

Focusing Review

アイスクロマトグラフィーによる氷と液相界面へのアプローチ

岡田哲男

Ice Chromatographic Approach to Interface between
Water-ice and Liquid Phase

Tetsuo Okada

*Department of Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Meguro-ku, Tokyo 152-8551, Japan**Received for review October 15, 2008. Accepted December 9, 2008.*

Abstract

Ice chromatography, in which water-ice particles are used as a chromatographic stationary phase, is an efficient method to probe the molecular interaction taking place on the surface of water-ice. Hydrogen bonding is a dominant retention mechanism at the temperatures of $<-2^{\circ}\text{C}$. A retention model indicates that two hydrogen bonds are simultaneously formed between an analyte molecule and the dangling bonds of water-ice regardless of the number of polar groups involved in an analyte molecule. As the temperature is raised, the quasi liquid layer (QLL) is developed at the surface of water-ice, and, in turn, the partition into QLL dominates the retention of water-soluble analytes. The thickness of QLL can be evaluated on the basis of an increase in retention due to the mechanism change.

Keywords: water-ice surface, hydrogen bonding, quasi liquid layer, ice chromatography.

1. はじめに

クロマトグラフィーの移動相として水または水性溶媒が用いられることは少なくない。私たちが日常的に用い、なじみ深い液体の水は、イオンをよく溶かし、極性の低い有機物をあまり溶かさない。しかし、高温水や超臨界流体水を用いると通常の液体の水とは異なる性質が現れることが知られており、クロマトグラフィーの移動相としての利用も検討されている[1, 2]。一方、通常の生活の中ではなじみのある物質であるにもかかわらず、クロマトグラフィーに限らず分離や計測にあまり利用されてこなかったものに、氷がある。融けないように温度制御する必要があり、液体の水に比べると利用

する上での制約条件が多い。どのような利用形態を選んでも決して使いやすい物質ではないかもしれない。それでは、氷を分離や計測の材料として用いることは荒唐無稽なことなのであろうか。

大気圧下、通常温度下での氷の安定相は氷 1h であり、六方晶系結晶構造を持っている。結晶やバルクの固体としての物性はこれまでに相当の研究の集積があり、よく理解されている。しかし、氷の表面や氷と液体の界面については未解明の現象が多い。典型的な問題として今も世界中の研究者を引きつけている問題に氷表面の擬似液層 (QLL) がある。QLL は雪の結晶形の決定、雷や凍上現象などの気象現象とも関係

東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻

〒152-8551 目黒区大岡山 2-12-1

電話：03-5734-2612

FAX：03-5734-2612

Email: tokada@chem.titech.ac.jp

があるとされている[3-7]。熱力学的な理論に基づいて、液層の存在による化学ポテンシャルの増加（融点以下で液相が存在することによる不安定）が表面エネルギー（固気界面に代わって固液と気液界面が存在）によって相殺されるために QLL が生じること、温度の上昇と共に QLL が厚くなり、発達することなどが示されている。実験的な研究例も数多いが、測定法や試料状態による違いが大きく、擬似液層の厚さの報告値には 2 桁程度のばらつきがある。

また、近年注目されている物質に不凍タンパクがある。南氷洋に生息する魚などでは氷点以下でも細胞液が凍らないことは長年知られていた[8-10]。このことは細胞液に溶解している物質による凝固点降下では説明できず、他のメカニズムの関与が示唆されていた。この現象を引き起こしているのが不凍タンパク質であるとされており、氷核が形成するとそこに吸着して氷の結晶成長を妨げるというメカニズムが指摘されている。最近ではある種の魚からこのタンパク質が大量に単離されるようになり、実験、理論の両面からの検討が進んだ。しかし、その分子論的描像が完全に解明されたわけではなく、特定の結晶面に不凍タンパク質が吸着することを示唆する研究例もある一方で、このメカニズムが疑問であるという指摘もある。このように氷の表面で起きる現象には、広い分野の研究者から注目されている最新の科学のトピックスが少なからず含まれている。

