

Fig. 3.10 PNIPAM 水溶液の HD-TG 応答
(温度ジャンプ幅: 1.0 K, 格子間隔: 80 μm)

4-7 μs 付近で観測される振幅の小さい振動応答は発生した音響回折格子がセル内で反射して、再び観測領域に戻ってきた応答だと考えられる。相転移が誘起される試料温度 32.5 $^{\circ}\text{C}$ の条件の応答では、 10^{-7} - 10^{-6} 秒領域に振動する応答以外に新たな成分が観測された。

次に、参照応答として、CV 水溶液(0.3 mM) を同様の条件で測定した結果を Fig. 3.11 に示す。温調セルで試料温度を 25.0, 35.0 $^{\circ}\text{C}$ に制御した。CV 水溶液の応答も同様に振動しながら緩和する音響回折格子信号が観測された。また、この応答は試料の温度に依存せず、PNIPAM 水溶液のように新規の成分は観測されなかったことから、PNIPAM の相転移に関する応答であると考えられる。

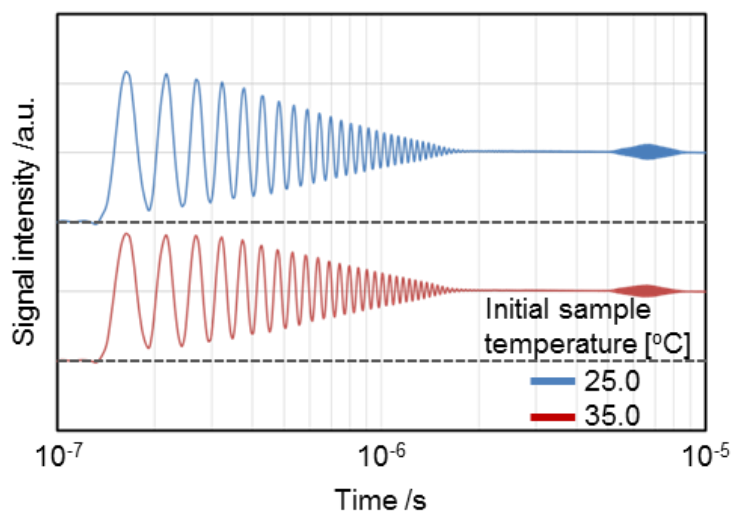


Fig. 3.11 CV 水溶液の HD-TG 応答
(温度ジャンプ幅: 1.0 K, 格子間隔: 80 μm)

音響回折格子信号の屈折率の時間変化 $\Delta n(t)_{\text{acoustic}}$ は次のように表すことができる。

$$\Delta n_{\text{acoustic}}(t) = A_{\text{acoustic}} \cos(2\pi ft + \varphi) \exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{acoustic}}}\right) \quad (3.6)$$

ここで、 A_{acoustic} は定数、 f は振動周波数、 τ_{acoustic} は音響回折格子の緩和時間をそれぞれ表す。ここで、振動周波数は次のように表される。

$$f = v_{\text{acoustic}} / \Lambda \quad (3.7)$$

v_{acoustic} は溶媒中の音速、 Λ は格子間隔を表す。

式 3.6 を用いて CV 水溶液のヘテロダイン過渡格子応答をフィッティングしたところ、振動周波数 f は 1.84×10^7 /s, τ_{acoustic} は 450 ns であった。また式 3.7 より、水中での音速が 1500 m/s, 格子間隔が 80 μm であることから、振動周波数の理論値は 1.88×10^7 /s と算出され、水中で音が伝わっていく音響回折格子信号が検出されていることが分かる。また音響回折格子信号は 25.0 から 35.0 °C の温度範囲

では CV 水溶液の試料温度に依存しなかった。

PNIPAM 水溶液の応答も同様にフィッティングを行った。試料温度 25.0 °C の条件では式 3.6 の音響回折格子を用いて振動周波数 f は 1.89×10^7 /s, $\tau_{acoustic}$ は 600 ns と CV 水溶液とほぼ同程度の値でフィッティングされた。一方、励起後の試料温度が相転移温度に到達する試料初期温度 32.5 °C の条件では、 10^{-7} - 10^{-6} 秒領域に新たな応答が観測されているため、音響回折格子応答だけでは表すことが出来なかった。ヘテロダイン過渡格子法で得られる応答は指数関数の足し合わせで表すことが出来るため、音響回折格子の式に新たに指数関数を追加した以下の式を用いてフィッティングを行った。

$$\Delta n_{total}(t) = \Delta n_{acoustic}(t) + \Delta n(t) \quad (3.8)$$

$$= A_{acoustic} \cos(2\pi ft + \varphi) \exp\left(-\frac{t}{\tau_{acoustic}}\right) + A_1 \exp(-t/\tau_1) \quad (3.9)$$

ここで、 A_1 は定数、 τ_1 は新規成分の時定数を表す。式 3.9 を用いて試料初期温度 32.5 °C の PNIPAM 水溶液のヘテロダイン過渡格子応答をフィッティングしたところ、 τ_1 は 220 ± 20 ns であった。右辺第 2 項によるフィッティング曲線を Fig. 3.10 黒のドット線として重ねて示した。

式 2.39 に示すように、ヘテロダイン過渡格子法による応答は拡散や寿命に関する情報を持つ。そこで、音響回折格子信号に指数関数の足し合わせで表すことができた成分 τ_1 について、回折格子間隔依存性の測定を行ったところ、格子間隔に対して依存性を示さなかった。つまり、拡散に関与する成分ではなく、励起されたその場で反応が起きていると考えられる。Sakamaki 等はアミド基と水の水素結合の切断は数 10 ps 領域で起こると報告している。^[11,12] また Lu 等は、蛍光プローブ分子を PNIPAM 水溶液に添加した時間分解蛍光測定を用いて、PNIPAM 分子の構造変化、いわゆる、coil-globule 転移が 20-200 μ s 領域で観

測されると報告している。^[13,14] また、Tanaka 等の流れの影響を考慮した Gaussian 計算から、coil-globule 転移は鎖末端ではなく鎖中心付近から起こると報告している。^[14] Katsumoto 等は DFT 計算を用いて NIPAM 二量体の安定構造を解析し、主鎖はイソプロピルアミド基の立体障害からトランス体構造を持ち、隣接するアミド基同士は水素結合を形成している構造が最も安定であることを報告している。^[15] また相転移により隣接するアミド基同士の水素結合が切断されることを全反射赤外分光測定より明らかにしている。生体分子との比較においては、Ballew 等は筋肉中の酸素貯蔵を担うミオグロビンから鉄が脱離したアポミオグロビンのフォールディング過程の解析を行い、およそ 250 ns で疎水性分子鎖が局所的に動くことによりヘリックス構造が形成されることを明らかにしている。^[16] これらの報告から、PNIPAM 水溶液のヘテロダイナミクス過渡格子応答で観測された成分 τ_1 は、PNIPAM 分子から水分子が脱離した後、coil-globule 転移が起こる以前の応答で、PNIPAM のアミド基間の水素結合が近距離相互作用から中・長距離相互作用へと変化し、局所で収縮が起きている応答だと考えられる。

次に、音響回折格子応答が緩和した後の応答、 10^{-5} - 10^{-2} 秒領域の PNIPAM 水溶液のヘテロダイナミクス過渡格子法による応答測定した。(Fig. 3.12) 同様に、温調セルを用いて試料の初期温度を、励起光の照射後も相転移温度に到達しない 25.0 °C (青線) と、相転移温度に到達する 32.5 °C (赤線) に制御し測定を行った。温度ジャンプ幅は 1.0 K とし、格子間隔は 80 μm を用いた。応答の縦軸は 10^{-4} 秒で規格化した信号強度、横軸は対数時間を表す。音響回折格子応答が緩和した後、試料温度 25.0 °C の条件では 10^{-5} から 10^{-3} 秒へかけてベースラインへと指数関数的に減衰する応答が観測された。

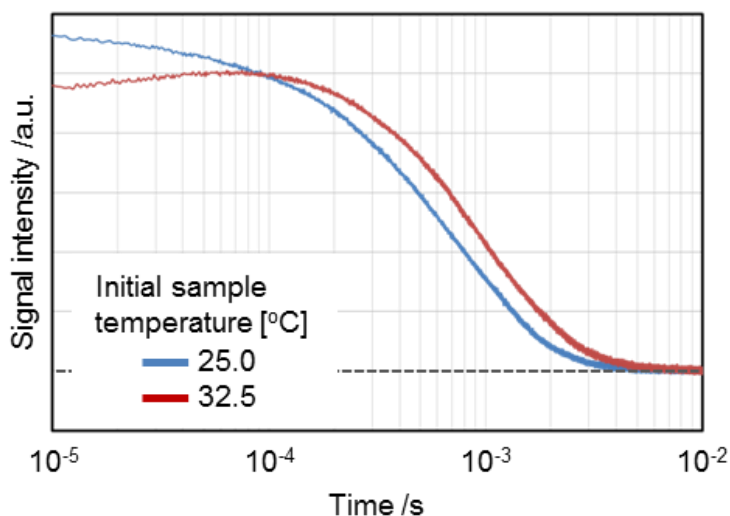


Fig. 3.12 PNIPAM 水溶液の HD-TG 応答
(温度ジャンプ幅: 1.0 K, 格子間隔: 80 μm)

Fig. 3.7 に示すように、CV 水溶液でも同様の減衰応答が観測された。この減衰応答は音響回折格子応答とともに、過渡回折格子法に特有な応答で、励起状態の失活に伴い縞状に発生した熱が拡散していく応答であり、熱拡散回折格子 (thermal grating: 熱格子) と呼ばれている。^[18] また、相転移が誘起される試料温度 32.5 °C の条件での応答では、 10^{-5} - 10^{-4} 秒領域に熱格子応答以外に新たな成分が観測された。

熱格子信号の屈折率の時間変化 $\Delta n_{th}(t)$ は以下のように表すことができる。

$$\Delta n_{th}(t) = A_{th} \exp(-t / \tau_{th}) \quad (3.10)$$

ここで、 A_{th} は定数、 τ_{th} は熱格子の時定数を表す。

式 3.10 を用いて CV 水溶液のヘテロダイン過渡格子応答をフィッティングしたところ、熱格子の時定数は 7.35×10^{-4} s となった。また音響回折格子と同様、CV 水溶液のヘテロダイン過渡格子応答に試料温度依存性は観測されなかった。一

方、相転移が誘起される条件で測定した PNIPAM 水溶液の応答は式 3.10 ではフィッティングすることが出来なかった。ヘテロダイン過渡格子法による応答は指数関数の足し合わせで表すことが出来るので、式 3.10 に新たに関数を追加した以下の式を用いてフィッティングを行った。

$$\Delta n_{total}(t) = \Delta n_{th}(t) + \Delta n(t) \quad (3.11)$$

$$= A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2} \quad (3.12)$$

このとき、 A_2 は定数、 τ_2 は新規成分の時定数を表す。成分 τ_1 、音響回折格子応答はすべて緩和し、無視できるとする。式 3.12 を用いてフィッティングを行ったところ、 τ_2 は $96 \pm 7 \mu\text{s}$ で、熱格子の時定数は 25.0°C の条件で $7.32 \times 10^{-4} \text{ s}$, 32.5°C の条件で $1.05 \times 10^{-3} \text{ s}$ と算出され、またこの値は CV 水溶液の熱格子の時定数と一致しなかった。また成分 τ_1 と同様に、回折格子間隔依存性の測定を行ったところ、 τ_2 の成分は格子間隔に対して依存性を示さなかった。この結果から、拡散に関与する成分ではなく、励起されたその場で反応が起きていると考えられる。Lu 等の報告による coil-globule 転移の応答と成分 τ_2 の時定数が良い一致を示したことから、水和した coil 状態の分子が収縮した globule 状態へと分子体積を変化させる際の屈折率変化を測定していると考えられる。

次に熱格子応答より、各溶液中の熱拡散係数を算出するため、格子間隔を $40\text{-}90 \mu\text{m}$ に変化させて測定を行った。熱は成分 τ_1 , τ_2 とは異なり、寿命を持たず、拡散しながら緩和するため、熱格子応答の格子間隔依存性を測定することで、式 2.39 の右辺第二項を無視し熱拡散係数が算出される。^[19,21] CV 水溶液について格子間隔を変化させたときの熱格子のヘテロダイン過渡格子法による応答を Fig. 3.13 に示す。試料温度は 25.0°C とし、各格子間隔で温度ジャンプ幅は 1.0 K とした。

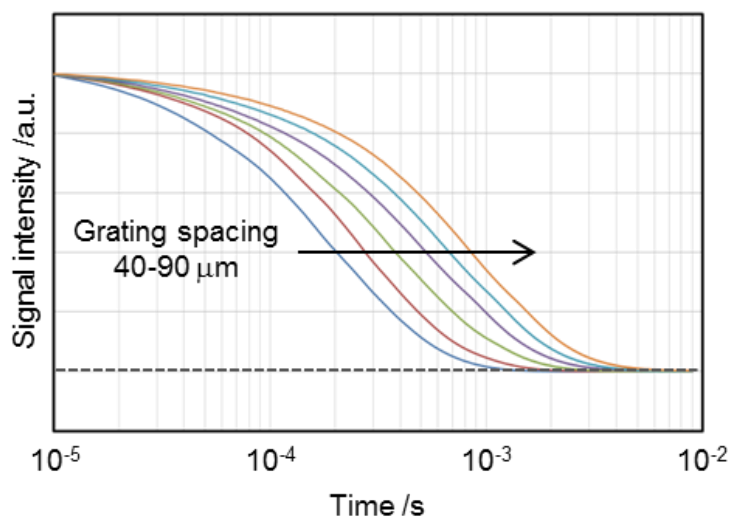


Fig. 3.13 CV 水溶液の HD-TG 応答の格子間隔依存性

熱格子応答は格子間隔が広くなるにつれて、遅くなる応答を示した。これは熱が拡散するための距離が伸びたことによる緩和時間の上昇によるものである。各回折格子を用いて測定した応答を式 3.10 を用いてフィッティングし、時定数を算出し、時定数の逆数を回折格子間隔の逆数の二乗に対してプロットした結果を Fig. 3.14 に示す。

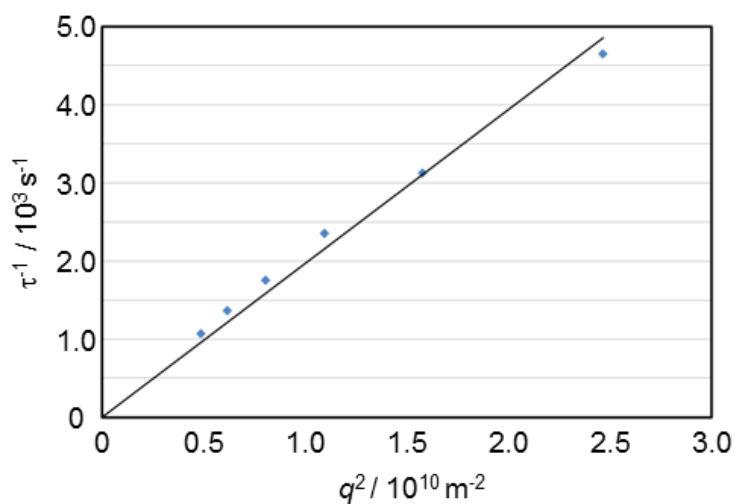


Fig. 3.14 CV 水溶液の熱格子応答の時定数の格子間隔依存性

ここで、式 2.34 において、 q を以下のように表記した。

$$q = 2\pi / \Lambda \quad (3.13)$$

このとき、プロットの傾きが熱拡散係数に相当する。^[22] 傾きより、CV 水溶液の熱拡散定数は $1.97 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ であった。また同様の測定を試料温度 $35.0 \text{ }^\circ\text{C}$ においても行ったが、測定温度範囲内で、熱拡散係数の温度依存性は観測されなかった。

同様に、PNIPAM 水溶液の熱格子応答の時定数を算出し、格子間隔依存性の測定を行った。PNIPAM 水溶液の熱格子時定数の格子間隔依存性を Fig. 3.15 に示す。

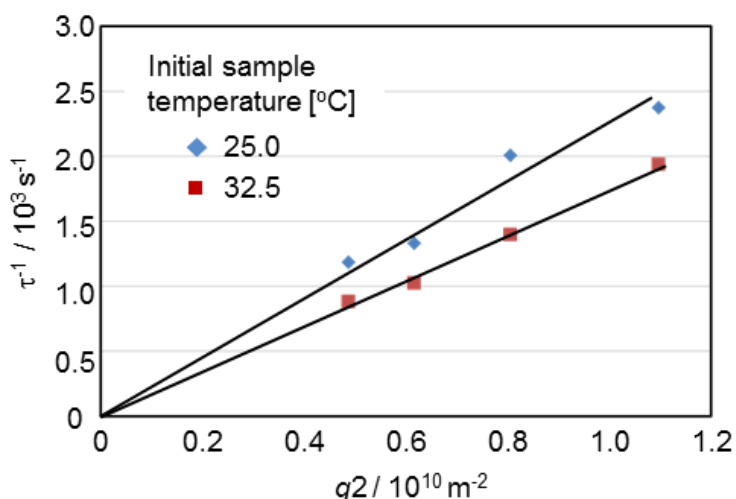


Fig. 3.15 PNIPAM 水溶液の熱格子応答の格子間隔依存性

CV 水溶液と同様に、傾きより試料温度 $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ の条件では熱拡散係数は $2.32 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$, 試料温度 $32.5 \text{ }^\circ\text{C}$ の条件では $1.61 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ となった。PNIPAM 水溶液では、試料温度に関わらず、熱拡散係数は CV 水溶液に比べて大きな値となった。また相転移が起きている条件下で、室温試料に比べて熱拡散係数が小さな値へと変化した。

化学便覧より、純水の熱拡散係数は 25.0 °C で $1.46 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$, 35.0 °C で $1.51 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ と測定温度範囲でほぼ一定の値を示すことが分かっている。そのため、PNIPAM 水溶液の熱拡散係数変化は相転移に由来する変化だと考えられる。このとき、熱拡散は初期温度 32.5 °C , 1.0 K の温度ジャンプした後の加熱後温度 33.5 °C での条件を考える。PNIPAM 水溶液は相転移により水和している coil 状態から脱水和した globule 状態へ構造転移しており、熱拡散は globule 状態の分子が凝集するより早く起こる。したがって異なる溶質中を拡散する熱について考察を行った。熱拡散係数 D_{th} は次の式を用いて表すことが出来る。

$$D_{th} = \frac{k}{\rho C_p} \quad (3.14)$$

ここで、 k は熱伝導率、 ρ は密度、 C_p は熱容量をそれぞれ示す。

物質拡散を考慮しない時間領域の応答なので、密度 ρ は一定、熱容量 C_p は DSC 測定よりやや変化することが報告されているが、無視できる範囲である。^[23] よって熱伝導率の変化が熱拡散係数に寄与していると考えられる。Terazima 等は水素結合の有無が熱拡散過程に与える影響を調べており、水素結合量の減少は熱の伝達を遅らせると報告している。^[24,25] つまり PNIPAM の水和数の減少は熱伝導率を減少させる。この傾向は coil-globule 転移による水和数の減少と熱拡散係数の減少の関係と一致する。この熱拡散係数の変化は相転移により溶質は水和した coil 状態の分子から脱水和した globule 状態の分子に変化していることを表し、成分 τ_2 で coil-globule 転移が起きていることを支持する結果だと考えられる。^[26,27]

3.4.4 Observation of phase transition dynamics after turbidity relaxation

次に濁度が緩和した後の 10^{-1} - 10^2 秒領域の応答について考察を行った。

Fig. 3.6 の試料温度 $32.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相転移が誘起されている条件の応答について考える。 10^{-1} - 10^2 秒領域の山なりの応答は過渡格子法の測定原理において、二つの屈折率変化の正負の異なる応答、つまり縞状に生成された中間種や励起種などの生成物による拡散と、縞状の励起によって消費された反応物の拡散、これらの相互拡散応答が観測されていると考えられる。これらの成分を同定するために、格子間隔依存性の測定を行った。式 2.39 にあるように、拡散する距離が変化すると、観測される時定数が変化する。各成分の時定数の格子間隔依存性を測定することで、拡散係数の算出を行った。^[28]

10^{-1} - 10^2 秒領域の相転移が誘起されている条件で、格子間隔依存性を測定した結果を Fig. 3.16 に示す。

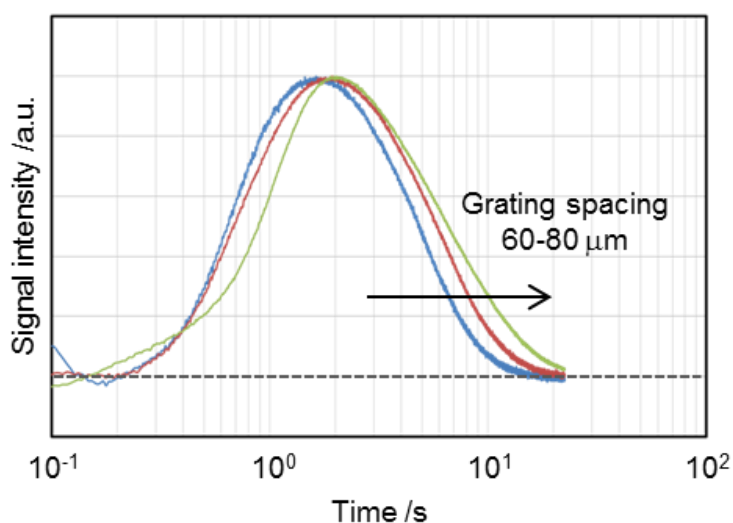


Fig. 3.16 PNIPAM 水溶液の HD-TG 応答の格子間隔依存性

縦軸は山なりの信号強度の最大値で規格化した値、横軸は対数時間を表す。格子間隔は $60\text{-}80\text{ }\mu\text{m}$ を用いた。温度ジャンプ幅は各格子間隔での測定でレーザー強度を調整し 1.0 K とした。温調セルを用いて試料の初期温度を、各格子間隔の測定において励起光照射後、相転移温度に到達する $32.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 制御した。山なりの

