薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
114 (5) 325-332 (1994)

プルロニック L-64 のミセル形成及びミセル構造に及ぼす温度の影響

斎藤好廣,^{*,a} 近藤行成,^b 阿部正彦,^b 佐藤孝俊^a

日本大学薬学部,^a 東京理科大学理工学部^b

Effects of Temperature on Micellar Formation and Micellar Structure of Pluronic L-64

Yoshihiro SAITO,^{*,a} Yukishige KONDO,^b Masahiko ABE,^b
and Takatoshi SATO^a

College of Pharmacy, Nihon University,^a 7-7-1 Narashinodai,
Funabashi-shi, Chiba 274, Japan and Faculty of Science and
Technology, Science University of Tokyo,^b 2641 Yamazaki,
Noda-shi, Chiba 278, Japan

(Received December 20, 1993)

The effects of the temperature on the micellar formation and on the micellar structure of poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide)/poly(ethylene oxide) triblock copolymer, pluronic L-64, were investigated in terms of surface tension, fluorometric analysis, static and dynamic light scattering measurements. Two clear discontinuities corresponding to the cmc_I and cmc_{II} were found in the relationship between the surface tension and L-64 concentration. The cmc_I was little affected by the temperature, but the cmc_{II} was greatly influenced. Furthermore, the numbers of micelle aggregation, micellar sizes and micellar shapes varied greatly with changing in the temperature and L-64 concentration.

Keywords—pluronic L-64; temperature; micellar formation; micellar structure

ポリ(エチレンオキシド)/ポリ(プロピレンオキシド)/ポリ(エチレンオキシド)トリブロック共重合体は、プルロニック (Pluronic®) として市販されている界面活性剤であり、疎水基としてポリプロピレンオキシドを含有していることで注目を引いた。¹⁾ この界面活性剤は、概して低刺激性、低毒性であり、湿潤作用並びに可溶化作用としての機能を発現する医薬用製品としても期待されている。^{2,3)} 一般に、界面活性剤の応用を論じる場合、ミセル形成並びにミセル構造に関する情報は必要不可欠であるが、プルロニック系界面活性剤の溶液物性に関する研究は、他の非イオン界面活性剤と比較して極めて少ない。特に、界面化学的性質の中で最も基礎的かつ重要であるミセル形成濃度 (cmc) については、一致したデータが少なく、またミセル形成の有無についても議論のあるところであり、未だ不明な点が多い。⁴⁾ この原因として、界面活性剤濃度や測定温度の設定範囲、測定手段の相違などが考えられる。

著者らは、これらの点を十分に考慮し、プルロニック L-64 (L-64) のミセル形成並びにミセル構造に及ぼす温度及び濃度の影響について検討した。

実験の部

試料 用いた界面活性剤は、旭電化工業 (株) から提供されたプルロニック系非イオン界面活

性剤 (L-64) である。プルロニック系界面活性剤には、プロピレンオキシド含量の多い物質が不純物として数パーセント含まれており、これが原因となってミセル特性に特異な現象をもたらすとの報告⁵⁾がある。そこで、L-64 を *n*-ヘキサンを用い精製した後、⁶⁾ ¹H-NMR 測定を行い⁷⁾ エチレンオキシド含量 45.5 wt% (平均分子量: 2900) のものを試料に供した。ピレンは和光純薬工業 (株) の試薬特級品をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-200, 展開溶媒: *n*-ヘキサン) により精製し⁸⁾ 試料に供した。8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸マグネシウム (ANS-Mg) は、東京化成 (株) の高品質分析用試薬をそのまま用いた。また、ドデシルピリジニウムクロリド (DPCI) は、東京化成 (株) の試薬を酢酸エチルにて 3 回再結晶を繰り返し、⁹⁾ 試料に供した。水は、蛍光分析用としても十分に純度が高いと評価されている¹⁰⁾ 注射用水 (大塚製薬 (株), 比抵抗: 0.78 MΩ·cm) を用いた。