分離、計測の立場から氷に関する現象を考えると、①氷の関わる興味深い現象は氷の表面（界面）で起きる、②氷表面の状態、界面での相互作用の多くは未解明である、③分離、計測手法には表面や界面を利用するものが少なくない、ということに気付く。クロマトグラフィーは、典型的な界面を利用する計測手法である。したがって、氷を固定相としてクロマトグラフィーを行えば、従前のアプローチとは異なる視点で氷の関わる界面の現象を捉え得るに違いないという発想が生まれる。また、氷は水の一形態であり、廃棄に特段の考慮を必要としない環境調和性の高い物質である。したがって、氷を材料として計測化学を展開することは、今世紀の科学において重要であるとされている“環境に優しい”という観点からも有利である。このような考えに基づき、筆者らは氷を固定相とするクロマトグラフィー、“アイスクロマトグラフィー”を提案し、氷／溶液界面での現象を捉えると共に、実際の分離法としてこの手法がどこまで通用するのかを検討している。現時点まで得られている成果は限られているが、クロマトグラフィーの手法を用いることで、広く興味の持たれている現象の解明や、新現象の発掘に寄与できる可能性があると考え、概要を紹介させていただく。

2. 氷を固定相とするクロマトグラフィー

氷を固定相として用いるクロマトグラフィーのアイデアは以前からあったものと思われる。しかし、筆者らが知る限りでは二グループによる論文が出版されているだけである。一

つは、Supatashvili のグループによるもので[11-13]、雪を集めてカラムに詰め、色素分子の吸着挙動や流れ出してくるイオンの分析を行っている。いずれの場合も物質による明確な挙動の違いは検出されていない。彼らは基本的には雪や氷河などへの興味からこの研究を行っており、分離や雪と溶液界面の分子挙動に興味があったわけではないように思われる。クロマトグラフィーを意識して氷を固定相として用いた報告に、Dasgupta と Mo によるものがある[14]。彼らはドライアイスと共に乳鉢中で破碎した氷をカラムに充填して、ヘキサノ／酢酸エチル移動相を用いて色素分離を試みている。最近になって、著者に確かめたところ、アラスカなどでタンカーが座礁した際に、流れ出した原油が氷の中でどのように挙動するのかを知ることが一つの目的であったとのことである。戦略的に色素分子を選択したわけではないこと、固定相として用いた氷粒子が大きいことなどの理由から、全く保持されていないものとわずかに吸着した色素の 2 種類が異なる挙動を見せたのみであった。この後このグループはこの方法の検討をやめてしまっている。

このように、アイスクロマトグラフィーでは、固定相の調整と試料分子の選択の観点から相当な考慮が必要であり、やみくもに氷をカラムに詰めてクロマトグラフィーの測定をすればよいというものではない。

3. 氷固定相の調整

アイスクロマトグラフィーを実践するに当たり、固定相の調整は重要な課題である。筆者らは、通常の測定には以下の手順で氷固定相を調整した。①ガラス製のネブライザーを用いて噴霧した水を液体窒素中に直接導入し凍らせる。②氷粒子を液体窒素中で 75 μm の金属ふるいを用いて選別し、大きな粒子を除く。③液体窒素中で PEEK カラムに充填する。このようにして調整したアイスカラムで、比較的安定した結果が得られたが、粒径から予想される通り、分離能はあまり高くない。一方、超音波加湿器が発生するミストは直径が 10 μm 程度である。また、一時間に 100mL 程度の水をミストにする装置も市販されている。これを用いると、図 1 に示すような氷粒子を調整することができることがわかった。ヒストグラムが示すよう氷粒子の平均粒径は 6.2 μm ($\sigma=3.4\mu\text{m}$) であり、比較的大きさのそろった氷固定相が得られた。実際、この方法によりガラス製のネブライザーを用いて調整したものよりも高い分離能が得られたが、水から調整した氷粒子の中には小さな粒子が凝集した塊が多数含まれており、カラムへの均一な充填が困難であった。1 mM 程度の種々の電解質を用いて氷固定相の調整を試みたところ、臭化テトラブチルアンモニウム (TBAB) を加えることにより粒子の凝集を防ぐことが可能であることがわかった[15]。以下に示す結果は、必要に応じてこれらの氷固定相を使い分けた。

