



先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業 フォトンファクトリーの産業利用促進 利用報告書

課題番号： 2013I005

研究責任者： 上田 俊吾 サンスター(株) H&B 事業部 スキンケア・ヘアケアグループ

利用施設： 高エネルギー加速器研究機構 放射光科学研究施設 BL-9A、BL-12C

利用期間： 2013年4月～2013年12月

本書面公開日：2016年1月5日

毛髪中成分元素の局所構造解析

The metal element configuration state analysis of hair

上田 誓子、鉤 美智、福永 丈明、上田 俊吾
Seiko Ueda, Michi Magari, Tomoaki Fukunaga, Syungo Ueda

サンスター株式会社
Sunstar Inc.

アブストラクト：

我々は昨年、毛髪から亜鉛を抽出した後、亜鉛化合物で処理した毛髪ミネラル状態を確認するため、BL-4Aでマイクロビーム XANES を実施した。その結果、ミネラルが処理前と同一の構造である可能性を得たが、マイクロビームを用いたために EXAFS 測定は行えず、十分な検証ができなかった。本年度、BL-12C および BL-9A にて XANES および EXAFS を実施した結果、毛髪内に浸透したミネラルは、処理時のミネラル化合物としての構造ではなく、未処理と同等の構造を再び形成していることを確認した。その構造はゆがんだ 4 面体構造であり、酸素または窒素原子と配位しており、毛髪内に多量に含まれている硫黄原子とは配位していないと判明した。

We conducted microbeam XANES experiments at BL-4A to study the local structure of the mineral in the treated hairs. The treated hairs were prepared by extracting the zinc from the hair, then treated with some zinc compounds. We found the possibility that the local structure of the mineral in treated hair is similar to that of untreated hair. But we couldn't confirm it because we couldn't measure EXAFS by the microbeam. This year we tried XANES and EXAFS experiments at BL-12C and BL-9A. We found that the local structure of the mineral in treated hair is similar to that of untreated hair, but it was different from the mineral compounds used for treatment. Zinc in hair takes a distorted tetrahedral structure and a zinc atom is coordinated to oxygen or nitrogen atoms, not to sulfur atom which is contained in large amounts in the untreated hair.

キーワード： hair、XAFS、局所構造

1. はじめに：

我々は昨年度、ギ酸を用いて毛髪から亜鉛を抽出した後、亜鉛化合物で処理することで、毛髪内に亜鉛が浸透することを BL-4A のマイクロビーム蛍光 X 線分析で確認した。さらに、亜鉛の局所構造を確認するため、同じく BL-4A にてマイクロビーム XANES 解析も実施した。その結果、亜鉛化合物を用いて毛髪に浸透させた亜鉛は、未処理毛髪内の亜鉛と同等の局所構造を形成している可能性を得た。しかしながら、亜鉛濃度が低く、マイクロビームを用いた EXAFS 実験が実施できなかったため、結論を出すには至らなかった。よって、今期は XAFS ビームラインにて未処理毛髪および亜鉛化合物処理毛髪の

XAFS を測定し、毛髪内局所構造を再度検証するとともに、亜鉛の第一配位にどのような元素が配位しているかの解明を試みた。

2. 実験：

試料準備：毛髪は(株)ビューラックスより購入した中国人女性毛（同一人、化学処理履歴なし）を用いた。これをギ酸に48時間浸漬することで、毛髪内の亜鉛をほぼ完全に抽出した。このギ酸処理毛髪を亜鉛化合物の1%水溶液に30℃、1時間浸漬した。処理後、イオン交換水で洗浄した後乾燥させた。

XAFS分析①常温測定：上記毛髪を直径5mmの毛束とし、XAFS測定部位の上下5mmを糸で固

く縛り、測定部位の毛髪をできる限り密にした。実験条件はBL-12CでZn-K端を室温測定し、標準試料は透過法で、毛束試料はCu-filter と19素子SSDを用いた蛍光法（時定数0.25 μ s）で2-4時間積算して測定した。

