

単分子膜の累積とその層数の簡単な測定法

システム工学科

松井義和

1. はじめに

水面上に浮かぶ単分子膜を固体基板上に一層ずつ移し取る技術は I. Langmuir と K. B. Blodgett らによって研究、開発された。現在では 2 人の名を取って Langmuir-Blodgett (LB) 法と呼ばれている。また、このようにして固体基板上に移し取られた累積膜を一般に LB 膜と呼ぶ。LB 膜は水面上に規則正しく配列、配向した両親媒性分子を一層ずつ積み重ねるため、分子オーダの膜厚と分子の配向、配列を同時に制御できるという大きな利点を有している。この意味において、LB 法は分子レベルでの秩序構造を有する有機超薄膜を得る最も有力な方法である。現在ではエレクトロニクス、オプトエレクトロニクス、さらにはバイオエレクトロニクスなど、様々な分野への応用が期待され、種々の研究が行なわれている。

筆者の所属する研究室では、現在、超音波や表面プラズモンなど物質界面（表面）を伝搬する波、表面波を利用したバイオセンサの開発を研究テーマの 1 つとしている。このバイオセンサは表面波の伝搬面上にある被測定物と波の相互作用によって生ずる波の物理的変化、すなわち超音波センサにおいては波の振幅、位相、あるいは周波数の変化を、また、表面プラズモンセンサにおいては表面プラズモン共鳴の発生する光の入射角度とその変化を測定することにより被測定物を特定する。あるいは被測定物の物理的状態変化、化学的変化を実時間で観測するものです。このバイオセンサの検出部には一般に被測定物と特異的に結合する。あるいは選択的に反応する物質を固定化した膜（感応膜）を持っている。感応膜の良否はセンサの感度、定量的測定、測定値の再現性を大きく左右する。感度向上には感応膜中に含まれる感応物質が多い程よい。また定量化、再現性の向上には感応物質が均一に分布していることが望ましい。

ここに報告する LB 膜の累積実験は、このようなバイオセンサの高感度化、高安定化を図る方法の 1 つとして、LB 膜を感応物質を固定化する膜として利用することを目的に実施したものである。LB 法で単分子膜を累積するためには種々の条件が必要であるが、筆者にとって未知のことも多く、ここでは一般的な LB 膜とはどんな膜であるか、どのように形成、累積されるか、また、累積装置の操作条件により膜の形成、あるいは累積に及ぼす影響について実験結果をもとに考える。最後に累積した膜の層数（膜厚）を簡便に測定する 2 つの方法について、その実験結果と合わせて示す。

2. 単分子膜の形成

石油などの炭化水素は水に対する親和力が最も弱い、すなわち、最も疎水性の強い化合物であって、水に接するよりも、それ自身で凝集する傾向のほうが強く、水に馴染まないばかりか、膜として水面上に広がる性質もない。一方、オレイン酸は長い炭化水素鎖を持っているために、水に対しては不溶性であるが、その末端にカルボキシル基のような親水性の原子団があるため、水に対する付着性が著しく増して、水面上に薄く広がる性質がある。このように水に不溶性の大きな疎水基を有し、それと同時に分子内に強い親水基を含む構造の物質（両親媒性物質）が水面におか

れた場合、その分子は親水基を水面に接し、疎水基を水面から遠ざけるような配向を取る。そして、その物質の水に対する付着力が、それ自身の凝集力より大きい場合には全ての分子が水面に引き付けられて、物質分子が一層だけ並んだ単分子膜を形成する。ところで、疎水基である炭化水素鎖どうしの凝集力は鎖の長さ（炭素原子数）と共に増す。したがって両親媒性物質であっても、疎水基部分があまり短くと親水基の効果がこれに打ち勝って、水に溶解する。酢酸やメタノール、エタノール等が水に溶けるのはこのためである。実際には炭素数が16~20の場合が最も安定な単分子膜ができるとされている。また、逆に親水性の極めて強い硫酸基やスルホン基を一端にもつ物質は炭化水素鎖がかなり長い場合にも親水性のほうが疎水性に勝るために水に溶け出してしまい、安定した単分子膜を形成できないとされている。図1は単分子膜の形成過程を模式的に示したものです。クロロホルムやベンゼンなどの揮発性の溶媒にステアリン酸やアラキジン酸などの膜物質を溶かした膜材料（展開液）をマイクロシリンジに取り、清浄な水などの下層液の表面に静かに滴下すると（a）、滴下直後は（b）の状態であるが、やがて溶媒が蒸発し（c）、（d）の状態となる。これをバリアで圧縮すると、（e）のように単分子膜が形成される。