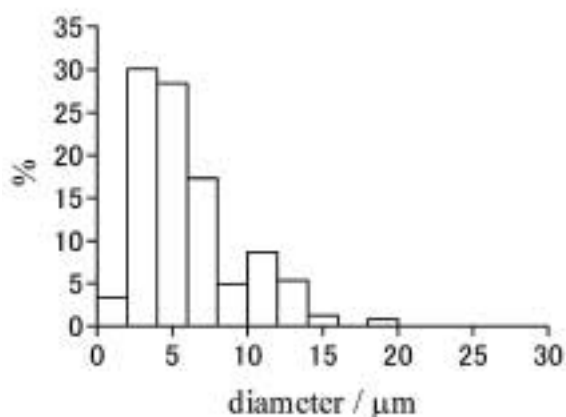
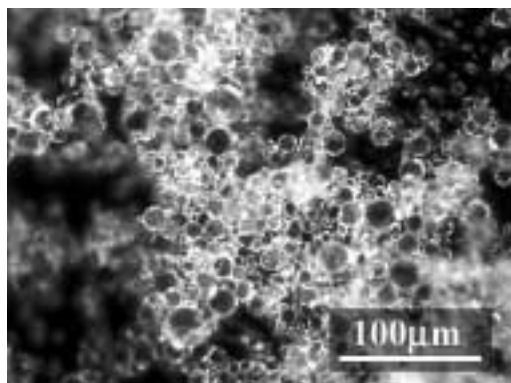


図1 超音波加湿器で調製した氷の顕微鏡写真とそこから求めた粒径分布

4. 水素結合形成による氷表面への吸着

バルク氷中の水分子は、酸素原子が4つの水素原子（2つは共有結合性、2つは水素結合性）に囲まれることによってネットワークを形成している。しかし、図2に示すように、表面にはダングリングボンドをもつ酸素原子および水素原子が存在し、吸着サイトとして機能すると考えられる。それぞれを-O-ダングリングボンドおよび-OHダングリングボンドと呼ぶことにする。極性の小さな移動相を用いてアイスクロマトグラフィーを行うと、これらのダングリングボンドと試料分子間に水素結合が形成されると考えられる[16, 17]。そこで、試料として、エーテル基またはヒドロキシル基を持つ化合物を用いた。図2に示すように、前者は氷表面の-OHダングリングボンドと、後者は-OHダングリングボンド、-O-ダングリングボンドいずれとも水素結合を形成でき、氷固定相に保持されると考えられる。図3に、移動相としてジエチルエーテル (DEE) / ヘキサンを用いたときの DEE 濃度による試料の保持変化を示す。DEE は-OHダングリングボンドとのみ相互作用し、-Oダングリングボンドとは水素結合を形成しないと考えられる。DEE 濃度の増加と共にいず

れの試料の保持も減少するが、その程度はクラウンエーテル類もフェノール類も同様である。したがって、-Oダングリングボンドへの吸着はあまり起きておらず、-OHダングリングボンドとの水素結合形成のみが重要であると考えられる。また、結晶面の構造から、-Oに対し-OHダングリングボンドは外側にあり、溶質と水素結合するのに好都合であることがわかる。

試料分子の-OHダングリングボンドへの吸着を次式で表すことができる。

$$s + n\text{-OH} \xrightleftharpoons{K_s} \text{-OH}_n\text{-s}$$

$$K_s = \frac{\Gamma_{\text{OH}_n\text{-s}}}{[s]\Gamma_{\text{OH}}^n}$$

ここで、 $\Gamma_{\text{OH}_n\text{-s}}$ および Γ_{OH} はそれぞれ、試料分子の表面濃度と-OHダングリングボンドの表面濃度、 $[s]$ は試料の濃度である。また、 n は吸着時に形成される水素結合の数である。同様に移動相中に加える極性成分（図3の例では DEE）の濃度を $[\text{PC}]$ 、吸着平衡定数を K_{PC} 、-OHダングリングボンドの表面全濃度を Γ_{OH} とすると、リテンションファクター

