

水溶液中のオレイン酸カリウムのミセル構造解明への 2次元 NMR 法 (NOESY) の応用

村田 義夫¹⁾

(平成 22 年 5 月 31 日受理)

Application of 2D-NMR(NOESY) to the Investigation of Potassium Oleate Micelle Structure in the Aqueous Solution

Yoshio MURATA¹⁾

(Received May 31, 2010)

Abstract

2-Dimensional NMR spectroscopy was applied to the aqueous solution (D_2O) of the Potassium Oleate (K Oleate) in order to investigate the structure of the micelle. NOESY (Nuclear Overhauser effect spectroscopy) was used to estimate the distance between 1H pairs in the K Oleate micelle at various temperatures (5 to 65°C). The distance between 1H - 1H pairs was equal to the distance which is estimated by the molecular model using Chem 3D software. From the NOESY results the micellar structure of K Oleate in D_2O solution was distinguished into two parts which is separated by the cis double bond in the K Oleate molecule. The inner part is more hydrophobic than the outer part of the micelle. The rotational correlation time (τ_c) of the molecule in the outer part was about half that of the inner part below 30°C. However, the τ_c of the outer part is dramatically increased above 35°C, where the phase transition of the solution is reported from the light scattering measurement.

序 論

オレイン酸は、植物や動物由来の天然油脂中に多く含まれ、各種細胞膜の重要な構成成分となる主要不飽和脂肪酸の一つである。生物体中でも存在量が多く、細胞膜中のリン脂質の構成成分の一つであり生物化学的には極めて重要な化合物である。しかし従来、オレイン酸は、その精製が難しく純度の高い製品が得られにくく工業的には浮遊選鉱や磁性流体への応用はされ

ているものの、界面科学などの物理化学の研究対象としては、その純度の低さからあまり選択されることは少ない化合物であった^{10,11)}。しかし最近、構造機能科学研究所は、分子蒸留などの手法を用いてオレイン酸を極めて高純度 99.9%以上に精製することに成功した。我々は、この高純度オレイン酸を本研究に用いた。

オレイン酸の分子構造は、炭素数 18 のアルキル基の中央に cis 型二重結合を持ち、「く」の字形の分子構造である。このオレイン酸塩分子を陰イオン性界面

¹⁾ 福岡大学理学部化学科, 〒 814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka, 814-0180, Japan

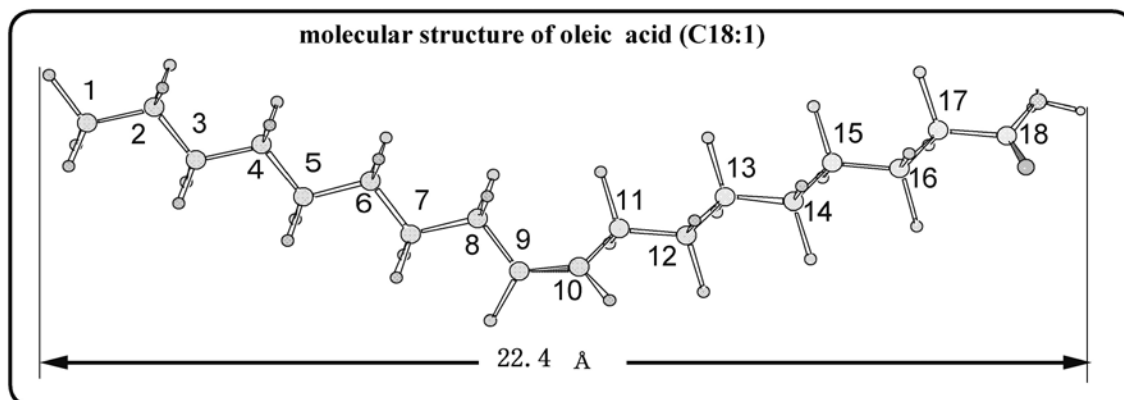


Fig. 1 オレイン酸の分子構造

この図の炭素の番号は、通常の番号とは逆になっているが、NMRスペクトルとの対比が容易なため、ここでは、このまま使用する。

活性剤としてとらえると、親水基はカルボニル基、疎水基はオレイル基 $C_{17}H_{33}$ である (Fig. 1)。この疎水基の中央にある cis 型二重結合のオレイン酸分子会合挙動に対する影響を、近年我々は、表面張力、光散乱法などを用いて、温度と濃度の関数として、異なる会合体が存在する領域図を物理化学的に研究してきた (Fig. 14)

