Accounts of Materials & Surface Research

Structural property and solution behavior of arginine oleate with a large amount of water

Teruhisa Kaneko

L.V.M.C. Inc. / RIST, Tokyo University of Science Toshima, Tokyo 170-0003 / Noda Chiba 278-8510 <u>tek-lvmc@aria.ocn.ne.jp</u>

Structural properties and solution behaviors of arginine oleate (ArgOA) were investigated by means of various instruments such as small angle X-ray scattering device, tensiometer and etc. In spite of the fact that ArgOA is a single-chained amphiphilic substance, it has been found to

have a characteristic to form lamellar liquid crystal (LLC) over a wide range of temperature and concentration. It has been concluded that a structural characteristic as a result of a cis-type double bond of oleic acid and a structural balance with L-arginine are inevitable in the formation of LLC. It has been also confirmed that ArgOA is able to form a lamellar liquid crystalline structure having a large amount of water. According to these results, it is expected that ArgOA can contribute significantly to a preparation of stable vesicle solution as well as a design of pharmaceutical and cosmetic formulations with highly moisturizing/skin penetrating abilities.



Keyword: arginine oleate, lamellar liquid crystal, surface tension, phase diagram, vesicle

Brief Personal History of Author

Teruhisa Kaneko is currently Representative Director of L.V.M.C. Inc. and Visiting Professor of Research Institute for Science & Technology (RIST) at Tokyo University of Science. In 2001, he received his Ph.D. in Engineering from Tokyo University of Science. He was a research scientist in the laboratory of Professor K.Shinoda at Yokohama National University from 1985 to 1986 and in the laboratory of Professor D.F.Evans at University of Minnesota from 1987 to 1988, studying characteristic properties of natural/synthetic lipids and surfactants membranes. He is an expert of liposome, microemulsion and



emulsion using lipids and has launched various skin care products. He won several awards including "Excellent Paper Award" at Japan Research Institute of Material Technology. He is now focusing on the studies for an effect of rare lipids such as β -sitosteryl sulfate in various lipids membranes at Tokyo University of Science.

高含水アルギニンオレエートの構造特性と溶液挙動

金子 晃久

株式会社 L.V.M.C./東京理科大学総合研究院

1. はじめに

不飽和脂肪酸は、生体内においてエネルギ ー源としてだけではなく生体膜の主要構成成分 としても重要な役割を果たしている[1-3]。生 体膜の流動性はその特徴的な動的構造に影響 され、不飽和脂肪酸であるオレイン酸に依存し ていることはよく知られている[4-8]。オレイン 酸は、その分子内の C9 位に二重結合を、また 自由に回転するメチレン基を両端に持ち、比較 的自由に屈曲できるシスーモノエン不飽和脂肪 酸の代表的なものの一つである(Fig.1)。



Figure 1. Chemical structure of oleic acid.

一方、従来より用いられてきたオレイン酸はその 純度が低かったため、オレイン酸そのものの基 礎物性研究のみならず、医薬品、香粧品、バイ オサイエンスなどのスペシャリティケミカル分野 への応用にも限界があった。しかし、近年純度 99%以上の品質のものが安定供給されるように なり、その基礎的物性の解析「9-13]およびそ の誘導体である非イオン界面活性剤の基礎物 性[14-16]、さらには薬物の経皮吸収促進効 果などが多数報告されている[17-20]。これら の研究から、オレイン酸で観察される物理化学 的現象は、疎水部のシス型二重結合に基づい た大きな空間実体容積[21、22]によるものが 多いと考えられる。ちなみに、オレイン酸の融点 は α 体が13.4 °C、 β 体が16.3 °C である。 一 方、オレイン酸と同一の炭化水素鎖長を有する ステアリン酸の場合は69.6℃である。

L-アルギニンは生体内の塩基性必須アミノ酸の一つであり、水溶液のpHに依存して4つの

Acc. Mater. Surf. Res. 2022, Vol.7 No.3, 112-118.