3. 単分子膜の累積（装置と累積）

現在、最も一般的な単分子膜の累積法は垂直浸漬法と言われる方法です。その基本は水面上に展開した単分子膜を一定の表面圧で圧縮しながら、膜面を通過して清浄な固体基板を垂直に上下させることにより膜を基板面上に移し取るものです。使用した単分子膜累積装置（共和科学社製）を図2に示す。この装置は膜の圧縮及び膜の圧力検出が連動し操作は自動である。また、X-Yレコーダに接続することにより、表面圧と膜の面積（ $\pi-A$ ）の曲線を描くことができる。表面圧の検出はプレートによって表面張力として測定される。表面張力は $\pi = \gamma_w - \gamma$ で表わされる。ここで π は表面圧、 γ_w は水の表面張力、 γ は単分子膜の表面張力である。バリアはテフロン製であり、この移動はバリア駆動モータによって行なう。また、膜の面積はバリアの位置によって算出される。膜をバリアで圧縮していったときの表面圧と膜面積の関係を求めた一般的なものを図3に示す。横軸は分子占有面積、縦軸は表面圧である。a-bは気体膜といわれる状態であり、b-cは気液2層共存する液化状態、c-dは液体膨張膜、d-eは中間膜、e-fは液体凝縮膜、f-gは固体凝縮膜とそれぞれ呼ばれている。g以上の圧縮を行なうと膜は崩壊する。一般に膜の累積はf-g間で行なわれるが、この累積過程の一般形を図4に示す。累積基板の表面が疎水性である場合には図4（a）、あるいは（b）のように基板下降時に累積され、上昇時には（a）のように累積される場合と、（b）のように累積されない場合とがある。また、基板が親水性の場合には下降時は累積されず、上昇時に累積され、

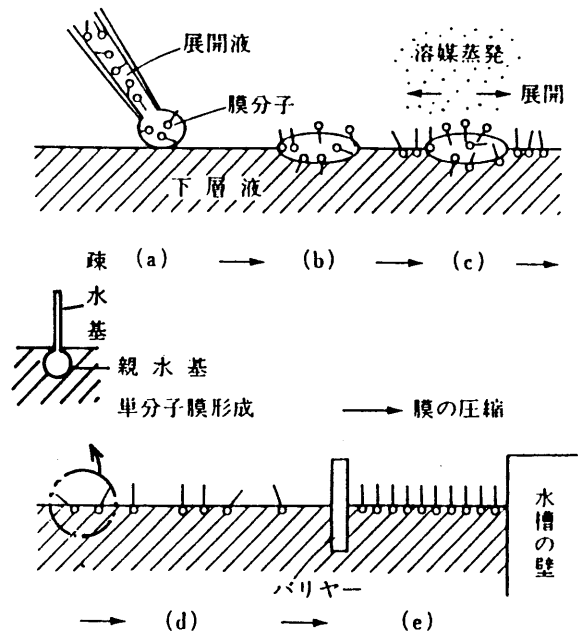


図1 単分子膜の形成

あり、この移動はバリア駆動モータによって行なう。また、膜の面積はバリアの位置によって算出される。膜をバリアで圧縮していったときの表面圧と膜面積の関係を求めた一般的なものを図3に示す。横軸は分子占有面積、縦軸は表面圧である。a-bは気体膜といわれる状態であり、b-cは気液2層共存する液化状態、c-dは液体膨張膜、d-eは中間膜、e-fは液体凝縮膜、f-gは固体凝縮膜とそれぞれ呼ばれている。g以上の圧縮を行なうと膜は崩壊する。一般に膜の累積はf-g間で行なわれるが、この累積過程の一般形を図4に示す。累積基板の表面が疎水性である場合には図4（a）、あるいは（b）のように基板下降時に累積され、上昇時には（a）のように累積される場合と、（b）のように累積されない場合とがある。また、基板が親水性の場合には下降時は累積されず、上昇時に累積され、

