

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25248034

研究課題名(和文)氷で制限されたナノ-マイクロ空間の分析化学

研究課題名(英文)Analytical chemistry in nano- and microspace confined by ice

研究代表者

岡田 哲男 (Okada, Tetsuo)

東京工業大学・理学院・教授

研究者番号：20183030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、氷と共存する液相を利用して以下の成果をあげた。(1)氷粒界チャンネルサイズ制御と粒子識別。(2)粒子カウンティング。(3)凍結プロリンやロイシン水溶液によるキラル分離。(4)シアフローアイスクロマトグラフィー。(5)キャピラリー電気泳動での1000倍の凍結濃縮。(6)ポルタンメトリーの高感度化。(7)氷へのイオンの取り込みの定量的評価。(8)電解質ドープ氷中に生じる液相だまりの生成過程の解明。(9)遷移金属イオンを共存させた凍結NaClの2次元、3次元蛍光X線(XRF)イメージング。(10)凍結溶液でのイオンの水和。(11)凍結による反応促進と液相空間依存性など。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have developed novel methods based on the functionality and have revealed phenomena related to freezing of aqueous solutions; (1) size control of grain boundary channels and application to resolution of particle size; (2) particle counting; (3) chiral separation with frozen proline or leucine; (4) shear-flow ice chromatography; (5) 1000-fold sample enrichment for capillary electrophoresis; (6) enhanced sensitivity of voltammetry; (7) distribution of ions into the ice phase; (8) properties of liquid inclusion formed in frozen electrolyte systems; (9) X-ray fluorescence two- and three-dimensional imaging of frozen NaCl solution containing transition metal ions; (10) hydration of ions in frozen systems; (11) enhanced kinetics by freezing and its dependence on the size of a liquid phase.

研究分野：分析化学

キーワード：氷 凍結 液相空間 アイスクロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

氷はありふれた物質であるが、氷には多くの未解明現象があり、学術的興味は尽きない。近年、環境科学、宇宙科学、エネルギー、バイオテクノロジー、材料科学などの分野でも氷やその関連物質の研究が盛んになっており、氷の基礎物性の解明と新物性の開拓はこれらの先端科学・技術を支える基盤の一つとなっている。

一般的な氷の実験研究では、氷を測定対象とすることで、氷を理解し、付随する現象を見出し・解釈することを目指している。光、電子、中性子などの物理プローブを用いる研究が多数展開されているが、氷の核形成、結晶成長、プロトン伝導のような基礎物性でさえ完全には理解されていない。特に表面・界面物性には未解明な点が多く、固定観念にとらわれないアプローチが必要である。代表者らはアイスクロマトグラフィーを開発し、氷表面に特有の分離選択性が発現されることを見出し、さらに分子プローブによる表面解析が可能であることを示した。また、凍結前に物質を溶かしておくだけで、合成を用いずに新たな機能を付与することも氷の大きな特徴である。また、種々の新規現象を見出している。これまでも、氷共存液相が窒素酸化物の輪廻やオゾン層破壊などの大気化学反応でも重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかし、このような反応が真にどこで起こるのが明確でなく、反応媒体としての氷の効果も詳細は不明であった。さらに、計測法が限られているために可逆反応は取り扱われてこなかった。代表者らは、氷制限空間での反応を *in situ* 計測することで、反応場の特定と可逆反応への適用が可能であることを示した。

2. 研究の目的

氷を用いて測定法を設計・実現し、それに基づいて氷を理解する研究は、代表者らの研究以外にはほとんど例がない。これはこのような発想がそもそもなかったからである。本研究では、これまでの研究をベースに、氷以外の物質では実現できない計測法を開発し、それに基づいて氷と氷で制限された液相中での新現象、新反応を開拓する。さらにそれらの分子論的な起源を解明することにより、氷をキーマテリアルとして物質科学の最先端を開拓する。

3. 研究の方法

以下の方法を用いて研究を推進した。

1. アイスクロマトグラフィー、シアーフローアイスクロマトグラフィー
2. 蛍光顕微計測
3. 凍結蛍光スペクトル測定
4. 凍結電気化学測定
5. 蛍光 X 線
6. 凍結試料のラマン分光、NMR