表面張力の測定 表面張力はウィルヘルミー型表面張力計 (協和界面科学 (株) 製: A3型) を使用した。なお、測定プレートには、白金製のものをを用い、溶液表面の濃度が内部と平衡に到達した後、表面張力値を求めた。

静的及び動的光散乱光度法 ミセル形成の有無、粒子径及び形状について、サブミクロン粒子アナライザー (Malvern 社製: 4700 型) を用いて検討した。なお、光源は Ar レーザー (Coherent 社製: Innova 90, 最大出力 4 W, 波長 488 nm) である。ミセル形成の有無は、入射光に対して 90° の還元散乱強度を測定 (静的光散乱光度法) することにより確認した。ミセル粒子径は同一の角度において散乱光を検出し、光子相関法 (動的光散乱光度法) により拡散定数を求めた後、Stokes-Einstein 式を用い、流体力学的粒子径として算出した。¹¹⁾ また、ミセルの形状は、拡散定数の逆数値と散乱ベクトルとの関係より検討した。¹¹⁾

蛍光スペクトルの測定 1) 蛍光最大波長の測定——蛍光最大波長の測定は、分光蛍光光度計 (日本分光工業 (株) 製: FP-770 型) を用いて行った。なお、励起波長は 355 nm に設定し、また、ANS-Mg の濃度は 10^{-5} mol dm⁻³ とした。

2) 蛍光消光法——ミセル会合数は蛍光消光法により算出した。¹²⁾ 種々の濃度の L-64 水溶液に 10^{-5} mol dm⁻³ 濃度に相当するピレンを可溶化させ、さらに所定濃度の DPCI を添加した溶液を数種類調製した。この溶液について窒素ガス導入下、凍結-融解を 3 回繰り返した後、励起波長 335 nm にてピレンの蛍光スペクトルを測定した。なお、凍結-融解法は難溶性物質のミセルへの可溶化を促進し、¹³⁾ さらに消光剤として働く酸素¹⁴⁾ を除去する目的で適用したが、本研究においてもこの効果が充分確認できた。

上述の測定にはすべて恒温循環水槽を用い、適宜熱電対により温度を確認しながら所定の温度 ($\pm 0.2^\circ\text{C}$) に制御した。

結 果 と 考 察

1. L-64 のミセル形成

1) **表面張力法** 種々の温度における L-64 水溶液の表面張力値と L-64 濃度 (*C*) の対数値との関係を Fig. 1 に示す。L-64 濃度の増加に伴い表面張力値は低下し、2 ヶ所の濃度で明瞭な屈曲を示した。以後、低濃度側の屈曲点に相当する濃度を cmc_I 、高濃度側の屈曲点に相当する濃度を cmc_{II} とする。表面張力曲線上のこのような 2 つの屈曲点の存在は、SDS や α, ω -タイプの界面活性剤においては認められている^{15, 16)} が、プルロニック系界面活性剤については、ほとんど報告が無い。この原因は、高濃度側の cmc (cmc_{II}) が測定温度により著しく影響を受けることに起因するものと考えられる。つまり、Fig. 1 から明らかなように、この界面活性剤の低温における cmc_{II} は、かなり高濃度領域に存在するため、広範囲の濃度で測定しなければ検出できないものと思われる。さらに、測定手段がモノマー濃度あるいはミセル濃度に敏感であるか否かにより、¹⁷⁾ 1 つの cmc しか

検出できないことも考えられる。

表面張力曲線から得られた諸量を Table I に示す。また、表面張力曲線から求めた cmc_I , cmc_{II} の対数値と温度 (T' , $^{\circ}\text{C}$) との関係を Fig. 2 に示す。 cmc_I の場合, 30°C 以下では, 温度の影響をまったく受けなかったが, それ以上の温度ではやや減少傾向を示した。一方, cmc_{II} の場合, 温度の上昇に伴い著しく減少し, 式 (1) で示される直線関係が得られた。

$$\log \text{cmc}_{II} = -0.12T' + 3.7 \quad (1)$$

2) 静的光散乱光度法 溶液中に分子間会合したミセルが存在する場合, 入射光に対し一定角度での光の還元散乱強度を測定することにより, その存在の有無を確認することができる。¹⁸⁾ Fig. 3 は, 縦軸に L-64 とベンゼンとの

Fig. 1. Plots of Surface Tension vs. Pluronic L-64 Concentration
○, 20°C ; ◐, 25°C ; ○, 30°C ; ●, 35°C ; ◐, 40°C ; ●, 50°C .

