

クライオ電子顕微鏡による界面活性剤ミセルのナノ構造観察

Observation of Nano-Structure of Surfactant Micelle by Cryogenic Electron Microscopy

吉村 倫一^a, 小川 哲也^b

Tomokazu Yoshimura and Tetsuya Ogawa

^a奈良女子大学大学院自然科学系化学領域^b京都大学化学研究所

要旨 界面活性剤が水溶液中で形成する会合体のナノ構造は、クライオ電子顕微鏡 (cryo-TEM) によって観察することができる。本稿では、分子内に2本のフッ化炭素鎖を有するフッ化炭素系ジェミニ型、フッ化炭素と炭化水素の異種の疎水鎖を有するハイブリッドジェミニ型、3本のアルキル鎖を有するトリメリック型の3つのタイプの特異な構造をもつ界面活性剤について、cryo-TEMによる会合体のナノ構造を紹介する。これらの界面活性剤の会合体の構造はアルキル鎖長、連結鎖長および界面活性剤の濃度によって異なり、フッ化炭素系ジェミニ型界面活性剤では多角形ベシクル、フッ化炭素-炭化水素系ハイブリッドジェミニ型界面活性剤では600~800 nmの多重層ベシクルを形成するなど、従来型の界面活性剤では認められないユニークな会合体特性を示す。

キーワード：クライオ電子顕微鏡, cryo-TEM, 界面活性剤, ミセル, ベシクル

1. はじめに

界面活性剤は、分子内に親水基と疎水基の両方をもつ構造のため、気/液や液/液などの界面に吸着して界面自由エネルギーを低下させ、その性質を著しく変化させる。さらに水溶液中で、ミセル、棒状ミセル、紐状ミセル、ベシクルなど種々の構造の会合体を形成する。この界面吸着とミセル形成の特性を利用して、界面活性剤は洗浄や化粧品、塗料など多くの分野で用いられている。界面活性剤ミセルの構造を調べるには、蛍光消光、時間分解蛍光寿命、動的散乱 (DLS)、静的散乱 (SLS)、中性子小角散乱 (SANS)、X線小角散乱 (SAXS)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、動的粘弾性などの測定手段があり¹⁾、これらを複数組み合わせることでミセルの形状やサイズなどのナノ構造を詳細に決定できる。TEMを用いた界面活性剤ミセルの測定には、染色法、フリーズフラクチャー (FF) 法、クライオ (cryo) 法といった手法がある²⁾。染色法によるTEM観察は、測定時に試料水溶液を乾燥させるため、会合体の構造が変形している可能性があり信頼性に欠ける。一方、FF法やcryo法によるTEM観察は、水溶液を凍らせて極低温で測定するため染色法のような心配はなく、数ナノメートルサイズのミセルの構造決定には決め手を欠けるが、とくにcryo法では棒状ミセルや紐状ミセル、ベシクルなどの会合体の構造を正確に確認することができる。

界面活性剤のほとんどは1疎水鎖1親水基の構造であり、これらの水溶液中でのミセル構造については十分知られている。近年、界面活性剤の性能の向上や高機能性の発現を目指

して、従来型の概念に捕われない斬新な構造をもつ界面活性剤の分子設計が行われている。なかでもジェミニ型界面活性剤は、分子内に2つの疎水基と2つの親水基をもち、親水基またはその近傍で界面活性剤同士が連結基によって繋がれた構造で、次世代の界面活性剤として注目されている^{3,4)}。これまでに疎水基、親水基、連結基の構造を変えた多種多様なジェミニ型界面活性剤が分子設計・合成され、界面吸着やミセル特性が調べられてきた。ジェミニ型界面活性剤の多くは、臨界ミセル濃度 (CMC) 付近でのプレミセル形成や低濃度でのベシクル形成など、従来型の界面活性剤とは異なるユニークな会合体の特性をもつ。また、ジェミニ型界面活性剤が形成する会合体は、アルキル鎖長や濃度に依存して転移や共存を示すこともあり大変興味深い。これらの会合体の構造をクライオ電子顕微鏡 (cryo-TEM) を用いて調べることは、大変有用であると思われる。

本稿では、cryo-TEMを用いた水溶液中における界面活性剤ミセルのナノ構造について、まず測定原理および方法を解説し、さらに疎水基にフッ化炭素鎖をもつジェミニ型界面活性剤およびジェミニ型の延長上の構造をしたトリメリック型界面活性剤を例に紹介する。

