

## 解説

# 凍結高分子ゲル中の氷晶とガラス化した水

村勢則郎

(受取日：2003年7月31日，受理日：2004年2月19日)

## Ice Crystals and Glassy Water in Frozen Polymer Gels

Norio Murase

(Received July 31, 2003; Accepted February 19, 2004)

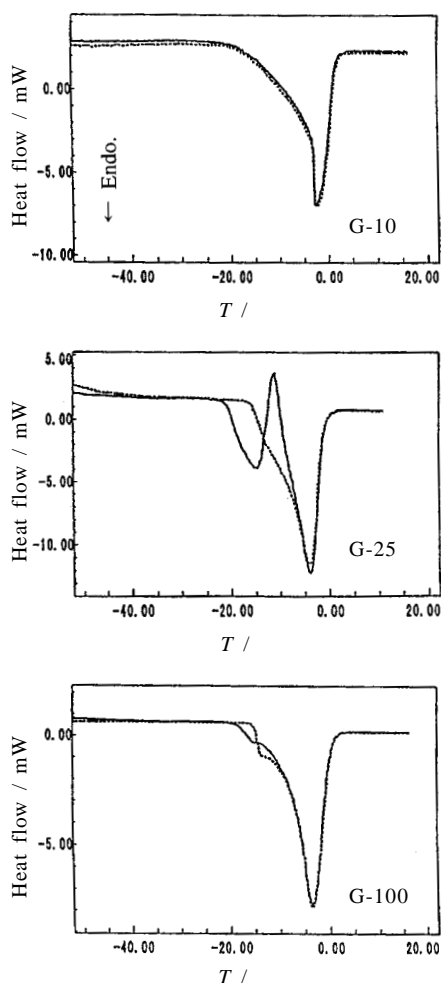
To understand the mechanism of ice crystallization during rewarming observed with a frozen crosslinked dextran gel of a certain density of crosslink, DSC, Raman scattering and X ray diffraction-DSC simultaneous measurements were conducted. It was found, as a result, that size of ice crystals as well as freezing behavior depend on the density of crosslink of the gels. By the study of two-dimensional X ray diffraction-DSC simultaneous measurements, formation of small ice crystals was indicated with the gel where ice crystallization during rewarming is observed. Presence of glassy water was also indicated in the frozen state of the gel by the measurement of Raman scattering. Then, it was clarified that ice crystallization in polymer gels is more or less obstructed by the polymer network, and by its change at the time of freezing. From these results together with the knowledge so far obtained, a conceivable mechanism of ice crystallization during rewarming was discussed.

### 1. はじめに

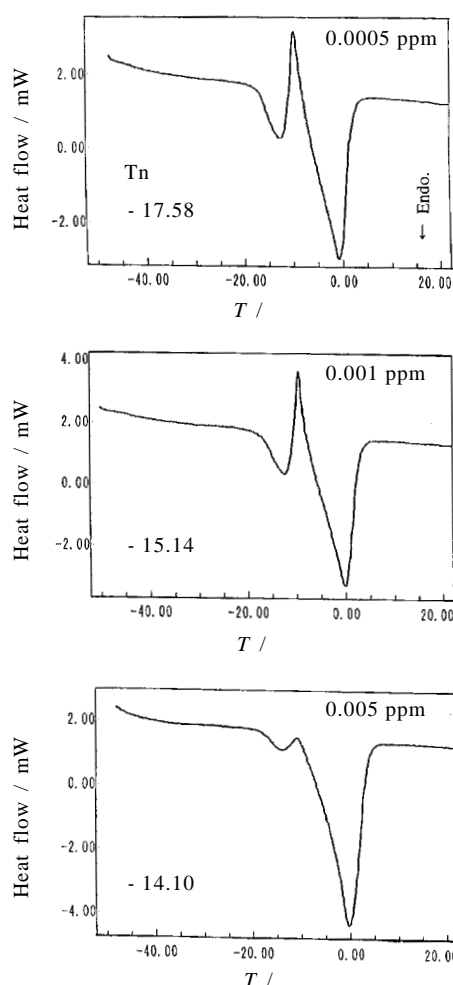
高分子ゲル中において、水は高分子網目構造によって区画化されている。区画化されることによって、水分子の拡散運動は多かれ少なかれ損なわれ、拡散を伴う凍結や乾燥挙動は影響を受けることが予想される。実際、架橋高分子ゲル中の水は、架橋密度に依存して冷却の際に部分的に凍らずに、昇温過程で結晶化することがある。<sup>1-7)</sup> そこで、このような現象が観測される Sephadex (架橋デキストラン) ゲルを用いて、その凍結・融解挙動および凍結状態を詳しく研究した。研究結果の一部は既に本誌に発表してあるが<sup>3)</sup> ここでは主としてその後得られた知見を整理し、解説することにしたい。