標準試料としてZn foil、ZnO、ZnS、フタロシアニン亜鉛、グルコン酸亜鉛水和物、0.1mol dm^{-3} (M) ZnCl₂水溶液を用いた。毛髪試料は未処理毛髪、ギ酸処理後グルコン酸亜鉛水溶液処理毛髪(以下グルコン酸亜鉛処理毛髪)、ギ酸処理後塩化亜鉛水溶液処理毛髪（以下塩化亜鉛処理毛髪）を用いた。

XAFS分析②低温測定：試料の均一性を高め、スペクトルのS/N比を良くするため、毛髪を細かく裁断した。クライオスタッドでの冷却のため、裁断した毛髪を樹脂内に封入し、樹脂厚さを約2mm程度にした。実験条件はBL-9AでZn-K端をクライオスタッドにて約15Kに冷却して測定し、19素子SSDによる蛍光法でCu-filter、0.25 μ s、6時間積算にて測定した。

XAFS 分析③S-K 端測定：細かく裁断した毛髪と標準試料は導電性テープに薄く塗った状態で測定を実施した。実験条件はBL-9AでS-K端を室温測定し、標準およびその他の試料は蛍光収量法と転換電子収量法（CEY）の同時測定を行った。標準試料はLシステイン、Lシスチン、Lメチオニン、ZnS、合成したシステイン亜鉛、ZnSO₄を用いた。毛髪試料は未処理毛髪と、塩化亜鉛処理毛髪、およびギ酸処理後グリシン亜鉛水溶液処理毛髪(以下グリシン亜鉛処理毛髪)を用いた。

3. 結果：

3-1 標準試料の常温での分析結果

標準試料のZn-K端のXANESスペクトルを図1に示す。

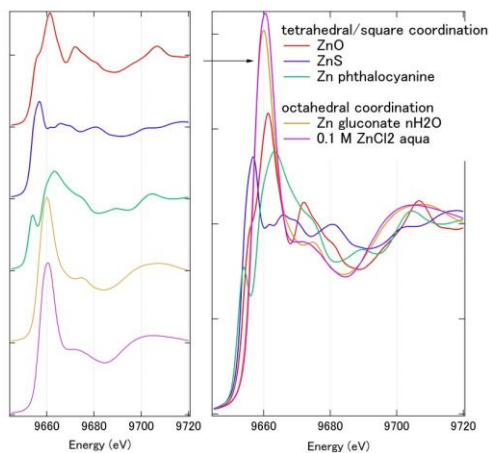


図1：標準試料のZn-K端XANESスペクトル

ZnO、ZnS、フタロシアニン亜鉛はそれぞれ酸素、硫黄、窒素の4配位構造。0.1M 塩化亜鉛水溶液は酸素の6配位構造と思われる。過去の報告⁽¹⁾では、6配位は4配位と比べ強いホワイトラインが観測されている。今回もグルコン酸亜鉛、0.1M 塩化亜鉛水溶液で強いピークが確認されている（図1矢印部分）。ただし、6配位の場合でも歪みが生じて対称性が低下する場合、ホワイトライン強度が減少する場合がある⁽¹⁾。

図1のスペクトルから求めた動径構造関数を図2に示す（後の毛髪試料との比較のためフーリエ変換の範囲を $k=2.4-9.4 \text{ \AA}^{-1}$ (フタロシアニン亜鉛のみ $k=3.4-10.4 \text{ \AA}^{-1}$ とした)。