以後は下降、上昇の両操作で累積される場合と、上昇時のみ累積される場合とがある。

(a) のように下降、上昇の両行程で膜が累積されるものをY膜、

(b) のように下降時のみに累積される膜をX膜、また、(c) のように上昇時のみに累積される膜をZ膜という。

このように膜のつき方に影響を及ぼす因子として、主に次のようなものがある。

- 1) 膜物質の化学構造、
- 2) 下層液のPHや含有塩類の種類、濃度、
- 3) 表面圧及び温度、
- 4) 累積基板の種類と表面状態、
- 5) 累積基板の上昇、下降速度

4. 単分子膜の作製条件と膜の状態

これまでは単分子膜累積に関する一般的な事柄を述べた。ここでは実際に行なった実験結果を基に、膜作製条件と単分子膜の状態、累積された膜について考える。

4. 1 膜圧縮速度と $\pi-A$ 曲線 ここでは膜の圧縮速度が単分子膜の形成にどのような影響を与えるかについて実験結果を基に考える。図5、図6はいずれも膜物質にアラキシン酸メチル ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$) を用いたときの $\pi-A$ 曲線であり、横軸は1分子当たりの占有面積、縦軸は表面圧 π である。展開液はクロロホルム(溶媒) 50 ml に対しアラキシン酸メチル: 13.6 mg、トリメチルステアリルアンモニウムクロリド: 3.8 mgを加えたもので、展開量、その他実験条件は図中に示す通りである。また、実験は温、湿度がコントロールされたクリーンルーム内で行なった。図5は膜圧縮速度20 cm^2/min として、膜崩壊に至まで連続して圧縮したときの $\pi-A$ 曲線、図6は膜圧縮速度を100、50、20 cm^2/min とそれぞれ変え、表面圧30 dyne/cm において、圧力を一定に保持したまま、いずれも1時間放置した後、さらに圧縮したものである。図中の2点破線はいずれも極限面積(1分子当たりの占有面