イオン解離状態を示す(Fig.2)[23, 24]。たと えば、ω位のグアニジル基は強い塩基性を示 すために対イオンを持つ物質を中和するが、α 位のアミノ基とカルボニル基は自己双極子双性 イオンを形成する特性を有する。アミノ酸の多く が200℃以上の高い融点を示すのは、この双 性イオンが無機塩に類似したイオン性結晶構造 を形成するためと言われている[23]。アミノ酸 は香粧品の分野においても極めて有用な物質 であり、肌の保湿機能を司る重要な役割を持つ ことも分かっている[25]。

これらの各分子配向特性から、オレイン酸とL ーアルギニンを組み合わせることで、リン脂質に 類似したバイオミメティックフィルムを形成する新 たな機能が期待できる。

本稿では、高純度(99.9%)のオレイン酸と 対イオンを L-アルギニンとした両親媒性物質 (アルギニンオレエート、以下 ArgOA)の構造特 性とその溶液挙動について紹介する[26]。



Figure 2. Four different dissociate ion states of L-arginine depending on pH.

2. アルギニンオレート/水系の相挙動

Fig.3 に、L-アルギニンとオレイン酸のモル比 が1/1の ArgOA/水系の相図を示す。この図 の領域(A)に見られるように、ArgOA の極めて 高濃度領域では水和固体が存在するが、ラメラ 液晶相(LLC)への転移温度(Tc)は水の濃度の 増加に伴い急激に低下し、6 wt%を超えると 0 ℃以下となりほとんどの領域がLLCに占めら れた。これは対イオンであるL-アルギニンが水 和されやすいためであり、同様の現象はステア リン酸カリウムやジパルミトイルホスファチジルコ リンなどでも見られる[27]。





LLC: Lamellar Liquid Crystal, W: Aqueous solution, Tc: Phase transition temperature (LLC-Hydrated crystal)

Fig.3 の25 ℃における組成(a)と(b)の偏光顕 微鏡像をFig.4 に示す。図のLLC+W 領域(a) の15 wt%ArgOA 水溶液では水中に分散した 粒子にマルテーゼクロス(マルチラメラベシクル) が観察され、LLC 領域(b)の35 wt%ArgOA 水溶液ではラメラ液晶像を観察できた[28]。



Figure 4. Polarized microscopic observation: (a) 15 wt%ArgOA aq.solu, (b) 35 wt%ArgOA aq.solu.

Acc. Mater. Surf. Res. 2022, Vol.7 No.3, 112-118.

また、LLC 領域の広さからも、ArgOA から成 る LLC はその構造体中に多量の水を保持でき ると考えられる。そこで、この構造体を更に詳細 に解析するために Fig.3(c)に相当する ArgOA /水の重量比が1/1の小角 X 線散乱(SAXS) 回折(25 ℃)結果を Fig.5 に示す。



Figure 5. Small angle X-ray diffraction pattern (25 $^{\circ}$ C). ArgOA/Water (1/1, by weight).

SAXS 回折の1次ピークと2次ピークの散乱ピ ーク比は1:1/2となり、偏光顕微鏡像も含め LLC 構造であると確認できた。そこで、SAXS 回 折による LLC の面間隔(d)を測定した(Fig.6)。 なお、横軸は水の重量分率(Cw)とArgOA の重 量分率(Cao)の比(Cw/Cao)である。したがっ て、d の増加はLLC構造の親水部間に水分子 が分配されていくことを示す[29, 30]。



Figure 6. Interlayer spacing of LLC phase as a function of water : ArgOA weight ratio (Cw/Cao) at 25 $^{\circ}$ C.