応答は格子間隔に依存して変化することが分かった。これは励起縞の間隔が変化するため、拡散緩和する時間が変化したためである。各応答は指数関数の足し合わせで表すことができるため、次の式を用いてフィッティングを行った。^[29]

$$\Delta n_{diffusion}(t) = \Delta n_{product}(t) + \Delta n_{reactant}(t) \quad (3.15)$$

$$= A_{pr} e^{-t/\tau_{pr}} + A_{rea} e^{-t/\tau_{rea}} \quad (3.16)$$

このとき、 A_{pr} , A_{rea} は定数でそれぞれ逆の符号の値を持つ、 τ_{pr} , τ_{rea} は各成分の時定数を表す。各回折格子を用いて測定した応答を式 3.14 を用いてフィッティングし、時定数を算出し、時定数の逆数を回折格子間隔の逆数の二乗に対してプロットした結果を Fig. 3.17 に示す。

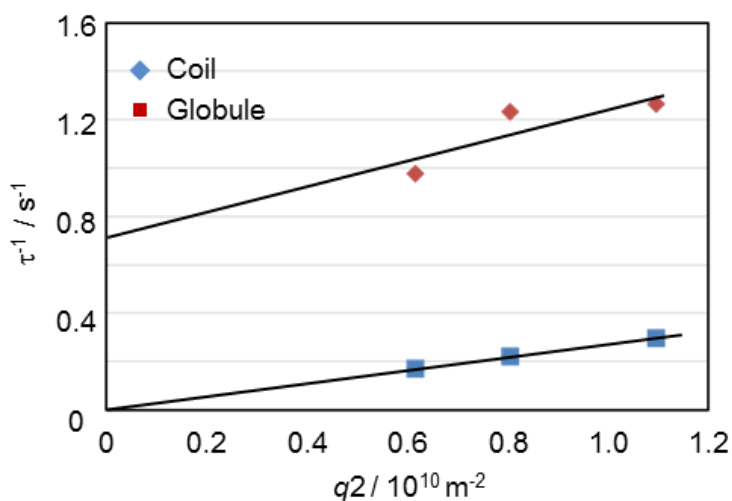


Fig. 3.17 PNIPAM 水溶液の相互拡散応答の格子間隔依存性

このとき、増加する成分を青のプロットで、減衰する成分を赤のプロットで示す。青のプロットから見ていくと、傾きから拡散係数を算出したところ、 $5.6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ であった。また y 切片は原点を通る、つまり寿命のない安定化学種の拡散応答であることが分かる。また赤のプロットについて見ていくと、傾きか

ら拡散係数は $2.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、y 切片、つまり寿命を持つ中間種の拡散緩和応答であることが分かった。y 切片の逆数から寿命を算出したところ 1.5 s 程度であった。濁度が緩和した後の PNIPAM 水溶液について考えると、安定化学種は反応物である coil 状態の分子であると考えられ、濁度が緩和した後の透明な溶液中に存在する中間種は coil 状態へと緩和する過程の globule 分子、またはそれに準ずる中間種であると考えられる。この結果より、globule-coil 構造緩和転移過程が観測され、その寿命は 1.5 s ほどと見積もられた。NMR を用いた測定からも同じオーダーで寿命が観測されていることから、得られた結果は妥当な値だと考えられる。^[30]

得られた拡散係数から溶液中の溶質状態について考える前に、室温で coil 状態の PNIPAM 水溶液について考える。溶液中の高分子鎖同士の重なりは次の式を用いて表すことができる。^[31]

$$C^* \approx \frac{3Mw}{4\pi NA(Rg)^3} \quad (3.17)$$

ここで、 C^* は重なり濃度、 Mw は分子量、 NA はアボガドロ定数、 Rg は回転半径を示す。重なり濃度から考えられる溶液中の高分子の状態の模式図を Fig. 3.18 に示す。

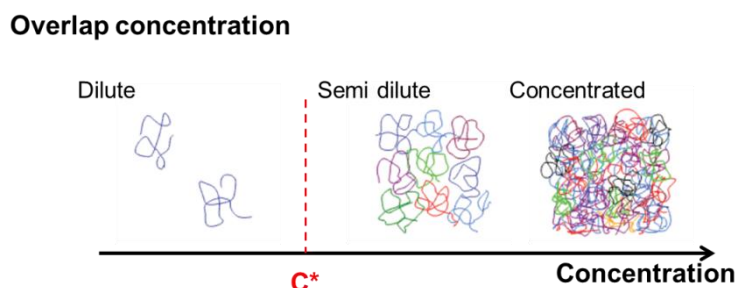


Fig. 3.18 溶液中の高分子の状態と濃度条件

本実験で用いたPNIPAM水溶液の分子量は25000 g/mol, 文献値より回転半径は3 nmとした。式 3.15 を用いて重なり濃度を算出したところ、0.37 g/mlであった。用いたPNIPAM水溶液の濃度は 3.0×10^{-2} g/mlであるので、PNIPAM水溶液は重なり濃度よりも薄く、溶液中の高分子鎖独立した状態を保つことが分かった。そのため、高分子鎖の内部の溶媒が固定化されて通り抜けを許さない、流体力学的に等価な球体モデルを適用し、Einstein-Stokes の式より拡散係数から粒径の算出を行った。^[32,33] 溶液中を拡散する高分子鎖の等価球モデルの模式図を Fig. 3.19 に示す。

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_H} \quad (3.18)$$

ここで、 k はボルツマン定数、 T は温度、 η は粘度、 r_H は流体力学的半径を示す。式 3.18 より拡散係数から粒径を求めたところ、coil 分子は直径 5.5 nm, globule 分子は直径 2.8 nm と算出された。coil 分子のサイズは globule 分子のサイズよりも小さく、構造転移して収縮している結果と一致した。水中の牛血清アルブミン(BSA) のサイズが分子量 65 kDa で 3.6 nm, b-lactoglobulin のサイズが 18 kDa で 2.7 nm であることから、得られた PNIPAM(分子量 25000 g/mol) のサイズは妥当であると考えられる。^[34,35]

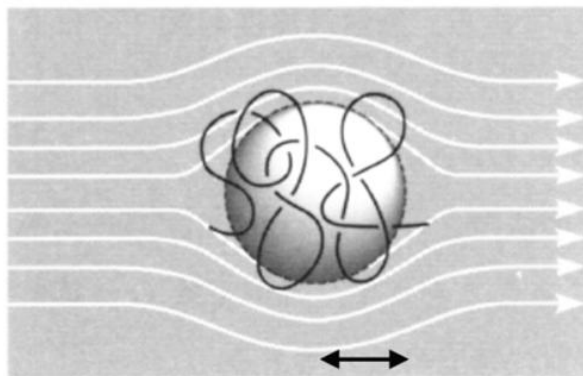


Fig. 3.19 溶液中を拡散する高分子鎖の等価球モデル

これらの結果から考えられる、PNIPAM 水溶液の相転移ダイナミクスの模式図を Fig. 3.20 に示す。水和した coil 状態の PNIPAM は温度ジャンプによりピコ秒領域で水の脱離が起こる。その後、成分 τ_1 として観測された高分子鎖中のアミド基間水素結合変化による局所的な収縮が起こる。続いて、成分 τ_2 として観測された globule 状態へと分子レベルでの収縮が起こる。その後、収縮した globule 分子の疎水性相互作用により凝集し光を散乱するサイズにまで成長する。熱の緩和とともに凝集は緩和し、globule 分子が独立し、数秒かけて元の coil 状態へと構造緩和していく様子を明らかにした。

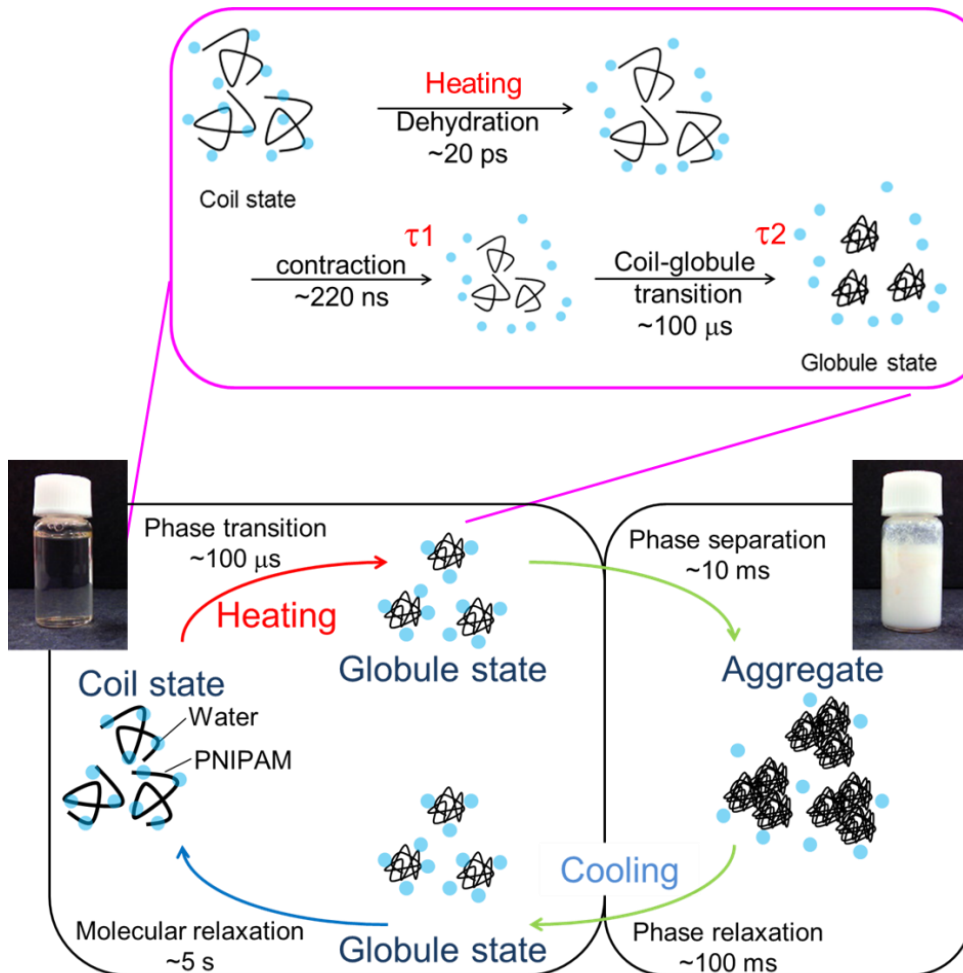


Fig. 3.20 PNIPAM 水溶液の相転移ダイアグラム

3.4.5 Observation of phase transition dynamics depending on initial sample temperature

以上までの結果より、レーザー温度ジャンプ法とヘテロダイン過渡格子法を用いた PNIPAM 水溶液の相転移ダイナミクス測定より、濁度の変化という巨視的な変化だけでなく、個々の分子レベルでの構造転移から、疎水性相互作用による分子集合体の形成・緩和、その後、再び元の状態へと構造緩和するという複雑に進行する一連の相転移過程を経ていることを明らかにしてきた。この一連の相転移ダイナミクスは相転移温度前後の 1.0 K 程度の温度上昇で水素結合変化から構造変化に至るまで多くの過程が誘起されることから、熱に対して非常に敏感であると考えられる。そこで、PNIPAM 水溶液の試料初期温度を変化させることで、熱がどのように相転移ダイナミクスに影響を与えるか考察を行った。

温調セルを用いて PNIPAM 水溶液(3.0 wt %, CV: 0.3 mM) の試料初期温度を 25, 32.2-33.1 °C まで変化させたときのヘテロダイン過渡格子法による応答を Fig. 3.21 に示す。温度ジャンプ幅はレーザー強度を調整し 1.0 K とした。格子間隔 60 μm の回折格子を用いた。応答の縦軸は 10^{-5} 秒時の信号強度で規格化した信号強度、横軸は対数時間を表す。もっとも大きな変化として、 10^{-1} - 10^2 秒領域で観測される coil-globule 相互拡散応答が試料温度を相転移温度に近づけると、遅い時間領域へとシフトしていく様子が分かる。また 10^{-2} - 10^{-1} 秒領域で観測される光の透過率変化応答はより試料温度が高温になると観測れる様子が分かる。これらの各成分の試料温度依存性について詳しく解析を行った。

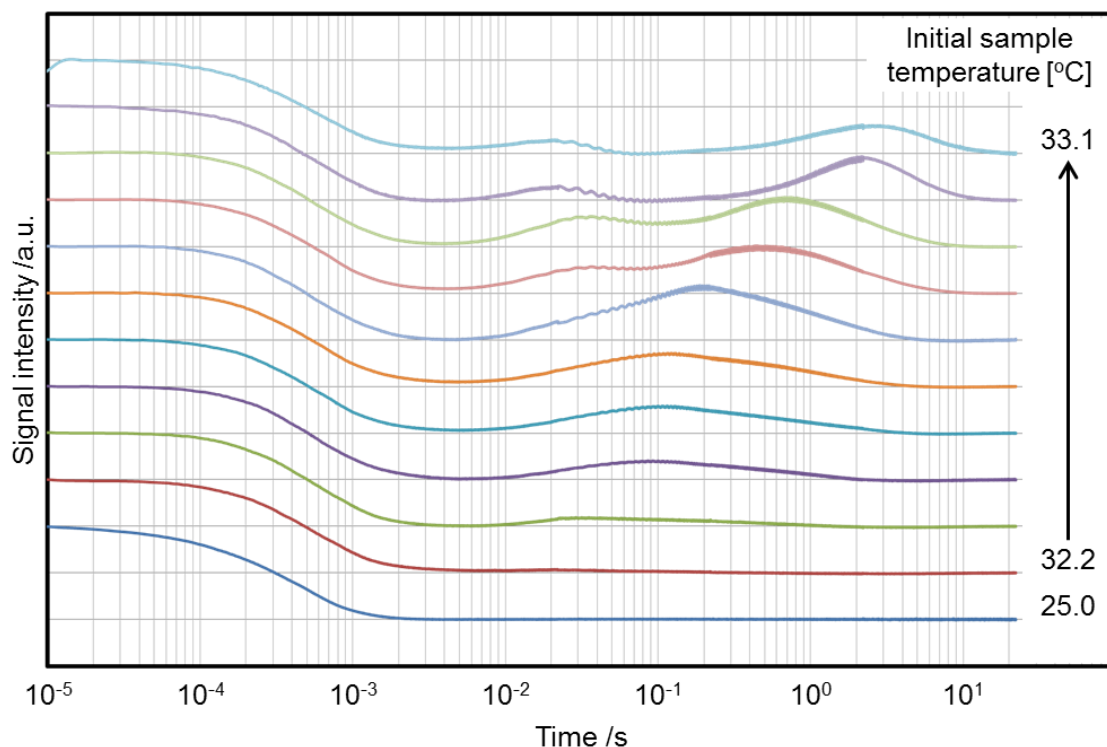


Fig. 3.21 PNIPAM 水溶液の HD-TG 応答の試料初期温度依存性
(温度ステップ: 0.1 K, 温度ジャンプ幅: 1.0 K, 格子間隔: 60 μm)

まず、相転移が誘起されている条件下での 10^{-5} - 10^{-4} 秒領域に観測される成分 τ_1 について時定数の温度依存性を算出した。coil-globule 構造転移応答の試料温度依存性を Fig. 3.22 に示す。縦軸は寿命、横軸は試料の初期温度を示す。観測された時定数は相転移が誘起される温度条件内で、試料初期温度依存性がなかった。後述するが、試料温度が相転移温度近傍になるとコイル状態の高分子鎖から水が脱離し、コイル分子同士が会合体を形成していると考えられる。しかし高温で会合体を形成しているにも関わらず、時定数に変化がないことから、coil-globule 構造転移応答は周囲の高分子鎖に影響されない局所の構造変化からなる応答であると考えられる。

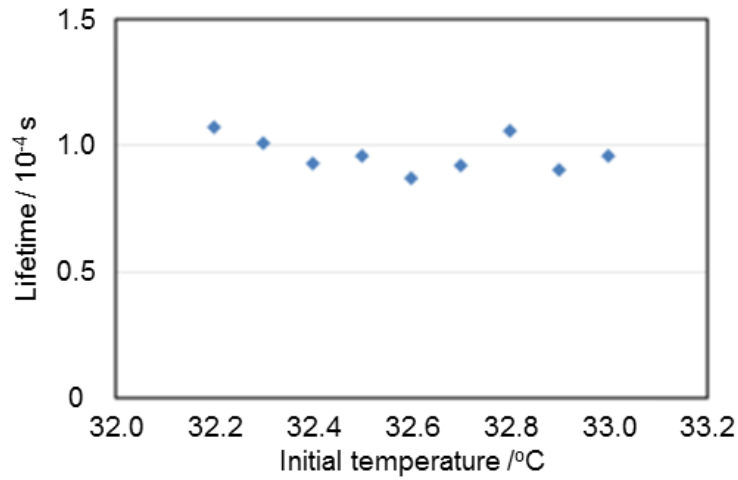


Fig. 3.22 Coil-globule 構造転移の試料の初期温度依存性

次に、相転移が誘起されている条件下での PNIPAM 水溶液の熱拡散係数の試料温度依存性について解析を行った。試料温度を 25.0, 32.2-33.1 °C まで変化させ、熱格子応答の格子間隔依存性から熱拡散係数を算出した。PNIPAM 水溶液の熱拡散係数の温度依存性を Fig. 3.23 に示す。

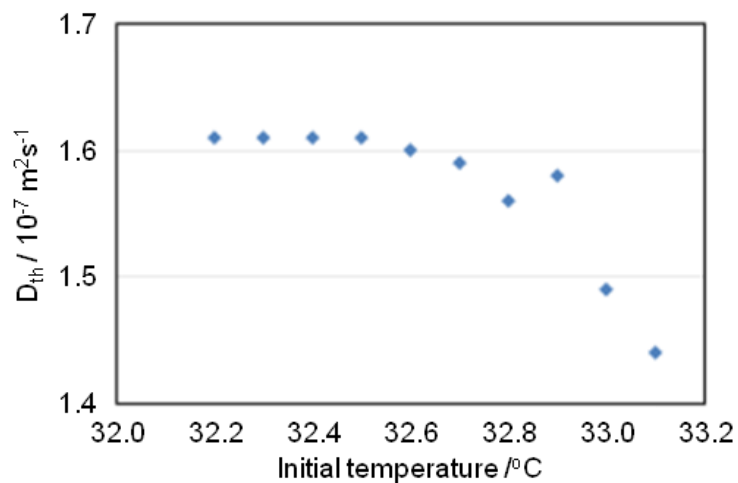


Fig. 3.23 PNIPAM 水溶液の熱拡散係数の温度依存性

縦軸は PNIPAM 水溶液の熱拡散係数、横軸は試料の初期温度を示す。試料初期温度が 32.7 °C を超えると熱拡散係数は減少し始めた。上記にもあるように、純水の熱拡散係数はこの温度範囲でほとんど変化がないことから、(25.0 °C: $1.46 \times 10^{-7} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, 35.0 °C: $1.51 \times 10^{-7} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) PNIPAM 水溶液の熱拡散係数変化は相転移に由来すると考えられる。高温状態での熱拡散係数の減少は coil 状態の分子から脱水した globule 状態の分子に変化していることを表し、より試料温度 32.7 °C (加熱後温度 33.7 °C) で globule 分子からより脱水が進行していると考えられる。この結果から、試料温度がより高温になると、globule 分子の脱水がより進行し、密に収縮、または後述するように会合体を形成していると考えられる。

次に相転移が誘起されている条件下での coil-globule 相互拡散応答の試料温度依存性について解析を行った。同様に、試料温度を変化させ測定した、ヘテロダイン過渡格子法の応答を Fig. 3.24 に示す。

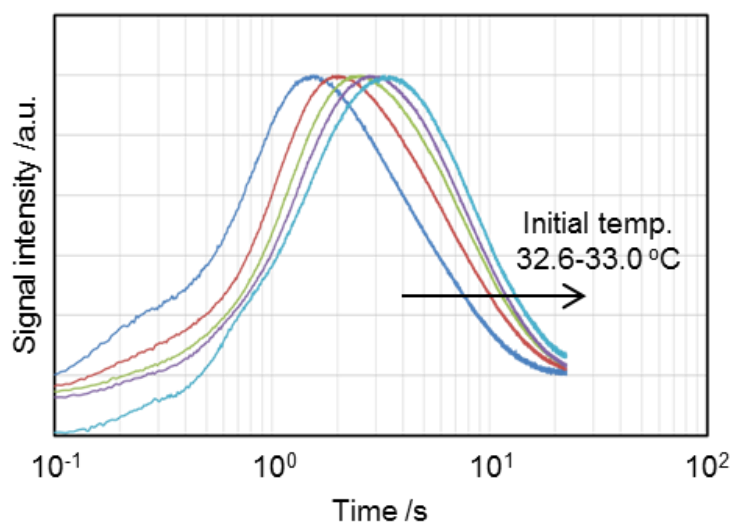


Fig. 3.24 PNIPAM 水溶液の coil-globule 相互拡散応答の温度依存性

増加する globule 分子の拡散緩和応答、減衰する coil 分子の拡散応答ともに、試料の初期温度を相転移温度に近づけるとともに、緩和時間が長くなる応答を得た。これら拡散する各成分から時定数を算出し、格子間隔依存性から拡散係数を算出した。coil 分子、globule 分子の拡散係数の試料温度依存性を Fig. 3.25 に示す。