4. 研究成果

【物質分離、センシング】 氷粒界チャンネル(GBC)サイズ制御と粒子識別：温度、ドーパント濃度により GBC サイズを制御し、新しい分離計測概念を示した。スクロースドープ氷では約 50 μm の間隔で 300 μm 程度の長さをもつチャンネルが生じることを見出した。マイクロ粒子をこのチャンネル内で電気泳動させることに成功した。種々の粒径の粒子を泳動させることで、チャンネル幅を正確に決定した。図 1 に示すように、スクロース濃度と温度を制御することにより、200 nm から 4 μm までの間でチャンネル幅を制御できることを示した。このことは氷を用いた粒子のサイズ分離の可能性を拓いたと言える。また、DNA をこのチャンネル内に導入すると、大きさだけでなく凝集状態も評価できることがわかった。(Sci.Rep.2015, 5, 17308)。

この氷内部チャンネルは粒子カウンティングデバイスとしても有効である。粒子を含む塩の溶液を凍結し、伝導率を測定したところチャンネルをブロックした粒子を計測することができた。これにより単一粒子センシングの可能性を示した(Anal.Sci.2014,30,1035)。

アイスクロマトグラフィー：アミノ酸単量体はそのままではほとんどキラル認識能を示さないが、プロリンやロイシン水溶液を凍結するとキラル認識能が発現することを見出した。塩の添加や pH の調整など、条件を変化させてキラル分離能を検討したところ、アミノ基がキラル分離に重要な役割を果たしていること、氷と共存する液相が存在しない条件がキラル分離に適していることを明らかにした。分子軌道計算により、図 2 に示すように、単量体のプロリンと二量体プロリンについてパイノールとの相互作用エネルギーを計算したところ、単量体にはキラル認識能は存在せず二量体のみキラル認識能があること、認識選択性が R 体に対して大きな相互作用を示し、アイスクロマトグラフィーと一致することを確認した。このことから、凍結によりアミノ酸の多量体が氷表面に生じ、それによってキラル認識能が発現していることが明らかとなった(Anal.Method 2016, 8, 105)。

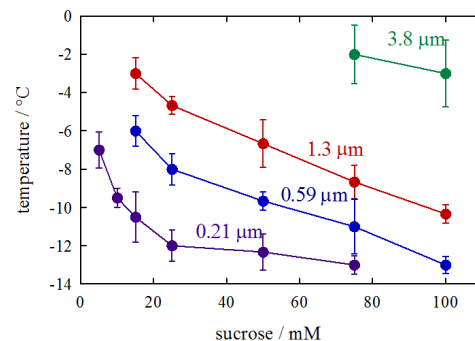


図 1 スクロースドープ氷表面に生じる液相チャンネル幅の温度とスクロース濃度依存性

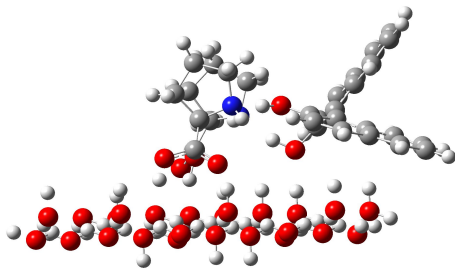


図2 氷表面でのプロリン2量体とR-バイノールとの相互作用

アイスクロマトグラフィーにおける多重拡散などを抑制するためにシアーフローアイスクロマトグラフィーを開発し、電荷による色素の分離に成功した(*Anal.Sci.*32, 805, 2016)。

【濃縮法としての凍結】水溶液を凍結すると、液相に溶質が濃縮される。このときの濃縮率は主溶質によって決まり、マイナー成分は主溶質の濃縮率に応じて液相に濃縮される。したがって、温度と主溶質濃度で自由に濃縮率を制御できる。一方、液相を任意の位置に出現させることは困難であるが、濃縮法として凍結を用いるためには液相の生成位置制御が極めて重要である。

キャピラリー電気泳動(CE)は、nL オーダーの試料溶液しか要しないため、高濃縮率でもCEの試料溶液としては十分な体積を確保できる。この点で凍結濃縮との相性が良い。しかし、氷に分散して液相が存在するとCEに濃縮後の試料を注入することができない。試料溶液を一方向に凍結することで、この問題を解決した。容器の底から表面方向に氷を成長させることで、表面付近に濃縮溶液を生成させ、CEに注入することで1000倍程度の濃縮が可能であった。(*Anal.Methods*,2013,5, 5912)。