このような界面活性剤水溶液系は、熱力学的に安定な系であり、その会合状態 (会合体の大きさや形状) などは、水溶液の濃度、温度、圧力によって規定される。これらの系のミセル状態の研究は、主に以下に述べる 3 種類の光源を用いた光学的手法で従来行われている。

(1) 可視光を用いる静的光散乱法 (LS) や準弾性光散乱 (QELS) 法の場合は、最近では、光源としてレーザー光をもちいる。LS や QELS では、会合体の大きさが決定できる。しかし、その会合体を形成する界面活性剤分子が主に 1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , などの軽元素で構成されている場合、可視光を用いるとミセルと溶媒の H_2O とのコントラストがかなり低い。

(2) 小角 X 線散乱法 (SAXS) では、放射光実験施設のような高輝度の X 線を光源として用いる必要がある。SAXS では、水中で形成される会合体の大きさばかりではなく球形か棒状などの会合体の形状を決定できる。しかしこの X 線をもちいてもミセルと溶媒の H_2O とのコントラストがかなり低い。

(3) 赤外吸収スペクトル法 (IR) は分子の振動回転に対する情報を与えるが、水素結合のように分子の電子密度を変化させるような分子間相互作用の変化についての情報も得られる。

一方、核磁気共鳴 (NMR) は、1940 年代にその原理が発見されて以来¹²⁾、装置的には磁場掃引型 NMR

装置に続き、超伝導磁石を用いるパルス FT-NMR 装置まで、かなりの発展を続けてきた。しかしその応用は、主に化学では、有機化学の分野で化合物の構造決定の手段として 1 次元の 1H および ^{13}C -NMR スペクトルなどが主に用いられるのに止まってきた。しかし、1980 年代に入ると一つの測定中に複数のパルスのある時間間隔で組み合わせるパルスシーケンスを用いる 2 次元 NMR 測定法が主流となってきた。その測定法とその応用範囲は、参考文献 5 の 2 章以下で述べられているように多種多様となり有機化学での構造決定は言うに及ばず、生物化学における溶液中のタンパク質の立体構造の解析や、コロイド化学の分野にも広がってきている^{3,4,5)}。

まず、始めに、界面活性剤水溶液系に NOESY 法を応用する場合の長所と短所について他の従来の測定法と比較しながら議論する。

[NOESY 法の長所]

- ◎ 共有結合を必要としないため、空間的に 5 ~ 6 Å 以内に存在している 1H 間であれば、同一分子内ばかりではなく、異なる分子上でも、近距離にある 1H であれば、その距離を測定できる。
- ◎ NMR のケミカルシフトが、分子中のそれぞれの基によって異なる為に、分子中のどの基の 1H とどの基の 1H が隣接しているかが、はっきり決定できる。これは、NOESY 法の最大の長所である。
- ◎ IR 法のように、水素結合のような特別な相互作用は、必要としないので、会合体の疎水部分と親水部分の全て部分に対して、隣接する 1H を決める事ができる。

[NOESY 法の短所]

- ◎ LS, QELS, SAXS 法のように、会合体の大きさや

形状に対する情報が得られない。

- ◎ 2次元 NMR の測定のためかなりの連続長時間の測定が必要になる。とくに低濃度 10^3 から 10^4 mole/l の測定には、2～3日を要する事も珍しくない。
- ◎ 低温での遅い分子運動状態での負の NOE から、高温の速い分子運動での正の NOE への変化の途中の温度で、NOE が小さくなり 0 になる温度領域があり、その温度領域での情報が得られない。
- ◎ D_2O を溶媒として用いなければいけない。NOESY 測定には、 D_2O 中の HOD の吸収を小さくする為に、溶媒消去法を用いる必要がある。

このように、NOESY 法は分子中のどの基の 1H とどの基の 1H が隣接しているかがはっきり決定できる利点は、従来のどの方法にもなく、ミセルの内部構造を分子レベルで研究できる、現状では唯一の方法である。