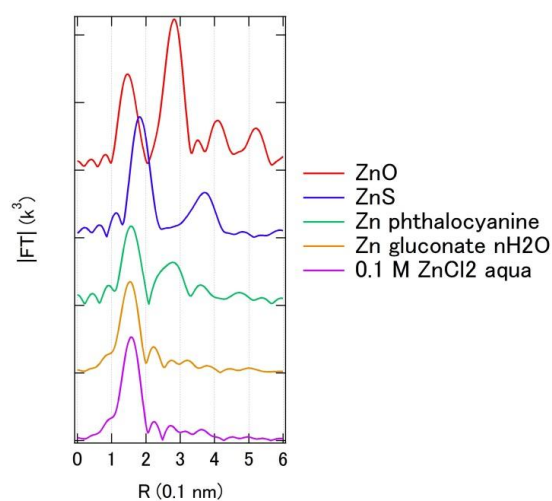


図2：標準試料のZn-K端動径構造関数

グルコン酸亜鉛水和物および0.1M 塩化亜鉛水溶液についてその配位数を確認するため、ZnOおよびZnSから見積もった減衰因子0.9を仮定し、 $k=2.3-12.1 \text{ \AA}^{-1}$ （グルコン酸亜鉛）および $k=2.3-12.9 \text{ \AA}^{-1}$ （塩化亜鉛）の範囲で動径構造関数の第一ピーク（ $r=1-2 \text{ \AA}$ ）の逆フーリエ変換スペクトルを酸素6配位のモデルによりFEFF6理論計算で $k\text{-weight}=3$ の条件でフィッティングした。その結果、グルコン酸亜鉛水和物は $N=5.0 \pm 0.7$ (R-factor: 0.0001%)、0.1M 塩化亜鉛水溶液は $N=6.6 \pm 0.6$ (R-factor: 0.005%)となり、確かに6配位をとっていることがわかった。

3-2 毛髪試料の常温でのXANES、EXAFS

図3に標準試料および毛髪試料中のZn-K端のXANESスペクトルを示す。未処理毛髪および塩化亜鉛処理毛髪において、4配位に近いホワイトラインピークが得られた。また、毛髪の吸収端エネルギーに比べ、グルコン酸亜鉛は高エ

エネルギー側にシフトしていることから、毛髪中の亜鉛は、グルコン酸亜鉛の配位数よりも低いと考えられた。

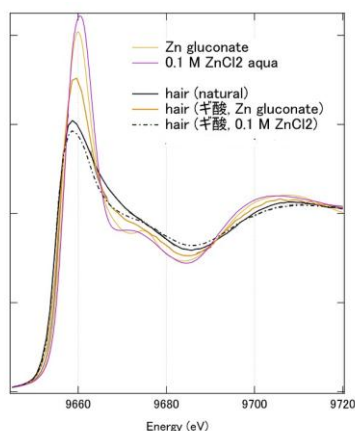


図3：標準試料および毛髪試料中のZn-K端のXANESスペクトル

なお、グルコン酸亜鉛処理毛髪では、洗浄不足により毛髪表面にグルコン酸亜鉛自体の残留が懸念され、実際未処理毛髪とグルコン酸亜鉛を52:48のスペクトル線形和でXANES、EXAFSを再現することができた。このため、グルコン酸亜鉛処理毛髪について解析するためにはより洗浄した毛髪を用いることが必要と考えられた。

過去のタンパクと結合した亜鉛のXANESスペクトルの報告⁽²⁾より、4配位亜鉛においてSとの結合が見られる場合、XANESのホワイトラインが2ピーク構造を示しているが、本毛髪試料ではそのような構造は見られず、亜鉛周囲に硫黄はほとんどついていないと思われる。

また別の報告⁽³⁾⁽⁴⁾を参考にすると、毛髪試料のXANESスペクトルではヒスチジン(N配位)亜鉛に最も近かったが、その他のアミノ酸との結合も考えられる。

標準試料および毛髪試料中のZn-K端のEXAFSから求めた動径構造関数($k=2.4-9.4 \text{ \AA}^{-1}$)を図4に示す。

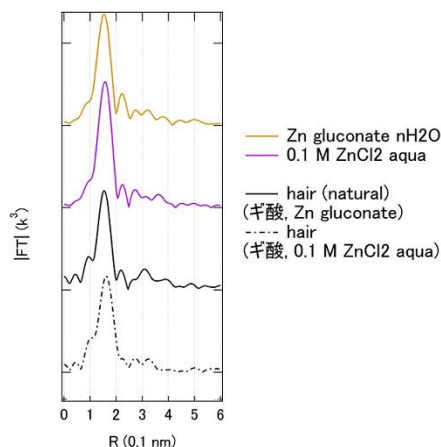


図4：毛髪試料中の動径構造関数

図4から分かるように、毛髪試料においてZnの配位数がグルコン酸亜鉛や塩化亜鉛に比べ減少していた。第一ピーク位置はすべて0.16nm以下であり、硫黄の結合は多くなかった。(硫黄との距離は2.2-2.4(0.1nm)⁽²⁾)

