶核にも関係があると考えられる．すなわち，2 nm 程度の微細な結晶では表面に存在するイオンが結晶内部のイオンに比べて多く，部分的に水和している可能性が高い．一方で，時間変化することは水和構造を保ったイオンがそのまま凍結されている可能性を示唆しているとも考えられる．また，①の現象が共晶点以下の温度で過冷却液相が残っていることによると考えると，液相の体積を算出することができる．これは，上述のドープ氷を用いるアイスクロマトグラフィーでも確認されている．これらからも「氷ではかる」ことが「氷をはかる」ことにつながっていると言うことができる．②の現象が起こる温度などの条件は相当狭い範囲に限られており，再検証が必要であるが，氷の中でイオンとイオン結晶が織りなす現象として興味深い側面を含んでいる．

9．さいごに

氷を機能性材料と位置づけることで可能になる新たな計測法の展開と，そこから見える氷の化学について簡単に述べた．この他にも，電気化学測定，共存液相のチャンネル構造を利用した測定，凍結による高感度化，共存液相での反応や pH などについて検討を行っている．本稿でも，βCD のキラル認識促進や疎水性物質の特異溶解が起きる可能性を指摘したが，クラウンエーテルの錯生成がバルク水中にくらべて 4 桁程度大きくなる現象も見つけている（Tasaki and Okada, 2012）．いずれもなぜ起きるのかはわかっていないが，現象として大変興味深いものばかりである．これらの解明を含めて，「氷ではかる．氷をはかる．」ことをもう少し進めてみたいと考えている．これらの結果についても近い将来紹介したい．

本論文記載の研究は，科学研究費補助金，研究成果展開事業「先端計測分析技術・機器開発プログラム」（科学技術振興機構）によって行われた．

参考文献

Dasgupta P. K. and Mo Y. (1997) Chromatography on Water-Ice, *Anal.Chem*. **69**, 4079–4081.

Dobashi Y., Nakamura K., Saeki T., Matsuo M., Hara S., and Dobashi A. (1991) New Chiral Polysiloxane Derived from (*R, R*)-Tartramide for Enantiomer Resolution by Capillary Gas Chromatography, *J. Org. Chem.*, *56*, 3299–3305.

Ewing G. E. (2004), Thin Film Water, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 15953–15961.

Harada M., Tasaki Y., Qu H., and Okada T. (2012), Hydration of Ions and Salt Crystallization in Liquid Phase Coexistent with Ice at Temperature below Eutectic Point, *RSC Adv.*, **2**, 461–466.

Hashimoto T., Tasaki Y., Harada M., and Okada T. (2011), Electrolyte-Doped Ice as Platform of Femto to Attoliter Reactor Enabling Zeptomol Detection, *Anal. Chem.*, **83**, 3950–3956.

Holtz M., Dasgupta P. K., and Zhang G. (1999) Small-Volume Raman Spectroscopy with a Liquid Core Waveguide, *Anal. Chem.,* **71**, 2934–2938.

Kaji N., Tokeshi M., and Baba Y. (2007), Quantum Dots for Single Bio-Molecule Imaging, *Anal. Sci.*, **23**, 21–24.

Muro M., Harada M., Hasegawa T., and Okada T. (2012), Formation and Growth of Tetrahydrofuran Hydrate at Ice/Hexane Interface, *J. Phys. Chem. C*, **116**, 13296–13301.

Okada T. (2007), Liquid-core Waveguide in Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis*, **28**, 3414–3419.

Okada T. and Tasaki Y. (2010), Ice Chromatography: Current Progress And Future Developments, *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**, 221–227.

Pan J.-Z., Yao B., and Fang Q. (2010), Hand-held Photometer Based on Liquid-Core Waveguide Absorption Detection for Nanoliter-scale Samples, *Anal. Chem.*, **82**, 3394–3398.

Sadtchenko V. and Ewing,G.E. (2003), A New Approach to the Study of Interfacial Melting of Ice: Infrared Spectroscopy, *Can. J. Phys*., **81**, 333–341.

Sato K., Hosokawa K., and Maeda M. (2007), Colorimetric Biosensors Based on DNA-nanoparticle Conjugates, *Anal. Sci.*, **23**, 17–20.

Shamoto T., Tasaki Y., and Okada T. (2010), Chiral Ice Chromatography, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 13135–13137.

Sodeau, J. R and O'Sullivan, D. (2008), Halogen cryo-reactions and their effects on our atmosphere, in *Recent Developments of Chemistry and Photochemistry in Ice* Ed. Takenaka, N., 111–135.

Sugiya, K., Harada M., and Okada T. (2009), Water-ice Chip with Liquid-core Waveguide Functionality. Toward Lab on Ice, *Lab on Chip*, **9**, 1037–1039.

Supatashvili G. D. and Kartvelistvili V. G. (1986) Mechanisms of Substance Fractionation during the Partial Melting of Snow (in Russian), *Bull. Georgian Acad. Sci*., **23**, 38–43.

Tasaki Y. and Okada T. (2006), Ice Chromatography. Characterization of Water-ice as a Chromatographic Stationary Phase, *Anal. Chem.*, **78**, 4155–4160.

Tasaki Y. and Okada T. (2008A), Ice Chromatographic Characterization of Thin Liquid Layer at the Interface between Water-ice and Organic Solvent, *J. Phys. Chem. C*, **112**, 2618–2623.

Tasaki Y. and Okada T. (2008B), Ice Chromatography. Modification of Solute Retention on Water-ice Stationary Phase, *J. Chromatogr. A*, **1189**, 72–76.

Tasaki Y. and Okada T. (2009A), Adsorption-partition Switching of Retention Mechanism in Ice Chromatography with NaCl-doped Water-ice, *Anal. Sci.*, **25**, 177–181.

Tasaki Y. and Okada T. (2009B), Facilitation of Applicability in Ice Chromatography by Mechanistic Considerations and by Preparation of Fine Water-ice Stationary Phase, *Anal. Chem.*, **81**, 890–897.

Tasaki Y., Harada M., and Okada T. (2010), Eutectic Transition of Local Structure for Bromide Ion in Bulk and on Surface of Doped Ice, *J. Phys. Chem. C*, **114**, 12573–12579.

Tasaki Y. and Okada T. (2011), Control of Ice Chromatographic Retention Mechanism by Changing Temperature and Dopant Concentration, *Anal. Chem.*, **83**, 9593–9599.

Tasaki Y. and Okada T. (2012), Up to Four Orders of Magnitude Enhancement of Crown Ether Complexation in Aqueous Phase Coexistent with Ice, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6128–6131.

Wada A., Harada M., and Okada, T. (2006), Kinetic Monitoring of Electrophoretically Induced Solute Reaction by Axial Absorption Detection with Liquid-core Waveguide, *Anal. Chem.*, **78**, 4709–4712.

Ward T. J. and Baker B. A. (2008), Chiral Separations, *Anal. Chem.*, **80** ,4363–4372.