2. クライオ電子顕微鏡による観察

水溶液中で界面活性剤が形成するミセルを直接観察するために、クライオ電子顕微鏡 (cryo-TEM) JEM-2100F (G5)、JEOL (図1) を用いた。これは、通常の加速電圧200 kVの電子顕微鏡の試料ステージ周りとは試料導入部を極低温観察用に改良したものであり、試料ステージを液体ヘリウムで冷却することにより、試料を極低温 (4.2 K) に保持した状態の

^a 〒630-8506 奈良市北魚屋西町
2013年12月26日受付

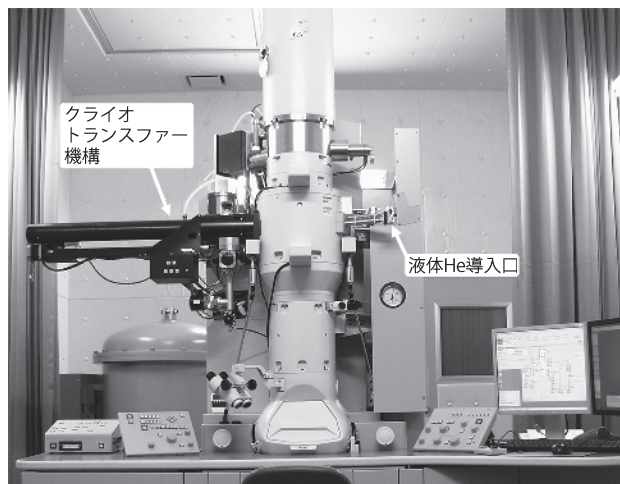


図1 クライオ電子顕微鏡 (JEM-2100F(G5), JEOL)

まま観察することができる電子顕微鏡である。鏡筒内に液体ヘリウムのタンク（および断熱シールドとして液体窒素タンク）を内蔵しており、4時間以上4.2 Kを保持して観察を続けることができる。試料ホルダーはいわゆるトップエントリータイプとよばれ、先端部に試料を載せたメッシュを装着した円錐形の試料ホルダーを、鏡筒内の試料ステージに置き去りにしてくるタイプである。よく利用されるサイドエントリータイプ（棒状の試料ホルダーの先端にメッシュを取り付けて鏡筒の横から試料ホルダーを挿入し、外部から先端の試料を冷却するタイプ）のクライオホルダーを利用して極低温観察する場合と比較して、試料周りの等方性が確保できかつ試料と外部との接触が無く断熱性が良いので、熱的なじょう乱による試料のドリフトが非常に少ない。そのため分解能は通常の電子顕微鏡と変わらず0.2 nmを保持している。また、鏡筒内にある液体ヘリウムタンクはコールドトラップとして働くため試料周りの真空度は通常より良い状態になるのでコンタミネーションが起りにくい。試料を鏡筒内へ導入するための予備排気部はクライオトランスファー機構とよばれ、液体窒素で冷却されており予備排気中も極低温に保たれる。水溶液試料は、マイクログリッドに溶液を滴下し、余分な液を濾紙で吸い取った後、急速凍結装置 (REIHERT KF80, Leika) を利用して、液体プロパン (-180°C) 中に打ち込み急冷することで、液体の水をアモルファス氷として固定する。このマイクログリッドを、低温に保つと同時に大気に晒して霜が付着しないように、液体窒素中で試料ホルダーに装着後、クライオトランスファー機構を通して鏡筒内に導入する。溶液膜の厚さは数十から数百 nm で、あまり強い電子ビームを照射すると氷の膜や溶液中の界面活性剤分子が電子線損傷を受けるので、倍率は数万倍程度に抑えざるを得ない。また、一般的に水溶液内の界面活性剤ミセルのコントラストは低いので、小さい対物絞りの使用と数ミクロンの大きなアンダーフォーカス条件で撮影してコントラストを増加させる必要があるため、実質的な像の分解能としては2 nm程度になる。