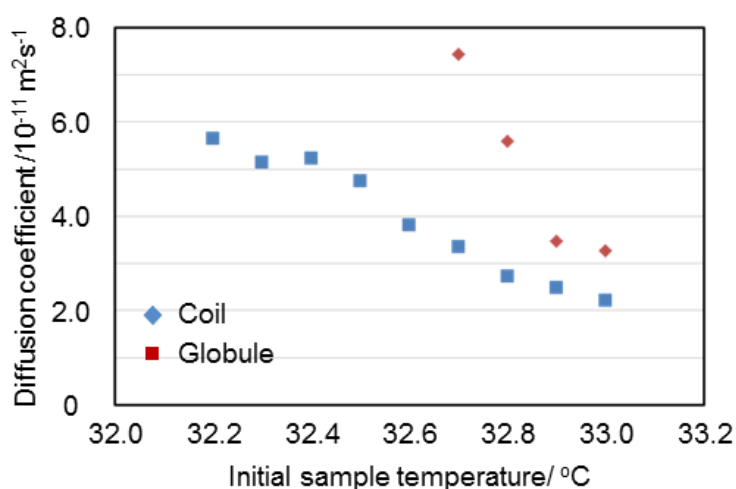


Fig. 3.25 coil, globule 分子の拡散係数の試料温度依存性

縦軸は各成分の拡散係数、横軸は試料初期温度を示す。32.6 °C から coil 分子の拡散係数が急激に減少する応答を得た。上記のように水溶液中の高分子鎖に等価球モデルを適用し、式 3.18 にあるように、Einstein-Stokes の式を用いて拡散係数から粒径を算出した

拡散係数より算出された粒径の試料温度依存性の応答を Fig. 3.26 に示す。縦軸は各成分の粒径、横軸は試料の初期温度を表す。試料の初期温度に応じて粒径が変化する結果を得た。まず、coil 分子について見ていくと、試料温度が十分低いとき、(~32.6 °C) 粒径は 3 nm とほぼ一定の値を示した。また試料温度が相転移温度近傍に近づくとともに、(32.7 °C~) 粒径は増大することが分かつ

た。Coil-globule 構造転移応答が誘起されると、coil 分子は収縮することから、この増大する粒径は複数の coil 分子が会合体を形成しているのではないかと、考えられる。また globule 分子について見ていくと、いずれも coil 状態の分子サイズよりも小さく、脱水して分子内収縮している様子が分かる。また、coil 分子同様に、globule 分子もより高温で粒径が増大することから、会合体を形成していると考えられる。光散乱を用いた粒径の試料温度依存性測定からも、相転移温度近傍で粒径の上昇が観測されることから、ヘテロダイン過渡格子により得られた結果を支持していると考えられる。^[36-38]

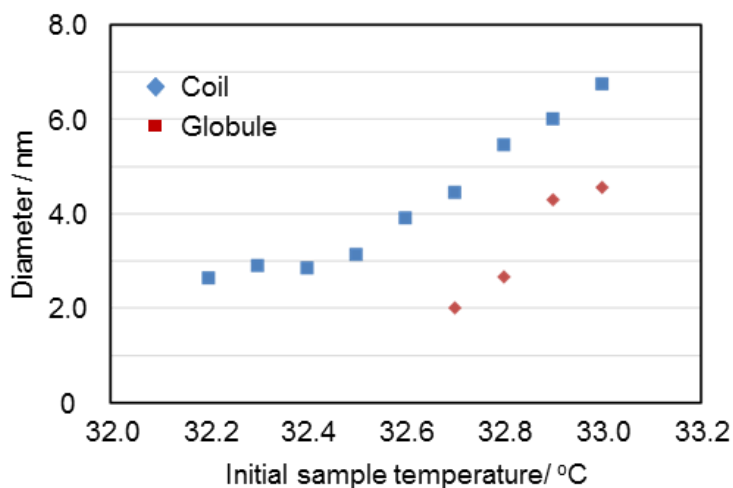


Fig. 3.26 coil, globule 分子の粒径の試料温度依存性

また、globule 分子の拡散緩和応答の格子間隔依存性から、globule-coil 構造緩和転移の寿命の試料温度依存性について Fig. 3.27 に示す。縦軸は globule-coil 構造緩和転移の寿命、横軸は試料の初期温度を表す。試料温度が高温になるとともに、構造緩和の寿命が長くなることが分かった。これはより高温で凝集体が形成された結果、濁度緩和の後も globule 状態で会合体を形成し、紐がほどけるのち時間がかかるように、緩和に時間がかかるのではないかと考えられる。

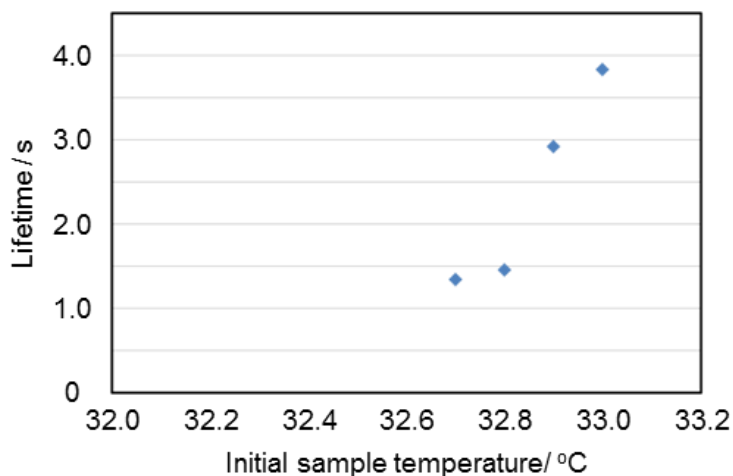


Fig. 3.27 Globule-coil 構造緩和転移応答の試料温度依存性

ヘテロダイナミクス格子法を用いた PNIPAM 水溶液の相転移ダイナミクス測定、またその試料温度依存性応答から考えられる PNIPAM 水溶液の相転移ダイナミクスの模式図を Fig. 3.28 に示す。

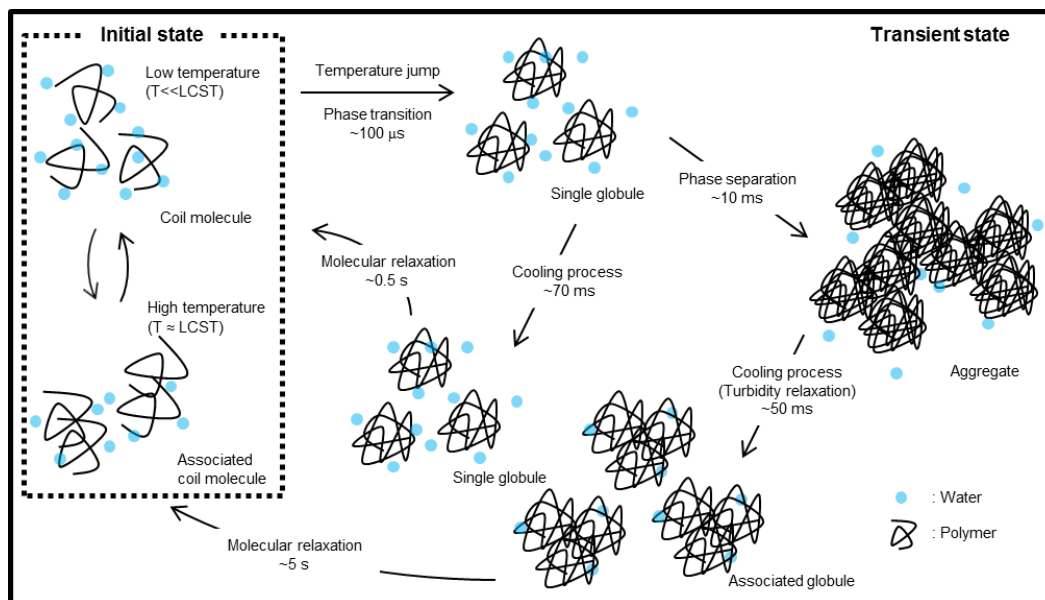


Fig. 3.28 PNIPAM 水溶液の温度依存性相転移ダイアグラム

ダイアグラムに示すように、PNIPAM 水溶液の相転移は透明な状態と白濁した状態の2状態ではなく、分子レベルの個々の相転移が数ステップかけておこり、中間種として **globule** 状態が形成され、凝集することで巨視的な変化として観測されることが分かった。また、相緩和が起こる際も **globule** 状態を経ることを明らかにし、また **coil** 分子、**globule** 分子ともに高温で会合体を形成することを明らかにした。

3.5 Summary

以上のように、PNIPAM 水溶液の相転移を光によって励起し、そのダイナミクスを、レーザー温度ジャンプ法を組み合わせたヘテロダイン過渡格子法により測定してきた。得られた応答を、温調フォルダーを用いて試料の初期温度を制御し、相転移が起こらない条件との比較を行い、また、PNIPAM を含まない試料での応答と比較を行うことで、PNIPAM 水溶液の相転移ダイナミクスの同定を行った。PNIPAM 水溶液は室温で水和した coil 状態から加熱されることにより、数 10 ps 程度で水和していた水との水素結合が切れる。その後、200 ns 程度から体積変化相転移の初期応答が観測され、100 μ s 程度で coil-globule 相転移が進行することが分かった。その後、およそ 10 ms 程度で globule 分子は疎水性相互作用により凝集し白濁、熱拡散とともに、およそ 50 ms 程度で凝集は緩和し元の透明な溶液へと緩和していった。凝集が緩和した透明な溶液中では、globule 状態の分子が存在し、数秒かけてもとの水和した coil 状態の分子へと拡散しながら緩和していく様子が観測された。さらに、相転移温度以前で、水和した coil 状態の分子は相転移温度近傍に近づくにつれて、会合体を形成し、また凝集より緩和した globule 状態の分子もより高温で凝集が形成されると会合体を形成していることを明らかにした。以上のように、PNIPAM 水溶液の相転移過程をレーザー温度ジャンプ法とヘテロダイン過渡格子法を組み合わせることで屈折率を通して測定した結果、透明・白濁という見た目の変化だけでなく、水和した coil 状態の分子から、脱水・収縮を経て globule 状態の分子へと構造転移する過程、疎水性相互作用により凝集・緩和する過程、もとの coil 状態へと構造緩和する過程、また試料の温度に応じて会合体を形成するなど、複雑な相転移ダイナミクスを有していることを明らかにすることが出来た。

Reference

- [1] H. Inoue, K. Katayama, K. Iwai, A. Miura, H. Masuhara, “Conformational relaxation dynamics of a poly(N-isopropylacrylamide) aqueous solution measured using the laser temperature jump transient grating method” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2012**, 14, 5620.
- [2] M. Okuda and K. Katayama, “Photochemical Reaction Dynamics Measured using the Near-Field Heterodyne Transient Grating Method” *J. Phys. Chem. A*, **2008**, 112, 4545.
- [3] M. Okuda and K. Katayama, “Selective detection of real and imaginary parts of refractive index change in solutions induced by photoexcitation using near-field heterodyne transient grating method” *Chem. Phys. Lett.*, **2007**, 443, 158.
- [4] K. Katayama, M. Yamagushi and T. Sawada, “Lens-free heterodyne detection for transient grating experiments” *Appl. Phys. Lett.*, **2003**, 82, 2775.
- [5] H. Staerk and G. Czerlinski, “Nanosecond Heating of Aqueous Systems by Giant Laser Pulses” *Nature*, **1965**, 205, 63.
- [6] D. Madge and M. W. Windsor, “Picosecond internal conversion in crystal violet” *Chem. Phys. Lett.*, **1974**, 24, 144.
- [7] S. Chen, I. Y. S. Lee, W. A. Tolbert, X. Wen and D. D. Dlott, “Applications of ultrafast temperature jump spectroscopy to condensed phase molecular dynamics” *J. Phys. Chem.*, **1992**, 96, 7178.
- [8] Y. Nagasawa, Y. Ando, D. Kataoka, H. Matsuda, H. Miyasaka and T. Okada, “Ultrafast Excited State Deactivation of Triphenylmethane Dyes” *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 2024.
- [9] Y. Tsuboi, Y. Yoshida, K. Okada and N. Kitamura, “Phase Separation Dynamics of Aqueous Solutions of Thermoresponsive Polymers Studied by a Laser T-Jump Technique” *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112, 2562.
- [10] E. L. Cussler, “*Diffusion Mass Transfer in Fluid System*”, 3rd ed. Cambridge Univ., **2009**.
- [11] T. Sakamaki, T. Fujino, H. Hosoi, T. Tahara and T. Korenaga, “Picosecond time-resolved fluorescence study of poly vinyl methyl ether aqueous solution” *Chem. Phys. Lett.*, **2009**, 468, 171.
- [12] S. Woutersen, Y. Mu, G. Stock and P. Hamm, “Hydrogen-bond lifetime measured by time-resolved 2D-IR spectroscopy: N-methylacetamide in methanol” *Chem. Phys.*, **2001**, 266, 137.
- [13] X. Ye, Y. Lu, L. Shen, Y. Ding, S. Liu, G. Zhang and C. Wu, “How Many Stages in the Coil-to-Globule Transition of Linear Homopolymer Chains in a Dilute Solution?” *Macromolecules*, **2007**, 40, 4750.
- [14] Y. Lu, X. Ye, J. Li, C. Li and S. Liu, “Kinetics of Laser-Heating-Induced Phase Transition of Poly(N-isopropylacrylamide) Chains in Dilute and Semidilute Solutions” *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115, 12001.
- [15] K. Kamata, T. Araki and H. Tanaka, “Hydrodynamic Selection of the Kinetic Pathway of a Polymer Coil-Globule Transition” *Phys. Rev. Lett.*, **2009**, 102, 108303.
- [16] Y. Katsumoto, T. Tanaka and Y. Ozaki, “Relationship between the coil-globule transition of an aqueous poly(N-isopropylacrylamide) solution and structural changes in local conformations of the polymer” *Macromol. Symp.* **2004**, 205, 209.

- [17] R. M. Ballew, J. Sabelko and M. Gruebele, "Observation of distinct nanosecond and microsecond protein folding events" *Nat. Struct. Biol.*, **1996**, 3, 923.
- [18] M. Terazima, "Temperature lens and temperature grating in aqueous solution" *Chem. Phys.*, **1994**, 189, 793.
- [19] M. Okuda, T. Tsuruta and K. Katayama, "Lifetime and diffusion coefficient of active oxygen species generated in TiO₂ sol solutions" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, 11, 2287.
- [20] Y. Nakazato, K. Taniguchi, S. Ono, T. Eitoku and K. Katayama, "Formation dynamics of gold nanoparticles in poly(vinylpyrrolidone) and other protective agent solutions" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, 11, 10064.
- [21] N. Maeda, T. Eitoku, Y. Ikezoe and K. Katayama, "Nucleation reaction dynamics of Pt nanoparticles observed by the heterodyne transient grating method", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2012**, 14, 200.
- [22] M. Terazima, T. Hara and N. Hirota, "Reaction volume and enthalpy changes in photochemical reaction detected by the transient grating method; photodissociation of diphenylcyclopropanone" *Chem. Phys. Lett.*, **1995**, 246, 577.
- [23] Y. Ding, X. Ye and G. Zhang, "Microcalorimetric Investigation on Aggregation and Dissolution of Poly(N-isopropylacrylamide) Chains in Water" *Macromolecules*, **2005**, 38, 904.
- [24] T. Okazaki, N. Hirota and M. Terazima, "Thermalization process after the relaxation of electronically excited states: Intramolecular proton transfer systems studied by the transient grating method" *J. Chem. Phys.*, **1999**, 110, 11399.
- [25] M. Terazima, "Vibrational relaxation from electronically photoexcited states in solution studied by the acoustic peak delay method: hydrogen bonding effect to betaine-30" *Chem. Phys. Lett.*, **1999**, 305, 189.
- [26] B. Sun, Y. Lin, P. Wu and H. W. Siesler, "A FTIR and 2D-IR Spectroscopic Study on the Microdynamics Phase Separation Mechanism of the Poly(N-isopropylacrylamide) Aqueous Solution" *Macromolecules*, **2008**, 41, 1512.
- [27] J. Dybal, M. Trchova and P. Schmidt, "The role of water in structural changes of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylmethacrylamide) studied by FTIR, Raman spectroscopy and quantum chemical calculations" *Vib. Spectrosc.*, **2009**, 51, 44.
- [28] A. Ukai, N. Hirota and M. Terazima, "Radical diffusion measured by the transient grating in a short timescale" *Chem. Phys. Lett.*, **2000**, 319, 427.
- [29] S. Nishida, T. Nada and M. Terazima, "Kinetics of Intermolecular Interaction during Protein Folding of Reduced Cytochrome c" *Biophys. J.*, **2004**, 87, 2663.
- [30] P. V. Yushmanov, I. Furo and I. Iliopoulos, "Kinetics of Demixing and Remixing Transitions in Aqueous Solutions of Poly(N-isopropylacrylamide): A Temperature-Jump 1H NMR Study" *Macromol. Chem. Phys.*, **2006**, 207, 1972.
- [31] I. Teraoka, "Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties" John Wiley & Sons, Inc.: New York, **2002**.
- [32] K. Katayama, H. Nomura, H. Ogata and T. Eitoku, "Diffusion coefficients for nanoparticles under flow and stop-flow conditions" *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, 11, 10494.
- [33] I. Yamamoto, K. Iwasaki and S. Hirotsu, "Light Scattering Study of Condensation of

- Poly (N-isopropylacrylamide) Chain” *J. Phys. Soc. Jpn.*, **1989**, 58, 210.
- [34] S. Takata, T. Norisuye, N. Tanaka and M. Shibayama, “Heat-Induced Gelation of β -Lactoglobulin. 1. Time-Resolved Dynamic Light Scattering” *Macromolecules*, **2000**, 33, 5470.
- [35] A. Valstar, M. Almgren and W. Brown, “The Interaction of Bovine Serum Albumin with Surfactants Studied by Light Scattering” *Langmuir*, **2000**, 16, 922.
- [36] J. Won, C. Onyenemezu, W. G. Miller and T. P. Lodge, “Diffusion of Spheres in Entangled Polymer Solutions: A Return to Stokes-Einstein Behavior” *Macromolecules*, **1994**, 27, 7389.
- [37] X. Qiu, M. Li, C. M. S. Kwan, C. Wu, “Light-scattering study of the coil-to-globule transition of linear poly(N-isopropylacrylamide) ionomers in water” *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.*, **1998**, 36, 1501.
- [38] H. Cheng, L. Shen and C. Wu, “LLS and FTIR Studies on the Hysteresis in Association and Dissociation of Poly(N-isopropylacrylamide) Chains in Water” *Macromolecules*, **2006**, 39, 2325.