我々は、表面張力や光散乱法などを用いて、温度と濃度の関数として、異なる会合体が存在する領域図 (Fig. 14) を、物理化学的に研究してきた¹¹⁾。本研究では、この領域図を参考にして、オレイン酸を KOH で中和してオレイン酸 K を調製し、CMC の 10 倍の濃度 ($m = 9.764 \times 10^3 \text{ mol/kg}$) におけるオレイン酸 K の溶存状態について温度を 5°C から 65°C まで変化させて、2次元 NMR 法により調べた。オレイン酸会合体中のいろいろな 1H 原子核間の距離の温度依存性から、オレイン酸 K のミセルの内部構造を検討した。

実 験

【試料】 オレイン酸カリウム $C_{17}H_{33}COOK$

・構造機能科学研究所より購入したオレイン酸を KOH で中和した後、エバポレーターを用いて濃縮したのち、真空中で恒量になるまで、乾燥して、オレイン酸カリウム (オレイン酸 K) を調製した。

・溶媒は、オレイン酸 K のカルボキシル基 (-COOH) のプロトン化を防ぐため、KOH を用いて pH 11 に調製した重水 (D_2O) を使用した。

・重水 (D_2O) は N_2 中で一次蒸留し、軽水 (H_2O) を出来る限り除去し、同時に常磁性の酸素による NOE 強度の減少を避ける為に、脱酸素して用いた。

【装置と測定条件】 NMR 装置は、varian 製 400MHz NMR (INOVA 400) である。

2次元 NMR 法は、その種類が多く、その名前も複雑であるためここに主にこの論文に関係する 2次元 NMR 法の名前とその目的と特徴をまとめて示す。

これらの測定法の原理、パルス系列や具体的応用例の詳細については、参考文献 5 を参照してください。

[I] 1H -X HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)

H-X HMQC 法は、1本の結合を隔てた 1H と X 原子核との異種核間相関法であり、プロトンと結合 1本を隔てた X (普通は、 ^{13}C) とのカップリングを測定し、どの 1H がどの C に結合しているかを決定する測定法である。

[II] X-X COSY (X-X Correlation Spectroscopy), X-X INADEQUATE (X-X Incredible Natural-Abundance Double-Quantum Transfer Experiment)

直接結合したカップリングしている X-X の結合を確認できる、ただし X スピンの天然存在比が 20% 以上の時に測定可能である。INADEQUATE 実験では、天然存在比が低い核間の結合も確認できる。

[III] 1H - 1H COSY (1H - 1H Correlation Spectroscopy)

結合 2～3本隔てた J カップリングした 1H 同士を確認する。一般には、隣り合った炭素に結合した 1H の確認に用いる。

[IV] 1H -X HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

プロトン観測によるロングレンジ異種核間カップリングが測定できる。

X が ^{13}C の場合は、結合 2～3本隔てたカップリングを観測できる。

[V] NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

1H - 1H 間の空間を通しての相関を測定できる。上記の 5つの 2次元 NMR 測定法が、観測する核が、必ず共有結合で繋がれた分子内に存在していなければならなかったのに対して、NOESY 法は、空間的に $5 \sim 6 \text{ \AA}$ 以内に存在している 1H 間であれば、共有結合を必要としないため、分子内ばかりではなく分子間の相関が測定できる。分子運動が、ゆるい低温領域での、負の相関から、分子運動が激しくなるにしたがって相関が消える領域を経て、正の相関へ大きく変化する。その相関の強度から 1H 間の距離を測定できる。

使用した NMR 測定法と、その主な測定条件とおおよその測定時間は、以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (1D)	[積算回数 $nt = 32,$ 測定時間 $= 2 \text{ min } 40 \text{ sec}$]
$^{13}\text{C-NMR}$ (1D)	[積算回数 $nt = 4096,$ 測定時間 $= 2 \text{ hr } 17\text{min}$]
DEPT (1D)	[積算回数 $nt = 2048, \text{mult} = 135,$ 測定時間 $= 1 \text{ hr } 54 \text{ min}$]
gCOSY (2D)	[積算回数 $nt = 64,$ 測定時間 $= 2 \text{ hr } 40\text{min}$]
gHMQC (2D)	[積算回数 $nt = 64, ni = 128,$ 測定時間 $= 5 \text{ hr } 27\text{min}$]
gHMBC (2D)	[積算回数 $nt = 64, ni = 200,$ 測定時間 $= 4 \text{ hr } 20\text{min}$]
NOESY (2D)	[混合時間 $\text{mix} = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 \text{ ms}$ 積算回数 $nt = 40, ni = 128,$ 測定時間 $= 12 \text{ hr } 30\text{min}$]