減衰因子を0.9と仮定し、 $k=2.4-9.4$ の範囲で動径構造関数の第一ピーク($R=1-2$)を逆フーリエ変換したスペクトルを酸素4配位のモデルをベースにFEFF6の理論計算でk-weight=3の条件でフィッティングした。その結果、未処理毛髪では $N=3.3 \pm 0.7$ (R-factor: 0.004%)、ギ酸処理後塩化亜鉛水溶液処理毛髪では $N=3.4 \pm 1.1$ (R-factor: 0.008%)となり、いずれも4に近い値となった。ただし、既報⁽⁵⁾によるとCu/HisやZn/HisなどEXAFSで4配位と見積もられた場合でも、遠距離にさらにN/Oが配位し八面体6配位構造をとっている場合、それがEXAFSスペクトルに現れないこともありうる。よって、この点を明らかにするため、低温条件での測定を実施した。

3-3 毛髪試料の低温でのXANES、EXAFS

図5に未処理毛髪、グルコン酸亜鉛処理後4回洗浄処理した毛髪およびグルコン酸亜鉛の低温でのXANESスペクトルを示す。ただし、グルコン酸亜鉛については室温での測定である。

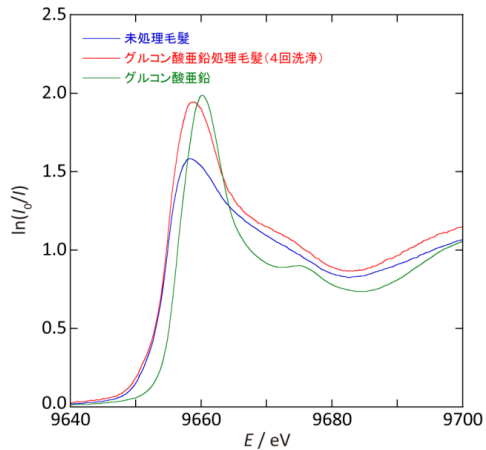


図 5 : 標準試料および毛髪試料中の Zn-K 端の XANES スペクトル

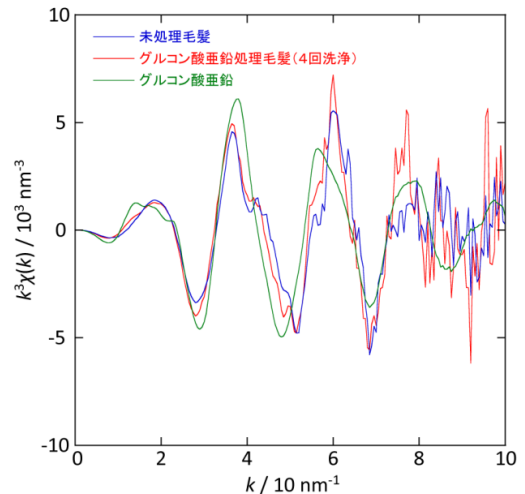


図 6 : 標準試料および毛髪試料中の EXAFS 振動

4 回洗浄したグルコン酸亜鉛処理毛髪中のホワイトラインピーク強度は図 3 に比べ高かった

	酸化亜鉛	PhthZn	GluZn	GluZn 処理毛髪	未処理毛髪
Zn-O(1)	S_0^2	0.94±0.06	0.94*	0.94*	0.94*
	N	1*	4*	4.2±0.9	4.2±1.0
	$R/10^{-1} \text{ nm}$	1.91±0.04	2.05±0.02	2.04±0.02	1.99±0.03
	$\sigma^2/10^{-2} \text{ nm}^2$	0.0039±0.001	0.0065±0.001	0.0067±0.003	0.0097±0.004
Zn-O(2)	N	3*			
	$R/10^{-1} \text{ nm}$	1.99±0.01			
	$\sigma^2/10^{-2} \text{ nm}^2$	0.0039**			
Zn-N	S_0^2		0.72±0.09		
	N		4*		
	$R/10^{-1} \text{ nm}$		1.99±0.01		
	$\sigma^2/10^{-2} \text{ nm}^2$		0.0032±0.001		
R-factor	0.005	0.017	0.026	0.022	0.049