Chapter 4

Observation of time resolved fluorescence spectroscopy & transmittance imaging using laser trapping under the microscope

4.1 Introduction

前章までに、ヘテロダイン過渡格子法を用いた poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) 水溶液の相転移ダイナミクス測定について紹介してきた。その結果、相転移には PNIPAM 鎖中のアミド基と水との水素結合や、高分子同士の疎水性相互作用が重要な役割を果たしていること、また、相転移は透明・白濁の 2 状態間で起こるのではなく、個々の分子鎖の構造転移から巨視的な過程へと連続的に進行していることを明らかにした。

本章は極性環境変化に敏感に応答する蛍光プローブ分子を用いることで、屈折率変化を用いて観測したヘテロダイン過渡格子法とは異なる視点から、PNIPAM 水溶液の相転移・相緩和過程についての考察を行う。過去に、蛍光プローブ分子を用いた熱応答性高分子の局所的な相転移ダイナミクスの測定はいくつか報告されている。^[1,2] しかし、これらの研究は熱応答性高分子が相転移することで、凝集、溶液が白濁することで蛍光強度の測定が困難になる問題点を抱えていた。

そこで、相転移による凝集の様子と極性変化による蛍光スペクトル変化を同時に測定する技術として、光圧を用いた相転移誘起と蛍光測定を顕微鏡下

で行うことを発案した。対物レンズを用いてレーザー光を集光すると、焦点近傍に光圧が生じ、ピンセットのように溶液中の微粒子を扱うことが出来る光ピンセットの技術は古くから知られている。また光圧を用いて熱応答性高分子の相転移誘起に関する研究も行われている。しかし、これらの研究は光圧の有用性を示す一方、熱応答性高分子の相転移ダイナミクスに関して深く考察が行われてこなかった。本研究は、蛍光プローブ分子を共重合させた PNIPAM の蛍光測定と、光圧を用いた相転移誘起を顕微鏡下で同時に行い、凝集の様子と蛍光スペクトル変化から、溶液の巨視的な相分離と微視的な相転移を相関付け、相転移・相緩和ダイナミクスについて考察する。

4.2 Photon force

4.2.1 Principle of photon force

媒体に光が入射される時、媒体は光からの圧力“光圧”を受けている。この考えは光子の運動量の変化として説明することが出来る。電磁気学の立場から光を電磁波としての性質でとらえると、マックス・プランクの式より、光のエネルギー E と電磁波の周波数 ν は次の関係にある。

$$E = h\nu \quad (4.1)$$

ここで、 h はプランク定数を表す。

また量子力学の立場から光を粒子としての性質でとらえると、アインシュタインの式より、光子は静止質量を持たず、そのエネルギー E と質量 m は次の関係にある。

$$E = mc^2 \quad (4.2)$$

ここで、 c は光の速度を表す。

また光の波長 λ と周波数 ν は次の関係にある。

$$c = \nu\lambda \quad (4.3)$$

このプランクの式とアインシュタインの式より、光の電磁波としての性質と粒子としての性質が結びつき、式 4.3 に代入すると次のように表すことが出来る。

$$\lambda = h/mc \quad (4.4)$$

ここで、質量 m と光速 c の積 (mc) は運動量 p に等しいので、次のように表すことが出来る。

$$p = h/\lambda \quad (4.5)$$

上記の式より、光はその波長に応じた運動量を持つことが分かる。したがって、

光が反射や屈折などにより、その進行方向を変化させた場合や、光の吸収、反射が起きた場合には、運動量保存の法則により、その反作用として光の放射圧 (radiation pressure) が生じることが分かる。この光の放射圧が ”光圧” と呼ばれている。光圧は 1871 年に Maxwell によって理論的に導かれ、その後、Levedev により実験的にも証明された。^[3] この光圧は身の回りの光に照らされているすべての領域にて生じているが、この光の圧力は極めて小さく、例えば、レーザーポインターの光(1 mW) をミラー表面に対して垂直に入射させて反射させた場合、ミラーにかかる放射圧は約 7 pN とほぼ無視できるほど小さく、日常生活で感じることはない。このごく小さい力である光圧は宇宙空間などの抵抗が極めて小さい条件で応用され、特に、太陽からの放射圧を宇宙船の推進機構の動力として用いるソーラーセイルの研究が行われており、また、2010 年には宇宙航空研究開発機構 (JAXA) で打ち上げられた IKAROS は世界初のソーラーセイル実証機として 2012 年現在も宇宙空間にて研究がなされている。Fig. 4.1 に小型ソーラー電力セイル実証機 IKAROS を示す。

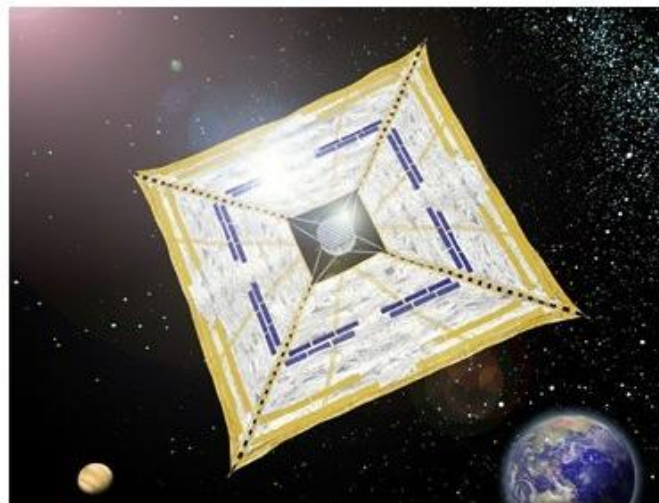


Fig. 4.1 小型ソーラー電力セイル実証機 IKAROS

(http://www.jaxa.jp/countdown/f17/overview/ikaros_j.html)

また、宇宙空間だけでなく、光を極限まで集めることで、光圧を利用する研究もなされている。Ashkin は 1970 年にレンズを用いてレーザー光を集束させると、その集光点に直径がマイクロメートル程度の微粒子を捕捉する力が発生することを発見した。^[4-6] この微粒子を補足する力は集光下で増強された光圧である。この手法を用いると、空間中に光を用いて物質を補足することが可能で、また、集光位置を操作することで、あたかも、ピンセットで微粒子をつまむように、微粒子を捕まえ、三次元的に自由に動かすことが可能である。この顕微鏡下でレーザー光を集光することで生成する光圧を用いたテクニックはレーザートラップや、特に微粒子操作を行うときはレーザーピンセットと呼ばれている。^[7-9] 光を用いて微粒子を操作することが可能なため、1) 非接触・非侵襲で対象物の捕捉・操作をおこなえる、2) トラップ光を遮断すれば容易に放すことができる、3) 多数の粒子を同時にそれぞれ干渉することなく制御できる、などのメリットがあり、広く研究がなされている。^[10,11]

4.2.2 Principle of laser trapping

光が屈折率の異なる媒質($n_1 < n_2$) に入射した場合、光は二つの媒質の境界面で反射、屈折し、光子の運動量に変化することで、作用反作用の法則から物質に光圧が働く。Fig. 4.2 に静止した二つの媒体(n_1, n_2) に光が入射したときに働く運動量の変化を示す。赤線は光の進行方向、黒の実線 P_1 は入射前の光の運動量のベクトル成分、黒の実線 P_2 は反射または屈折した後の光の運動量のベクトル成分、黒の点線は二つの媒質界面にかかる光圧を示す。反射・屈折現象ともに光の進行方向が変化するので、光の運動量の変化から、界面に垂直な方向に光圧がかかることが分かる。

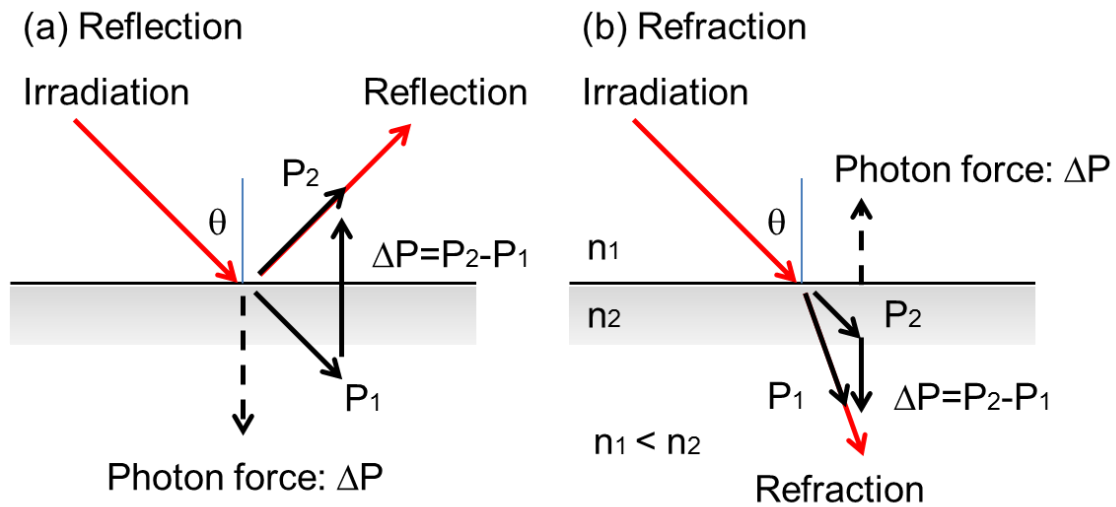


Fig. 4.2 静止した屈折率の異なる二つの媒体に光が入射したときの光子の運動量変化 (a)光が反射する場合 (b)光が屈折する場合

次に、顕微鏡下でレーザー光を球状微粒子に集光した場合に働く光圧について考える。理論的な取り扱いとして、微粒子半径が波長に比べて十分大きい場合には幾何光学の理論を用いて、微粒子半径が波長よりも十分小さい場合には Rayleigh の光散乱の理論を用いて近似的に表すことができる。^[12,13]

まず、微粒子の粒径(r) が波長(λ) に比べて十分大きい場合に働く光圧の模式図を Fig. 4.3 に示す。幾何光学的に考えると、対物レンズによって集光されたレーザー光は周囲の媒質より高い屈折率をもつ微粒子に入射すると、光は微粒子表面で屈折する。このとき、光子の進行方向が変化することで運動量が変わり、微粒子に光圧が働く。微粒子内を通過した光は微粒子からでるときにもう一度屈折し、再び微粒子に光圧が働く。様々な角度から入射する光の放射圧を積分するとレーザー光の焦点方向に働く力 F となる。粒子のブラウン運動よりも粒子に働く光圧が大きいとき、微粒子はレーザー光の焦点に補足される。

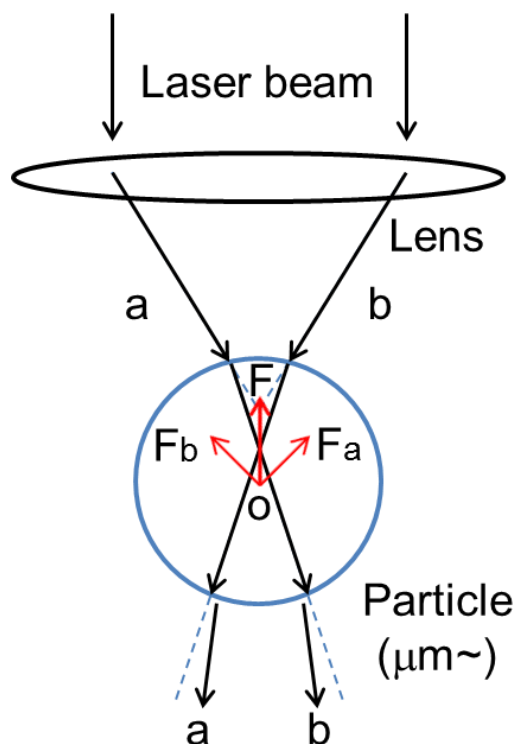


Fig. 4.3 マイクロメートルサイズの粒子に働く光圧 ($2r \gg \lambda$)

次に、光の波長より十分に小さいナノメートルサイズの粒子の場合の模式図を Fig. 4.4 に示す。Rayleigh の光散乱の理論より、ナノ粒子に光が照射されたとき、ナノ粒子が周囲の電場から受ける力は Lorentz 力として次のように表すことができる。^[14] ナノ粒子を 1 個の電気双極子とする近似を用いると、

$$\mathbf{F} = \frac{1}{2} \alpha \nabla E^2 + \alpha \frac{\partial}{\partial t} (\mathbf{E} \times \mathbf{B}) \quad (4.6)$$

ここで

$$\alpha = 4\pi\epsilon_2 r^3 \frac{(n_1/n_2)^2 - 1}{(n_1/n_2)^2 + 2} \quad (4.7)$$

\mathbf{E} は電場密度、 \mathbf{B} は磁束密度、 r は微粒子の半径、 n_1 はナノ粒子の屈折率、 n_2 は媒質の屈折率である。

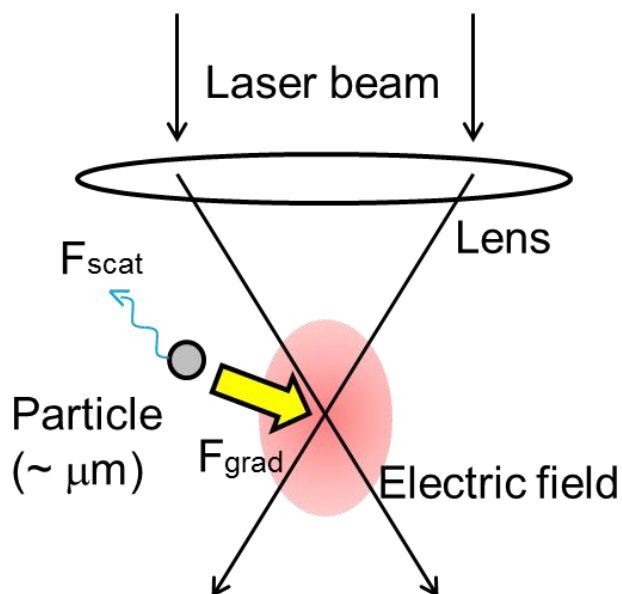


Fig. 4.4 ナノメートルサイズの粒子に働く光圧 ($2r \ll \lambda$)

Lorentz 力はナノ粒子と媒質の比誘電率に依存し、式 4.6 右辺第一項は双極子が不均一な空間分布をした電場の中におかれているときに生じる静電応力で、勾配力(F_{grad}) と呼ばれ、微粒子の屈折率が周囲の媒質に比べて高い場合には電場強度の強いところへ微粒子を引き寄せる力として働く。右辺第二項は光のエネルギーの進行方向が時間的に変化することによって生じる力であり、散乱力(F_{scat}) と呼ばれている。勾配力が散乱力よりも上回るとき、焦点近傍に粒子がトラップされる。顕微鏡下でレーザー光を集光する場合には、開口数の大きいレンズを用いて光を集光させることで、勾配力が散乱力に比べて大きくなり、ナノ粒子は光強度の高いところへとひきつけられることになる。

光圧を用いて集光点にトラップできる物体の条件として、レーザー光の波長に対して透過率が高く、溶媒よりも屈折率が高いことが挙げられる。また、レーザートラップの効率にはレーザー光の強度と入射角、微粒子サイズに依存することが分かっている。これらの条件を満たすことで、粒子だけでなく、水中

のタンパク質やアミノ酸の結晶化や熱応答性高分子の相転移などを光圧により誘起できることが知られている。^[15-17] 光圧により分子が集められ、相が変化する場合について考える。Fig. 4.5 に光圧を用いた PNIPAM 水溶液の相転移・光トラップの概念を示す。^[18-20] 光圧により分子が集められ、局所的な濃度が増加すると、系の平衡状態が変化する。相図のシフトより集光位置には均一相とは異なる分子集合体が生じる。分子集合体が凝集しサイズが上昇することで、ブラウン運動が減少し、より強い光圧が働き、系の平衡状態は加速度的に相分離を生じる方向へとシフトし、定常的に相が異なる状態の粒子をトラップすることが可能となる。

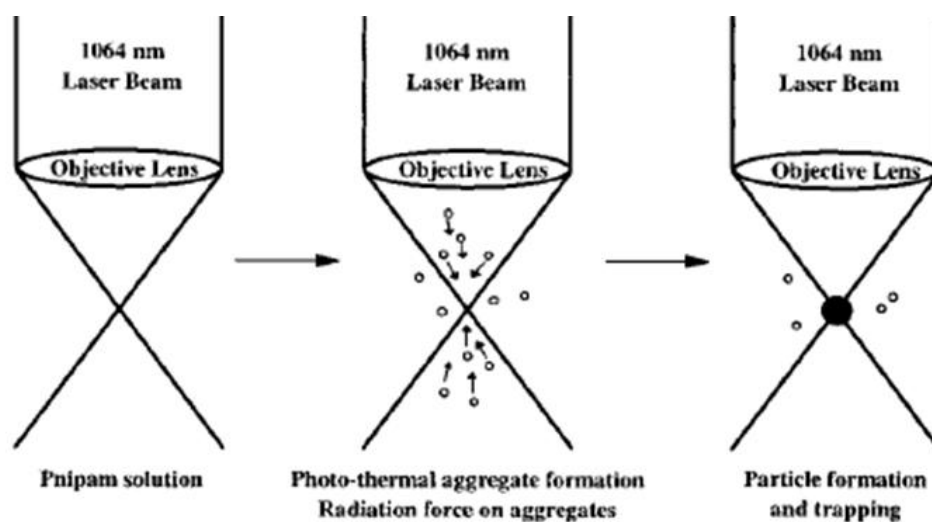


Fig. 4.5 光圧を用いた PNIPAM 水溶液の相転移・光トラップの概念

(J. Hofkens et al., *Langmuir*, **13**, 414, 1997.)

4.3 Experimental section

4.3.1 Optical setup

レーザートラップの装置図を Fig. 4.6 に示す。レーザートラッピング用の近赤外光源として Nd:YVO₄ レーザー (MATRIX 1064-10-CW, Coherent,) の基本波(λ : 1064 nm, 連続光) を用いた。近赤外光の強度は 1/2 波長板と偏光ビームスプリッター(PBS) を用いて微調節した。近赤外光は二つの凸レンズを用いてビーム径を対物レンズの開口径に合わせて拡大した。対物レンズ(UPlan FLN 60 NA: 0.9 または UPlan SAPO, 100x oil, NA: 1.4, Olympus)を用いて近赤外光を集光した。焦点位置は試料セルの中央とし、硝子基板の影響を排除した。蛍光プローブ励起用の光源として He-Cd laser(IK3410R-F, KIMMON, λ =325 nm, 連続光) を対物レンズの後ろ焦点に集光することで、試料面で広域に照射されるようにした。落射光の透過光または試料の蛍光は各種フィルターを用いて励起光をカットした後、EMCCD (PIXIS 400; Princeton instruments), Polychromater (SP2300i; Princeton instruments) を用いて、透過像、蛍光画像および蛍光スペクトルを測定した。

試料セルはカバー硝子とパラフィルムを用いて自作した(Fig. 4.7)。2枚のカバーガラス(Matsunami, 24 x 40, No.1, 18 x 18, No. 1) にパラフィルム(PM-996) を薄く延ばしたものをスペーサーとして挟み込み、ホットプレートで加熱し融着させて試料セルを作成した。試料セルの厚みは約 80 μ m、試料の液量は 10 μ L 程度であった。

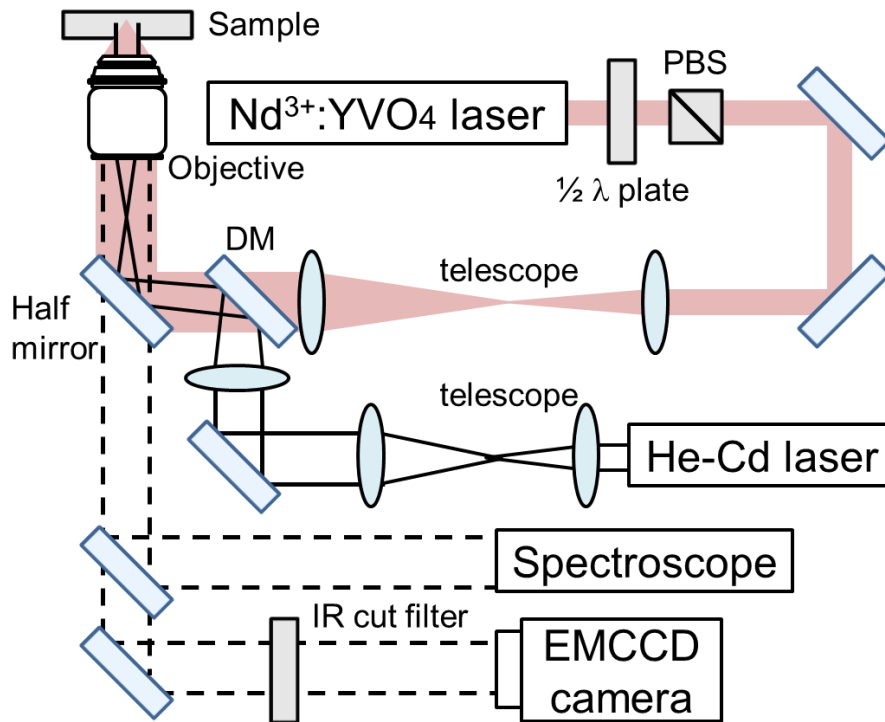


Fig. 4.6 光トラップ顕微蛍光測定のための光学セットアップ

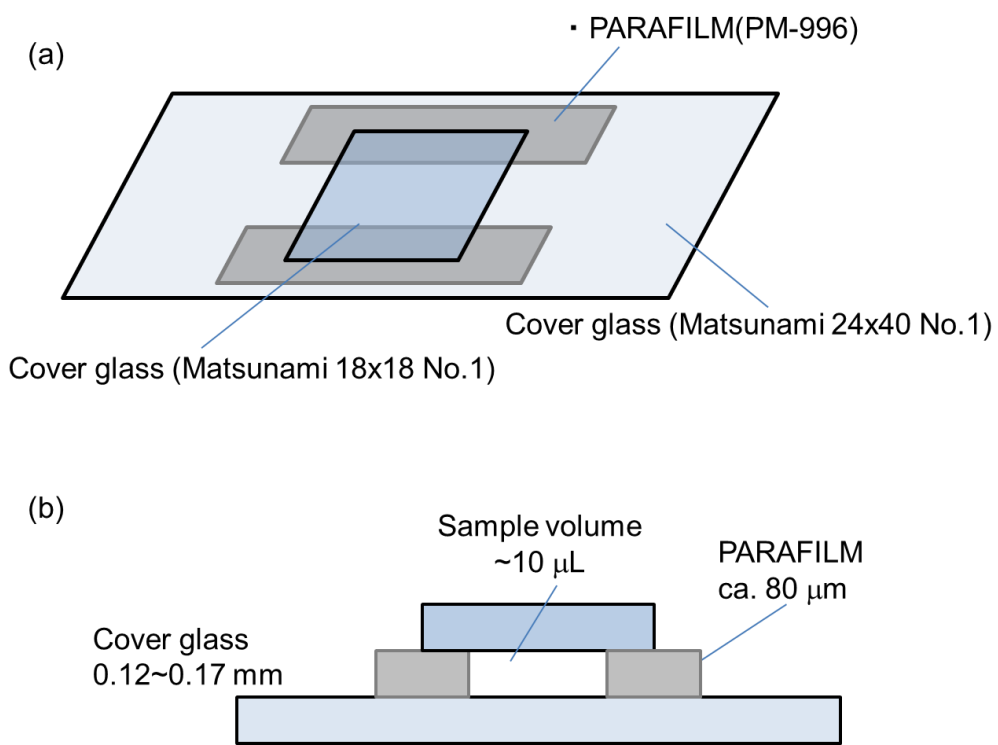


Fig. 4.7 (a)試料セルの模式図 (b)断面図

4.3.2 Sample preparation

本実験で用いた熱応答性高分子の構造を Fig. 4.8 に示す。PNIPAM は Sigma-Aldrich より分子量 20000-25000 g/mol のものを購入した。また蛍光ラベルとして、3-(2-propenyl)-9-(4-N,N-dimethyl-aminophenyl) phenanthrene (VDP) を NIPAM モノマーとともに共重合させた VDP-co-NIPAM を用いた。VDP は NIPAM に対して 0.1 mol% の組成比で重合させた。VDP-co-NIPAM の分子量は 30000 g/mol で、合成法については参照論文に詳しく紹介されている。^[21] 各試料は純水または重水に 3.5 wt% になるように溶解した。濁度測定により求められた各高分子の相転移温度は水溶媒中で PNIPAM, VDP-co-NIPAM とともに 32 °C、重水溶媒中で PNIPAM, VDP-co-NIPAM とともに 34 °C であった。溶媒間の相転移温度の差は水素結合力に起因すると考えられる。^[22]