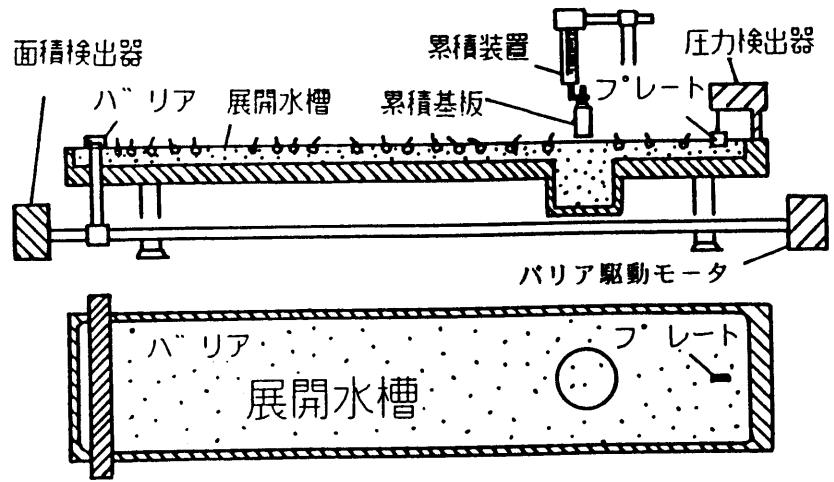


図2 単分子膜累積層置

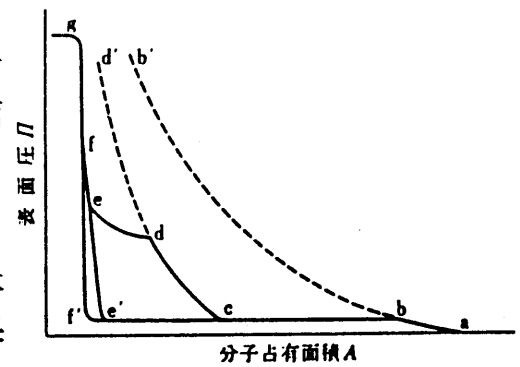


図3 表面圧-分子占有面積の一般形

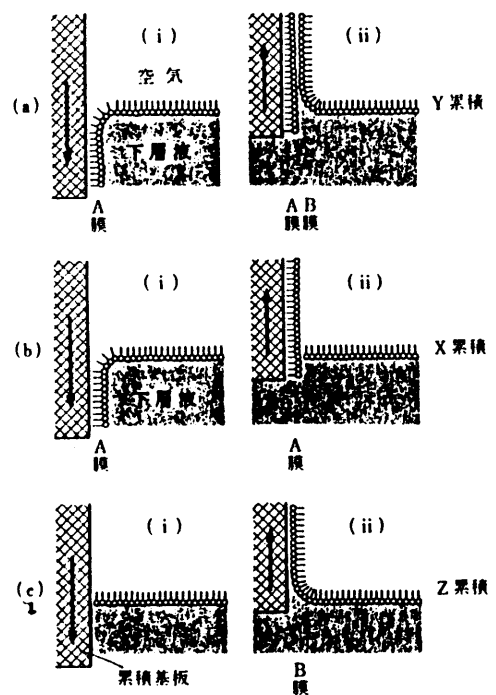


図4 単分子膜の累積過程

積)を求めるために記したもので、 $\pi-A$ 曲線の表面圧が直線的に変化する部分を $\pi=0$ まで外挿し、 $\pi=0$ における1分子当たりの占有面積が極限面積である。この値は図5では23.4 [\AA^2]と読めるが、図6における圧縮速度20 cm^2/min の結果(点a)は21.8 [\AA^2]、圧縮速度が50, 100 cm^2/min の結果(点b)はほぼ同じ22.0 [\AA^2]となった。この結果より図5における点Sにおいて、単分子膜にはまだ多少の空隙が存在することが予想される。図7は圧縮による単分子膜の形成過程を想像し、これを模式的に描いたものである。展開分子を圧縮していくと、分子間に働く凝集力などにより分子どうしが集まって小さな島を形成し、水面上にバラバラに浮かんで存在していたものが、圧縮の進行にともない分子の島と島が結合し、さらに大きな島へと成長し、やがて島は1つとなり均質な単分子膜になる〔(a)~(c)〕と仮定したものである。しかし、圧縮速度が速い場合には(a)~(b)の過程のうち、つまり、膜内に多少の空隙が存在している状態で表面圧が上昇したと考えられる。したがって、この過程が正しいとすれば、図5の条件の場合は圧縮速度をもう少し遅くすれば良いことになる。また、 $\pi-A$ 曲線は膜を累積する上で重要な資料となるが、実験結果はこの $\pi-A$ 曲線が圧縮速度によって異なっている。これは看過できない問題である。ここに最適な圧縮速度を見い出さなければならない理由の1がある。

4. 2 下層水と $\pi-A$ 曲線 図8は下層水に蒸留水を用いた場合と蒸留水に塩化カルシウムを加えたものを用いた場合のそれぞれの $\pi-A$ 曲線を示す。膜物質はアラキシン酸メチル、下層水の蒸留水のPHは5.6、蒸留水に加えた塩化カルシウムの量は $3 \times 10^{-4} \text{mol/l}$ このときのPHは蒸留水と同じ5.6であった。また、圧縮速度は20 cm^2/min 、その他実験条件は図中に示す通りである。下層水に塩化カルシウムが入ったことによりアラキシン酸メチル1分子当たりの占有面積が増加したことがわかる。図中のa点の表面積は21.3 [\AA^2]、b点の表面積は22.2 [\AA^2]であり、1分子当たり2.9 [\AA^2]増加したことになる。これは水中に溶け込んだ塩化カ