Fig. 6 から明らかなように、d は Cw/Cao が 約0.3を超えるとほぼ直線的に増加し、約2を 超えると一定値に近づく。これは、それ以上の 水は構造体に入り込めず、水相として分離しLL C相と共存すること(LLC+W)を示す。つまり、 ArgOA が約70 %の水を含んだ LLC を形成す ることを意味すると同時に、生体膜の主要構成 成分であるレシチンより多量の水を保持する能 力があることも分かる[27,31]。したがって、 Fig.3のLLC+W 領域内の ArgOA ベシクルも、 ベシクル内に約70 %の水を保持でき、外相で ある水との比重差もより小さくなっていると考えら れる[30]。その結果の一例として、室温で1か月 以上分離などの生じない、比較的安定なベシク ル水溶液が得られている。このように、ArgOAは 一鎖型両親媒性物質であるにもかかわらず、分 岐鎖[32]または二鎖型[33]の両親媒性物質 のように高い LLC 形成能を有し、さらに多量の 水をその構造体に保持できることが分かった。こ のことは、対イオンとしてアルギニンの代わりに ナトリウムを用いたオレイン酸ナトリウム(NaOA) /水系、さらに、疎水部であるオレイン酸の代わ りにステアリン酸を用いたアルギニンステアレー ト(ArgSA)/水系での相挙動の比較からも理解 できる。つまり、ArgOA 系と異なり、NaOA 系で は相状態がラメラ液晶とヘキサゴナル液晶で占 められ、構造体内への水保持量も低い[26]。一 方、ArgSA 系でも相状態はラメラ液晶とヘキサゴ ナル液晶からなり、約60 ℃以下の広い範囲が 水和固体(α-ゲル)領域で占められている [26]。これらの比較結果からも、シス型二重結 合に基づく疎水部としての嵩高い構造を有する オレイン酸と双性イオンとしての強い分子間相 互作用を持つアルギニンを組み合わせた ArgOA の分子構造特性が高含水 LLC 形成に 適しているものと考えられる。

3. ArgOA 水溶液の希薄系での溶液物性

ArgOA の希薄溶液系での物性を知ることは、 ArgOA の界面化学的特性を理解する上で極め て重要である。ここでは、ArgOA 水溶液の表面 張力-濃度曲線によりその特性を紹介する (Fig.7)。Fig.7 から明らかなように、2か所の屈 曲点が存在する。同様な傾向は、プルロニック 系界面活性剤や二分子膜形成能を有する1,2 ージラウロイルホスファチジルグリセロールナトリ ウム塩(DLPG)の希薄水溶液においても報告さ れており、それらの屈曲点では相変化が生じて いると解析されている[34,35]。そこで、Fig.7 の2つの屈曲点を第1cmc(C1:3.0×10⁻⁴ M)、 第2cmc(C2:1.0×10⁻² M)とする。この2点 間の濃度領域に着目すると、図の写真に見 られるように C1 から溶液の外観に変化が生





-Surface tension [mN/m]

---- Transmittance [%] at 700 nm

じたため、C1、C2 付近も含めた溶液の透過 率を測定し、合わせて Fig.7にその結果を 示した。透過率 T を見ると、C1 から低下し 始め、C2 付近まで低下することが確認でき た。これは、C1付近からミセルあるいは高次 会合体が共存するものと推定される。そこで、 C1-C2 間の水溶液のフリーズフラクチャー 法による TEM (Transmission Electron Microscope) 観察を行なった(Fig.8)。この 写真より、ArgOA の1 mM(0.046 wt%)に おいて、10~50 nm と 200~300 nmの粒 子状物質(高次会合体と思われる)が観察 された。前述したように、C1からC2にかけ ての溶液の透過率の低下とArgOAの高い LLC形成能を考え合わせると、これらの高 次会合体はベシクルである可能性が高いと 思われる。これらの結果から、C1-C2間は ミセルーベシクル様高次会合体の共存領域 であると考えられる。



Figure 8. Transmission electron microscopic observation (ArgOA 1.0×10^{-3} M) in the region from C1 to C2 of Figure 7.

一方、C2付近からArgOA水溶液の粘性に 変化が見られた(Fig.9)。C2以下の濃度 領域における粘度は水の粘度に近い値を 示しているが、C2を超えると急激に上昇し た。この粘度の上昇はLLC領域への相転 移に基づくものと思われる。



Figure 9. Viscosity v.s. concentration of ArgOA at 25 $^{\circ}$ C.

これらのことから、ArgOAはその希薄溶液 領域から高次会合体を形成できる能力があ ることが分かった。

4. 高次会合体形成に対する Lーアルギニンの効 果

前述したように、ArgOA は一鎖型両親媒性物

質であるにもかかわらず特異的な相挙動を示し、 また極めて低濃度から高次会合体を形成するこ とが分かった。このArgOAの特異性は、疎水部 であるオレイン酸のシス型二重結合に伴う構造 特性のみならず、対イオンとしてのL-アルギニ ンの特性も大きく寄与しているものと解析した。 そこで次に、対イオンに着目して希薄溶液系で の高次会合体形成におけるアルギニンの効果 を紹介する。

ArgOA は脂肪酸セッケンであり、pH の変化 から対イオンの解離状態を推察することができ る。そこで、C1、C2 付近におけるArgOA水溶 液のpHと濃度の関係を検討した(Fig. 10)。



Figure 10. pH vs. concentration of ArgOA (25 °C).