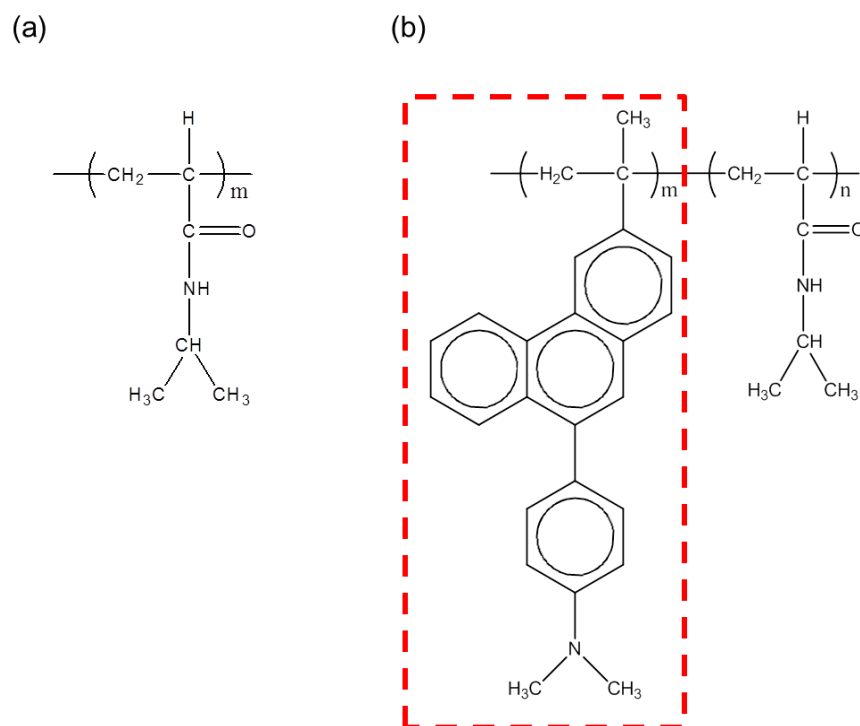


Fig. 4.8 (a) PNIPAM (Mw: 25000 g/mol) (b) VDP-co-NIPAM (VDP unit content is 0.1 mol% (m:n = 1:1000), Mw: 30000), 赤点線内は VDP ユニットを示す

VDP ユニットの分子間電荷移動特性を持ち、局所的な溶媒の極性変化に敏感なため、極性蛍光プローブとして働く。熱応答性高分子の相転移には極性変化が伴うため、VDP ユニットの蛍光スペクトル変化が局所的な相転移過程を反映できると期待される。Fig. 4.9 に各誘起溶媒における VDP ユニットの蛍光スペクトルを示す。^[23] 蛍光スペクトルより、VDP ユニットの極性溶媒になるほど蛍光ピークがレッドシフトする。

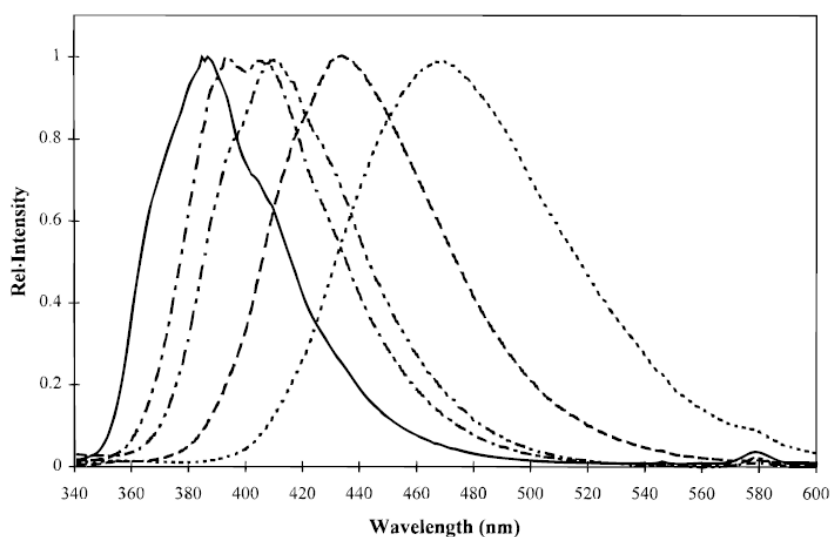


Fig. 4.9 各誘起溶媒における VDP ユニットの蛍光スペクトル (励起 295 nm)
蛍光ピーク波長の短波長側からイソオクタン、ジブチルエーテル、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、アセトニトリル
(A. Onkelinx et al., *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2892, 1996.)

4.4 Results and discussion

4.4.1 Photothermal effect of near infrared laser

光圧による相転移誘起・蛍光測定を行う前に、光圧以外に近赤外光が PNIPAM 水溶液に与える効果について考察を行った。光圧を用いた測定には、試料物質の吸収の少ない近赤外波長領域のレーザー光、特に Nd:YVO₄ 結晶を用いた半導体レーザー($\lambda=1064$ nm) が安価、高出力で高安定であり、光圧の光源として広く用いられている。しかし、水溶液系の光圧実験、特に熱応答性高分子の相転移実験において、Nd:YVO₄ レーザー($\lambda=1064$ nm) を用いることは、光圧の光源としてだけでなく重要な意味を持つ。Fig. 4.10 に PNIPAM 水溶液(1) と PNIPAM 重水溶液(2) の可視・近赤外吸収スペクトルを示す。

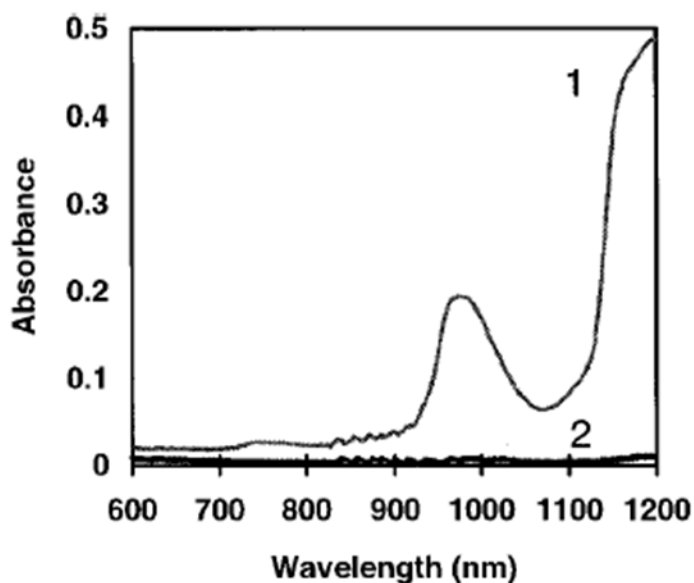


Fig. 4.10 PNIPAM 水溶液(1)と PNIPAM 重水溶液(2)の
可視・近赤外吸収スペクトル

(J. Hofkens et al., *Langmuir*, **13**, 414, 1997.)

近赤外領域において、PNIPAM 自体の吸収は存在しない。また水、重水分子においても近赤外領域に電子遷移による吸収は存在しない。しかし水分子では、波長 950 nm 付近に OH 伸縮振動の倍音による吸収バンドが存在し、水溶液の光圧の光源に高強度の Nd:YVO₄ レーザー($\lambda=1064$ nm)を用いると、光熱変換による熱の影響が無視できなくなってくる。この吸光度は波長 1064 nm、光路長 1 cm セルを用いて約 0.06 と見積もられる。通常、この吸光度の値は光路長が短いので無視できる値だが、光圧を発生させるために高強度の近赤外光を回折限界まで絞り込み、集光位置付近の僅かな加熱体積を考えると 100 mW の近赤外光で約 $0.37 \text{ K}/\mu\text{m}^3$ の程度上昇が生じると計算できる。PNIPAM は熱を外部刺激として相転移現象を示すため、近赤外光による相転移誘起は光圧の効果と光熱変換効果の双方の寄与を考慮する必要がある。そこで、OH 伸縮振動の倍音バンドによる吸収を無視できる PNIPAM 重水溶媒と光熱変化効果のある PNIPAM 水溶液で同様の実験を行い、その効果を考察した。

4.4.2 Laser trapping of PNIPAM water and heavy water solution

溶媒の近赤外光吸収による局所的な加熱効果の影響を調べるために、PNIPAM 水溶液と、光熱変換を無視できる PNIPAM 重水溶媒との応答と比較を行った。

PNIPAM 重水溶液(Mw 25000 g/mol, 3.5 wt%) に近赤外光を集光照射したときの応答を Fig. 4.11 に示す。対物レンズは 100 倍 (UPlan SAPO, 100x oil, NA: 1.4, Olympus), 試料面での近赤外光の強度は 140 mW とした。重水溶媒では近赤外光の吸収による光熱変換効果の局所加熱がなく、光圧のみの効果で相転移を誘起させることができると考えられる。

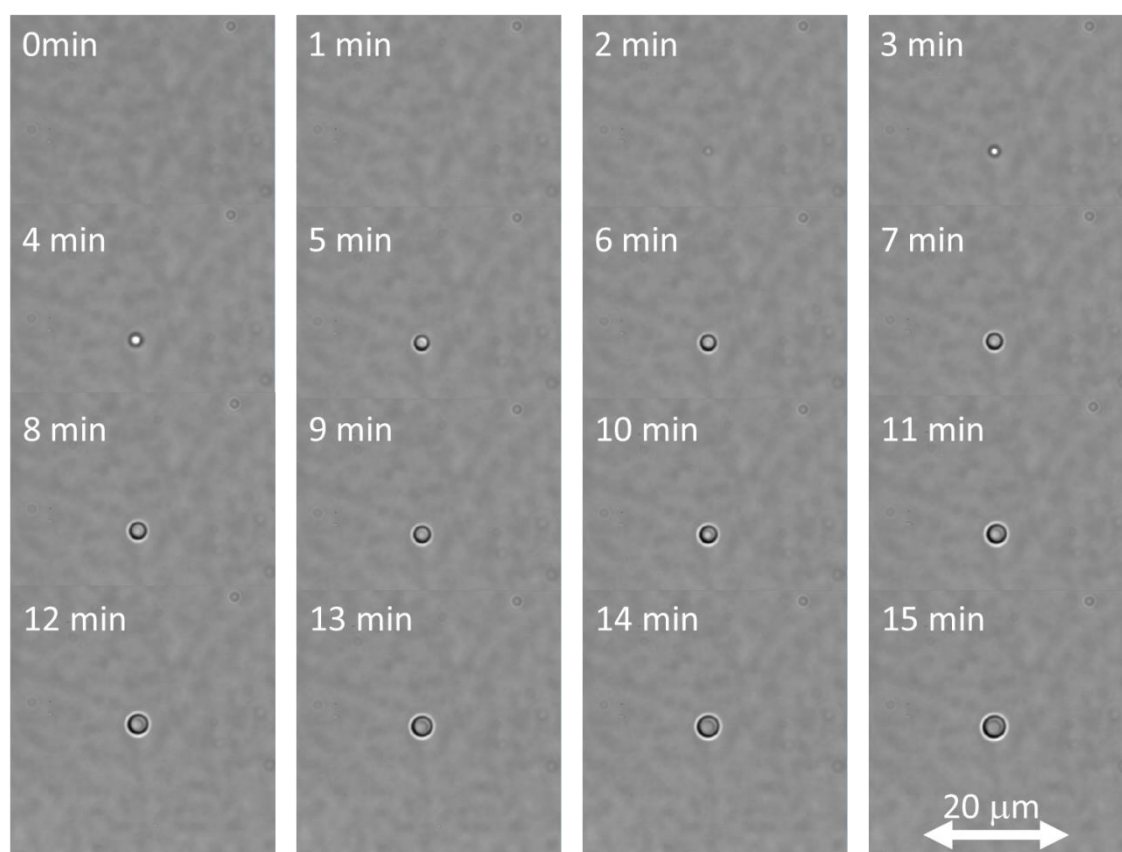


Fig. 4.11 PNIPAM 重水溶液(Mw 25000 g/mol, 3.5 wt%)に近赤外光を集光照射したときの透過像(140 mW)

近赤外光の照射からおよそ 3 分で焦点近傍に粒子核の生成が確認された。その後、粒子核は 15 分で約 $2.5 \mu\text{m}$ の直径をもつ単一微粒子が徐々に形成されていく様子が確認された。局所的な加熱は無視することが出来るので、光圧のみの効果で PNIPAM の相転移が誘起され、球状に凝集しているものと考えられる。

次に、形成される PNIPAM 微粒子の粒径の光強度依存性について測定を行った。照射強度と微粒子サイズの間を Fig. 4.12 に示す。

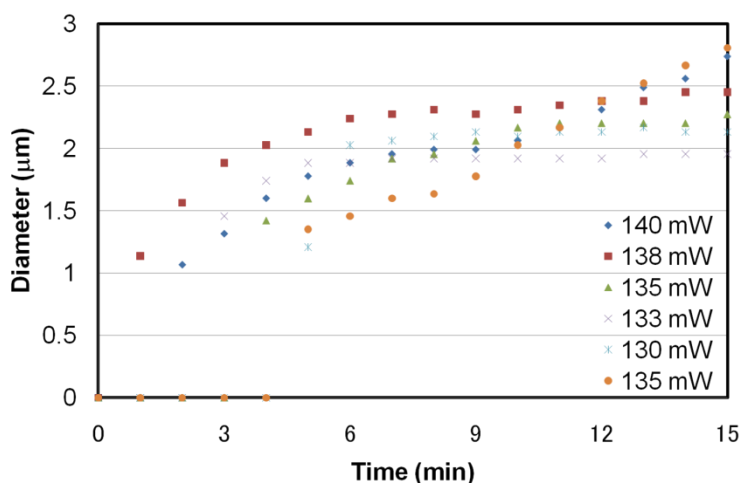


Fig. 4.12 トラップされる粒径の近赤外光強度依存性 PNIPAM 重水溶液
(Mw 25000 g/mol, 3.5 wt%)

近赤外光の強度を上げることで、粒子核形成までの時間は短縮されるが、粒径の急激な上昇は観測されず、いずれの強度においても粒子サイズはおよそ 2.5 μm 程度で一定の値となった。このことから、光圧は焦点近傍で急激に強くなり、PNIPAM を相転移させ微粒子を形成していると考えられる。またこの粒径は回折限界まで絞り込んだ近赤外光のビーム径よりもやや大きいことから、観測領域外の広域より PNIPAM 鎖を引き寄せ、焦点近傍にて相転移が誘起していると考えられる。

次に、PNIPAM 水溶液(Mw 25000 g/mol, 3.5 wt%) に近赤外光を集光照射したときの応答を Fig. 4.13 に示す。対物レンズは 100 倍 (UPlan SAPO, 100x oil, NA: 1.4, Olympus), 試料面での近赤外光の強度は 120 mW とした。

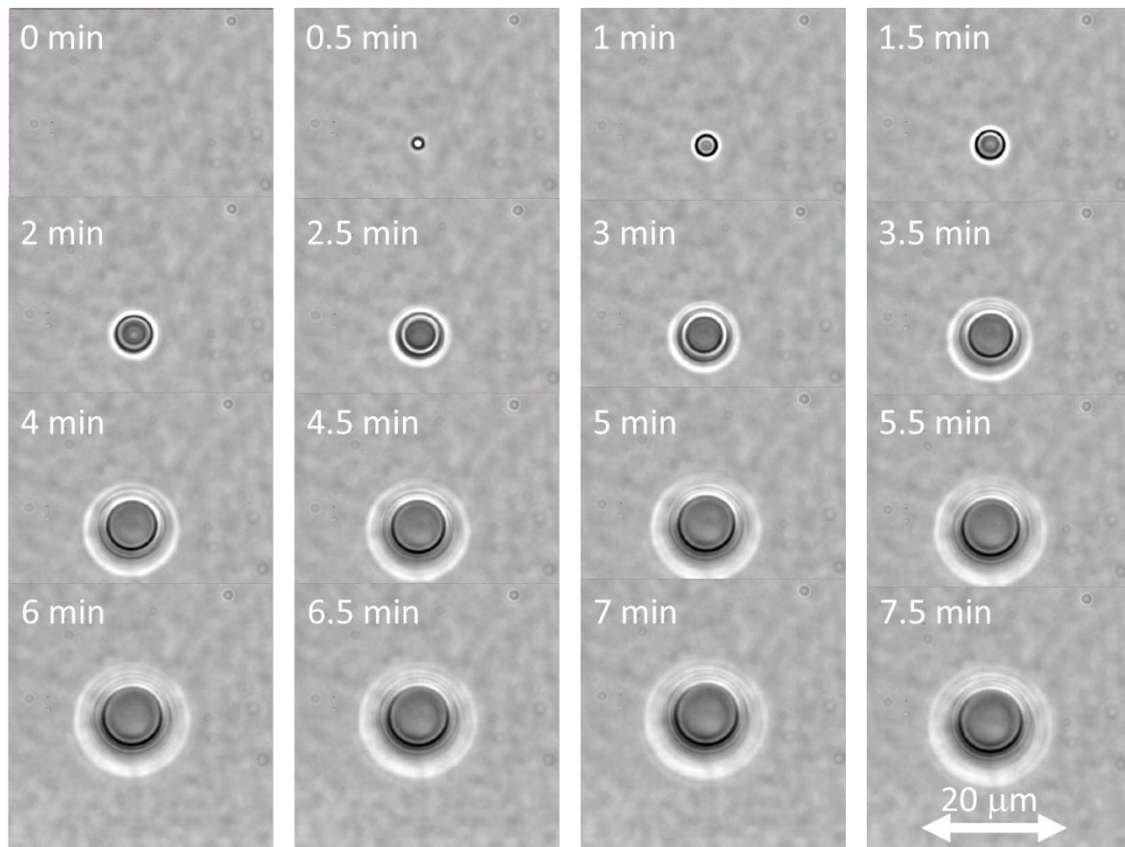


Fig. 4.13 PNIPAM 水溶液(Mw 25000 g/mol, 3.5 wt%) に近赤外光を集光照射したときの透過像 (120 mW)

近赤外光の照射からおおよそ 30 秒で焦点近傍に粒子核の生成が確認された。その後、徐々に粒子核は大きくなっていき、おおよそ 7 分で 10 μm の直径をもつ単一微粒子が形成されていく様子が確認された。この単一微粒子は光熱変換効果と光圧により相転移した PNIPAM が球状に凝集し焦点にトラップされていると考えられる。

焦点にトラップされた微粒子は近赤外光の照射を停止すると、数秒かけて徐々に溶解していく様子が観測された。光圧の効果は照射の停止とともにな

くなる。また発生した熱の影響については、三次元の熱拡散方程式を用いて表すことができる。^[24]

$$L = \sqrt{6Dt} \quad (4.8)$$

ここで、 L は熱拡散長、 D は熱拡散係数、 t は拡散時間を示す。20 μm の距離を熱が拡散するときの拡散時間を考えると、水の熱拡散係数($D=0.146 \text{ mm}^2/\text{s}$)を用いると、およそ50 μs 以内には観測領域の温度は一定になることから、相転移したPNIPAMは凝集した状態で数秒間、液中に存在していることが分かった。ヘテロダイン過渡格子法を用いた測定では熱の緩和とともに濁度の緩和が観測されていることから、相転移したPNIPAMは光圧の効果で、より密にパッキングされているのではないかと考えられる。

次に近赤外光による加熱効果を見積もるために照射強度を変化させたときの、観測される粒径の形状変化を Fig. 4.14 に示す。

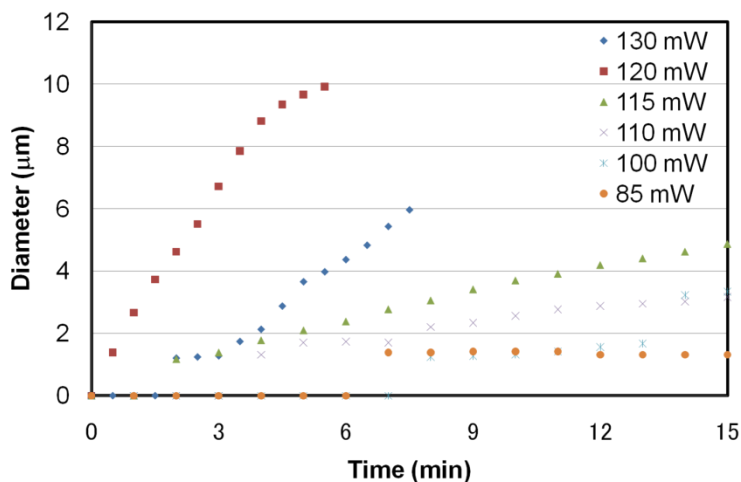


Fig. 4.14 光圧により形成されるPNIPAM微粒子の近赤外光強度以前性 (PNIPAM水溶液(Mw 25000 g/mol, 3.5 wt%))

近赤外光の強度が弱いとき(~100 mW), 照射から 6 分後に粒子各が形成し、その後、一定のサイズのまま変化しなかった。また近赤外光を強くすることで、粒子核形成までの時間が短縮され、粒径も大きくなった。130 mW 以上の強度で照射することで、粒径の増加傾向の強度依存性が変化したことから、均一な粒子の形成には、相転移温度以上まで加熱される領域、つまり相転移した PNIPAM の分子数と光圧により焦点方向へと集める力、これらのバランスが重要であると考えられる。光圧の影響を受けて高分子の濃度が上昇するとともに、光熱変換効果により集光位置付近の液温が上昇することで、熱応答性高分子は相転移する(Fig. 4.15)。凝集した高分子の屈折率は媒体の屈折率に比べて十分高いので、凝集した高分子にはより大きな光圧が働き、レーザー光に集光位置に集められる。これによりレーザー光の焦点に凝集したポリマーのブラウン運動が抑えられ、単一微粒子が形成する。以上のように、熱応答性高分子水溶液における相転移粒子形成には、光圧に加え光熱変換による局所的な加熱効果が大きく関係しているものと考えられる。