3. フッ化炭素系ジェミニ型カチオン界面活性剤のミセル構造

疎水基の一部またはすべてをフッ化炭素鎖に置き換えたフッ化炭素系界面活性剤は、炭化水素系では見られない優れた界面活性、高い熱的および化学的安定性をもつ。また、生体を構成している炭化水素系有機化合物との相互作用が小さくほぼ生体不活性物質であるため、薬物送達システムやスーパーオキシドイオンの消去としての応用が期待されている。ジェミニ型界面活性剤の疎水基のほとんどは炭化水素鎖であるが、フッ化炭素系ジェミニ型界面活性剤の研究は合成の制約などを理由に少ない。我々は、親水基に四級アンモニウム塩化物を有するフッ化炭素系ジェミニ型界面活性剤 ($C_m^F C_3-s-C_3 C_m^F$, m, s はそれぞれフッ化炭素鎖長, 連結基のメチレン鎖長) の合成に成功し、その水溶液物性と会合体特性を調べ、これらに及ぼすフッ化炭素鎖長および連結基のメチレン鎖長の影響について明らかにしてきた⁵⁻⁸⁾。ここでは、 $C_m^F C_3-s-C_3 C_m^F$ の水溶液中でのミセル構造について紹介する。

イオン性界面活性剤の溶解度は温度によって著しく変化し、ある温度で急激に増大する。この温度はクラフト温度とよばれ、クラフト温度以下では界面活性剤の溶解度は小さく界面活性は発揮されないのに対し、クラフト温度以上になると単分散のモノマーとミセルが共存した溶液となる。フッ化炭素系ジェミニ型界面活性剤 $C_m^F C_3-s-C_3 C_m^F$ は、対イオンが臭化物イオンで連結鎖長が短いときにクラフト温度が40~50°Cと高くなるが、対イオンを塩化物イオンにすることでクラフト温度が低下し水溶性の向上が認められる。塩化物イオンを対イオンにもつ $C_m^F C_3-s-C_3 C_m^F$ の CMC は、フッ化炭素鎖長6および8のいずれにおいても連結鎖長が4のときに最も低くなる。連結鎖長が4から6に増大すると CMC は急激に増加し、連結鎖長6以上では鎖長の増加とともに CMC はわずかに減少する。連結鎖長が長くなると、その鎖が湾曲状となって疎水鎖のようにふるまうために低濃度でミセル形成しやすくなることが考えられる。CMCにおける $C_m^F C_3-s-C_3 C_m^F$ の表面張力はフッ化炭素および連結鎖長に大きく依存し、フッ化炭素鎖長6および連結鎖長4のときに最も高い表面張力低下能 (16.2 $mN m^{-1}$) を示し、一般のフッ化炭素系界面活性剤がもつ最低の表面張力 (14 $mN m^{-1}$) に近い値を示す。DLS, cryo-TEM および SAXS の測定による水溶液中での $C_8^F C_3-s-C_3 C_8^F$ の会合体は、連結鎖長および界面活性剤の濃度によって異なる。連結鎖長4の場合、幅広い濃度 (0.132 ~ 16.9 $mmol dm^{-3}$) において半径約100 nmの大きさの会合体を形成する。高濃度の8.44 および 16.9 $mmol dm^{-3}$ では、この大きなサイズの会合体に加え、半径10 ~ 20 nmの小さな会合体が共存する。8.44, 16.9 および 42.2 $mmol dm^{-3}$ における $C_8^F C_3-4-C_3 C_8^F$ の cryo-TEM 写真を図2に示す。これより、数十~数百ナノメートルサイズの多角形構造のベシクルと小さなサイズの会合体が確認される。高濃度 (42.2 $mmol dm^{-3}$) では水溶液の粘性が高くなり、多重層の多角形ベシクルが見られる。この多角形ベ

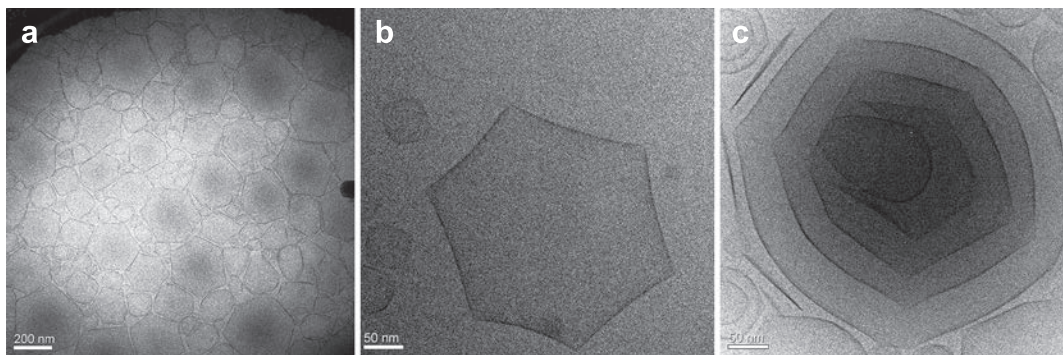


図2 フッ化炭素系ジェミニ型カチオン界面活性剤 $C_8^F C_3-4-C_3 C_8^F$ が形成する会合体の cryo-TEM 写真 (a : 8.44, b : 16.9, c : 42.2 mmol dm⁻³)