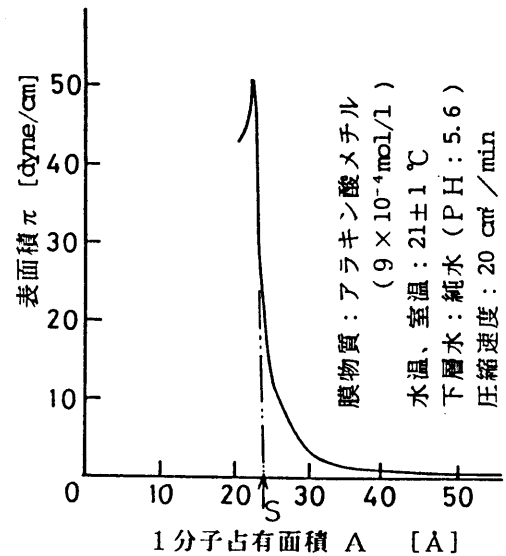


図5 アラキシン酸メチル単分子膜の $\pi-A$ 曲線

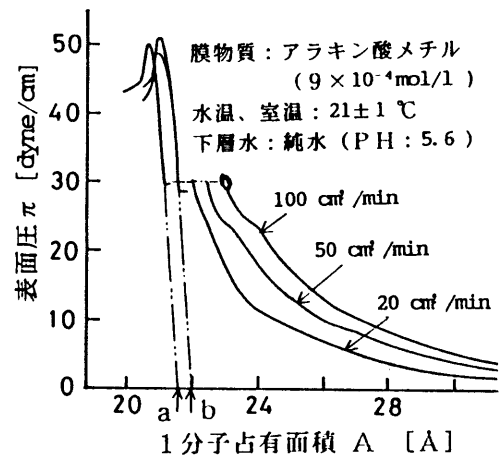


図6 膜圧縮速度と $\pi-A$ 曲線

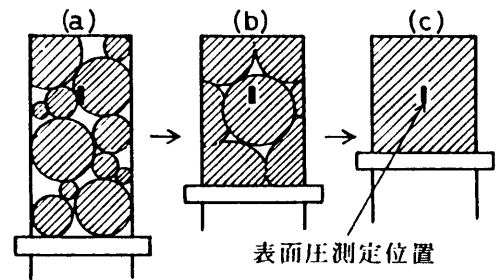


図7 単分子膜形成過程の模式図

ルシウムの Ca^{2+} がアラキシン酸メチルの親水基であるカルボキシル基に結合し、面積を増大させたと思われる。また、表面圧の最大値もわずかに増大していることから、膜の剛性がいくらか増大したといえる。

4. 3 累積速度と累積比 アラキシン酸メチル単分子膜のガラス基板上への累積における膜累積速度と累積比の関係を求めた。図9、図10はいずれも展開層中の単分子膜をガラス基板上に移し取ること（累積）によって生ずる展開層中の単分子膜占有面積の変化を求めたものである。横軸は時間、縦軸は展開膜占有面積である。図9は累積基板速度を 50 mm/min 、図10は 5 mm/min とした場合の実験結果である、図中上の折れ線は累積基板の上、下変位の様子を横軸を時間で表わしたものです。累積はいずれも表面圧 30 dyne/cm において、スライドガラスに累積した。また、下層水は蒸留水、温度は 21°C である。それぞれの累積結果を表1、表2に示す。累積比は展開層中の単分子膜占有面積の減少に対する基板に累積された膜の面積（基板下降時の下層液中への浸入面積より換算）の割合である。累積基板は親水性であるので、基板の上昇過程では基板速度にあまり関わりなく、ほぼ同程度累積されていることが分かる。しかし、基板の下降過程では基板速度が速くなると、ほとんど累積されていないことが分かる。