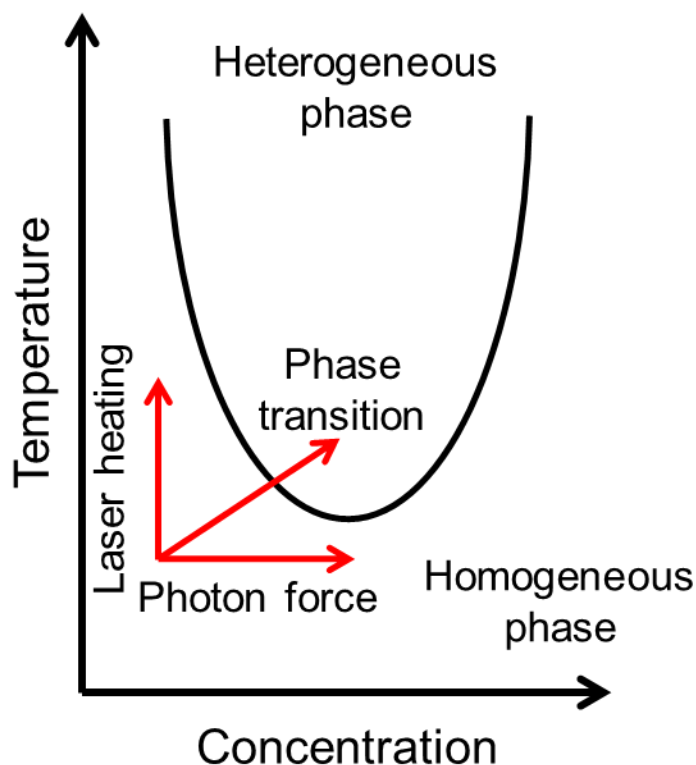


Fig.4.15 光圧と近赤外加熱を用いた相転移誘起

4.4.3 Observation of phase relaxation process by transmittance image and fluorescence spectrum

重水と水溶媒を用いた PNIPAM の光圧相転移実験より、水溶媒が近赤外光を吸収した結果、光熱変換効果による熱の生成が PNIPAM 相転移微粒子の形成に重要であることが分かった。次に極性蛍光プローブ付の PNIPAM 水溶液を用いて、相転移における微粒子形成と蛍光変化についての測定を行った。

対物レンズは 60 倍(UPlan FLN 60, NA: 0.9, Olympus), 試料面での近赤外光の強度は 300 mW とした。実験におけるハンドリング向上のため、油浸の 100 倍対物レンズから 60 倍の対物レンズに交換した。VDP-co-NIPAM 水溶液の粒子形成は PNIPAM 水溶液同様、均一な粒子が形成された。蛍光測定に関しては、

He-Cd レーザーを相転移誘起とともに長時間照射することで、試料の劣化、蛍光のブリーチングが観測されたため、近赤外光の照射を止めた後の相緩和過程のみ測定を行った。VDP-co-NIPAM 水溶液(Mw 25000 g/mol, 3.5 wt%)に近赤外光を集光照射し、微粒子形成させたのち、近赤外光の照射を止めたときの応答を Fig. 4.16 に示す。

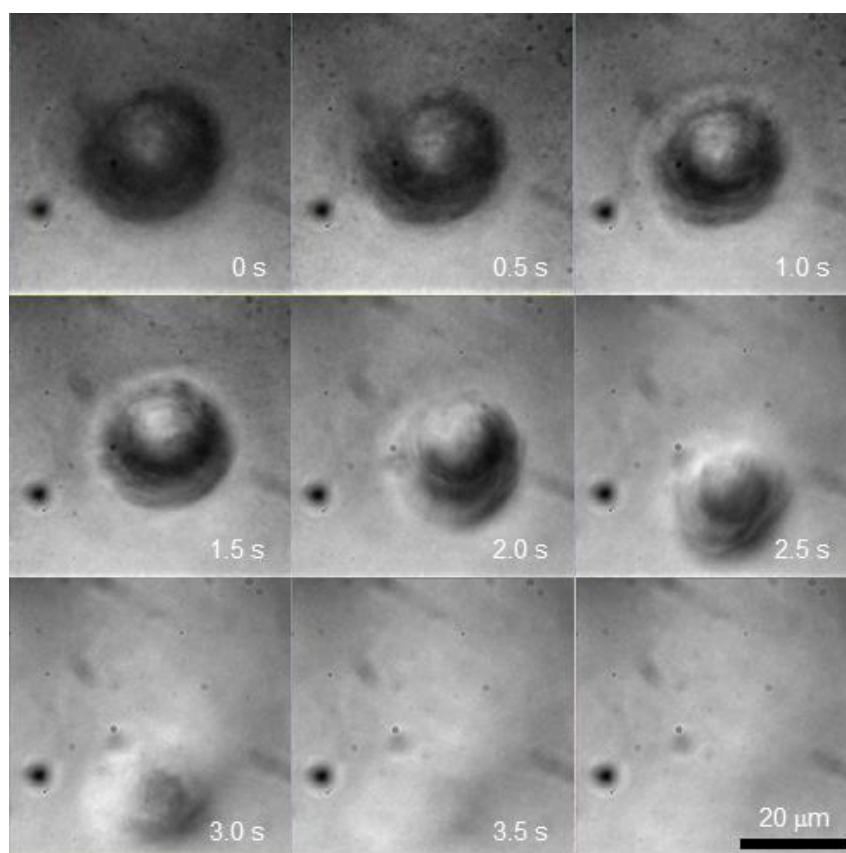


Fig. 4.16 VDP-co-NIPAM 水溶液(Mw 30000 g/mol, 3.5 wt%) に近赤外光を集光照射し微粒子形成させたのち、照射を止めたときの透過像

近赤外光の照射を止めて 4 秒ほどで、トラップ粒子は溶解していく、相緩和過程が顕微画像から観測された。熱拡散は PNIPAM 水溶液の条件と同様に、式 4.8

より、1 ミリ秒以内に起こっていると考えられる。次に、同測定条件において、落射照明を切り He-Cd レーザーを照射し蛍光励起したときの蛍光スペクトルの時間変化を Fig. 4.17 に示す。

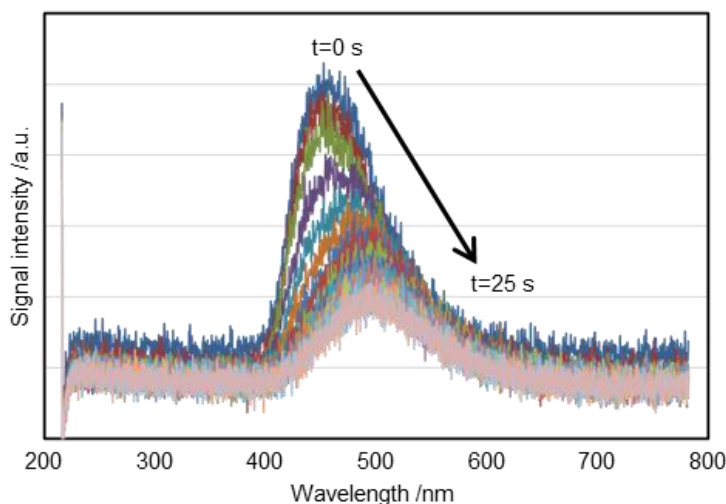


Fig. 4.17 VDP-co-NIPAM 水溶液(Mw 30000 g/mol, 3.5 wt%) の相緩和時の
蛍光スペクトルの時間変化

縦軸は蛍光強度、横軸は蛍光波長をそれぞれ表す。近赤外光を照射している($t=0$ s) 蛍光スペクトルでは、蛍光ピーク波長は $\lambda=456$ nm で、蛍光強度も強い。これは相転移微粒子が形成されることで、VDP ユニットが PNIPAM 鎖内に取り込まれ、無極性側へとシフトしているためと考えられる。また凝集することで単位体積当たりの VDP ユニット数が増加し、蛍光強度が増加したと考えられる。また、経過時間とともに、蛍光ピーク波長はレッドシフトし、蛍光強度も減少していく様子が観測された。これは相緩和がおこることにより凝集がほどけ、VDP ユニットが極性環境へと暴露されていくためだと考えられる。蛍光ピーク波長の時間変化を Fig. 4.18 に示す。

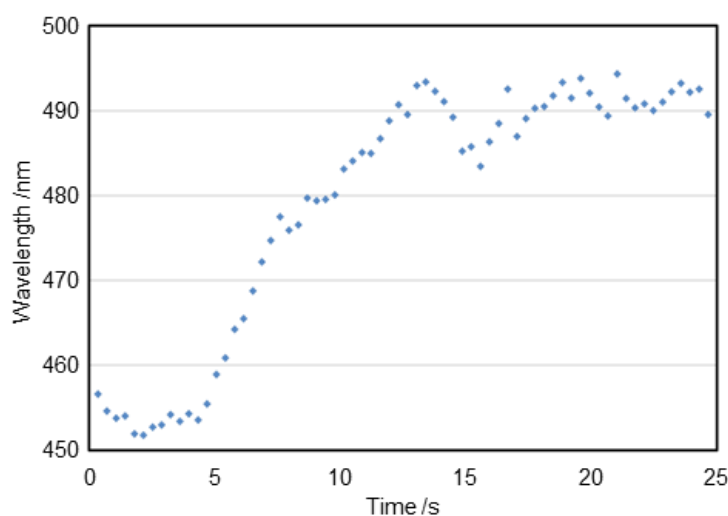


Fig. 4.18 VDP-co-NIPAM 水溶液(Mw 30000 g/mol, 3.5 wt%) の相緩和時の
蛍光ピーク波長の時間変化

縦軸は蛍光ピーク波長、横軸は近赤外光の照射を止めたとき($t=0$ s)からの経過時間を表す。蛍光ピーク波長は照射を止めた後、456 nm のピーク波長を保ち、その後、徐々にレッドシフトし、502 nm に緩和していく様子が観測された。緩和過程の透過像との比較から、456 nm のピーク波長を数秒間保つのは微粒子の溶解過程に関与していると考えられる。つまり、相転移微粒子から 456 nm のピーク波長をもつ蛍光が観測されている。一方、透過像では相転移微粒子が溶解した後に、蛍光ピーク波長では徐々にレッドシフトが起きていることが分かる。すでに述べたように、観測領域からの熱の拡散、近赤外光の照射を止めて数十マイクロ秒で起こる。つまり、系は相転移温度以下であり、光圧の影響がない条件で、凝集体が緩和した後、VDP ユニットは徐々にもとの水和構造へと緩和していく様子が観測された。この結果はヘテロダイン過渡格子法で得られた濁度が緩和した後に globule 状態の分子が数秒程度存在していることを支持する結果だと考えられる。

4.5 Summary

光圧による PNIPAM 水溶液の相転移・レーザートラップによる微粒子形成を行った。重水中での PNIPAM の相転移は光圧のもっとも大きい焦点近傍でのみ観測された。光圧により高分子密度が上昇することで水和構造よりも高分子鎖の分子内・分子間相互作用が優位になるためと考えられる。また水溶媒においては、近赤外光の吸収による光熱効果により熱が発生し、光圧とともに相転移を相互的に誘起することを明らかにした。また緩和過程において、微粒子が溶解する様子から、光圧により PNIPAM はより密にパッキングしていることを明らかにした。

また、極性蛍光プローブを共重合させた PNIPAM の蛍光スペクトルと透過像との比較から、微粒子が溶解したのちに、極性環境変化が起きていることを明らかにした。この結果から、微粒子が溶解した後、水和状態へと緩和する以前に、VDP ユニットが高分子鎖の内側に取り込まれている状態が存在していると考えられる。ヘテロダイン過渡格子法の結果と比較すると、透過像は凝集体が緩和していく過程と、蛍光スペクトルは個々の分子が構造緩和していく過程と関係付けられ、緩和過程における透過像と蛍光スペクトルの時間変化から、ヘテロダイン過渡格子法で観測された globule 分子の緩和過程の存在を支持し、また、globule 分子の極性環境についての情報を得ることが出来た。

Reference

- [1] K. Iwai, N. Matsumoto, M. Niki and M. Yamamoto, "Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals" *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1998**, 315, 53.
- [2] K. Iwai, K. Hanasaki and M. Yamamoto, "Fluorescence label studies of thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels" *J. Lumin.*, **2000**, 87, 1289.
- [3] P. N. Lebedev, "EXPERIMENTAL EXAMINATION OF LIGHT PRESSURE" *Ann. Phys. (Berlin)*, **1901**, 6, 433.
- [4] A. Ashkin, "Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure" *Phys Rev. Lett.*, **1970**, 24, 156.
- [5] A. Ashkin, "Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime" *Biophys. J.*, **1992**, 61, 569.
- [6] A. Ashkin, "History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules" *IEEE J. Sel. Top. Quant.*, **2000**, 6, 841.
- [7] K. Sasaki, M. Koshioka, H. Misawa, N. Kitamura and H. Masuhara, "Laser-Scanning Micromanipulation and Spatial Patterning of Fine Particles" *Jpn. J. Appl. Phys.*, **1991**, 30, L907.
- [8] H. Felgner, O. Muller and M. Schliwa, "Calibration of light forces in optical tweezers" *Appl. Opt.*, **1995**, 34, 977.
- [9] H. Misawa and S. Juodkazis, "Photophysics and photochemistry of a laser manipulated microparticle" *Prog. Polym. Sci.*, **1999**, 24, 665.
- [10] K. Svoboda and S. M. Block., "Biological Applications of Optical Forces" *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1994**, 23, 247.
- [11] M. P. Sheets, "*Methods in Cell Biology, vol. 55, Laser Tweezers in Cell Biology*", ACADEMIC PRESS, **1998**.
- [12] H. Masuhara, F. C. De Schryver, N. Kitamura and N. Tamai, "*Microchemistry: Spectroscopy and Chemistry in Small Domains*", Elsevier, Amsterdam, **1994**.
- [13] M. Born and E. Wolf, "*Principles of Optics, Pergamon Press*", Oxford, **1980**.
- [14] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm and S. Chu., "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles" *Opt. Lett.*, **1986**, 11, 288.
- [15] T. Sugiyama, T. Adachi and H. Masuhara, "Crystal Growth of Glycine Controlled by a Focused CW Near-infrared Laser Beam" *Chem. Lett.*, **2009**, 38, 482.
- [16] T. Rungsimanon, K. Yuyama, T. Sugiyama, H. Masuhara, N. Tohnai and M. Miyata, "Control of Crystal Polymorph of Glycine by Photon Pressure of a Focused Continuous Wave Near-Infrared Laser Beam" *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 599.
- [17] K. Yuyama, T. Sugiyama and H. Masuhara, "Millimeter-Scale Dense Liquid Droplet Formation and Crystallization in Glycine Solution Induced by Photon Pressure" *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 1321.
- [18] J. Hofkens, J. Hotta, K. Sasaki, H. Masuhara, and K. Iwai, "Molecular Assembling by the Radiation Pressure of a Focused Laser Beam: Poly(N-isopropylacrylamide) in Aqueous Solution" *Langmuir*, **1997**, 13, 414.
- [19] M. Ishikawa, H. Misawa, N. Kitamura, R. Fujisawa and H. Masuhara, "Infrared Laser-Induced Photo-Thermal Phase Transition of an Aqueous Poly(N-isopropylacrylamide) Solution in the Micrometer Dimension" *Bull. Chem. Soc.*

- Jpn.*, **1996**, 69, 59.
- [20] J. Hofkens, J. Hotta, K. Sasaki and H. Masuhara, "Molecular Association by the Radiation Pressure of a Focused Laser Beam: Fluorescence Characterization of Pyrene-Labeled PNIPAM" *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 2741.
- [21] Y. Matsumura and K. Iwai, "Synthesis and thermo-responsive behavior of fluorescent labeled microgel particles based on poly(N-isopropylacrylamide) and its related polymers" *Polymer*, **2005**, 46, 10027.
- [22] S. Ito, T. Sugiyama, N. Toitani, G. Katayama and H. Miyasaka, "Application of Fluorescence Correlation Spectroscopy to the Measurement of Local Temperature in Solutions under Optical Trapping Condition" *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 2365.
- [23] A. Onkelinx, F. C. De Schryver, L. Viaene, M. V. Auweraer, K. Iwai, M. Yamamoto, M. Ichikawa, H. Masuhara, M. Maus and W. Retting, "Radiative Depopulation of the Excited Intramolecular Charge-Transfer State of 9-(4-(N,N-Dimethylamino)phenyl)phenanthrene" *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 2892.
- [24] E. L. Cussler, "*Diffusion Mass Transfer in Fluid System*", 3rd ed. Cambridge Univ., **2009**.

Chapter 5

Application of local extraction and condensation under a microscope

5.1 Introduction

前章までに、熱応答性高分子について、またヘテロダイン過渡格子法を用いた相転移ダイナミクス測定について、また顕微蛍光スペクトルを用いた相緩和ダイナミクス測定について紹介してきた。続く第五章では、熱応答性高分子の相転移機構を利用した新しい応用についての研究を紹介する。

熱応答性高分子は外部からの熱刺激に応答して、その溶解性を変化させる。^[1] このとき、溶液内では、透明・白濁という見た目の変化だけでなく、親水・疎水性や極性といった物性が大きく変化し、また熱に応じて可逆的に作用する。^[2,3] この熱応答性高分子の相転移による物性変化を利用した応用は、Heskins 等が熱応答性高分子を報告して以来、広く研究がなされている。その一例として、懸濁水溶液中に熱応答性高分子を添加し、低温で粒子と水和吸着、高温で吸着した粒子ごと沈殿・凝集させる懸濁溶液中のスラリー回収・水質浄化の研究に着目した。^[4,5] 熱応答性高分子は懸濁粒子の回収のみならず、凝集とともに水溶液中に可溶化している疎水性物質を取り込む特徴を有し、溶液中の物質を抽出する均一固相抽出法と呼ばれる研究も行われている。^[6-13] この方法は試料溶液中に熱応答性高分子を入れ、加熱することで溶解している試料を高分子に取り込ませ、凝集・沈殿・回収し、有機溶媒に再溶解させ試料の濃縮を

行い、既存の分析装置を用いて検出する。本研究は熱応答性高分子の相転移による試料の取り込みに注目し、さらに均一固相抽出法のように沈殿・回収・再溶解過程を行わない試料の **In-situ** 濃縮・検出を用いた新しい熱応答性高分子の応用について研究を行った。方法としては、マイクロ空間中で熱応答性高分子の相転移を誘起し、白濁化による検出の困難さを排除し、高分子水溶液に溶解させた様々な色素を局所相転移領域内に捕集させることで、その濃縮度を確認した。熱応答性高分子として **poly(N-isopropylacrylamide)** (PNIPAM) と **poly(Vinylmethylether)** (PVME) を用いて、色素の局所相転移領域内への捕集機構についても考察を行った。^[14,15]

5.2 Experimental section

5.2.1 Local laser heating under the microscope

Fig. 5.1 に金属細線付セルを用いた局所加熱システムに用いた光学系の概略図を示す。[16, 17]

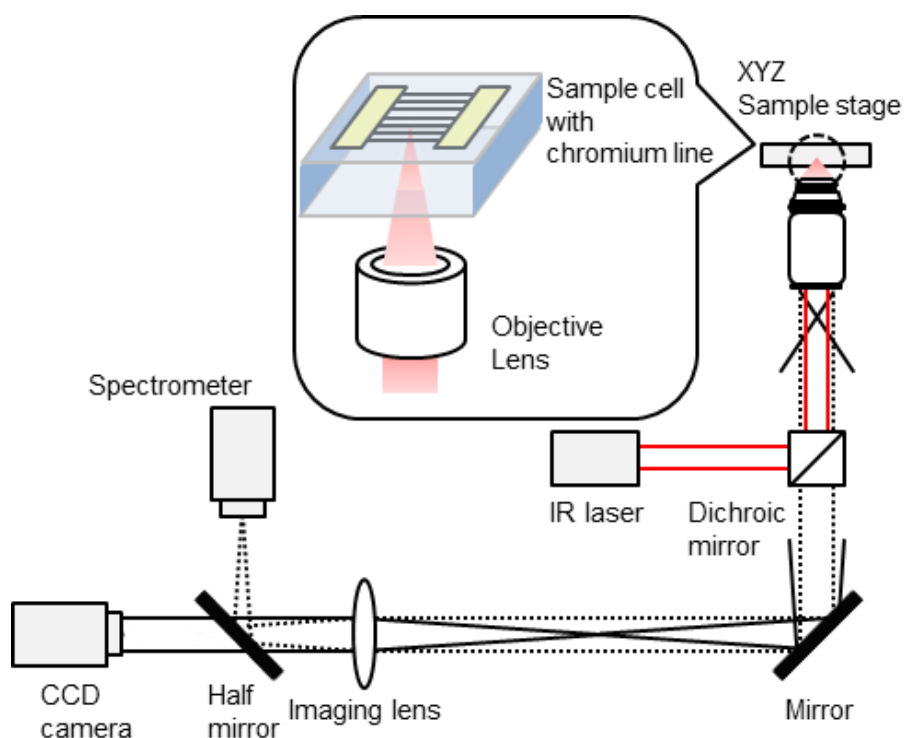


Fig. 5.1 金属細線付セルを用いた局所加熱システム装置図

試料セルは金属細線が蒸着した顕微鏡のキャリブレーション用マイクロメーター (NT58-606, Edmund Optics) とカバーガラスの間に薄く延ばしたパラフィルムを厚み $40\ \mu\text{m}$ のスペーサーとして挟み込み、熱で融着させて作成した。金属細線(クロム製)の太さは $2\ \mu\text{m}$ のものを用いた。波長 $975\ \text{nm}$ の近赤外光(PL980P330J, Thorlabs) を対物レンズ(E Plan 100, oil, NA: 1.2, Nikon) に平行に照射し、試料面金属細線上に集光照射した。試料面での近赤外光強度はおよそ $8.5\ \text{mW}$ であり、