TABLE I. Critical Micelle Concentration (cmc), Surface Tension (γ_{cmc}) of Pluronic L-64 from Surface Tension Measurements

Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	cmc_I ($\text{g dl}^{-1} \times 10^4$)	cmc_{II} (g dl^{-1})	$\gamma_{\text{cmc}I}$ (mN m^{-1})	$\gamma_{\text{cmc}II}$ (mN m^{-1})
20	2.0	20	50.0	34.0
25	2.0	7.6	48.9	33.0
30	2.0	1.3	47.0	32.5
35	1.3	4.5×10^{-1}	45.5	32.1
40	0.96	1.0×10^{-1}	45.3	32.0
50	0.66	6.5×10^{-2}	45.2	31.0

Fig. 2. Effects of Temperatures on cmc Values of Pluronic L-64

還元散乱強度の比 ($R_{\text{samp.}}/R_{\text{benz.}}$), 横軸に濃度の対数値をとり, プロットしたものである. いずれの温度においても $R_{\text{samp.}}/R_{\text{benz.}}$ は濃度の増加に伴い初めわずかに増加したが, ある濃度を境に急激に増大した. この $R_{\text{samp.}}/R_{\text{benz.}}$ が急激に変化する濃度は, 表面張力法で求めた cmc_{II} とほぼ一致した. したがって, cmc_{II} の濃度は, 分子間会合したミセル (多分子ミセル¹⁹⁾) を形成する濃度と考えられる. Prasad ら⁴⁾は 20°C における L-64 のミセル構造についての報告の中で, ある濃度以上では, L-64 分子中の親油基がからまった周囲をオキシエチレン鎖がとり囲んだ状態の単分子ミセル¹⁹⁾が存在すると述べている. 本研究の 20°C における cmc_{I} は, この単分子ミセル形成濃度にほぼ近い値であった. $R_{\text{samp.}}/R_{\text{benz.}}$ の値が極めて小さかったことを考え合わせると, cmc_{I} では分子間会合したミセルを形成しているのではなく, 分子内会合した単分子ミセルを形成しているものと推察される.

2. L-64 のミセル構造

1) 蛍光プローブ法 ANS 分子は分子周囲の環境の変化に敏感に応答する微環境プローブである. また, プローブ周囲の極性が低くなる (あるいは微視的粘性が増加する) と短波長移動 (ブルーシフト) することが知られている.^{20,21)} したがって, ANS 分子はミセル構造の変化に関する有

Fig. 3. Reduced Intensity of Scattered Light as a Function of Pluronic L-64 Concentration
●, 20°C; ○, 30°C; ●, 50°C.

Fig. 4. Changes in Emission λ_{max} of ANS-Mg as a Function of Pluronic L-64 Concentration
□, 20°C; △, 25°C; ○, 30°C; ■, 35°C; ▲, 40°C; ●, 50°C.