*fixed value

**same σ^2 value as Zn-O(1)

ものの、そのスペクトルのピーク位置および構造は未処理毛髪のそれによく似ていた。また、グルコン酸亜鉛に見られる 9675eV 付近の緩やかなピークが毛髪試料では見られない。これらのことから、グルコン酸亜鉛処理毛髪中の亜鉛はグルコン酸亜鉛の化学状態とは異なると考えられる。

次に図 6 に標準試料および毛髪試料の XANES スペクトルから得られた EXAFS 振動および図 7 に動径構造関数を示す。

なお、動径構造関数では位相シフトは補正していない。

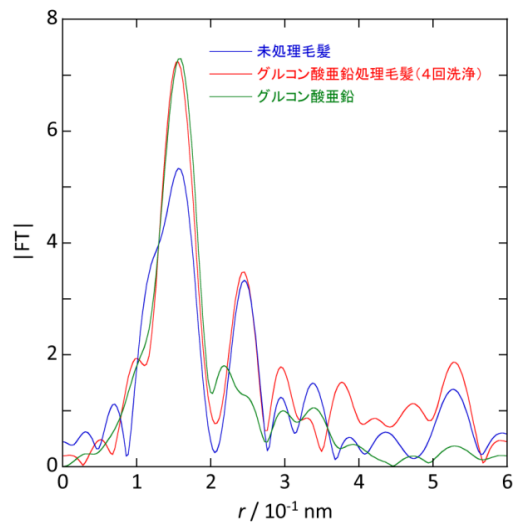


図 7 : 標準試料および毛髪試料中の動径構造関数

毛髪試料の EXAFS 振動の位相はほぼ一致しているのに対し、グルコン酸亜鉛のみ $25\sim 65\text{nm}^{-1}$ 付近の位相がずれている。

動径構造関数ではいずれの試料についても 0.16nm 付近にピークが現れている。これはグルコン酸亜鉛に関しては亜鉛と最近接の酸素との相互作用であり、毛髪試料中では亜鉛と最近接の酸素もしくは窒素の相互作用と考えられる。

フィッティングによって得られた構造パラメータを表 1 に示す。Zn-O の相互作用の標準試料に酸化亜鉛を、Zn-N の相互作用の標準試料にはフタロシアニン亜鉛 (PhthZn) を用いた。標準試料より So^2 を求め、得られた So^2 を用いて各試料の配位数を決定した。考慮する相互作用の後方散乱振幅強度および位相シフトは FEFF8.20 コードを用いて算出した。

毛髪中の亜鉛に関しては、毛髪中のアミノ酸と結合している可能性があるため、酸素以外に窒素、硫黄、炭素など可能性のある元素でのフィッティングを試みたが、硫黄、炭素を考慮しても実験データをうまく再現することはできなかった。また酸素と窒素は原子番号が 1 つしか変わらず、後方散乱振幅強度や位相シフトは有意な差がないため、両者を区別することができなかった。フタロシアニン亜鉛は亜鉛の周りに窒素が平面配置している構造のためかフィッティングがうまくいかなかった。亜鉛の周りに酸素が正四面体で 4 配位している構造モデルを適用した結果、おおよそ 4 という配位数が得られた。よって、四面体の頂点を窒素もしくは酸素が占める四面体構造であると推測された。

一般的に亜鉛イオンの 4 配位四面体構造ではその結合距離はおおよそ 0.195nm であり、同様に 6 配位八面体構造における結合距離はおおよそ 0.210nm である⁽⁶⁾。本研究で得られたグルコン酸亜鉛処理毛髪中、未処理毛髪中およびグルコン酸亜鉛中の亜鉛の最近接結合距離はそれぞれ 0.204nm 、 0.199nm 、 0.205nm であり、一般的な 4 配位四面体構造の結合距離としては長く、四面体構造と八面体構造の中間の値に近い。このことから、グルコン酸亜鉛処理毛髪および未処理毛髪中の亜鉛は歪んだ四面体構造を採っているものと考えられる。毛髪試料は 15K で測定しているため 0.24nm 付近に比較的強い 2 番目のピークが現れている。このピークは毛髪中のアミノ酸などの C、N、O など様々な可能性が考えられる。グルコン酸亜鉛では同様な第二ピー