- Surface tention [mN/m] + pH

この図から明らかなように、pHとArgOA濃度と の関係は表面張力-濃度曲線(Fig. 7 から転 記)と相関性があることが分かる。まず、C1付近 からpHがシャープに上昇し始め、さらにC2まで 濃度にほぼ比例して上昇した。pHはC2付近で 極大値を示し、その後pHは低下していくがその 減少は緩やかになり始めた。C2がLLC相への 相転移開始点であるとすれば、pHの変化は強 塩基性のアルギニンのグアニジルーオレイン酸 のカルボキシル基の結合部周囲の水和状態も 反映しているものと考えられ、会合状態との関 係も推定できると思われる。そこで、結合部周囲 の状態を検討するため、¹H-NMRを用いてア ミノ基プロトンの化学シフトを測定した(Fig. 11)。 この図より、前述のLLC への相転移開始点と考 えられる C2(0.01 M)付近から 0.1 M へ向けて ArgOAの濃度Cが増加すると、化学シフトは高 磁場側へとシフトした。一般に、相対的に電子





密度の高い原子の核は、より高磁場側に現れ、 相対的に電子密度の低い原子の核は、それより 低磁場に現れる。この定性的な化学シフトのル ール[36]に従うと、Fig.11 では、ArgOAの濃 度の増加に伴い、アミノ基(この場合はアルギニ ンのグアニジル基)の解離度が低下(電子密度 の偏りの低下)して電子密度が高くなり、アミノ基 プロトンはより高磁場側へ現れてくることを示す ものと考えられる。したがって、このことはpHの 変化が結合部周囲の水和状態も反映している と思われる。これらのことより、ArgOAの LLC 形 成は、その濃度の増加に伴い、近接したL-ア ルギニン分子間の二次元方向の(横方向の)相 互作用が強まり、結合部の水和能が低下するた め、L-アルギニングアニジル基結合部の解離 度が低下して(pHの低下)、疎水性相互作用は さらに加速され、より会合体形成に有利な環境 となり、結果として無限会合体であるLLCが形 成されるものと考えられる。

5. 結論

ArgOA は一鎖型両親媒性物質であるにもか

かわらず、広い温度および濃度領域で安定して LLC を形成する特性を持つことが見出された。 このLLC形成には、シス型二重結合を特徴とす るオレイン酸と双性イオンとして強い分子間相 互作用をもつL-アルギニンとの組み合わせに よる構造的なバランスが不可欠であることが分 かった。さらには、ArgOA は高い水分保持能を 有するLLC構造が形成できることも明らかとした。 以上の結果を踏まえると、工業的にも、ArgOA を応用することにより[37]、安定なベシクル水溶 液の調製、高い保湿能・皮膚浸透能を有する医 薬・化粧品製剤等の設計を可能にすることが期 待される。

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、SAXS 測定の機会お よびそれに関する貴重なご助言を頂きました東 京工業大学・浅井茂雄准教授、試料の調製等 にご協力いただいた日油株式会社・前田一仁 代表取締役をはじめとする研究所スタッフの 方々、研究全般に貴重なご助言をいただいた 東京理科大学・阿部正彦名誉教授/東京理科 大学・貝瀬千尋客員教授に心より深く感謝致し ます。

参考文献

- 1) S.Abrahamsson, I.Ryderstedt-Nahrungbauer, *Acta Crystallogr.*, **1962**, *15*, 1261-1268
- Ed.G.Weissman, R.Claiborne, Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology & Pathology, HP Publishing Co., Inc., New York, 1975
- C.Tanford, The hydrophobic effect, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1980
- 4) S.J.Singer and G.L.Nicolson, *Science*, **1972**, *175*, 720-731
- 5) M.Kito, Protein, Nucleic Acid, Enzyme, 1972, 17, 500-508
- 6) M.Kito, Biochemistry, 1977, 49, 1301-1315
- S.Ohnishi, Dynamic structure of biomembrane, Tokyo University publishing Co., Inc., Tokyo, 1981
- 8) K.Sato, M.Kobayashi, *Lipid structure and dynamics, Kyoritsu publishing Co., Inc.*, Tokyo,