【NOESY 測定】

ここでは、特に NOESY 測定手順について詳細に述べる。他の測定法に関しては、通常の測定法に順じて行った。

この論文では、オレイン酸 K の重水溶液の濃度は $m = 9.764 \times 10^{-4} \text{ mol/kg}$ でオレイン酸 K の $\text{CMC} \times 10$ に全て設定した。INOVA の温度可変装置で、温度を $5 \sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$ 、一定にした後、シム調製、90 度パルスの測定、溶媒除去の各パラメーターの最適値を測定した後に、NOESY の 3 つの 90 度パルスを用いた標準パルス系列を用いて Fig. 2 に示したように、混

合時間 mixing time τ_m を $0.2 \sim 0.8 \text{ ms}$ と変えて二次元 NMR (NOESY) で測定した。

結果と考察

[1] gHMQC・gHMBC によるオレイン酸 K の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの同定

まず、溶媒除去 (PRESAT) 法で得た、オレイン酸 K の重水溶液の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Fig. 3 に示す。ここで、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル中のピークは、高磁場側から、番号をつけた。ここで⑥は、溶媒除去法により、重水中に含まれる消去された HOD の痕跡である。

このスペクトルの同定を行うために $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT をおこない、まず、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルの同定を行った。その結果については、詳細は、省くが、 $^{13}\text{C-NMR}$ のピークの位置とその同定については、Table 1 の gHMQC の欄を参考にして下さい。

次に、これらのデータを基に、gHMQC と gHMBC を 25°C でおこなった。

gHMQC と gHMBC の結果については、Table 1 にまとめてある。

gHMQC・gHMBC の測定結果により、1次元 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは Fig. 4 のように帰属された。