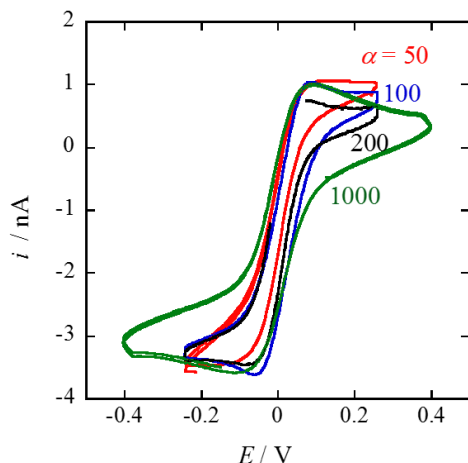


図3 50-1000倍の倍率で凍結濃縮した $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ のサイクリックボルタモグラム。NaClで濃縮率を制御。温度、 -3.4°C 、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ の凍結後の液相濃度2mM。

また、溶液は凍結系中の異種界面に形成される傾向がある。そこで、電極を溶液に浸けたまま凍結することで電極表面付近に液相形成を誘導し、その後ポルタンメトリーで計測することを検討した。一度高い温度でアニールした後、温度を下げることで、図3に示すように、目指した濃縮率で溶質を濃縮することがわかった。また、クロノアンペロメトリーを用いることで、電極表面での氷の成長、融解方向や電極活性物質の拡散方向についての知見が得られることを明らかにした。

(*Anal.Chem.*2015, 87, 4314)。

【氷界面での物質挙動解析】凍結によるイオンの挙動：イオンの氷への分配不均衡を精密に評価した。塩の水溶液を凍結すると陽イオンと陰イオンで氷への取り込まれやすさが異なるために、氷、溶液の両方の相で電荷の不均衡が起きる。これを補償するために、水が解離して、水素イオンと水酸化物イオンがそれぞれの相に移動する。たとえば、陰イオンが優先的に氷に取り込まれれば液相が塩基性に、陽イオンが取り込まれると液相が酸性に変化する。アルカリ金属塩化物水溶液を凍結した際の液相のpHを蛍光性pH指示薬であるピラニンを用いて精密に測定した。その結果を次式で表される液相/氷間の分配モデルを構築し、解析した。

$$[\text{Cl}^-]_{\text{ice}} - [\text{Na}^+]_{\text{ice}} = (K_- - K_+)c_0 \frac{V_0 \rho_{\text{liq}}}{V_{\text{ice}} \rho_{\text{ice}}} \ln \left(\frac{c_{\text{liq}}}{c_{\text{ice}}} \right)$$

ここで、 K 、 ρ 、 V 、 c はそれぞれ、イオンの分配係数、密度、体積、濃度を、下付の0、liq、iceはそれぞれ全体、液相、氷を表す。塩化物塩では氷相に Cl^- が優先的に取り込まれ、アルカリ金属イオンの氷への取り込みは、 $\text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ の順に小さくなること、イオン間の分配係数の差は 10^4 程度であることなどを明らかにした。(*J.Phys.Chem.C* 2014,118, 15723)。

電解質ドープ氷中に生じる液相だまりの種結晶の大きさは電解質の種類によらず一定であるという興味深い事実を発見した。蛍光顕微画像から一つの液だまりの大きさを

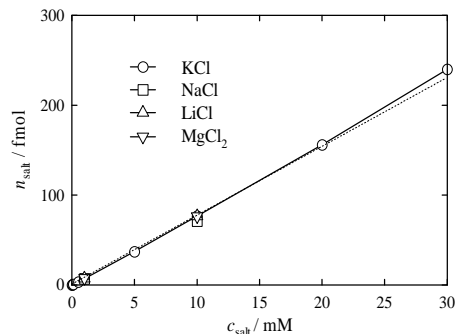


図4 凍結水溶液中の液だまりを形成する種結晶の物質質量。塩の種類および凍結前の塩濃度依存性。

算出し、液だまりを形成するための種結晶の物質量を算出した。図4に結果を示す。この図から種結晶の物質量はおおむねサブ pmol のオーダーであり、凍結させる溶液の濃度に比例すること、塩の種類によらないことがわかる。また、X線小角散乱の結果から、この種結晶は 10^6 - 10^8 個程度のnmオーダーの微小結晶の集まりであることを明らかにした(ChemPhysChem 2013,14,3410)。