### 2. 架橋密度に依存する DSC 昇温曲線と昇温結晶化

高分子ゲル中の水の昇温結晶化：適度な架橋密度のデキストランゲル (Sephadex G25, Amersham Biosciences Corp. (NJ, USA)；約50%含水率)を冷却して凍結後に昇温すると、DSC曲線は-12℃付近に水の結晶化による発熱ピーク(以下昇温結晶化と呼ぶ)を示す。<sup>1,2)</sup> Sephadexはビーズ状(直径50~150μm)をしており、分子ふるいクロマトグラフィーの担体として使用されているものである。Gナンバーが小さいほど架橋密度は大きく、膨潤しにくい。(架橋密度：G10>G25>G100)架橋密度がG25より高くても低くても昇温結晶化は観測されない。また、昇温結晶化は含水率、冷却速度、凍結温度などの凍結条件に依存する。すなわち、含水率が50%付近のSephadex G25ゲル(以下G25ゲルと略す)では冷却速度に依存せずに観測され



**Fig.1** DSC heating traces obtained with frozen Sephadex gels. : first heating; ... : second heating where 1<sup>st</sup> heating was interrupted before complete ice melting followed by recooling to -50 . Water content: 50 wt%, heating and cooling rates: 5 min<sup>-1</sup>, DSC: Shimadzu DSC-41. See refs.5 and 6.



**Fig.2** DSC heating traces obtained with frozen Sephadex G25 gels depending on the nucleation temperature of the precedent cooling. Nucleation temperatures were controlled by the concentration of ice nucleating protein added to water used for the sample preparation. Experimental conditions: same as Fig.1. See refs.5 and 6.

るが、含水率の高い場合は冷却速度が遅くないと ( $\sim 10^3$  min<sup>-1</sup>以上) 観測されない。<sup>4)</sup> 上述のようにG25ゲルを室温から冷却すると、過冷却して凍結は -20 付近で開始され (非平衡凍結と呼ぶ)、その後の昇温過程で氷晶形成による発熱現象が観測される。しかし、試料中に氷が存在するか有効な氷核物質が存在する状態で冷却すると、凍結は過冷却を伴わずに開始され (平衡凍結)、その後の昇温過程で結晶化は観測されなくなる。 -14 付近を境に凍結温度がこれより高くなると、昇温結晶化による発熱は消失することが明らかになった。発熱の消失と同時に吸熱方向への移行

開始温度は上昇する。<sup>5-7)</sup> (Figs.1, 2)

DSC発熱ピークに先行する吸熱方向への移行現象：昇温結晶化による発熱ピークに先行して、DSC昇温曲線は吸熱方向に移行する。移行の原因を明らかにすることは、ゲル中における凍結のメカニズムおよびゲルの凍結状態を解明する上で重要であると考えられる。そこで詳しい解析を行った。平衡凍結させると、発熱ピークの消失と同時に、吸熱方向への移行開始温度は高温側にシフトする。この移行がガラス転移による比熱の変化 ( $\Delta C_p$ ) として計算すると、