この帰属を基に、色々な温度、濃度における NOESY 二次元スペクトルの測定を行ったので、以

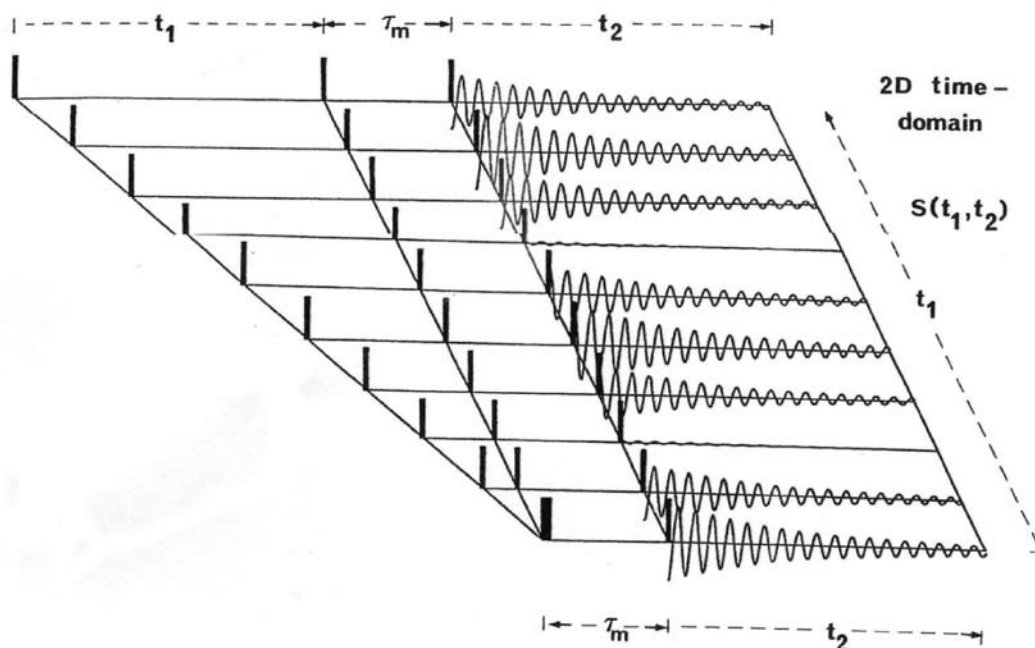


Fig. 2 NOESY のパルス系列と測定のための変数の関係

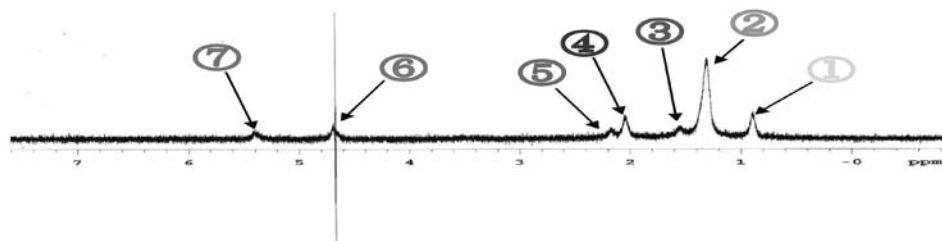


Fig. 3 オレイン酸Kの重水溶液の¹H-NMR（PRESAT）スペクトル，濃度m = 9.764 × 10⁴ mol/kg、温度 25℃

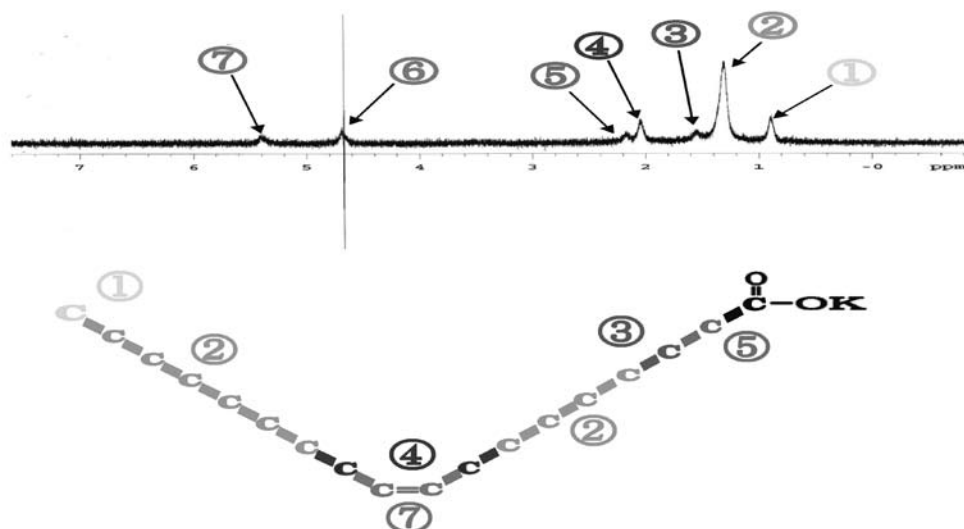


Fig. 4 オレイン酸Kの重水溶液の1次元¹H-NMRスペクトルの帰属

Table 1 オレイン酸Kの重水溶液のgHMQC・gHMBCの測定結果による相関関係

	¹ Hケミカルシフト(ppm)	¹³ Cケミカルシフト(ppm)	gHMQC	gHMBC
①	0.716	13.985	①	なし
	0.733	22.771	②	①※②
	0.749	26.520	③	⑤
②	1.141	27.337	④	⑦
	1.167	27.436	④	⑦
③	1.394	29.535	②	②④※③
④	1.879	29.612	②	②④※③
	1.894	29.795	②	②④※③
⑤	2.003	29.940	②	②④※③
⑥	4.622	32.093	②	①②
⑦	5.214	38.063	⑤	なし
	5.226	129.855	⑦	④
		130.183	⑦	④