益な情報を提供する.²²⁾ そこで, 種々の温度における ANS-Mg の蛍光最大波長 (Emission $\lambda_{\max}$) と L-64 濃度の対数値との関係を検討した (Fig. 4). いずれの温度においても, 0.01 g dl⁻¹ 付近までは水中での蛍光最大波長とほぼ同じ値を示したが, その後, L-64 濃度の増加とともにある一定値 (約 474 nm) に達するまでブルーシフトした. このような蛍光最大波長の変化は, 他のブロック共重合体にも認められており, ANS 分子の微視的環境の疎水性が, ブロック共重合体のコンホメーション変化により増大したためであると説明されている.²²⁾ すなわち, L-64 濃度の増加とともにミセル内 ANS-Mg の微視的環境の極性が低下し, ある一定の濃度以上では, もはや微視的環境の極性が変化しないことを示唆しているものと思われる. また, 蛍光最大波長が一定値を示す濃度 (cmc_{II} より若干高濃度) は, 温度の増加とともに低濃度側にシフトした. なお, 20°C では蛍光最大波長の一定値を示す濃度は, 表面張力測定から得られた cmc_{II} とほぼ一致しているが, それ以上の温度においては一致しておらず, cmc_{II} よりもかなり高濃度側である. すなわち, 高温の場合, cmc_{II} で分子間会合したミセルを形成した後, さらにそのミセル形態が変化しているものと思われる.

2) ミセル会合数 ミセル会合数は, ミセル構造の最も基本となるパラメーターの1つである. その決定には種々の方法が用いられ, 特に静的光散乱光度法は, 有益かつ繁用されている測定法である. しかし, この方法は cmc における会合数の決定に限定されたものであり, cmc 以上の濃度における会合数の決定には不向きである. そこで, 蛍光の消光を利用したミセル会合数の決定法^{9,23)}を試みた. ミセル中に消光剤 (DPCI) が存在しないときの蛍光プローブ (ピレン) の1番目のピーク (373 nm) の蛍光強度と, DPCI が存在するときの蛍光強度の比 (I_0/I) は次式で示される.

$$\ln(I_0/I) = [Q]/[M] \quad (2)$$

ここで, $[Q]$ は消光剤の濃度, $[M]$ はミセル濃度である. また, $[M]$ は式 (3) で表すことができる.

$$[M] = ([C] - [S])/[N_s] \quad (3)$$

ここで, $[C]$ は L-64 濃度, $[N_s]$ はミセル会合数, $[S]$ はミセルと平衡状態にある単分散モノマー濃度であり, 一般に cmc で置き換えられる. したがって, 式 (2), (3) より, 次式が導出される.

$$\ln(I_0/I) = [Q] \cdot [N_s]/([C] - [S]) \quad (4)$$

式 (4) に基づくプロットの一例 (L-64 濃度: 3.5 g dl⁻¹) を Fig. 5 に示す.

$\ln(I_0/I)$ と $[Q]$ との関係は直線を示すことができ, 式 (4) の成立が確認できた. そこで, 直線の

Fig. 5. Plots of $\ln(I_0/I)$ vs. $[Q]$ for Quenching of Pyrene Fluorescence by DPCI
●, 20°C; ○, 30°C; ◐, 50°C.

Fig. 6. Changes in Micelle Aggregation Numbers as a Function of Pluronic L-64 Concentration
●, 20°C; ○, 30°C; ◐, 50°C.

傾きから種々の濃度、温度における L-64 のミセル会合数を算出した (Fig. 6). 20°C では、濃度の増加とともに会合数は徐々に増加し、 cmc_I 以上の濃度であっても cmc_{II} に近い場合には、分子間会合したミセルの存在が示唆された. 一方、30°C、50°C では、会合数は初めわずかに増加したが、ある濃度以上で会合数は著しく増加し、その後一定値を示した. プルロニック系界面活性剤に関して、温度が低い場合にはダイマー、トリマーミセルの存在や会合数及び粒子径分布が広いとの報告²⁴⁾もあり、 cmc_I 以上の濃度領域におけるミセル状態は、温度によりかなり異なるものと思われる. また、一般に非イオン界面活性剤では、温度の上昇とともにオキシエチレン鎖に脱水和を生じ、会合数は増加する傾向を示すとされている.²⁵⁾ このことから考えると、50°C の会合数は予想される値よりも小さすぎる. しかし、ビニルピリジン-オキシエチレンブロック重合体の会合数は、温度の増加とともに減少するとの報告²⁶⁾もあるので、この点に関しては今後さらに検討を加えたい.