~ 100 J g<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>となる。水蒸気をガラス化したときの比熱変化としては1.94 J g<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>の値<sup>8)</sup>が、微小水滴のガラス化では< 0.089 J g<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>の値<sup>9)</sup>が報告されている。したがって、吸熱方向への移行はガラス転移による比熱の変化としては大きすぎる。ガラス転移に付随するエンタルピー緩和の可能性も考えられるので、吸熱方向に移行開始する直前で温度を一定に保持し熱処理してから再冷却後にDSC昇温曲線を求めたが、吸熱方向への移行の程度に変化はみられない。<sup>5)</sup> また、温度振動モードのDSC測定を試みたが、緩和を示唆する結果はえられなかった。<sup>10)</sup> このことは吸熱方向への移行がガラス転移に直接関係している現象ではないことを示唆している。

吸熱方向への移行原因として、網目内に形成されるサイズの小さな氷晶の融解が考えられる。半径*r*のキャピラリー内の氷の融点(凝固点)降下度(Δ*T*<sub>f</sub>)は、ラプラス式を利用すると、1/*r*に比例することになる。<sup>11,12)</sup>

$$\Delta T_f = 2V_m T_f^0 \sigma \cos \theta / (\Delta H_f r) \quad (1)$$

- V<sub>m</sub>* : 水のモル体積
- T<sub>f</sub><sup>0</sup>* : バルク水の凝固点
- σ : 氷 - 液体水間の界面自由エネルギー
- θ : 接触角 (通常 θ = 0 を仮定する)
- Δ*H<sub>f</sub>* : 氷の融解熱

DSC測定で融点(約 -13 °C)から氷晶サイズを評価すると、直径nmぐらゐと見積られる。しかし、そのように小さな氷晶は電顕観察(透過型、走査型)では確認されていない。<sup>5,7,10)</sup> 融点降下は1/*r*と同時に氷と液体水間の界面自由エネルギーにも比例するが、この界面自由エネルギーとして、氷とバルク水間の文献値<sup>13)</sup>(~ 30 × 10<sup>-7</sup> J cm<sup>-2</sup>)をそのまま用いて評価している点に問題がある。実際には氷と高分子に水和した水との界面を考えるべきで、界面自由エネルギーが大きくなれば、*r*が大きくても低い融点を説明できるのである。そして、平衡凍結後の昇温過程において吸熱方向への移行開始温度が上昇するのは、大きな氷晶の形成によるものと考えられることができる。

### 3. 吸熱方向への移行の原因と X線回折 - DSC同時測定

昇温結晶化を含めて、吸熱方向への移行とDSC昇温曲線に対応する物理的現象を微視的に理解するために、一次元X線回折 - DSC同時測定を行なった。その結果、22 ° < 2θ < 26 ° に3本の回折ピークが観測された。<sup>14,15)</sup> (Fig.3) ただし、θは、Bragg回折条件、*nλ* = 2*d* sinθ (*n*: 正の整数)を充たす角度で、λ = 0.15418 nmである。これらは六方氷(I<sub>h</sub>)の(100),(002),(101)面からの反射と帰属され、DSC発熱ピークに対応して回折強度が増大している。

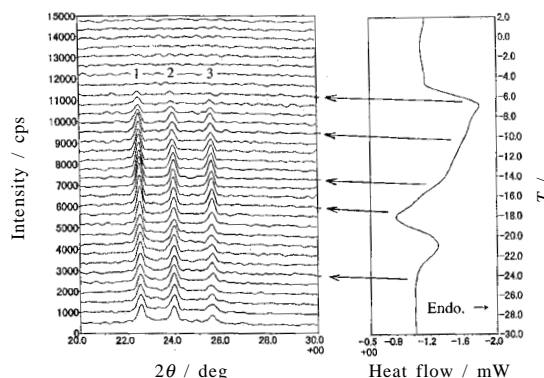


Fig.3 Heating traces obtained with Sephadex G25 gels by the simultaneous XRD-DSC measurement. Cooling rate: 5 min<sup>-1</sup>, heating rate: 1 min<sup>-1</sup>, scanning rate for diffraction angle (2θ): 20 ° min<sup>-1</sup>. An XRD-DSC II (Rigaku Corp.) equipped with a RINT Ultima\*/Hp was used for XRD measurements. Refs.14 and 15.