5. 単分子膜累積層数の測定法

累積に用いたアラキジン酸メチルの長さは約 2.5 nm と言われている。従って、これを累積した単分子膜の1層あたりの膜厚は 2.5 nm と考えられる。このように薄い膜の膜厚を計ることは一般に難しい。最近ではトンネル顕微鏡、あるいは原子間力顕微鏡などにより単分子膜の表面や膜厚の観測が行なわれるようになった。しかし、これら装置は高価、大掛かりであると共に操作はそれほど簡単ではない。ここでは基板に累積された単分子膜が何層累積されているかを実験室レベルで簡便に計ることができる2方法について述べる。

5. 1 光の多重反射を用いる方法 図11はこの測定方法を示したものである。波長 633 nm のレーザー光は $f = 20 \text{ cm}$ のレンズで絞られ、鏡となる銀膜面と観測試料の単分子膜を銀膜面上に累積した基板間で多重反射した後、迷光をカットする絞りを通して、レンズの焦点位置にある光検出器に入る。レーザー光 I_0 は単分子膜を

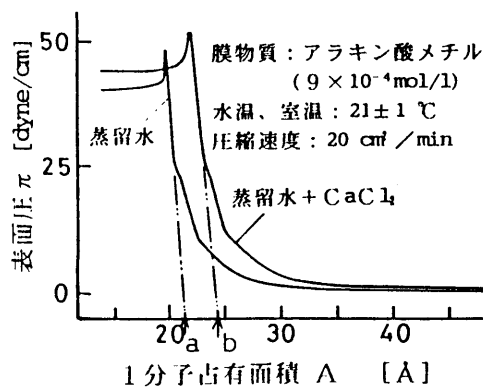


図8 下層水と $\pi - A$ 曲線

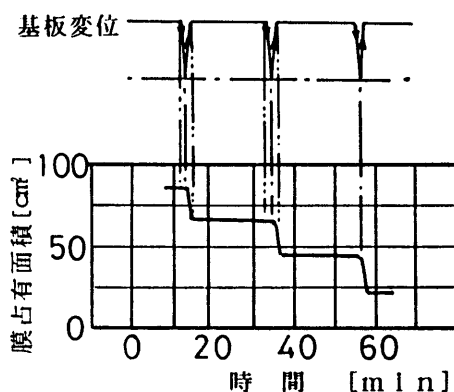


図9 膜の累積と膜の占有面積変化 (累積基板速度 50 mm/min)

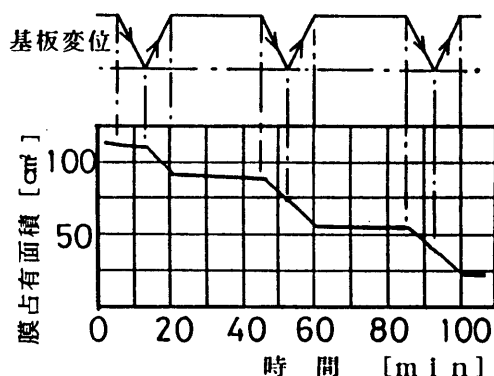


図10 膜の累積と膜の占有面積変化 (累積基板速度 5 mm/min)

通過する度に膜による吸収、散乱により減衰する。光検出器に入る光を I とすれば、 $I = I_0 e^{-\alpha x}$ と表わされる。ここで α 、 x はそれぞれ光の膜への入射角で基準化した膜の吸収係数と膜の層数である。図 12 は累積層数をパラメータに、反射回数と光検出器出力の関係を示したものである。反射回数が増加するほど感度が向上し、この方法で膜層数の検出が可能であることが分かる。なお、このときの入射角 θ は 45 度である。