3) ミセルの粒子径と形状 L-64 ミセルの粒子径は、動的光散乱装置を用い光子相関法により拡散定数 (D) を求めた後、Stokes-Einstein の式から流体力学的粒子半径 (R_h) として算出した.¹¹⁾

$$R_h = (kT) / (6\pi \cdot \eta_0 \cdot D) \quad (5)$$

ここで、 k はボルツマン定数、 T は絶対温度、 η_0 は溶媒の粘度である. その結果を Table II に示す. 20°C の場合、散乱強度の時間相関関数の再現性に乏しく、蛍光最大波長や会合数の変化から期待される変移点を見だし難かった. しかし、30°C になると再現性が良くなり、3.5—7.0 g dl⁻¹ の間で著しく粒子径の増大する領域が認められた. また、7.0 g dl⁻¹ 以上では、粒子径は濃度の増加にほとんど依存せず、約 8 nm の値を示すことが分かった. なお、ミセル粒子径はある濃度以上では、温度 (30°C と 50°C) による影響が少なく、Zhou らによる F-68 についての報告²⁷⁾と同様の結果を得た. また、20°C の場合、他の温度に比較して大きな粒子径を示した. そこで、これらの点の解明も含めてミセルの形状について検討した (Fig. 7). ミセルが球状であり、ミセル間に相互作用が働かない場合、拡散定数の逆数値 (D^{-1}) は散乱ベクトル (q) に依存しないことが知られている.^{11,28)} 20°C の場合、15 g dl⁻¹ 濃度の D^{-1} は q に依存し、ミセルの球状からのずれ、あるいは、ミセル間の相互作用が示唆された. 一方、30°C 及び 50°C での D^{-1} は q に依存せず、ミセルは球状であることが分かった. なお、他のプル

TABLE II. Effects of Temperature and Concentration on Diffusion Coefficients (D) and Hydrodynamic Radii (R_h) of Pluronic L-64

Temp. (°C)	Conc. (g dl ⁻¹)	D (cm ² s ⁻¹ × 10 ⁷)	R_h (nm)
20	10.0	2.06	10.4
	15.0	2.06	10.4
	20.0	1.91	11.2
30	2.0	9.94	2.8
	3.5	6.47	4.3
	7.0	3.16	8.8
	10.0	3.66	7.6
50	0.6	5.70	7.6
	1.0	4.51	9.6
	3.5	4.92	8.8
	7.0	5.09	8.5

Fig. 7. Reciprocal of Diffusion Coefficient as a Function of Scattering Vector

●, 20°C (15 g dl⁻¹); ○, 30°C (10 g dl⁻¹); ◐, 50°C (1.0 g dl⁻¹); ⊙, 30°C (3.5 g dl⁻¹).

ロニッ系界面活性剤においても球状ミセルの形成が示唆されている。²⁰⁾ また、30°Cにおける D^{-1} は、会合数及びミセル粒子径が急激に変化する濃度前後についてのものであるが、 D^{-1} は q に依存しないことから、多分子ミセルを形成した後は、その形状（球状）を変化させないことが明らかとなった。

結 論

プルロニック L-64 のミセル形成及びミセル構造に及ぼす温度及び濃度の影響について検討した。その結果、温度が低い場合、単分子ミセルの形成に始まり、その後徐々に会合状態を変化させ、多分子ミセルを形成することが明らかとなった。また、温度が高い場合、多分子ミセルを形成した後、会合数が著しく増加する過程を経て一定の会合状態に到達することが明らかとなった。すなわち、L-64 は著しく温度、濃度の影響を受ける界面活性剤であることが示唆された。L-64 は所定の温度、濃度において、可溶化能の高い他の非イオン界面活性剤、例えば Tween 80 や Triton X-100 と比較して、²⁴⁾ ミセル粒子径が約 2 倍の大きさであり、かつ、低毒性、低刺激性なため医薬用の可溶化剤、乳化剤として十分期待の持てる界面活性剤であると思われる。本研究の知見は、プルロニック系界面活性剤による可溶化並びに乳化製剤を調製する上での基礎的かつ重要な情報となり得るものと考えられる。