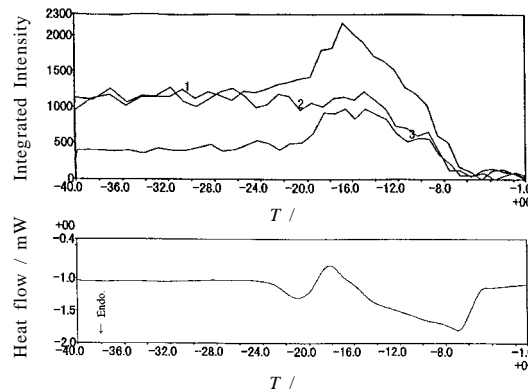
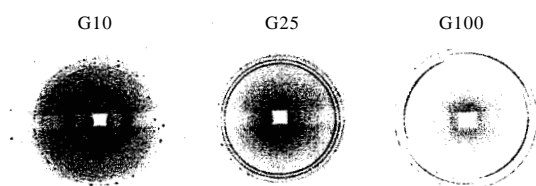


Fig.4 Temperature dependence of the integrated XRD intensity calculated from the data shown in Fig.3.

(Fig.4)したがって、発熱ピークは氷の結晶化によるものであることが確認された。ただし、ガラス状氷の存在を示唆する立方氷に対応する回折ピークは観測されていない。昇温結晶化に先行する吸熱方向への移行の際には、回折強度の変動が大きく、強度低下の傾向はほとんど観測されない。したがって、吸熱方向への移行は氷の融解によるものであるとは断定できない。氷晶サイズが小さいために融解が起こっても強度変化として観測されないのかも知れないが、変動すること自体、水分子の運動開始、すなわち、氷晶の融解あるいはゲルビーズの回転移動が開始していることを示唆しているとも考えられる。

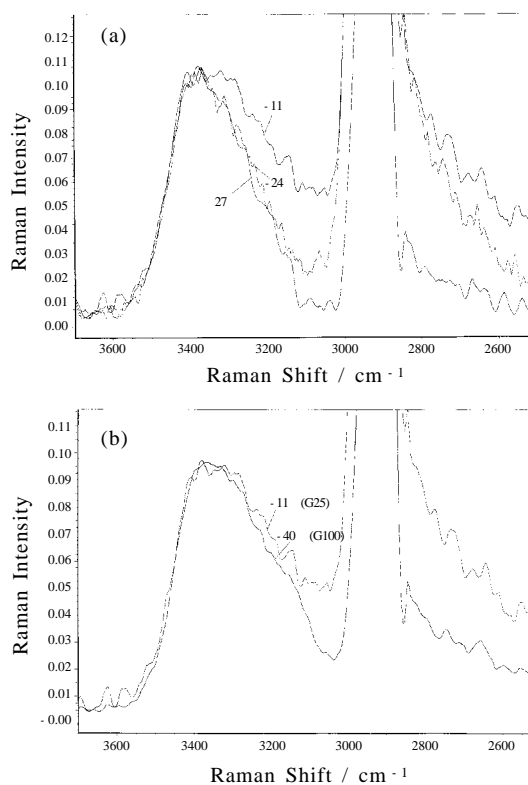


**Fig.5** Two-dimensional XRD images using synchrotron irradiation observed with frozen Sephadex gels at  $-30^{\circ}\text{C}$ . Cooling rate:  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , water content: 50 wt%. A beam line 18C of Photon Factory (Tsukuba, Japan) was used for the measurement. Refs.16 and 17.