遷移金属イオンを共存させた凍結 NaCl の2次元、3次元蛍光X線(XRF)イメージングを行い、特異的濃縮などの挙動を発見した。遷移金属イオンは流氷などと共に運ばれ生物活動に関与していると考えられている。遷移金属イオンを含む NaCl 水溶液は海水のモデルでもある。このような溶液は、NaClの水溶液の凍結と同じ凍結挙動を見せる。その際、マイナー成分である遷移金属イオンも液相に濃縮される。このような氷を試料として、高エネルギー加速器研究機構および SPring8の放射光X線を用いてXRFイメージングを行った。結果の一例を図5に示す。画像の交差部分が氷、2つの交差する線が液相であり、ここに NaCl と遷移金属イオンが濃縮されている。温度が低い(-12.0 °C)ときに、液相が大きく見えている。これは、凍結濃縮により液相中のイオンの濃度が高くなったことによる。-5.0 °Cでは液相の形が変形しており、氷の融解が進んだことがわかる。Cl⁻、Mn²⁺、Co²⁺はほとんど同じイメージを与えており、これらが単純に液相に濃縮されたことを示唆している。一方、Cu²⁺とZn²⁺は異なる凍結濃縮挙動を示しており、特異的な濃縮が起きている可能性が高い。この原理によりXRF測定の高感度化可能であると考え、現在検討を進めている。

また、測定温度における濃縮率が既知であることを利用し、2次元画像から3次元画像を計算できることを示した。図6にCl⁻、Mn²⁺、

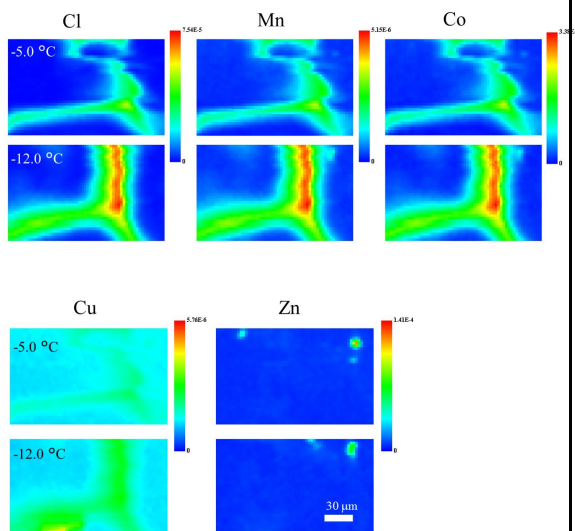


図5 凍結 NaCl 水溶液の XRF イメージング。凍結前の濃度：25 μM Mn²⁺、15 μM Co²⁺、5 μM Cu²⁺、5 μM Zn²⁺、17 mM NaCl。

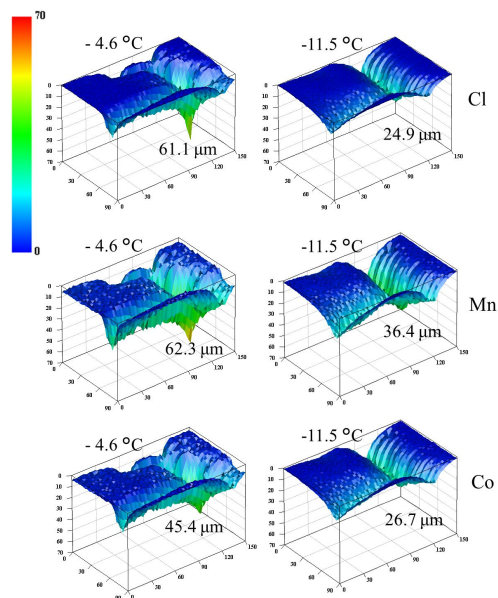


図6 図5の2次元画像データから計算した3次元画像

Co²⁺のシグナル強度を利用して求めた画像を示す。いずれの元素を用いた場合もほぼ同じ3次元画像が得られている。水溶液チャンネルの交点が最も液相が深く、その深さはおよそ50 μmであることがわかる。