①※②は、¹Hの①と②との相関があったことを示す。

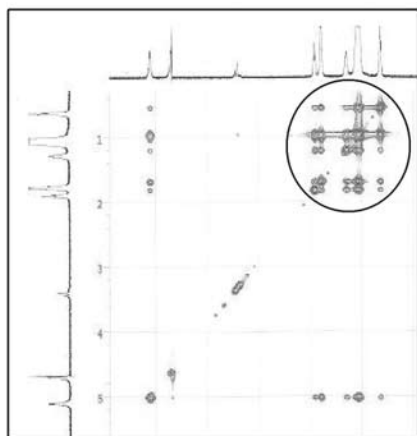


Fig. 5 オレイン酸KのNOEスペクトル
10°C, CMC×10, mixing time = 0.2ms

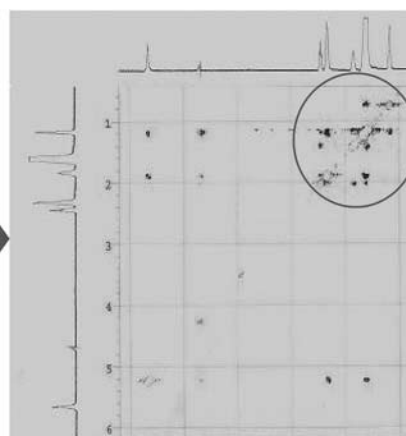


Fig. 6 オレイン酸KのNOEスペクトル
65°C, CMC×10, mixing time=0.2ms

下に議論する.

[2] オレイン酸 K の NOESY スペクトルの温度変化

まず始めに、NOESY スペクトルの基礎的解釈について 10°C で得られたオレイン酸 K の NOESY スペクトル (Fig. 5) を用いて説明する. NOESY スペクトルの縦軸と横軸は、Fig. 2 で示されている溶媒のピークを消去した 1 次元 ^1H -NMR スペクトルが、それぞれ貼り付けてある. つまりこの Fig. 5 で対角線上に現れる一連の相関ピークは、対角要素と呼ばれる相関ピークで同じ ^1H 同士から生じているので、NOESY スペクトル中には、必ず現れるピークであり、常に負のピークとして現れる¹³⁾.

これに対して、対角要素の示す対角線の両側に対照的に現れるピークは、交差ピークと呼ばれて、それぞれ異なる基の中の ^1H の相関を示している.

低温である 10°C では青い負の NOE しか見られないが (Fig. 5)、高温である 65°C では赤い正の NOE が多く見られる (Fig. 6).

これは、温度上昇に伴い緩和経路が Fig. 7 に示すように変化したことによる. NOE の理論から、NOE の符号は、Fig. 6 で示されるように、回転相関時間 (τ_c) の長い低温では負となり、400MHz の NMR 装置で観測している場合は、分子の回転相関時間 τ_c が 2.8ns になる温度で消失する.

もし、界面活性剤分子が溶液中で単独で存在したとすると、その回転相関時間 (τ_c) は、その分子量に反比例して長くなるはずである. しかしオレイン酸 K (分子量 $M_w = 294.5 \text{ g/mol}$) ミセル溶液では、15 ~ 25°C の中間で回転相関時間 τ_c が 2.8ns になり、多くの NOE が負から正へと変化した. これに対して、オ

レイン酸 K より分子量が大きい C10E8 ($M_w = 510.7 \text{ g/mol}$) ミセル溶液では 25 ~ 30°C の中間で回転相関時間 (τ_c) が 2.8ns になった (2007 年中村碧 卒論¹⁴⁾), しかし C10E8 ($M_w = 510.7 \text{ g/mol}$) と比較して、分子量が小さい胆汁酸 Na ($M_w = 499.8$) ミセル溶液では C10E8 に比べてきわめて高い温度 50°C 前後で回転相関時間 τ_c が 2.8ns になり、NOE が負から正へと変化した (2007 年 馬場崎央枝 卒論¹⁵⁾).

これは、ミセル中で会合した分子の回転相関時間の温度変化の違いを明らかに示し、NOESY 法によって明らかになった一つの会合挙動の相違の具体例である.

分子量 M_w が 510.7 の C10E8 のゼロ交差点が分子量のより小さな胆汁酸塩よりも 20 度近くも低く観測された. これは C10E8 分子のミセル中での分子運動が激しいのに対して、胆汁酸塩分子のミセル中での運動がかなり束縛されていることを示していると考えられる.