焦点でのサイズはおよそ $3 \mu\text{m}$ と見積もられる。透過像はダイクロイックミラー (DMSP805, Thorlabs) を透過し、ハーフミラーを用いて、CCD カメラ (DCU223M, Thorlabs) と分光器 (USB4000, Ocean Optics) を用いて観測した。吸収スペクトルを測定するポジションは光ファイバーにより分光器と同軸上に導入された位置合わせ用レーザーを用いて、金属細線に被らない観測領域のほぼ中心になるように調整された。

5.2.2 Sample preparation

熱応答性高分子として PNIPAM (Mw: 40000, Polyscience, Mw: 157000, Polymer Source) と、PVME (Mw: 30000, Polyscience) を用いた。各熱応答性高分子の構造式を Fig. 5.2 に示す。

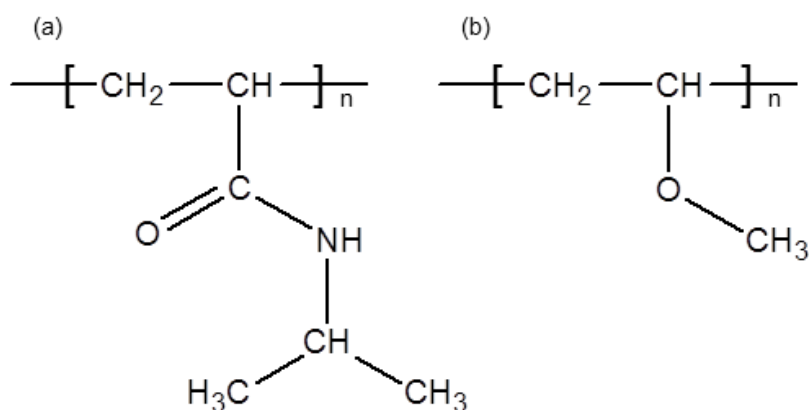


Fig. 5.2 (a)PNIPAM (b)PVME の構造式

これら熱応答性高分子は純粋に 10.0 wt% で溶解させた後、24 時間静置した。その後、実験に応じて純水で薄めて使用した。熱応答性高分子水溶液に添加する物質として、malachite green (MG), crystal violet (CV), sunset yellow (SY), new

coccine (NC) を和光ケミカルより、rhodamine B (RhB), rhodamine 6G (Rh6G) を Sigma-Aldrich より erythrosine (Er), rose bengal (RB) を東京化成工業より、eosine Y (EY) を純正化学より購入した。用いたこれらの物質の分子構造を Fig. 5.3 に示す。これらの物質は純粋に 1.0 mM の濃度で調整し、その後実験に応じて、0.5, 0.1 mM に薄めて使用した。

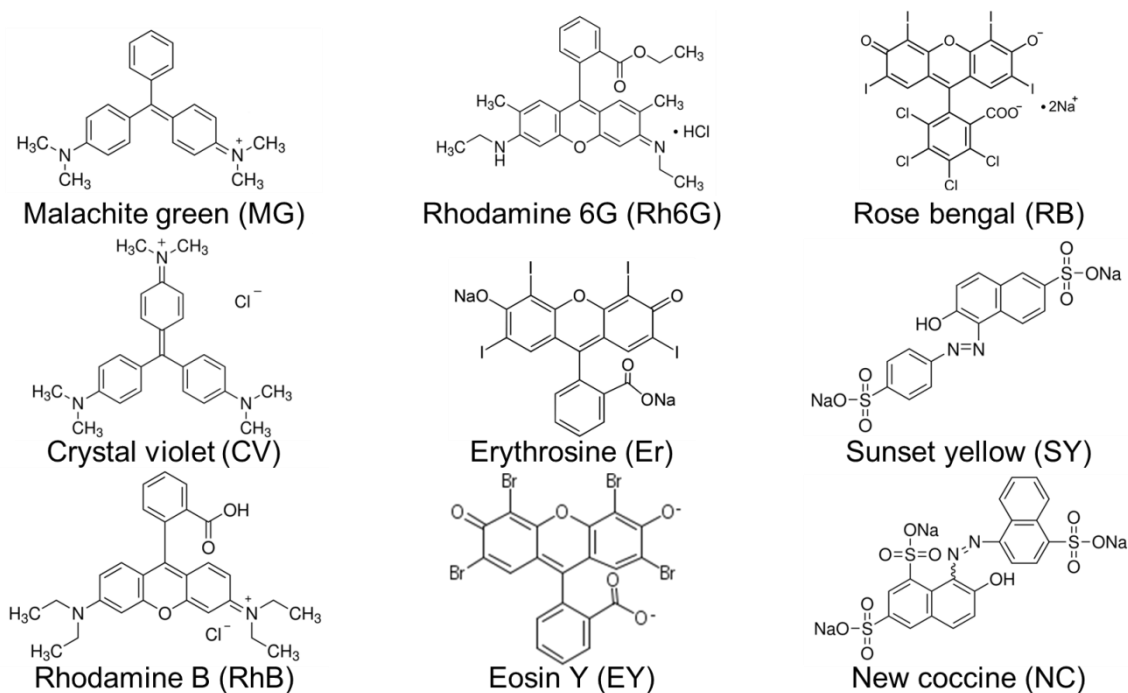


Fig. 5.3 各色素の構造式

5.3 Results and discussion

5.3.1 Local laser heating & phase transition

Fig. 5.4(a) に PNIPAM 水溶液(分子量 40000, 濃度 10.0 wt%) を金属細線付試料セルに入れ、顕微鏡下で近赤外光を照射したときの透過像を CCD カメラを用いた撮影した動画のコマ送り画像を示す。

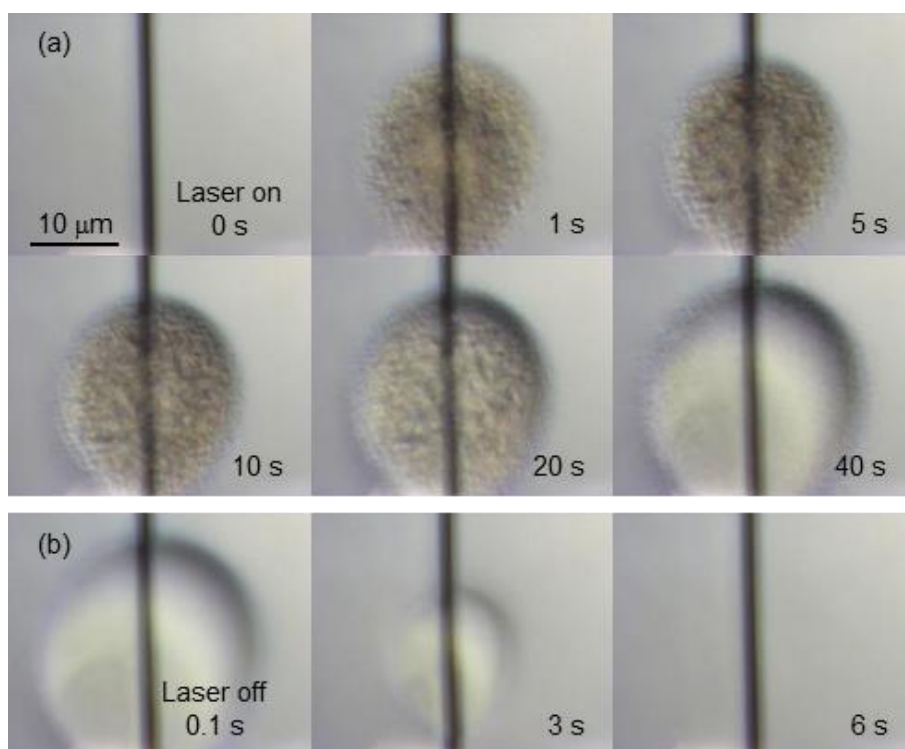


Fig. 5.4 PNIPAM 水溶液(Mw 25000 g/mol, 10.0 wt%) に近赤外光を集光照射したときの透過像 (a)近赤外光 on, (b) off

金属細線はコマ送り画像上の黒い細線として撮影される。近赤外光が照射される以前の画像から、室温で溶液は均一な状態を保つことが分かる。近赤外光を金属細線上に照射することにより、金属細線が近赤外光を吸収し、光熱効果により、熱が発生、面内に等方的な熱拡散により円形に温度上昇する。試料が相

転移温度以上に加熱されることで相転移が誘起される。照射を続けると、焦点を中心とした円形の相転移領域の生成が確認できる。経時変化を詳しく見ていると、照射開始からおおよそ 1 秒以内で、相転移により相が不均一になる様子が確認できる。その後、PNIPAM 同士の疎水性相互作用による凝集が起これ、内部に含まれていた水が追い出されるため、均一な相が形成されていく様子が確認できる。照射を続けるとおおよそ 40 秒で完全に脱水が終わり、円形の均一な PNIPAM 相が生成しているのが分かる。Fig. 5.4(b) より近赤外光の照射を止めると、相転移温度以下まで冷やされ、PNIPAM 相は速やかに均一相へと溶解していく様子が確認できる。これらの結果から、金属細線と近赤外光を用いることで局所的に均一な PNIPAM 相の生成に成功した。

また濃度を変化させた PNIPAM 水溶液(分子量 40000, 濃度 5.0 wt%) を用いて同様の相転移領域の生成実験を行ったところ、均一な PNIPAM 相の形成にかかる時間は 10.0 wt% の条件で 2 倍程度早かった。これは濃度を薄くすることで、脱水する水の量が多くなり、均一な高分子相の形成に時間がかかったためと考えられる。また、高分子量の PNIPAM 水溶液(分子量 157000, 濃度 10.0 wt%) で同様の測定を行ったところ、低分子量条件の方が PNIPAM 相の形成が早いことが分かった。これは高分子量溶液では溶液粘度が高く (Mark-Houwink-Sakurada equation)、また分子サイズも大きい為、高分子の移動にかかる拡散時間が長くなったためと考えられる (Einstein-Stokes equation).^[18,19]

5.3.2 Local extraction & condensation

次に PNIPAM 水溶液に水溶性色素を添加して同様の実験を行った。一例として、PNIPAM 水溶液(分子量 40000, 濃度 10.0 wt%) に CV 水溶液(0.1 mM) を添加したときの顕微鏡下で近赤外光を照射したときの透過像を CCD カメラを用

いた撮影した動画のコマ送り画像を Fig. 5.5 に示す。また、位置合わせガイドレーザーを用いて相転移領域のほぼ中心(緑の☆印)からの光を測定した顕微吸収スペクトルの時間応答を Fig. 5.6 に示す。

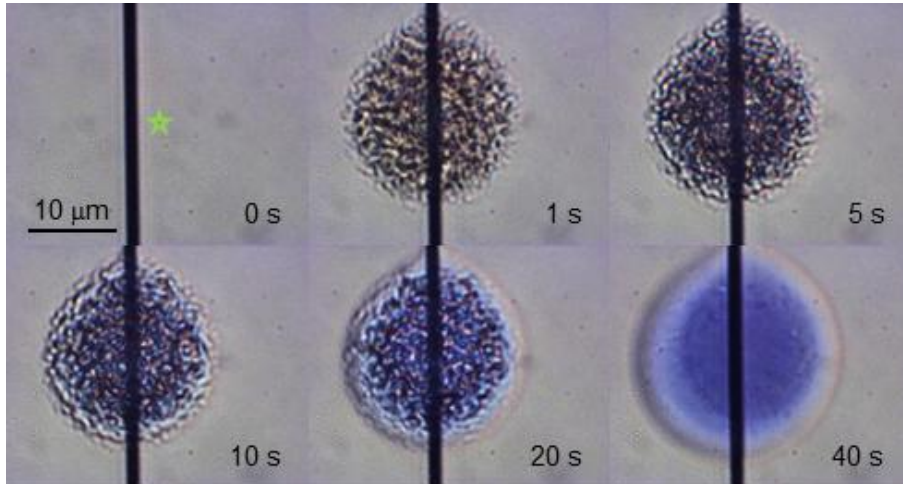


Fig. 5.5 CV を添加した PNIPAM 水溶液(Mw 25000 g/mol, 10.0 wt%, CV: 0.1 mM) に近赤外光を集光照射したときの透過像

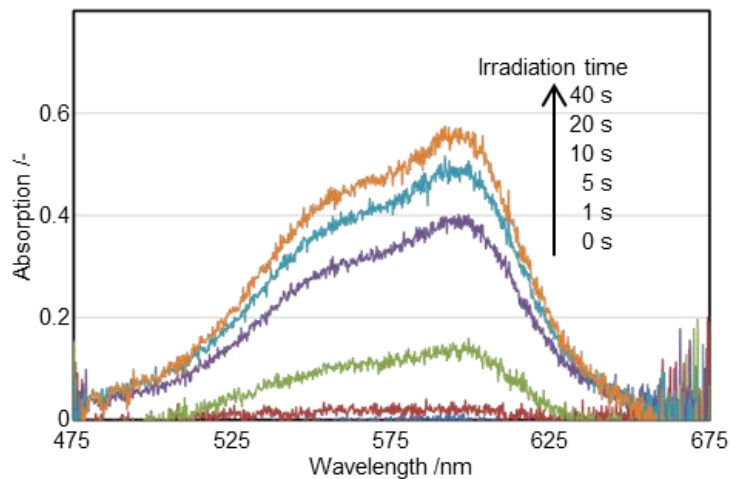


Fig. 5.6 CV を添加した PNIPAM 水溶液(Mw 25000 g/mol, 10.0 wt%, CV: 0.1 mM) に近赤外光を集光照射したときの吸収スペクトルの時間応答

近赤外光の照射とともに、相転移が誘起され、脱水が進行していくとともに、相転移領域が色ついていく様子が観測された。また吸収スペクトルも同様に、相転移が誘起されるとともに吸収が増大し、均一相が形成される 30-40 秒にかけて変化する応答を得た。ここで、参照応答として、バルクで測定した CV 水溶液の吸収スペクトルを Fig. 5.7 に示す。分光光度計として UV/VIS spectrophotometer(V-530, JASCO) を用いた。ブランクの測定には純水を用いた。

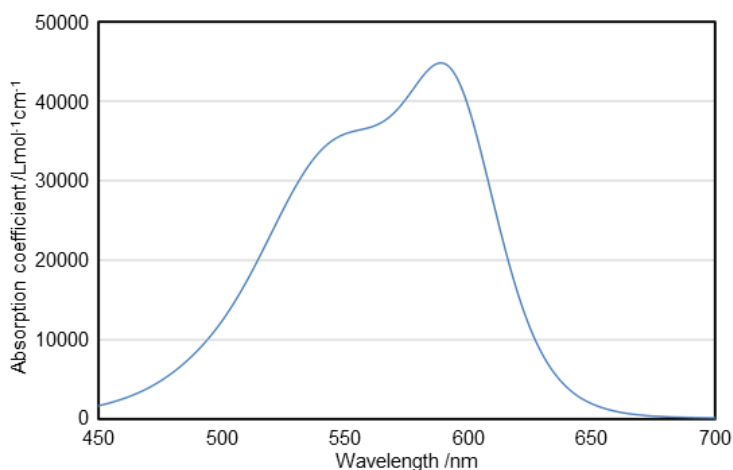


Fig. 5.7 バルクでの CV 水溶液の吸収スペクトル

得られた顕微吸収スペクトルと、バルクでの CV 水溶液の吸収スペクトルを比較すると、相転移により得られた吸収スペクトルは 5 nm 程度のレッドシフトが見られるが、CV 水溶液の吸収スペクトルとおよそ一致した。このことから、相転移領域に抽出・濃縮されているのは添加した CV であることが分かった。吸収ピークのレッドシフトは PNIPAM 相の極性変化による溶媒効果であると考えられる。このとき吸光度の変化から、CV はおよそ 25 倍濃縮され、PNIPAM 相中で 2.5 mM 程度になった。

同様の測定を CV 水溶液の濃度を 0.5 mM で行った。すると、相転移領域で CV はおよそ 5 倍濃縮され相転移領域中で 2.5 mM 程度になった。また濃度や分子量を変化させた PNIPAM 水溶液中においても、CV は相転移領域中で 2.5 mM 程度になった。これらのことから、相転移領域に捕集できる溶解量に一定の値があるのではないかと考えられる。

他の色素についても、同様の実験を行い、吸収スペクトル変化から、濃縮度を算出した。9 種類の色素を測定したところ、PNIPAM 相に捕集される色素と捕集されない色素が存在することが分かった。熱応答性高分子は相転移時の水相-高分子相に分かれるため、色素の各層への分配には物質の疎水性度を表す分配係数が関係していると考えられる。用いた各試料について、水/オクタノール分配係数を求めた。^[20]

水/オクタノール溶液は各色素水溶液(0.5 mM) に 1-オクタノールを同量加えて調製し、良く振とうさせたのち 24 時間以上放置し、水相中の各色素について、UV-Vis 分光光度計を用いて吸収スペクトル測定を行った。得られた水相の吸収スペクトルから水相の試料濃度を算出し、初期濃度の差から油層の濃度を算出した。以下の式を用いて各色素の分配係数を求めた。

$$\text{Log}P_{o/w} = \text{Log}C_o / C_w \quad (5.1)$$

Table 5.1 に各色素の分配係数と 0.5 mM の色素濃度を用いたときの、相転移領域中での濃縮度を示す。

Table 5.1 各色素の分配係数と濃縮度

Dye	Partition coefficient Log(Po/w) [-]	Condensation [times]
Malachite green (MG)	1.92	1.9
Crystal violet (CV)	1.34	4.9
Rhodamine B (RhB)	1.36	3.4
Rhodamine 6G (Rh6G)	0.16	6.0
Erythrosine (Er)	-0.25	3.1
Eosin Y (EY)	-0.50	5.5
Rose bengal (RB)	-1.10	-
Sunset yellow (SY)	-1.18	-
New coccine (NC)	-1.74	-

分配係数と濃縮度を比較すると、分配係数が正、つまり疎水性物質は相転移領域内へと捕集されることが分かった。また分配係数が負、つまり親水性物質である RB, SY, NC は捕集されないことが分かった。これらのことは、相転移領域が水相よりも疎水性が高いことと一致した結果だと考えられる。しかし、Er, EY に関しては、分配係数が負、つまり親水性物質であるにも関わらず、相転移領域内へと捕集されることが分かった。これらのことから、PNIPAM 相転移領域内への濃縮はおおむね物質の疎水性度に依存すると考えられる。

相転移領域への物質の抽出機構についてより理解するために、PNIPAM に変わる熱応答性高分子として、PVME を用いて同様の測定を行った。PVME 水溶液(分子量 30000, 濃度 10.0 wt%) に CV 水溶液(0.5 mM) を添加したときの相転移時のコマ送り画像を Fig. 5.8 に示す。

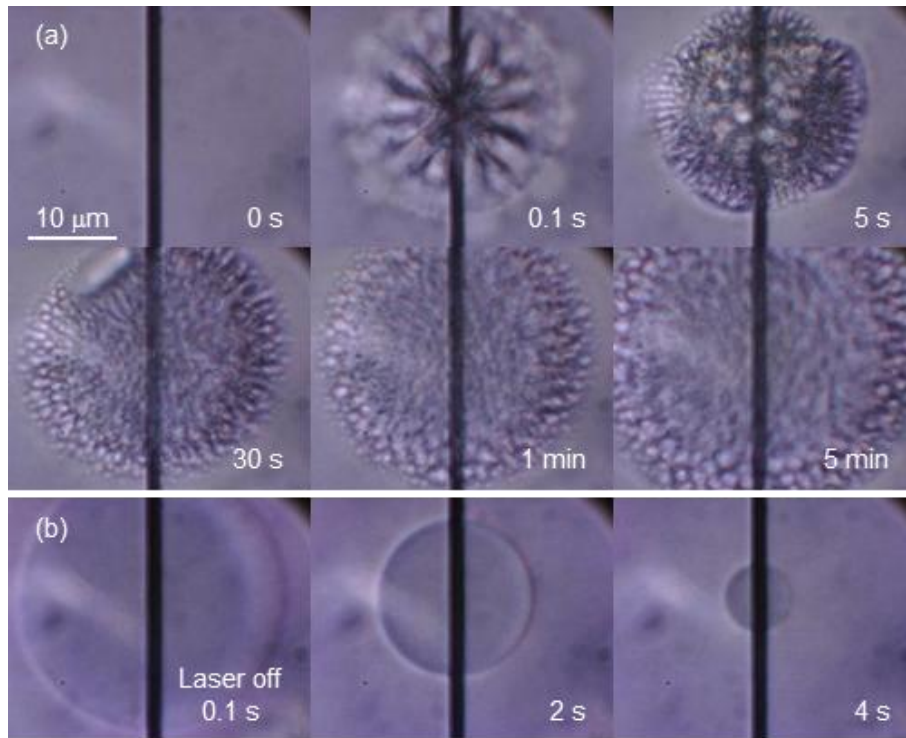


Fig. 5.8 CV を添加した PVME 水溶液(Mw 30000 g/mol, 10.0 wt%, CV: 0.5 mM)に近赤外光を集光照射したときの透過像 (a)近赤外光 on, (b) off

PNIPAM 水溶液の相転移応答と同様に、近赤外光を照射すると相転移領域が生成されているのが分かる。また照射をやめるともとの均一水溶液に緩和していく様子が観測された。しかし、CCD カメラの画像からは PVME の相転移領域内に CV が濃縮されていく様子は観測されなかった。相転移時の顕微吸収スペクトルの時間変化応答を Fig. 5.9 に示す。