詳しい解析を行うために、放射光を使用した二次元X線回折-DSC同時測定を試みた。凍結状態の二次元X線回折像は一次元測定で観測されるピークに対応して3本のリング状を呈すが、回折パターンは架橋密度に依存した。<sup>16,17)</sup> (Fig.5) G25ゲルの場合、低温では連続したリングを示したが、このような回折パターンは粉末状の氷晶生成を意味し、氷晶のサイズとしては $\mu\text{m}$ 程度以下と見積られる。<sup>18)</sup> 架橋密度がG25より大きくても小さくても粉末状の回折パターンはえられていない。温度上昇に伴いDSC昇温曲線が吸熱方向に移行しだすと、G25ゲルの場合、連続したリングは徐々に不連続となり、多数のスポットが観察されるようになった。さらに昇温すると、昇温結晶化に対応してスポット数が一層増加し、強度も強まった。吸熱方向への移行に対応してリングが不連続となりスポットが観察されるようになったのは、氷晶の成長を意味し、サイズの小さな氷晶の融解と同時に再結晶が起こっていることを強く示唆している。そして、DSC昇温曲線が吸熱方向へ移行するのは、氷晶の融解による吸熱が再結晶による発熱を上回っているためと理解できる。また、連続したリングが不連続なリングに変化し始める温度から判断して、ガラス転移点は吸熱方向への移行開始温度より低温にあると予想される。これまでのところガラス転移点は観測されていないが、観測される可能性はある。回折像のパターンがゲルの架橋密度に依存する結果は、水分子の運動性が高分子網目構造に依存し、それによって、生成する氷晶のサイズ、形状が異なることを強く示唆している。G25ゲルでも、平衡凍結後には不連続なリングが観測され、サイズの大きな氷晶が形成されと考えられる。

#### 4. ラマン測定によるガラス化した水の研究

凍結高分子ゲル中にガラス状態の水が存在するか否かを明らかにする目的で、ラマン散乱測定を行った。測定結果をFig.6に示しておく。<sup>15,17,19)</sup>  $3400\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークは



**Fig.6** (a) Raman spectra of OH stretching band observed with a Sephadex G25 gel containing 50 wt% water; (b) Raman spectra of OH stretching band observed with a Sephadex G25 at the temperature where the exotherm during rewarming was completed, and with a frozen Sephadex G100 gel. A Raman 960 spectrometer (Thermo Nicolet, USA) where 1064 nm YAG laser at 450 mW was used. A micro-miniature refrigerator (MMR Technologies, USA) was used for as a cooling unit. Refs.14 and 15.

OH伸縮振動に対応するものであるが、昇温結晶化を示すG25ゲルの場合、凍結状態にある $-24^{\circ}\text{C}$ のラマン強度は室温のときとほとんど変わらず、昇温結晶化した後の $-11^{\circ}\text{C}$ で低波数側の強度が増大している。その結果、昇温結晶化の観測されないG100ゲルの凍結状態( $-40^{\circ}\text{C}$ )のスペクトルに近くなった。(ただし、スペクトルは $3400\text{ cm}^{-1}$ のピーク強度で規格化してある。)このような結果は、昇温結晶化により氷晶形成が進行し、水素結合網がより整ってくることによる。そして、昇温結晶化温度より低温では、構造的に液体状態に近い水、すなわち、ガラス状態の水が凍結G25ゲル中に存在していることを意味している。