NOE 強度の温度依存性についての詳しい議論は、文献 5 の高分解 NMR テクニック (クラリッジ著) 8 章を参照して頂きたい.

次にこの NOESY スペクトルから得られる NOE 強度を規格化して、分子内もしくは分子間の $^1\text{H} - ^1\text{H}$ の間の距離の算出法を示す.

[3] オレイン酸 K の NOESY スペクトル: NOE 強度の規格化¹³⁾

各実験により NOESY の積算回数が異なり NOE 強度が異なるため、NOE ピーク強度の規格化を行う.

Fig. 9 の C2 と C3 は対称的に現れるので、NOE の平均を下記の式のように求める.

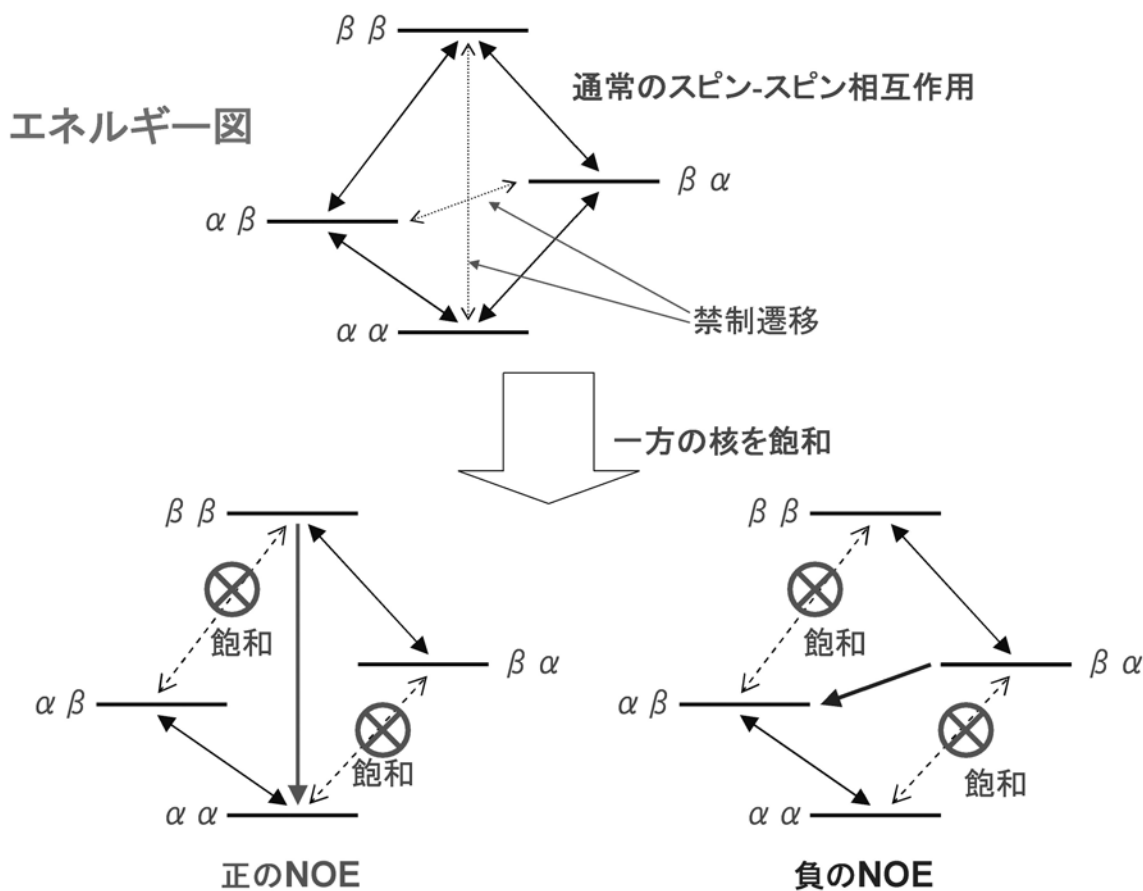


Fig. 7 NOEの符号と緩和経路の関係

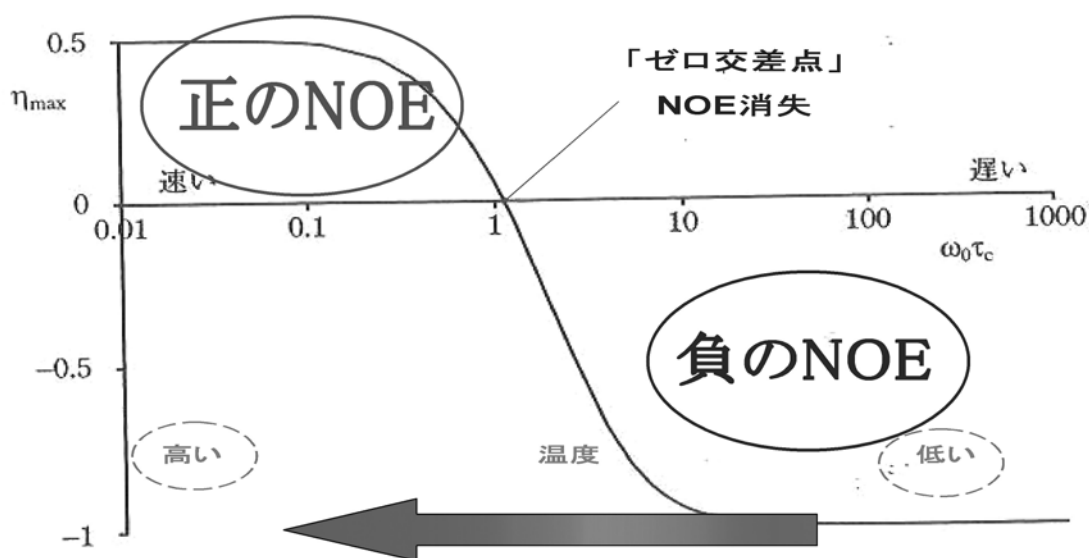


Fig. 8 NOE強度の符号の温度依存性と「ゼロ交差点」

$$V_{C2-C3} = \frac{1}{2} (V_{C2} + V_{C3})$$

そして, standardとなる C1 の対角要素の NOE 強度で割って規格化する.