引 用 文 献

- 1) 山下雄也, 染料と薬品, **31**, 59 (1986).
- 2) 刈米孝夫, 油脂, **44**, 92 (1991).
- 3) S. Miyazaki, C. Yokouchi, T. Nakamura, N. Hashiguchi, W. M. Hou, M. Takada, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1801 (1986).
- 4) K. N. Prasad, T. T. Luong, A. T. Florence, J. Paris, C. Vaution, M. Seiller, F. Puisieux, *J. Colloid Interface Sci.*, **69**, 225 (1979).
- 5) M. Almgren, J. Alsins, P. Bahadur, *Langmuir*, **7**, 446 (1991).
- 6) N. K. Reddy, P. J. Fordham, D. Attwood, C. Booth, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **86**, 1569 (1990).
- 7) E. Zhou, B. Chu, *Macromolecules*, **21**, 2548 (1988).
- 8) 阿部正彦, 徳岡由一, 内山浩孝, 荻野圭三, 油化学, **39**, 565 (1990).
- 9) M. Abe, H. Uchiyama, T. Yamaguchi, T. Suzuki, K. Ogino, J. F. Scamehorn, S. D. Christian, *Langmuir*, **8**, 2147 (1992).
- 10) 木下一彦, 御橋廣眞, “蛍光測定, 生物科学への応用,” 学会出版センター, 東京, 1985, p. 87.
- 11) Y. Saito, M. Abe, T. Sato, *Colloid Polym. Sci.*, **271**, 774 (1993).
- 12) A. Malliaris, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **27**, 153 (1987).
- 13) K. Kano, Y. Ueno, K. Umakoshi, S. Hashimoto, T. Ishibashi, T. Ogawa, *J. Phys. Chem.*, **88**, 5087 (1984).
- 14) 田村善蔵, 太幡利一, 保田和雄, “けい光分析,” 講談社, 東京, 1976, p. 76.
- 15) M. Kodama, M. Miura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **45**, 2265 (1972).
- 16) K. Meguro, K. Ikeda, A. Otsuji, M. Taya, M. Yasuda, K. Esumi, *J. Colloid Interface Sci.*, **118**, 372 (1987).
- 17) J. P. S. Cabral, A. R. W. Smith, *J. Colloid Interface Sci.*, **149**, 27 (1992).
- 18) M. Kodama, Y. Kubota, M. Miura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **45**, 2953 (1972).

- 19) 高分子学会編, “高分子の分子設計,” 培風館, 東京, 1972, p. 143.
- 20) J. C. Gilbert, C. Washington, M. C. Davies, J. Hadgraft, *Int. J. Pharm.*, **40**, 93 (1987).
- 21) 阿部正彦, 後藤正樹, 荻野圭三, 油化学, **39**, 351 (1990).
- 22) M. Ikemi, N. Odagiri, S. Tanaka, I. Shinohara, A. Chiba, *Macromolecules*, **15**, 281 (1982).
- 23) 上野 實, 浅野浩志, 高橋正樹, 丸井理恵, 田端勇仁, 日本界面医学会雑誌, **19**, 28 (1988).
- 24) A. A. AL-Saden, T. L. Whateleg, A. T. Florence, *J. Colloid Interface Sci.*, **90**, 303 (1982).
- 25) R. R. Balmbra, J. S. Clunie, J. M. Corkill, J. F. Goodman, *Trans. Faraday Soc.*, **60**, 979 (1964).
- 26) P. Bahadur, T. N. Nagar, Y. K. Rao, *Tenside Deterg.*, **29**, 121 (1992).
- 27) Z. Zhou, B. Chu, *J. Colloid Interface Sci.*, **126**, 171 (1988).
- 28) K. Ogino, M. Nakamae, M. Abe, *J. Phys. Chem.*, **93**, 3704 (1989).
- 29) P. Bahadur, K. Pandya, *Langmuir*, **8**, 2666 (1992).