(Langmuir 2016, 32, 527)。

凍結水溶液と1,2-ジクロロエタンの界面でのイオン移動ポルトンメトリー測定に成功した。テトラメチルアンモニウムイオンの水和エネルギーが凍結により低下することを見出した(ChemElectroChem, 2015, 2, 1249)。

凍結反応促進：凍結濃縮では促進されない擬一次反応が、氷制限空間では促進されることを見出した。フルオレセインジアセテートの塩基性での加水分解反応速度を凍結条件下で評価した。LiClとNaClを電解質として用いたときの結果を図7に示す。この図の横軸

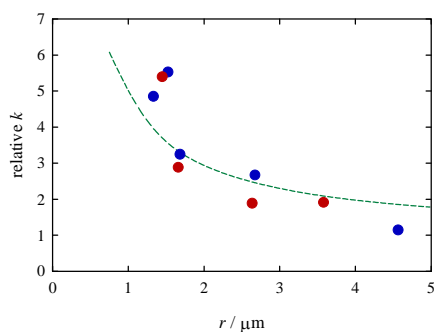


図7 フルオレセインジアセテートの加水分解反応速度。赤丸、LiCl。青丸、NaCl。温度、256.5 K。イオン強度、LiCl 4.0 M、NaCl 3.0 M。反応速度定数は、未凍結溶液に対する相対値。横軸は、液相空間の半径。破線は、氷界面での反応促進を仮定して計算した結果。

は、測定条件における液相空間の半径を、縦軸は未凍結溶液に対する相対的な速度定数を表す。未凍結溶液に比べて、反応速度が大きくなっていること、凍結空間が小さくなるほどその傾向が顕著であることがわかる (*J.Phys.Chem.A* 2013, **117**, 10619)。氷界面で反応速度が大きくなることを仮定したモデル(図中の破線)により実験結果を解釈できることがわかった。

NMR およびラマン分光を用いて、氷界面でのアルコールの分子間相互作用を検討した。類似構造を持つグリセロールと1,3-ブタンジオールの氷界面での挙動は異なることを明らかにした。測定結果から、前者は水と混合した状態を保つのにに対し、後者は水と分離して氷界面に存在することがわかった。

(*J.Phys.Chem.C* 2013, **117**, 24873)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

1) Chiral Resolution with Frozen Aqueous Amino Acids, S.Takahashi, M.Harada, T.Okada, *Anal.Methods* **8**, 105 – 110 (2016) 査読あり

2) X-ray Fluorescence Imaging of Frozen Aqueous NaCl, K.Tokumasu, M.Harada, T.Okada, *Langmuir*, **32**, 527–533 (2016) 査読あり

3) Shear-Driven Flow Ice Chromatography as Possible Tool Probing Ice/Water Interface, M.Shimizu, M.Harada, A.Hibara, T.Okada, *Anal.Sci.* **32**, 805-808 (2016) 査読あり

4) Fluidic Grooves on Doped-Ice Surface as Size-Tunable Channels, A.Inagawa, M.Harada, T.Okada *Sci. Rep.* **5**, 17308, 10 pages (2015) 査読あり

5) Freeze Enrichment Protocol Based on Voltammetric Probing of Liquid-Phase Growth in Frozen Aqueous Electrolyte Solutions, H.Qu, Y.Arai, M.Harada, T.Okada, *Anal.Chem.* **87**, 4314-4320 (2015) 査読あり

6) Microfluidic Protein Crystallisation Controlled Using Spontaneous Emulsification, M.Fukuyama, A.Akiyama, M.Harada, T.Okada, A.Hibara, *Anal.Methods*, **7**, 7128-7131 (2015) 査読あり

7) Ion-Transfer Voltammetry at the Interface between Organic and Salt-Doped Ice Phases, H.Qu, M.Harada, T.Okada, *ChemElectroChem*, **2**, 1249-1253 (2015) 査読あり

8) Versatile Chiral Chromatography with Mixed Stationary Phase of Water-Impregnated Silica Gel and Reversed-Phase Packing, S.Takahashi, T.Okada, *Analyst*, **139**, 3410-3416 (2014) 査読あり