## 凍結高分子ゲル中の氷晶とガラス化した水

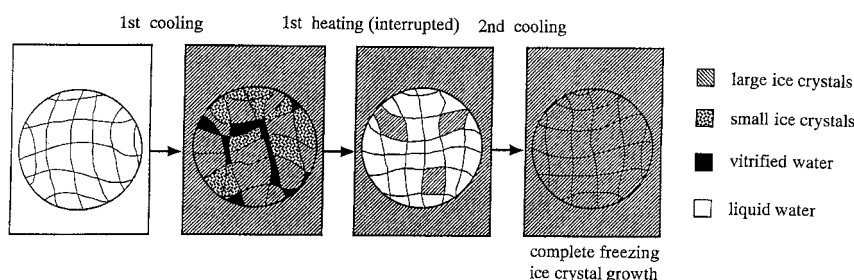


Fig.7 A conceivable mechanism of ice crystallization in Sephadex G25 gel. Refs.5 and 6.

### 5. 昇温結晶化のメカニズム

これまで得られた結果より、G25ゲルにおいて考えられる凍結スキームをFig.7に整理しておく。氷晶の成長速度、すなわち凍結速度は過冷却度 ( $\Delta T$ ) に依存し、 $\Delta T^\alpha$  ( $\alpha = 1 \sim 2$ ) に比例することが知られている。<sup>20)</sup> 室温から冷却すると、充分過冷却して凍結が開始する。この場合は凍結速度が速いので凍結開始時の網目構造変化速度も速く、水は部分的に網目構造内にトラップされて凍れず、ガラス化するものと考えられる。ガラス化しないまでもサイズの小さな氷晶が形成される。凍結の際にゲルビーズが変形しやすいことは環境制御型走査電顕により確認されている。<sup>21,22)</sup> 氷が完全に融解する前に昇温をストップして再冷却すると、試料中に残っている氷が核となって凍結が開始され、過冷却は回避される。この場合は凍結速度が遅いため網目構造の変形速度も遅く、水は網目内にトラップされずに氷晶形成が進行し、昇温結晶化は観測されなくなるものと説明される。架橋密度が低いゲル (G100ゲル) では網目間の水の連続性が高いためにガラス化されず、冷却過程で結晶化する。架橋密度の高いゲル (G10ゲル) では網目構造が変形しにくいいため、水は網目内にトラップされずに冷却過程で結晶化してしまうのであろう。このようにして、ゲル中の水の凍結スキームを定性的に説明することができる。

### 6. まとめ

高分子ゲル中の水は高分子網目構造によって区画化されており、水分子の拡散運動は制限されている。その結果、水分子の拡散を伴う凍結挙動も影響を受け、水溶液の凍結挙動とは異なってくる。網目構造は絶えず揺らいでおり、凍結の進行と共に変形する。そのことによって、凍結挙動はさらに制限をうけることになる。

高分子ゲル中に生成する氷晶は、網目構造の特性 (架橋密度、網目の柔軟性、網目間の水の連続性) を反映して、サイズに分布ができる。サイズの異なった氷晶の融点は異なり、小さな氷晶は低温で融解する。小さなサイズの極限

としてガラス化することが考えられる。このような考えは、凍結乾燥した試料の走査型電子顕微鏡観察により、ゲル中の氷 (実際には氷の抜けた空隙) の形状を詳しく解析することで正当化される必要がある。

液体の水、水溶液はただ凍って融けるというのではなく、高分子網目構造の存在、凍結条件によって生成する氷のサイズは異なり、融解中にもサイズは変化するという認識が大切であることを改めて実感する。特に生物資源や食品の凍結保存において、生成する氷のサイズ・形状が大切になってくることを指摘しておきたい。