シクルの報告例はほとんどなく、理由はまだ明らかではないが、非常に特異な会合体の特性である。なお、SAXSの結果からも、ベシクルの形成が確認されている。また、連結鎖長6では、11.4～114 mmol dm⁻³の幅広い濃度で球状ミセルまたは短い紐状ミセルを形成し、鎖長8 (9.72～96.9 mmol dm⁻³)、鎖長10 (6.88～34.7 mmol dm⁻³)、鎖長12 (3.68 mmol dm⁻³)と連結と連結鎖が長くなるといずれも数ナノメートル程度の小さなミセルを形成する。これより、形成する会合体の構造は連結鎖長に大きく依存し、鎖長が長くなると大きなサイズの会合体を形成しにくいことが明らかである。

4. フッ化炭素-炭化水素系ハイブリッドジェミニ型カチオン界面活性剤のミセル構造

界面活性剤は単独よりも異種のを混合して用いる方が界面活性の面から優れていることが知られている。同一分子内に異種の疎水基または親水基をもつハイブリッド型の界面活性剤は、異種同士を連結基で繋いだ構造を有し、異なる界面活性剤の両者の優れた性質を併せもつことが期待される。我々は、分子内にフッ化炭素と炭化水素の異種の疎水鎖を同時に有するハイブリッドジェミニ型界面活性剤 ($C_n-s-C_3 C_m^F$, n, m, s はそれぞれ炭化水素, フッ化炭素, 連結の鎖長) を分子設計・合成し、その基礎物性ならびに水溶液中での会合挙動を明らかにしてきた^{8,9)}。ここでは、 $C_n-s-C_3 C_m^F$ の水溶液中でのミセル構造について紹介する。

ハイブリッドジェミニ型界面活性剤 $C_n-s-C_3 C_m^F$ 水溶液の低濃度 (CMC の 10～30 倍の濃度) では、いずれの各鎖長においても数ナノメートルの大きさのミセルを形成していることが DLS および cryo-TEM より確認される。 $C_8-3-C_3 C_6^F$ (CMC × 10) が形成するミセルの cryo-TEM 写真を図3に示す。ミセルと考えられる小粒子の会合体が見られるものの、これだけでミセルと判断するのは難しい。しかし、DLS より見かけの流体力学的直径は 2.6～4.0 nm と見積もられ、cryo-TEM で見られる小粒子は球状か非球状か詳細な形状はわからないがミセルであると考えられる。高濃度になると溶液に粘性が現れ、 $C_n-s-C_3 C_m^F$ の会合体は連結鎖長 s および界面活性剤の濃度に大きく依存する。両アルキル鎖長が比較的長い $C_{12}-3-C_3 C_8^F$ では、cryo-TEM (図4 (a)) より CMC の

100 倍の濃度で紐状ミセル (線状ミセル) とベシクルの2つの会合体の共存が認められる。濃度が CMC の 400 倍に高くなると、600～800 nm の非常に大きな多重層ベシクルに転移する (図4 (b))。連結鎖長が長い $C_{12}-6-C_3 C_6^F$ では、連結鎖長3とは異なる粘性溶液となり、CMC の 100 倍の濃度で紐状ミセルが見られる。このように、ハイブリッドジェミニ型界面活性剤の各鎖長ならびに濃度を少し変えるだけで、形成する会合体の構造が劇的に変わり、しかもハイブリッド構造から創出されるユニークな会合挙動は大変興味深い。