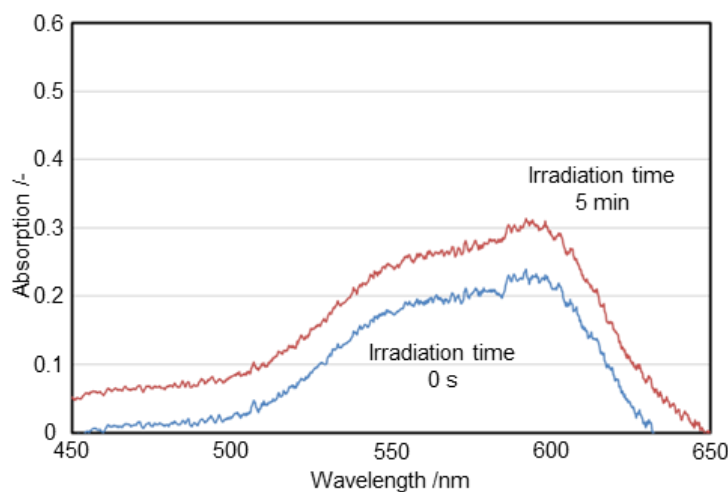


Fig. 5.9 CV を添加した PVME 水溶液(Mw 30000 g/mol, 10.0 wt%, CV: 0.1 mM)に近赤外光を集光照射したときの吸収スペクトル

顕微吸収スペクトルから、相転移の前後で吸収変化が観測された。しかし、相転移時の吸収スペクトルに注目すると、波長 450-500 nm に観測される、CV 水溶液で通常、吸収がない、ベースラインとなる領域の吸収が増加している様子が観測された。このことから、相転移前後のスペクトル変化は濃縮による吸光度の増加ではなく、相転移した PVME による光の透過率の減少であると考えられる。PNIPAM 水溶液においても、用いる分子量を大きくすると、このような相転移による光の透過率の減少が観測されることから、熱応答性高分子由来の光の透過率減少応答であると考えられる。

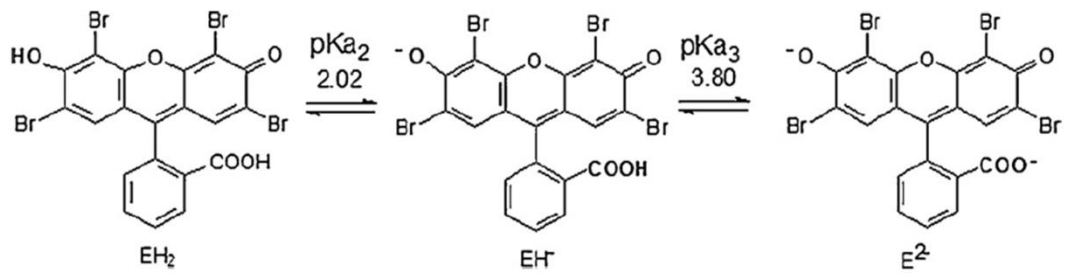
PVME を用いた局所相転移領域中への物質の捕集について、他の試料に対しても測定を行ったところ、どの物質も捕集されることはなかった。PNIPAM 同様に、PVME による相転移領域は水相よりも疎水性が高く、親水性物質が濃縮されやすい環境になっていると考えられるが、物質捕集に差が生じた。このことから、PNIPAM と PVME の構造の違いが、物質の捕集機構に深く関与して

いるのではないかと考えられる。

両者の構造について比較を行うと、熱応答性高分子の基本骨格としての親水基に PNIPAM はアミド基、PVME はエーテル基を有していることが分かる。(Fig. 5.2) また、PNIPAM の相転移領域内に捕集される物質について見ていくと、MG, CV, RhB, Rh6G は官能基としてアミド基と相互作用の起きやすいアルキルアミノ基を有していることが分かる。(Fig. 5.3) また Er, EY も同様に相互作用の起きやすいカルボキシル基を有していることが分かる、これらの PNIPAM の親水基と相互作用の起きやすい官能基を持つ物質が優先的に捕集・濃縮されることが考えられる。

Er, EY, RB は基本骨格としてキサンテン構造を持ち、同様にカルボキシル基を持つが、RB だけ捕集されなかった。これらの色素は官能基としてヒドロキシ基とカルボキシル基を持ち、溶液中の pH によって水素イオンが解離するため、PNIPAM のアミド基との相互作用が変化すると考えた。水溶液中の EY と RB の酸解離の平衡反応式を Fig. 5.10 に示す。^[21] 平衡式から分かるように、EY と RB のヒドロキシ基、カルボキシル基の水素イオンはともに、中性条件で解離していることが分かった。各色素の持つ官能基に差異が見られなかったことから、RB の構造由来の立体障害や Cl 分子の電子状態などが関与しているのではないかと考えられる。

(a)



(b)

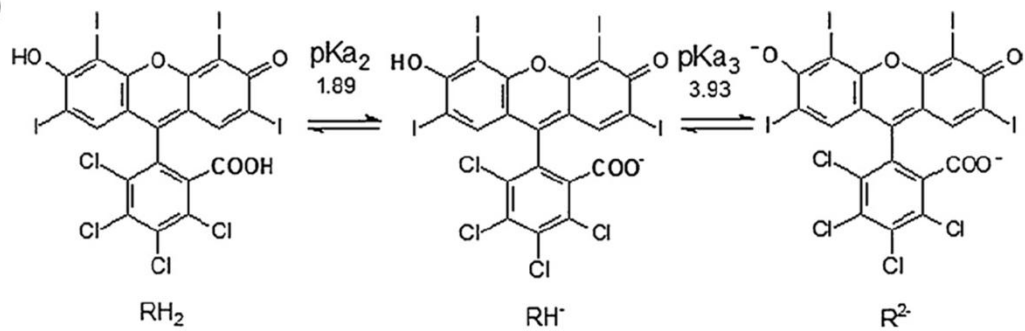


Fig. 5.10 (a) EY と (b) RB の酸解離平衡反応式

(V. R. Batistela et al., *Spectrochimica Acta Part A*, **79**, 889, 2011.)

5.4 Summary

以上のように、金属細線付の試料セルと近赤外光を用いて、顕微鏡下で局所的に熱応答性高分子の相転移領域の生成に成功した。またこの相転移領域を用いて溶存中の物質を *in-situ* に濃縮・検出することに成功した。この相転移領域には疎水性物質や PNIPAM のアミド基と相互作用の起きやすい官能基を持つ分子が捕集・濃縮されることを明らかにした。また、局所空間において物質の濃縮が行えることから、反応・抽出・検出を硝子基板上で集積して行えるマイクロ化学チップにおいて、反応後の試料の濃縮・検出が高感度に行えるのではないかと考えている。また、目的の分子構造と相互作用の起きやすい熱応答性高分子をデザインし、抽出剤に用いることで、特定物質の高感度熱応答性濃縮剤としても応用できるのではないかと考えられる。また局所空間中の相転移領域を用いた物質の捕集を行い、その捕集機構について明らかにした。局所において相転移領域を生成、濃縮場に利用することで、*in-situ* にその様子を検出することが可能となり、この研究を発展させることで、熱応答性高分子の相転移領域を試料の濃縮だけでなく、局所での環境変化を利用した反応場の形成や、反応触媒とともに保持することで、高活性触媒反応などにも使えると期待される。

Reference

- [1] M. Heskins and J. E. Guillet, "Solution Properties of Poly(N-isopropylacrylamide)" *J. Macromol. Sci.: Part A - Chemistry*, **1968**, 2, 1441.
- [2] T. Sun, G. Wang, L. Feng, B. Liu, Y. Ma, L. Jiang and D. Zhu, "Reversible Switching between Superhydrophilicity and Superhydrophobicity" *Angew. Chem.*, **2004**, 116, 361.
- [3] Y. Matsumura, K. Iwai, "Synthesis and thermo-responsive behavior of fluorescent labeled microgel particles based on poly(N-isopropylacrylamide) and its related polymers" *Polymer*, **2005**, 46, 10027.
- [4] G. V. Franks, "Stimulant sensitive flocculation and consolidation for improved solid/liquid separation" *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**, 292, 598.
- [5] K. Fujinaga, Y. Yamoto, Y. Seike and M. Okumura, "An Attempt to Develop the Hybrid Liquid-Solid Extraction Method-Centrifugal Phase Separation using Poly(N-isopropylacrylamide) as an Adsorbent" *Anal. Sci. Suppl.*, **1997**, 13, 141.
- [6] T. Saitoh, Y. Yoshida, T. Matsudo, S. Fujiwara, A. Dobashi, K. Iwaki, Y. Suzuki, C. Matsubara, "Concentration of Hydrophobic Organic Compounds by Polymer-Mediated Extraction" *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 4506.
- [7] T. Saitoh, T. Ohyama, T. Sakurai, T. Kaise, K. Takamura, Y. Suzuki and C. Matsubara, "Polymer-mediated extraction of 8-quinolinolato metal chelates for the determination of metal ions in water with graphite furnace atomic absorption spectrometry" *Talanta*, **1998**, 46, 541.
- [8] T. Saitoh, M. Haga, T. Sakurai, T. Kaise, and C. Matsubara, "Polymer-Mediated Extraction for Microplate Reader Spectrophotometric Determination of ppb-Level Copper(II) Ion in Water" *Anal. Sci.*, **1998**, 14, 929.
- [9] T. Saitoh, S. Ohkubo and C. Matsubara, "Polymer-Mediated Extraction of Porphirinato Chelates for a Spectrophotometric Approach to Sub-ppt Level Detection of Metal Ions" *Chem. Lett.*, **1999**, 28,151.
- [10] C. Matsubara, N. Kikuchi, I. Denpouya and K. Takamura, "A New Preconcentration Method of Hydrophobic Substances in Water Using Polyvinylmethylether as a Thermo-responsive Polymer. Application to Spectrophotometric Determination of a Trace Amount of Phosphate in Natural Water" *Chem. Lett.*, **1993**, 22, 849.
- [11] T. Saitoh, T. Ohyama, K. Takamura, T. Sakurai, T. Kaise and C. Matsubara, "Extraction of Iron(II)-Tris(1, 10-phenanthrolinato) Chelate into the Polymer Phase Formed from an Aqueous Solution of Poly(N-isopropylacrylamide)" *Anal. Sci.*, **1997**, 13, 1.
- [12] T. Saitoh, K. Asano and M. Hiraide, "Removal of phenols in water using chitosan-conjugated thermo-responsive polyme" *J. Hazard. Mater.*, **2011**, 185, 1369.
- [13] C. Matsubara, S. Izumi, K. Takamura, H. Yoshioka and Y. Mori, "Determination of trace amounts of phosphate in water after preconcentration using a thermally reversible polymer" *Analyst*, **1993**, 118, 553.
- [14] S. Fujishige, K. Kubota and I. Ando, "Phase transition of aqueous solutions of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylmethacrylamide)" *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 3311.
- [15] R. A. Horne, J. P. Almeida, A. F. Day, N.-T. Yu, "Macromolecule hydration and the

- effect of solutes on the cloud point of aqueous solutions of polyvinyl methyl ether: A possible model for protein denaturation and temperature control in homeothermic animals” *J. Colloid Interface Sci.*, **1971**, 35, 77.
- [16] S. Fujii, K. Kobayashi, K. Kanaizuka, T. Okamoto, S. Toyabe, E. Muneyuki and M. Haga, “Manipulation of Single DNA Using a Micronanobubble Formed by Local Laser Heating on a Au-coated Surface” *Chem. Lett.*, **2010**, 39, 92.
- [17] S. Fujii, K. Kanaizuka, S. Toyabe, K. Kobayashi, E. Muneyuki and M. Haga, “Fabrication and Placement of a Ring Structure of Nanoparticles by a Laser-Induced Micronanobubble on a Gold Surface” *Langmuir*, **2011**, 27, 8605.
- [18] S. Fujishige, “Intrinsic Viscosity-Molecular Weight Relationships for Poly(N-isopropylacrylamide) Solutions” *Polym. J.*, **1987**, 19, 297.
- [19] K. A. Dill and S. Bromberg, “*Molecular Driving Forces: Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology*”, Garland Science, New York, **2003**.
- [20] J. Sangster, “*Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*”, Vol. 2, Wiley Series in Solution Chemistry, Chichester, **1997**.
- [21] V. R. Batistela, D. S. Pellosi, F. D. Souza, W. F. Costa, S. M. O. Santin, V. R. Souza, W. Caetano, H. P. M. Oliveira, I. S. Scarminio and N. Hioka, “pKa determinations of xanthene derivates in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data” *Spectrochimica Acta: Part A*, **2011**, 79, 889.

Chapter 6

Conclusion and future outlook

6.1 Conclusion

本研究は、熱応答性高分子、特に poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) 水溶液の相転移ダイナミクスを、ヘテロダイン過渡格子法を用いて明らかにした。また同測定法と別の視点から PNIPAM 水溶液の相転移を考察するため、近赤外光を導入した顕微鏡下で蛍光ラベルされた PNIPAM の相転移の誘起とその緩和過程の観察、および蛍光スペクトル測定を行った。また、相転移による PNIPAM の物性変化を用いて、試料の局所的な濃縮とその原理について検討を行った。

第一章では、熱応答性高分子の熱に対する特異的な性質と応用例を紹介し、水と高分子の相互作用が生体高分子の機能発現に深くかかわっていること、相転移ダイナミクス研究の目的について述べた。また分光法・時間分解分光法について、また光熱変換分光法が発展した歴史的背景について紹介した。

第二章では光熱変換分光法的一种である過渡回折格子法およびヘテロダイン過渡格子法の特徴および測定原理について数式を用いて解説した。また緩和法的一种であるレーザー温度ジャンプ法を紹介し、ヘテロダイン過渡格子法と組み合わせることで、光を用いて熱により反応が進行する過程が測定できる利点について述べた。

第三章では、同測定法を用いて PNIPAM 水溶液の相転移ダイナミクス測

定を行い、分子レベルから溶液全体へと連続して起こる一連の相転移過程について検討を行った。その結果、PNIPAM 水溶液の相転移過程は透明・白濁の二状態のみが存在するのではなく、PNIPAM 鎖から水が脱離する過程から巨視的に凝集が起こるまでに数段階の過程を経ていること、また凝集状態からの緩和においても、巨視的な構造緩和から、分子レベルでの構造緩和を経ていること、これらの一連の相転移・相緩和過程について初めて明らかにした。

第四章では光圧による PNIPAM 水溶液の相転移誘起、および顕微蛍光測定を行った。極性蛍光プローブを共重合させた PNIPAM の蛍光スペクトルと透過像との比較から、微粒子が溶解した後の、極性環境変化について検討を行った。蛍光スペクトル変化より個々の分子が構造緩和していく過程が観測され、また粒子が溶解していく透過像の応答と比較を行うことで、局所的な構造転移と巨視的な相緩和の相関について明らかにした。この結果はヘテロダイン過渡格子法により得られた考察を支持した。

第五章では PNIPAM 水溶液の相転移による物性変化を用いた応用として、金属細線と近赤外光を用いた局所相転移領域の生成と、相転移領域の極性環境などによる試料の局所的な in-situ 濃縮および検出を行った。局所的な空間において、均一な PNIPAM 相の形成に成功し、物質の抽出場としての特性について検討を行い、同等の分子量・相転移温度を持つ poly(vinylmethylether) (PVME) 水溶液を用いた比較実験、および用いた色素の構造から、濃縮場としての特性は高分子相の疎水性だけでなく、物質-高分子間の相互作用が重要であると示唆された。この結果から、試料の濃縮だけでなく、局所での環境変化を利用した反応場の形成や、反応触媒とともに保持することで、高活性触媒反応などにも使えると期待される。

第六章では本研究を総括した。

以上、PNIPAM 水溶液の相転移ダイナミクス測定および相転移を利用したアプリケーション開発についての研究に成功した。我々の周りで起きている化学反応の多くは熱変化を伴う反応である。従来の光を用いた分光測定では、これらの熱変化を反応解析の手法として生かした測定はあまり行われてこなかった。その中で光熱変換分光法的一种であるヘテロダイン過渡格子法を用いて反応解析を行えたこと、またレーザー温度ジャンプ法を用いて光熱変換による試料の熱誘起を行えたことは、光と熱の境界領域を広げる興味深い研究であったと考えている。

熱応答性高分子の相転移ダイナミクスについては、同測定法を用いて一連の相転移過程を明らかにすることで、高分子と水や、高分子間の連続的に変化する相互作用について明らかにすることが出来た。この結果から、将来的に生体高分子の構造変化過程などの研究を行う際の知見になるのではないかと考えている。また光圧による相転移誘起と顕微蛍光測定を相転移ダイナミクス測定に用いたことで、顕微鏡測定に関する技術や知識を習得できたことは非常に有意義であった。透過像と蛍光スペクトルという異なる測定を用いて同一の現象を測定することで、相緩和に関する新しい知見が得られた。各々の測定を行うだけでなく、各測定結果を比較する手法は相転移を伴う過程の解析に有効な手段であると考えている。

また局所空間中の相転移領域を用いた物質の捕集を行い、その捕集機構について明らかにした。局所において相転移領域を生成、濃縮場を利用することで、*in-situ* にその様子を検出した。この研究を発展させることで、熱応答性高分子の相転移領域を試料の濃縮だけでなく、局所での環境変化を利用した反応場の形成や、反応触媒とともに保持することで、高活性触媒反応などにも使えるのではないかと考えている。

最後に、修士・博士課程において、光と物質の相互作用に関して、光により物質を励起したヘテロダイン過渡格子法、光により物質を操作したレーザートラップ法についての技術・知識を習得することができた。また光と物質の相互作用の一環として、光による物質の破壊を基にしたレーザーアブレーション研究が出来なかったのが心残りである。

Acknowledgement

本研究を遂行し、学位論文をまとめるに当たり、指導教授である片山建二教授のご指導に深く感謝しております。また助教である栞原章太先生、分光化学システム研究室の諸先輩方、同期、後輩におきましては日々の研究だけでなく、研究室の運営などの支援をしていただき、深く感謝しております。

学部・博士前期課程におきましては、東京電気通信大学 豊田太郎教授、沈青先生にテラヘルツ関連の研究・指導をして頂き、深く感謝しております。

また台湾交流協会 角田佳子さまにおきましては、若手研究者交流事業を通じた研究支援をして頂きました。交流協会の関係者の皆さまにこの場を借りてお礼を申し上げたいと思います。

台湾交通大学 増原宏教授、三浦篤志先生、宇和田貴之先生におきましては、交流事業を通して留学を受け入れてくださり、また、帰国した後も多岐に渡りご指導・ご教授を頂きました。この場を借りてお礼を申し上げたいと思います。

奈良女子大学 岩井薫教授におきましては、研究試料の提供をして頂きました。この場を借りてお礼を申し上げたいと思います。

最後に、研究・生活面におきまして、支援していただいた多くの方々に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

Publication list

1. Kenji Katayama, **Hayato Inoue**, Hisashi Sugiya, Qing Shen, Taro Toyoda and Keith A. Nelson
“Generation and detection of tunable phonon polaritons using a single transmission grating”
Applied Physics Letters. Vol. 92, 031906 (2008).
2. **Hayato Inoue**, Kenji Katayama, Qing Shen, Taro Toyoda and Keith A. Nelson.
“Terahertz reflection response measurement using a phonon polariton wave”
Journal of Applied Physics. Vol. 105, 054902 (2009).
3. **Hayato Inoue**, Kenji Katayama, Qing Shen, Taro Toyoda and Keith A. Nelson.
“Comparative study of by near-field heterodyne transient grating and continuously variable spatial frequency transient grating methods for measurements of terahertz reflection responses”
Journal of Physics: Conference Series. Vol. 214 012123 (2010).
4. **Hayato Inoue**, Kenji Katayama, Kaoru Iwai, Atsushi Miura and Hiroshi Masuhara.
“Conformational relaxation dynamics of a poly(N-isopropylacrylamide) aqueous solution measured using the laser temperature jump transient grating method”

Physical Chemistry Chemical Physics. Vol. 14, 5620-5627 (2012).

5. **Hayato Inoue**, Takayuki Yamamoto, Shota Kuwahara and Kenji Katayama.
“Local Extraction and Condensation under a Microscope Using the Optically Controlled Phase Separation of a Thermoresponsive Polymer”
Chemistry – An Asian Journal. Vol. 8, 108-112 (2013).
6. **Hayato Inoue**, Shota Kuwahara and Kenji Katayama.
“The whole process of phase transition and relaxation of poly(N-isopropylacrylamide) aqueous solution”
Physical Chemistry Chemical Physics. Vol. 15, 3814-3819 (2013).
7. Takaaki Chiba, **Hayato Inoue**, Shota Kuwahara and Kenji Katayama
“Disorder/Reorientation dynamics of 4-methoxybenzylidene-4-n-butylaniline observed by heterodyne transient grating method”
Analytical Sciences. (Submitted).
8. Mika Arai, Tomomi Fujii, **Hayato Inoue**, Shota Kuwahara and Kenji Katayama.
“Curing dynamics of photopolymer measured by single-shot heterodyne transient grating method”
Analytical Sciences. (Accepted).

Awards

1. International Symposium on Frontier of Terahertz Spectroscopy III.
Best student poster award (Oct. 2009)
2. The 92nd Annual Meeting of CSJ
CSJ Student Presentation Award 2012 (Oral). (Apr. 2012)
3. Annual Meeting on Photochemistry 2012
Best student award (Oral). (Sep. 2012)
4. 平成 24 年度 渋谷健一奨励賞 (Mar. 2013)

Carrier

1. Research Fellowship of the Japan Society for the Promotion of Science for
Young Scientists DC1 (Apr. 2010-Mar. 2013)