### 文 献

- 1) N. Murase, M. Shiraiishi, S. Koga, and K. Gonda, *CryoLetters* **3**, 251 (1982).
- 2) N. Murase, K. Gonda, and T. Watanabe, *J. Phys. Chem* **90**, 5420 (1986).
- 3) 村勢則郎, 熱測定 **14**[4], 133 (1987).
- 4) N. Murase, *CryoLetters* **14**, 367 (1993).
- 5) 村勢則郎, 井上智広, 低温生物工学会誌 **41**[1], 17 (1995).
- 6) N. Murase, T. Inoue, and M. Ruike, *CryoLetters* **18**, 157 (1997).
- 7) 村勢則郎, 類家正稔, 表面 **35**[8], 453 (1997).
- 8) M. Sugisaki, H. Suga, and S. Seki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **41**, 2591 (1968).
- 9) A. Hallbrucker, E. Mayer, and G. P. Johali, *Phil. Mag. B* **60**[2], 179 (1989).
- 10) 村勢則郎, 井上智広, 高野哲也, 鈴木 徹, 高井陸雄, 低温生物工学会誌 **42**[2], 139 (1996).
- 11) L. G. Homshaw, *J. Colloid & Interface Sci.* **84**, 127 (1981).
- 12) C. L. Jackson and G. B. McKenna, *J. Chem. Phys.* **93**[12], 9002 (1990).
- 13) K. L. Kerr, R. E. Feeney, D. T. Osuga, and D. S. Reid, *CryoLetters* **6**, 371 (1985).
- 14) 村勢則郎, 堀江勝廣, 類家正稔, 吉岡澄江, 低温生物工

- 学会誌 **46**[2], 13 (2000).
- 15) N. Murase, M. Ruike, S. Yoshioka, C. Katagiri, and H. Takahashi, in H. Levine (Ed.) "Amorphous Foods and Pharmaceutical Systems", Royal Soc. Chem., Cambridge, UK, 339 (2002).
  - 16) 村勢則郎, 安部 悟, 高橋 浩, 片桐千仍, 亀卦川卓美, 低温生物工学会誌 **48**[2], 91 (2002).
  - 17) N. Murase, S. Abe, H. Takahashi, C. Katagiri, and T. Kikegawa, in "Proc. of IIR C1 conference, Cryopreservation and Safe Keeping of Cells and Tissues" in press.
  - 18) W. Parrish, M. Hart, and T. C. Huang, *J. Appl. Crystallography* **19**[Part 2], 92 (1986).
  - 19) 村勢則郎, 冷凍 vol.77, No.891, 44 (2002).
  - 20) 加藤悦朗, 中 重治, 野田稲吉, 「無機材料化学」, コロナ社, 東京 (1997).
  - 21) 村勢則郎, 堀江勝廣, 類家正稔, 渡部徳子, 桑原有子, 低温生物工学会誌 **44**[2], 123 (1998).
  - 22) M. Ruike, S. Takada, N. Murase, and T. Watanabe, *CryoLetters* **20**, 61 (1999).

### 要 旨

凍結した架橋デキストランゲルを昇温すると、架橋密度が適当な場合、氷晶形成による結晶化現象が観測される場

合がある。この昇温結晶化のメカニズムを解明する目的で、DSC、ラマン散乱、X線回折-DSC同時測定を行った。その結果、凍結挙動だけでなく、生成する氷晶のサイズも架橋密度に依存することが明らかになった。すなわち、二次元X線回折-DSC同時測定の結果から、昇温結晶化の観察されるゲルではサイズの小さな氷晶の形成されやすいことが示唆された。また、ラマン散乱実験から、このゲルにおいてガラス状態の水の存在が示唆された。したがって、高分子網目構造の存在および凍結時における網目構造の変化により、高分子ゲル中において氷晶形成は妨げられることが明らかになった。これまでに得られた知見より、昇温結晶化のメカニズムについて議論した。



村勢則郎 Norio Murase  
 東京電機大学理工学部生命工学科, Dept.  
 of Biotechnology, School of Science  
 and Engineering, Tokyo Denki Univ.,  
 TEL. 049-296-2911, FAX. 049-296-  
 5162, e-mail: nmurase@b.dendai.ac.jp  
 研究テーマ: 水系における氷晶形成とガ  
 ラス化  
 趣味: 音楽鑑賞(特にヒーリングミュー  
 ジック), 散歩