5. トリメリック型カチオン界面活性剤のミセル構造

ジェミニ型界面活性剤の延長上の構造として、ジェミニ型構造にもう1分子を繋いだ3疎水基3親水基の構造のトリメリック型界面活性剤が知られている。ジェミニ型界面活性剤の研究は1990年頃から現在まで膨大な数の論文が報告されているのに対し、トリメリック型界面活性剤の報告はかなり少ない。トリメリック型界面活性剤は、ジェミニ型と比べると分子設計・合成が比較的難しく、精製の際に副生成物や不純物などの除去が困難である。我々は出発物質にジエチレントリアミン、トリス (2-アミノエチル) アミン、塩化シア

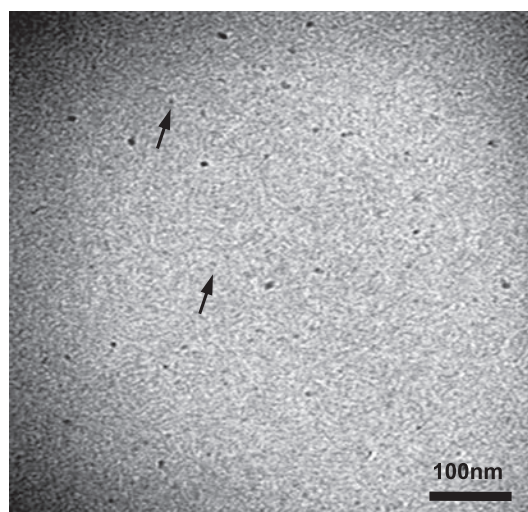


図3 フッ化炭素-炭化水素系ハイブリッドジェミニ型カチオン界面活性剤 $C_8-3-C_3 C_6^F$ (CMC × 10) が形成する会合体の cryo-TEM 写真

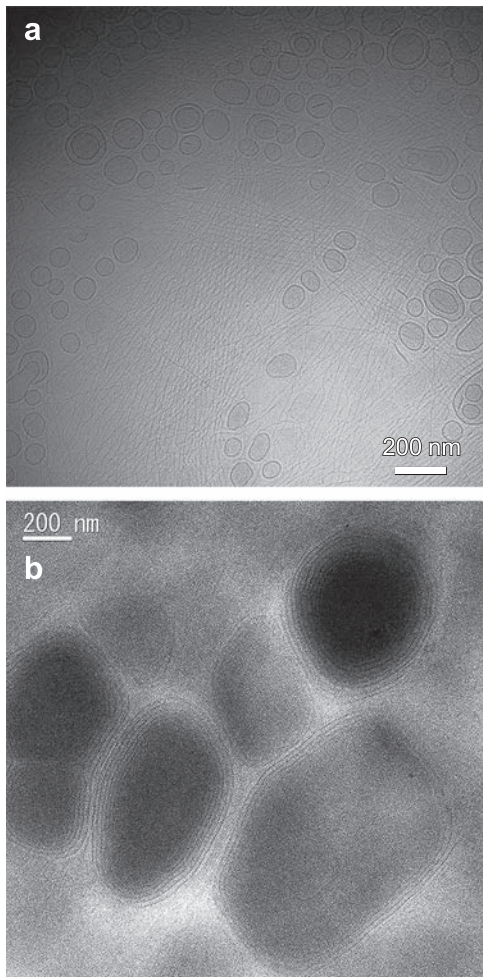


図4 フッ化炭素-炭化水素系ハイブリッドジェミニ型カチオン界面活性剤 $C_{12}-3-C_3C_8^F$ が形成する会合体の cryo-TEM 写真 (a: CMC \times 100, b: CMC \times 400)

ヌルを用いることで、数種類のトリメリック型界面活性剤の開発に成功した¹⁰⁾。従来型のモノメリック構造からジェミニ型、そしてトリメリック型に構造が変わるときの物性や会合挙動、それらとアルキル鎖数（オリゴマー度）との関係进行调查することは、学術的な面で大変興味深い。我々は最近、星型の四級アンモニウム塩トリメリック型界面活性剤 ($3C_n\text{trisQ}$, n はアルキル鎖長) を分子設計・合成し、界面吸着と会合体特性について報告した^{11,12)}。ここでは、 $3C_n\text{trisQ}$ の水溶液中でのミセル構造について紹介する。