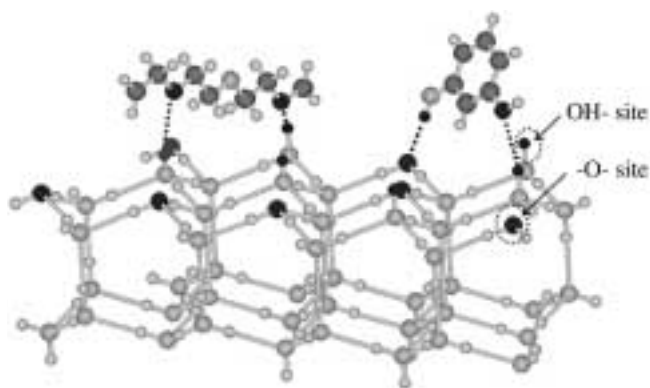


図2 氷表面 ([0001]面) と水素結合する化合物の模式図

大きい球は酸素原子、小さい球は水素原子を表す。黒い球は、水素結合ネットワークに完全には組み込まれていない原子を表す。

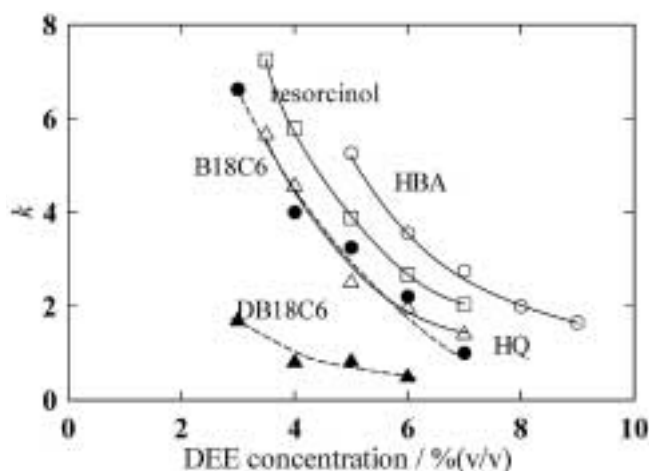


図3 DEE 濃度に対する各種溶質の k の依存性
略号は表1の説明参照。

表1 各種溶質の n の値

極性成分	n					
	B18C6	DB18C6	DB24C8	HQ	resorcinol	HBA
DEE	1.69	1.84		2.32	1.77	2.01
THF	1.57		2.08	1.82	1.93	2.00

B18C6, DB18C6, DB24C8, HQ, HBA はそれぞれ、ベンゾ18-クラウン-6, ジベンゾ18-クラウン-6, ジベンゾ24-クラウン-8, ヒドロキノン, ヒドロキシベンジルアルコールの略。

は以下のように書くことができる。

$$k = \frac{A\Gamma_{OH}^n K_S}{V(1 + K_{PC}[PC])^n} \quad (1)$$

ここで、 A と V はそれぞれ氷固定相の表面積とカラム中の移動相体積である。この式から、 $K_{PC}[PC]$ が1より大きいときには $\log k - \log [PC]$ プロットが直線になり、その傾きから n を決定することができる。表1にDEEおよびTHFを極性成分としたときの n の値を示す。分子内にヒドロキシル基が2個あるフェノール類では n が概ね2になっており、両方のヒドロキシル基が水素結合に関与していることがわかる。また、クラウンエーテル類では環の大きさが大きいときに n が若干大きくなる傾向が見られるが、やはり n は2付近の値をとる。このことから、同時に生じる水素結合数は基本的に二つであり、溶質分子中に極性基が三個以上ある場合には、二つを越える水素結合が同時に生じ得るがその寄与は小さいと結論できる。したがって、極性基の数が増えることによる保持の増加は、主に二つの水素結合を生じるためのエントロピー的な利得によるものと考えられ、この他に水素結合数の若干の増加と極性基の位置による効果が副次的に寄与しているものと考えられることができる。