クは明確には現れていないが、室温でのデータであるため、動径構造関数だけでは局所構造が異なっているとは判断することはできない。また 6 配位構造のうち、4 配位および相互作用が弱く結合長の長い 2 配位という歪んだ八面体構造をもつという仮説に対しては、EXAFS 解析の結果最近接の構造が 4 配位四面体構造であることが明らかとなったため否定される。このため、 0.24nm のピークは周期構造の中で確認される第二近接元素によるものと結論される。

動径構造関数の $0.1\sim 0.3\text{nm}$ の領域を逆フーリエ変換して得られた (図 8) EXAFS 振動の $k=30\text{nm}^{-1}$ 以上の領域では毛髪試料はいずれも明らかに複数の \sin 関数から構成されていることが確認できる。

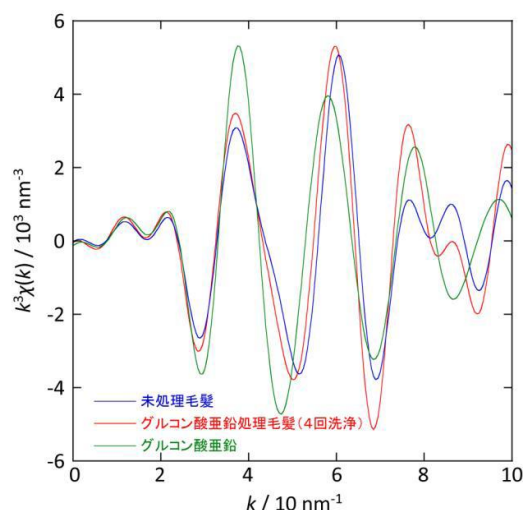


図 8 : 動径構造関数の $0.1\sim 0.3\text{nm}$ の領域を逆フーリエ変換して得られた各試料の EXAFS 振動

一方でグルコン酸亜鉛では同じ領域でひとつの \sin 関数しか存在しないように見える。このことから毛髪中の亜鉛では第二近接に何らかの元素が存在しているが、グルコン酸亜鉛中の亜鉛では第二近接の元素は見えないことが明らかになった。グルコン酸亜鉛では確認できない第二近接距離の元素がグルコン酸亜鉛処理毛髪試料において確認されたという本研究結果から、グルコン酸亜鉛処理によって添加された亜鉛は毛髪中に取り込まれ、未処理毛髪中の亜鉛と同様に毛髪を構成するアミノ酸と相互作用をしている可能性が示唆された。

3-4 S-K 端実験結果

蛍光測定では厚み効果による歪みが見られたため、以降 CEY によるスペクトルを示す。図 9 に標準試料および未処理毛髪の S-K 端 XANES CEY スペクトルを示す。