星型構造のトリメリック型界面活性剤 $3C_n\text{trisQ}$ ($n = 10, 12, 14$) は、分子内に 3 本のアルキル鎖を有するにもかかわらず高い水溶性を示し、対応する単鎖型およびジェミニ型と比べて、CMC が低くミセル形成能に優れ、低い表面張力を示し、気/液界面への吸着・配向を高めるなどの特性をもつ。水溶液中で形成する $3C_n\text{trisQ}$ の会合体はアルキル鎖長および界面活性剤の濃度によって異なる。SANS と cryo-TEM より、鎖長 10 では、CMC ($1.17 \text{ mmol dm}^{-3}$) の 2.5~5.0 倍の濃度で楕円体ミセル (短軸 1.6~1.7 nm, 短軸と長軸の比 0.51~0.55) を形成する。鎖長 12 では、CMC ($0.139 \text{ mmol dm}^{-3}$)

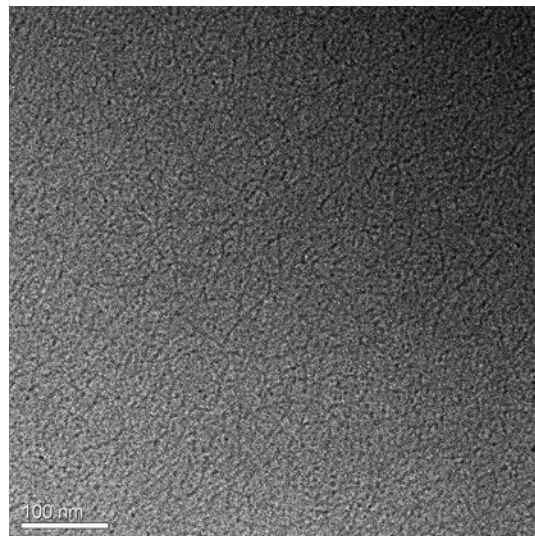


図5 トリメリック型カチオン界面活性剤 $3C_{12}\text{trisQ}$ (CMC \times 200) が形成する会合体の cryo-TEM 写真

の 25 倍の濃度で楕円体ミセル (短軸 1.9 nm, 軸比 0.44) を形成し、濃度が CMC の 200 倍に増加すると、会合体の構造は紐状ミセル (半径 2.0 nm, 長さ 16.6 nm) に転移する。このときの cryo-TEM 写真を図 5 に示す。これより、少ない分岐をもつ糸状のミセルの形成が確認される。鎖長 14 では、低濃度から広範囲の濃度領域で紐状ミセル (半径 2.1~2.3 nm, 長さ 25 nm 以上) を形成する。鎖長 14 の CMC ($0.00647 \text{ mmol dm}^{-3}$) の 50 および 100 倍の濃度における cryo-TEM 写真からも、鎖長 12 と同様に、少ない分岐をもつ糸状ミセルの形成が確認される。CMC がかなり小さく低濃度であるため濃度が増加しても高い粘度は示さないものの、ミセル同士の絡み合いは増大することが示されている。

文 献

- 1) 日本化学会編：コロイド科学IV。コロイド科学実験法，東京化学同人，東京，1-110 (1996)
- 2) 西村善文：生命科学のための機器分析実験ハンドブック，羊土社，東京，122-139 (2007)
- 3) Zana, R. and Xia, J.: Gemini Surfactants: Synthesis, Interfacial and Solution—Phase Behavior, and Applications, Marcel Dekker, New York (2004)
- 4) Zana, R.: in Esumi, K. and Ueno, M. (Eds.): Structure-Performance Relationships in Surfactants, 2nd ed., Chapter 7, Marcel Dekker, New York (2003)
- 5) Yoshimura, T., Ohno, A. and Esumi, K.: *Langmuir*, 22, 4643-4648 (2006)
- 6) Matsuoka, K., Yoshimura, T., Shikimoto, T., Hamada, J., Yamawaki, M., Honda, C. and Endo, K.: *Langmuir*, 23, 10990-10994 (2007)
- 7) Yoshimura, T. and Hayami, M. *et al.*: manuscript in preparation
- 8) 吉村倫一：オレオサイエンス，11, 319-326 (2011)
- 9) Yoshimura, T. and Okuda, A. *et al.*: manuscript in preparation
- 10) 吉村倫一：色材協会誌，85, 370-377 (2012)
- 11) Yoshimura, T., Kusano, T., Iwase, H., Shibayama, M., Ogawa, T. and Kurata, H.: *Langmuir*, 28, 9322-9331 (2012)
- 12) Kusano, T., Iwase, H., Yoshimura, T. and Shibayama, M.: *Langmuir*, 28, 16798-16806 (2012)