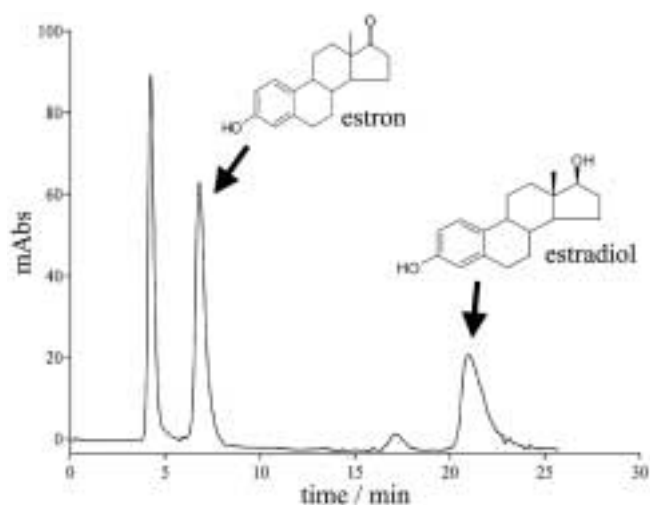


図4 アイスクロマトグラフィーによるエストロゲンの分離
移動相：2%THF-ヘキサン，温度：-4℃。はじめのピークはボイドピークであり，17分付近のものは不純物によるものである。

以上のように、氷への吸着の強さは、極性基の数に依存することがわかった。この特徴を利用すると、種々の物質を分離することができる。女性ホルモンであるエストロゲンの分離例を示す。エストロゲンには、エストロン、エストラジオール、エストリオールの3種類がある。アイスクロマトグラフィーを用いると図4に示すようにエストロンとエストラジオールを分離することができた。エストリオールは、この条件では吸着が強すぎるためにカラムから溶出しなかったが、他の2つと識別されたことは明らかである。この他にも、ポリオキシエチレン型非イオン性界面活性剤成分の極性基の大きさによる分離や、アミノ酸誘導体の分離などが可能であることがわかっており、上述の例のように極性基の種類とその数によって溶出順を説明できる。

5. 氷表面疑似液体層 (QLL)

4で述べたアイスクロマトグラフィーにおいては、QLLの存在が無視でき、物質の氷への保持は水素結合による吸着で説明できた。4までの実験は主に-4℃以下で行った。このような温度範囲では、温度を下げることで保持が若干大きくなる傾向が見られた。これは水素結合が低温で強くなる一