9) Imbalance between Anion and Cation Distribution at Ice Interface with Liquid Phase in Frozen Electrolyte as Evaluated by Fluorometric Measurements of pH, H.Watanabe, T.Otsuka, M.Harada, T.Okada, *J.Phys.Chem.C*, **118**, 15723–15731 (2014) 査読あり

10) Single Micro-channel Formation in a Gap between Probe Electrodes by Freezing Aqueous Electrolyte, Y.Arai, M.Harada, T.Okada, *Anal.Sci.* **30**, 1035-1037 (2014) 査読あり

11) Constant Number Density of Liquid Inclusions Formed in Frozen Aqueous Electrolyte, T.Hashimoto, M.Harada, S.Noijima, T.Okada, *ChemPhysChem*, **14**, 3410-3416 (2013) 査読あり

12) Freeze Sample Enrichment Highly Adaptable to Capillary Electrophoresis, K.Ito, T.Okada, *Anal.Methods*, **5**, 5912–5917 (2013) 査読あり

13) Enhanced Kinetics of Pseudo First-Order Hydrolysis in Liquid Phase Coexistent with Ice, K.Anzo, Harada, T.Okada, *J.Phys.Chem.A*, **117**, 10619–10625 (2013) 査読あり

14) Behavior of Polyhydric Alcohols at Ice/Liquid Interface, M.Uyama, M.Harada, T.Tsukahara, T.Okada, *J.Phys.Chem.C*, **117**, 24873–24882 (2013) 査読あり

[学会発表](計 13 件)

1) Synergistic Effect of Histidine on Cyclodextrin Chiral Resolution in Aqueous Phase Supported by Silica Gel Stationary Phase. Y.Imura, T.Okada, HPLC2016, San Francisco, Jun, 2016.

2) Size Tunable Channels Fabricated with Ice for Nano/Microseparation, A.Inagawa, M.Harada, T.Okada, HPLC 2015, Geneva, Switzerland, June, 2015.

3) Ice grain boundary as a size-selective electrophoretic separation field A.Inagawa, T.Okada, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, December 2015

4) Shear flow ice chromatography, M.Shimizu, M.Harada, T.Okada, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, December 2015.

5) Two-dimensional Separation of Particles with Acoustic-Gravity-Flow Field, T. Kanazaki, T.Okada, FFF2014, Salt Lake City, October 2014.

6) Chiral Recognition in Frozen Aqueous Phases, Satsuki Takahashi, T.Okada, Chirality 2014, Prague, June, 2014.

7) Hydration Structures of Bromide Ion in Various Molecular Environments, e.g. in Aqueous Polyelectrolyte, on Micellar Surfaces, and in Frozen Electrolyte, M.Harada, T.Okada, Polyelectrolyte, Singapore, January, 2014.

8) Bio-separation by Ice Grain Boundary Electrophoresis, A.Inagawa, T.Okada, RSC Tokyo International Conference 2014, Chiba, Japan, September 2014.

9) Ice Grain Boundary Electrophoresis. Concept and Applicability A.Inagawa, T.Okada, The 6th International Conference of Ion Exchange, Okinawa, Japan, November 2014.

10) Ice Grain Boundary Electrophoresis, A.Inagawa, T.Okada, The 17th International conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences, Freiburg, Germany, October 2013.

11) Ice Confined Liquid Phase Microreactor Accelerating Reactions Therein, K.Anzo, T.Okada, The 17th International conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences, Freiburg, Germany, October 2013.

12) pH Shift in Frozen Electrolyte Caused by Imbalance of Ionic Distribution between Ice and Liquid Phases, H.Watanabe, T.Okada, The 17th International conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences, Freiburg, Germany, October 2013.

13) Ice Grain Boundary Electrophoresis, A.Inagawa, T.Okada, RSC Tokyo International Conference 2013, Chiba, Japan, September 2013.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡田 哲男(Tetsuo Okada)
東京工業大学・理学院・教授
研究者番号：20183030

(2)研究分担者

火原 彰秀(Akihide Hibara)
東京工業大学・理学院・准教授
研究者番号：30312995

原田 誠(Makoto Harada)
東京工業大学・理学院・助教
研究者番号：60313326

大塚 拓洋(Takuhiro Otsuka)
東京工業大学・理学院・助教
研究者番号：20280993

山本 佳孝(Yoshitaka Yamamoto)
産業技術総合研究所・研究員
研究者番号：80358283