5.2 表面プラズモンを用いる

方法 この方法は先に示した多重反射を用いる方法より構成が少し複雑になるが、感度は格段に向上する。図 13 はこの方法の構成を示したものである。レーザー光は偏光板で P 波にした後、ビームスプリッターでセンシング光 I_s とリファレンス光 I_o に分割される。センシング光 I_s はプリズムと金属界面で反射し、 I_s' となって光検出器で検出される。除算器で I_s' を I_o で割ることにより入射光の変動を除去している。光が屈折率の大きなプリズムから屈折率の小さな金属膜（ここでは膜厚 50 nm の銀を用いている）へ臨界角以上で入射すると、光はその界面で一般に全反射されるが、このとき界面から深さ方向に指数関数的に減衰するエバネッセント波が滲み出る。このエバネッセント波の界面に平行な波数成分 $(\omega/c)n_p \sin\theta$ と表面プラズモンの波数 $((\omega/c)[\epsilon_m \epsilon_s / (\epsilon_m + \epsilon_s)])^{1/2}$ ここで ω 、 c は光の角振動数と速度、 n_p はプリズムの屈折率、 θ は入射角、 ϵ_m 、 ϵ_s はそれぞれ金属の誘電率とこれに接する媒質の誘電率である）が一致すると、金属と媒質界面で表面プラズモン共鳴が生じる。このとき入射光のエネルギーは表面プラズモン (SP) の励起に使われるため、全反射領域でありながら反射光は減衰する。ここで被測定物となる媒質がエバネッセント波の浸透深さに比べて十分に厚い場合

表 1 累積結果 1
(基板速度 50mm/min)

累積過程	減少面積 [cm ²]	累積比
1	↓	0.0
	↑	19.0
2	↓	4.5
	↑	16.75
3	↓	5.0
	↑	17.5

基板表面積 = 21.964 [cm²]

表 2 累積結果 2
(基板速度 5mm/min)

累積過程	減少面積 [cm ²]	累積比
1	↓	0.0
	↑	18.5
2	↓	16.25
	↑	17.0
3	↓	16.25
	↑	17.0

基板表面積 = 21.094 [cm²]