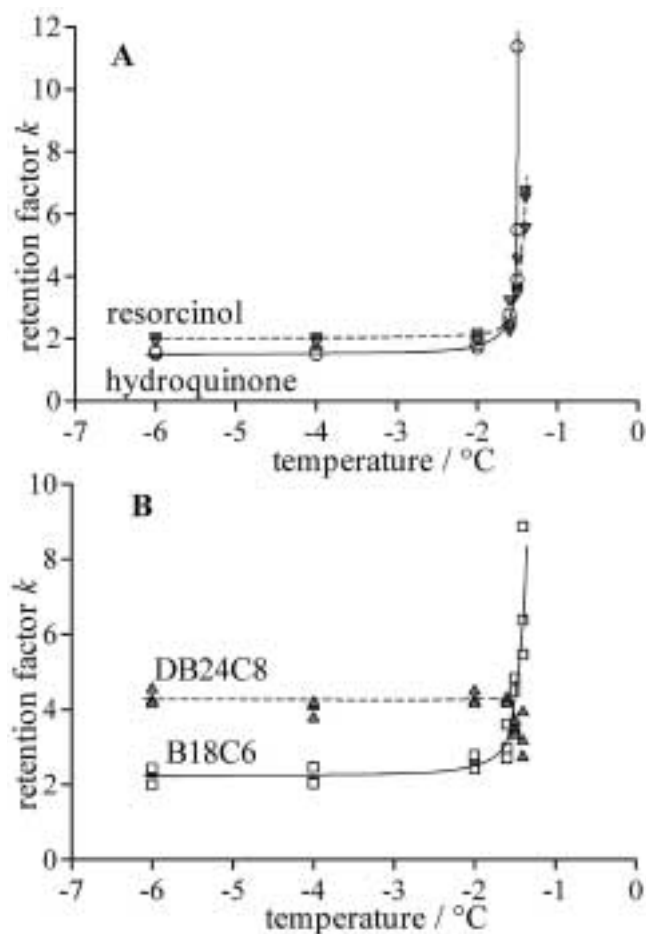


図5 QLLの成長による k の変化。移動相：3%THF-ヘキサン。

般的傾向とも一致する。一方で、図5に示すように、温度を -2°C 以上の領域に上げると、ヒドロキノンやレゾルシノールなどでは急速に保持が大きくなることがわかった[18]。この保持増加は、氷粒子表面にQLLが成長したためであると考えることができる。これまで種々の研究によって指摘されているように温度上昇によってQLLは厚くなると考えられる[3]。QLLが成長すると、試料は氷表面との水素結合形成による吸着よりもむしろQLLへの分配によって氷固定相に保持される。温度上昇によるQLLの成長は固定相として働く水相の体積を増加させるので、保持の急激な変化はQLLの成長を反映していると考えのが妥当である。

QLLへの分配による保持変化は、溶質の分配特性によって異なる。図5に示す溶質ではジベンゾ24-クラウン-8 (DB24C8)の保持が温度増加によって減少しているのに対し、他の溶質の保持は増加している。この違いは、水/ヘキサン-THF間での溶質の分配の違いによって説明できる。すなわち、DB24C8の水/ヘキサン-THF間の分配係数 K_d ($=C_{\text{water}}/C_{\text{hexane-THF}}$, クロマトグラフィー系との整合性を保つため、通常とは異なり水中での濃度を分子にとった)は他の溶質に比べて2桁程度小さく、水への分配が極端に小さい。したがって、この物質はQLLが成長してもそこにはほとんど分配されず、むしろ氷表面が固体から液体的になることによって水素結合吸着が抑制され、 k が小さくなったと説明することができる。他の3つの溶質はQLLへの分配が主な保持機構となり、温度の増加と共に保持が極端に大きくなる。

QLLの厚さは、 -3°C 以上での k の変化分 Δk の値から見積もることができる。 Δk は、疑似液体層の厚さ L と溶質のQLL-移動相間分配係数 K_d に依存する。QLLの溶媒としての特性を通常の水で表せると仮定すると、 Δk を以下のように表すことができる。

$$\Delta k = \frac{V_{\text{QLL}}}{V_m} K_d = \frac{L \cdot S}{V_m} K_d \quad (2)$$

V_m は移動相の体積、 S は氷の表面積である。この測定で用いた氷固定相の表面積を窒素BET吸着法で求めたところ、カラム当たり(内径7.5mm, 長さ150mm) $S=12\text{m}^2$ であった。この値と、水/ヘキサン-THF間の K_d , および Δk の値から図6に示すQLLの厚さ L を見積もることができる。 L の温度依存性は多くの方法で調べられているが、方法や測定系への依存性が大きいためにデータのばらつきが大きいだけでなく、QLLと氷との境界線の定義そのものが明確でないために、単純に数値を比較することはできない。また、アイスクロマトグラフィーでは、試料が移動相から分配するのに十分な厚みを持っている必要があるため、QLLの厚さが分子の大きさに相当するときには、求められた厚さがどのような物理的意味をもつのかは明らかではない。以上のように、QLLの定量的な扱いには克服すべき問題が多いが、図6の結果は他の報告値に比べて温度依存性が大きい。本法で対象としている氷表面は、液体(移動相)と接している。