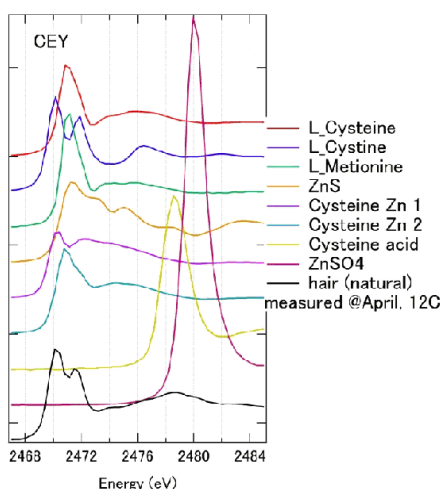


図9：標準試料および未処理毛髪のス-K端 XANES CEY スペクトル

XANES 形状から毛髪内のSはシスチンの状態に最も近かった。

次に図10に各毛髪試料のCEY XANES スペクトルを示す。

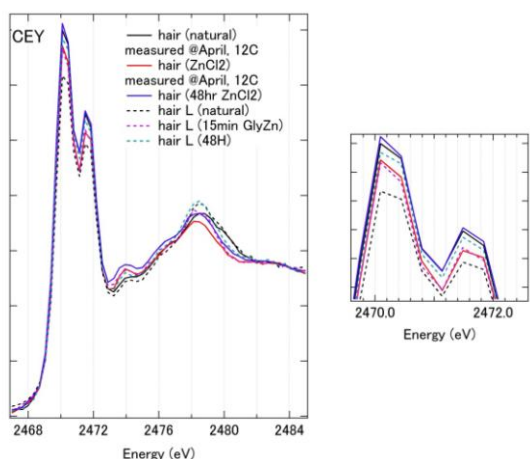


図10：毛髪試料のス-K端 XANES CEY スペクトル

未処理毛髪と処理毛髪とで目立った変化はなく、S-S結合が処理後も保たれていることがわかった。毛髪内亜鉛量は硫黄量の1-2%程度だったことから、硫黄側から亜鉛がついているかどうか、亜鉛添加による系統的な変化も見られず、議論できなかった。

4. 考察：

以上の結果、ギ酸処理で亜鉛を抽出後、亜鉛化合物を用いて毛髪中に浸透させた亜鉛は、未処理毛髪中の亜鉛と同様の状態で取り込まれ、その構造は亜鉛が酸素、もしくは窒素とゆがんだ四面体4配位構造を形成していると考えられるスペクトルを得た。4配位のうちSは配位していないか、いたとしても1程度。毛髪中の硫

黄はS-S結合を有した状態で主に存在し、それは今回のギ酸処理+亜鉛添加を施してもほぼ切断されずに保たれていると考えられる。

上甲らは羊毛繊維の天然染料（ヘマテイン）による染色に関する報告⁽⁷⁾で、水溶液中のヘマテインがキューティクル層に存在する細胞膜複合体（CMC）に浸透・拡散すること、CMCを構成する δ -層の表層に位置する疎水性タンパク質に亜鉛が存在し、その亜鉛とヘマテインが錯塩を形成することを報告している。我々はこのことから、亜鉛の四面体4配位構造のうち一部がCMC内のタンパク質表面のアミノ基と結合し、残りはCMC内に浸透してきたヘマテイン等と結合可能な状態にあるのではないかと考えた。ヘマテインが存在しない状態では、亜鉛はCMC内の別の成分とゆるい配位結合を形成していると考えられ、そうでなければ、ヘマテインとは反応できない。CMC内には δ -層に隣接して遊離脂肪酸を多量に含む β -層が存在していることから、我々は亜鉛が通常、遊離脂肪酸のカルボニル基と錯塩を形成しているのではないかと考えている。このことは、常温測定では出現しなかった動径構造関数のピークが、低温測定において出現したことから推測できると考えられる。

5. まとめ：

毛髪中における亜鉛の局所構造を調べるためXAFS測定を行った。EXAFS測定およびXANES測定結果より、毛髪内から亜鉛を抽出した後亜鉛化合物で処理すると、亜鉛が毛髪から抽出する前の状態に復元できている可能性が高いことを見出した。また毛髪内に存在する亜鉛の局所構造は、酸素または窒素原子と配位したゆがんだ四面体構造であることが示唆された。

参考文献

- [1] F.A Cotton *et al.*, J. Chem. Phys. 28, 83 (1958).
- [2] K.C.-Baldwin *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 120, 8401 (1998).
- [3] R.A. Kelly *et al.*, Microchemical J., 71, 231 (2002).
- [4] R. Terzano *et al.*, J. Agric. Food Chem. 56, 3222 (2008).
- [5] M. Yu *et al.*, Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A619 408 (2009).
- [6] Y. Inada *et al.*, Inorg. Chem., 33, 1875 (1994).
- [7] K. Joko *et al.*, 繊維学会誌, 投稿中.

成果発表状況： 本成果を今後、繊維関連および、化粧品関連学会にて随時発表するとともに、新製品上市の際にプレスリリースにて発表する予定。