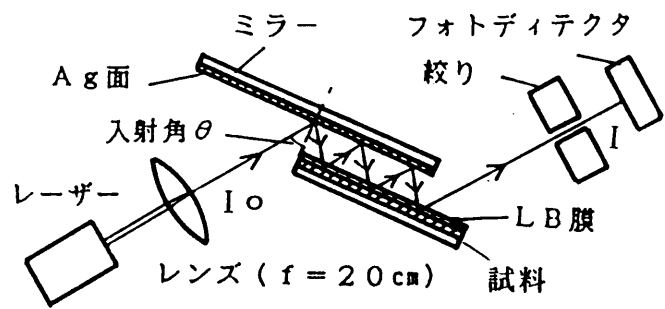


図 11 光多重反射による膜厚測定法

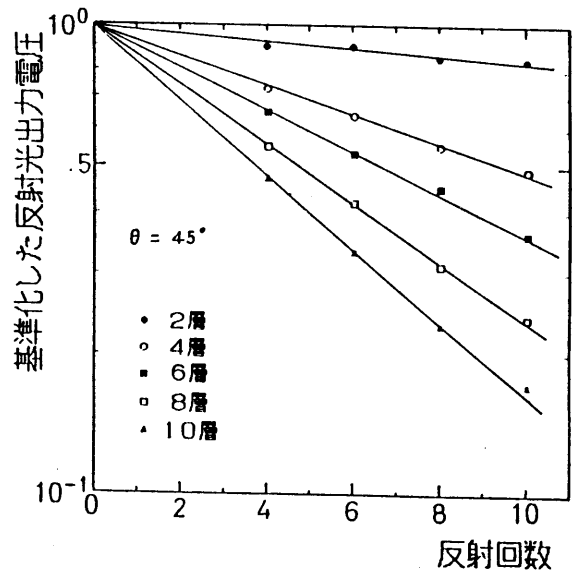


図 12 反射回数と反射光出力

には、その誘電率 ϵ_s はSPの共振角より一意的に求まる。しかし、ここで扱う単分子膜のように非常に薄い膜である場合にはSP共振角は膜の厚さと誘電率及び膜上の物質の誘電率に依存する。ここでは膜上の物質は空気である。図14はステアリン酸単分子膜の累積結果を表面プラズモンを用いて測定した結果である。横軸は光の入射角度、縦軸はリファレンス光で基準化した反射光の出力電圧である。膜の累積は銀を50nm蒸着したガラス基板に表面圧25 dyne/cmで行なった。また、下層液は蒸留水に塩化カルシウム 3×10^{-4} mol/l 加えたものです。銀膜のみの共振角は43.22'、銀膜上に膜が2層付いたときの共振角は43.65'、4層付いたときの共振角は44.30' となった。銀膜~2層、2層~4層とそれぞれ2層ずつ膜厚が増加したのに対し共振角のシフト量はそれぞれ0.43'、0.65' と異なっている。ステアリン酸単分子の長さは約2.5 nmと言われているので、4層では約10 nmである。このように薄い膜においては共振角のシフトは膜厚に比例することより、銀膜~2層と2層~4層で膜厚が異なっていることを示している。

6. おわりに

単分子膜の形成し、これを累積するためには膜物質の化学構造をはじめ、下層液のPHや含有塩類の種類、濃度、温度、累積基板の種類とその表面状態（疎水性、親水性）といった多くの条件を満たさなければならない。しかし筆者の未知の事柄も多いため、ここでは最初に単分子膜の累積方法に付いて、膜の形成から累積の仕方、累積装置などについて、ごく一般的な事項に付いて述べ、つぎに成膜装置の操作において問題となる膜形成における圧縮速度と下層水について、また累積における累積速度と累積比について、それぞれの実験結果を示すと共に、いくらかの検討を加えた。最後に累積した単分子膜の層数を実験室レベルで行なえる2つの測定方法について、実験結果と共に紹介した。

参考文献 (1) 化学の原点7 界面化学 日本化学会編

(2) 石井淑夫 よいLB膜をつくる実践的技術 共立出版

(3) 松井、塩川、木下、神谷 表面プラズモンバイオセンサの免疫反応における高感度化 信学技報 1994-07 など。

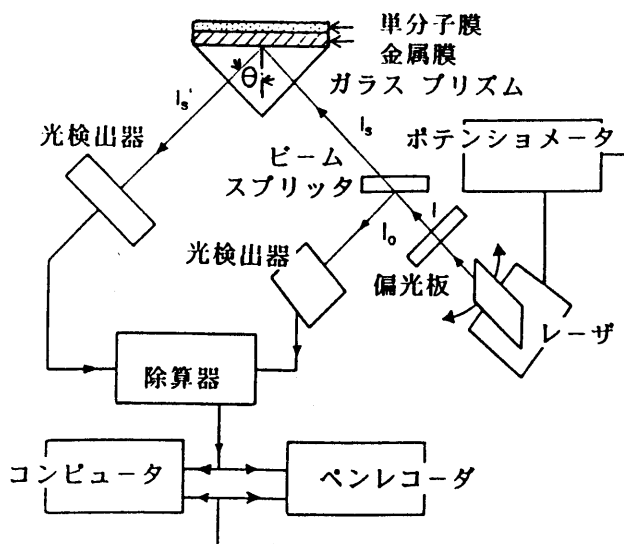


図13 表面プラズモン膜厚測定装置

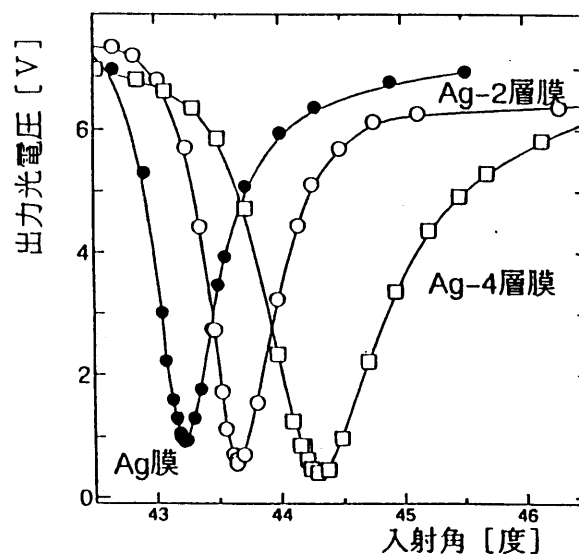


図14 ステアリン酸単分子膜の層数と表面プラズモン共振曲線