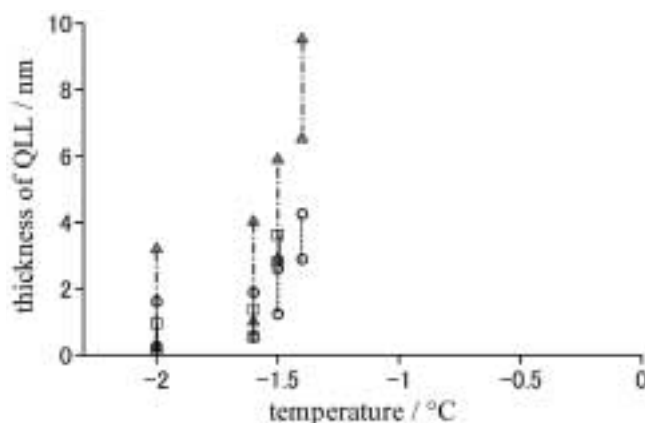


図6 QLLの厚さの温度依存性。図5の値から見積もったQLLの厚さ。

シンボルは図5と同じ。

同一温度で2つの厚さの値が示されているが、これは表面吸着による寄与がないと仮定した場合と、固体の氷表面と液体表面への吸着が同じであると仮定した場合を反映している。実際にはこの2つの極端の中間に位置するものと考えられる。

このために、QLLは純粋な水ではなく、移動相から物質が溶け込んだ一種の混合溶媒である。たとえば、THFよりも水に分配しやすいジオキサンは、QLLの成長を促すのに対し、水への分配が起こりにくいジエチルエーテルをTHFの代わりに用いると、 0°C に近くまで昇温してもQLLの厚さは非常に薄いことがわかっている。

7. さいごに

氷粒子を固定相とするアイスクロマトグラフィー測定が可能であることを示し、その分離科学的な特徴を明らかにすると共に、物理化学的に氷/液体界面をプローブするために有用な方法であることを示した。氷表面を扱う研究の物理や化学研究の多くは、真空中で行われており、氷の表面あるいは氷とそれと平衡にある水蒸気界面を取り扱っている。アイスクロマトグラフィーは液体-氷界面を取り扱い、そこでの物質と氷の相互作用についての情報を与える点で他法とは異なる。氷の結晶面による表面特性の違いを利用することやドーピングした氷を用いるなどアイスクロマトグラフィーには種々の展開の可能性を秘めている。また、このような研究を通じて界面での相互作用に関する分子過程についての具体的な描像を得ることで、氷表面の物性や自然界での氷の働きを理解することにもつながるものと考えている。

文献

- [1] Smith, M. R. *J. Chromatogr., A* **2008**, 1184, 441-455.
- [2] Vanhoenacker, G.; Sandra, P. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 1822-1835.
- [3] Dash G. J.; Rempel W. A.; Wettlaufer S. *J. Rev. Mod. Phys.*

- 2006**, 78, 695–741.
- [4] Ewing, G. E. *J. Phys.Chem.B* **2004**, 108, 15953–15961.
- [5] Sadtchenko, V.; Ewing, G. E. *Can. J. Phys.* **2003**, 81, 333–341.
- [6] Furukawa, Y.; Yamamoto, M.; Kuroda, T. *J. Cryst. Growth.* **1984**, 82, 665–677.
- [7] Furukawa, Y.; Nada, H. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 6167–6170.
- [8] Furukawa, Y.; Nishimura, Y.; Yokoyama, E. *Kotai Butsuri*, **2002**, 37, 396–402.
- [9] Yang, C.; Sharp, K. A. *Biophys. Chem.* **2004**, 109, 137–148.
- [10] Mao Y., Ba Y. *J. Chem. Phys.* **2006**, 125, 091102.
- [11] Supatashvili, G. D.; Kartvelistvili, V. G. *Bull. Georgian Acad. Sci.* **1986**, 12, 38–43.
- [12] Supatashvili, G. D.; Kaviladze, M. Sh.; Barnov, B. A. *Bull. Acad. Sci. Georgian SSR*, **1987**, 125, 329–332.
- [13] Supatashvili, G. D. *Geochemistry*, **1981**, 11, 1734–1741.
- [14] Dasgupta, P. K.; Mo, Y. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4079–4081.
- [15] Tasaki, Y.; Okada, T. *Anal. Chem.* in press.
- [16] Tasaki, Y.; Okada, T. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 4155–4160.
- [17] Tasaki, Y.; Okada, T. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1189, 72–76.
- [18] Tasaki, Y.; Okada, T. *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 2618–2623.