1992

- M.Suzuki, T.Ogaki, K.Sato, J.Am.Oil Chem.Soc., 1985, 62, 1600-1604
- K.Ogino, M.Abe, Y.Goto, M.Goto, Y.Tanaka, T.Funada, J.Hirano, *J.Jpn.Oil Chem.Soc.*, **1990**, *39*, 398-404
- 11) K.Sato, J.Jpn.Oil Chem.Soc., 1995, 44, 702-712
- 12) M.Suzuki, Hyomen(Surface), 2000, 38, 24-39
- 13) P.Tandon, G.Förster, R.Neubert, S.Wartewig, J.Molecular Structure, 2000, 524, 201-215
- 14) M.Abe, K.Takasaka, Y.Yoshihara, K.Ogino,K.Sato, M.Suzuki, *Shikizai*, 1995, 68, 135-141
- K.Takasaka, Y.Yoshihara, Y.Hirano, H.Sakai, K.Saito, M.Suzuki, M.Abe, *Material Technology*, **1995**, *13*, 279-285
- S.Yomo, Y.Endo, T.Kato, T.Seimiya,
 M.Iwahashi, Y.Kidera, M.Suzuki, *J.Jpn.Oil* Chem.Soc., **1997**, 46, 873-878
- 17) N.Hashida, M.Murakami, H.Yoshikawa,
 K.Takada, S.Muranishi, *J.Pharm.Dyn.*, 1984,
 7, 195-203
- 18) B.W.Barry, J.Controlled Release, 1987, 6, 85-97
- B.Ongpipattantakul, R.R.Burnette, R.O.Potts, M.L.Francoeur, *Pharm. Res.*, **1991**, *8*, 350-354
- F. Yamashita, H.Bando, Y.Koyama,
 S.Kitagawa, Y.Takakura, M.Hashida,
 Pharm.Res., **1994**, *11*, 185-191
- 21) D.M.Small, J.Lipid Research, **1984**, 25, 1490-1500
- 22) M.R.Rich, *Biochim.Biophys.Acta*, **1993**, *1178*, 87-96
- 23) T.Takehara, *Fragrance Lournal*, **1988**, *89*, 69-76
- 24) Chemical Handbook I, Maruzen Co., Inc., 2003, 609
- 25) T.Hirano, Fragrance Journal, 1989, 17, 14-19

- 26) T.Kaneko, Y.Yamaoka, C.Kaise, M.Orita,
 H.Sakai and M.Abe, *J.Oleo Sci.*, 2005, 54(6),
 325-333
- 27) M.Kodama, S.Seki, *Progress in Colloid and Polymer Sci.*, **1983**, *68*, 158-162
- A.Kafle, T.Misono, A.Bhadani, K.Sakai, C.Kaise, T.Kaneko, H.Sakai, *Colloids & Surfaces B*, 2018, 161, 59-66
- 29) T.Kaneko, H.Sagitani, *Colloids and Surfaces*, 1992, 69, 125-133
- 30) T.Kaneko, C.Kaise, M.Akamatsu, A.Kafle and
 - H.Sakai, *Material Technology*, **2020**, *38(2)*, 25-34
- 31) D.M.Small, *J.Lipid Research*, **1967**, *8*, 551-557
- 32) T.Suzuki, H.Takei, S.Yamazaki, J.Colloid & Interface Sci., **1989**, 129, 491-500
- 33) H.Kunieda, J.Chem.Soc.Jpn., 1977, 2, 151-156
- 34) Y.Saito, Y.Kondoh, M.Abe, T.Satoh, Yakugakuzasshi, **1994**, 114, 325-332
- 35) Nihonkagakukai, Koroido Kagaku III, Tokyokagakudoujin, **1996**, 145-149
- 36) R.M.Silverstein, G.C.Bassler, T.C.Morril, Spectrometric Identification of Organic Compounds, 4th ed, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1981**
- 37) C.Kaise, T.Kaneko, J.Soc.Cosmet.Chem.Jpn., 2006, 40(4), 269-277