$$RV_{C2-C3} = \frac{V_{C2-C3}}{V_{C1}}$$

RV_{C2-C3} は, 積算回数に依存しない, 規格化された NOE 体積となる.

次にこのようにして求めた規格化された NOE 体積を用いて, 温度一定での ^1H - ^1H 間の距離の算出を試みる.

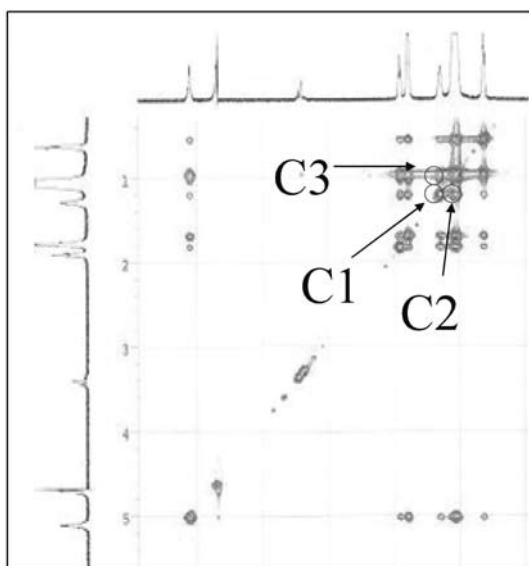


Fig. 9 オレイン酸Kの2次元NOESYスペクトル

[4] オレイン酸KのNOESYスペクトル:
NOE体積の温度依存性¹³⁾

規格化した NOE 体積をもとに ^1H 間距離を求めるために, mixing time に対する NOE 体積を温度ごとにプロットし, 初期勾配を求めた.

NOE 体積の測定結果は, 温度を 5°C から 65°C までの温度範囲を, 5°C ごとに温度上昇させて測定した.

また, Fig. 10 ~ 12 までの図中には, 10°C , 25°C , 35°C などの初期勾配の代表値についても記入してある.

まず, アルキル基と各部分との NOE 体積の mixing time 温度依存性を示す.

まず, Fig. 10 にオレイン酸 K ミセル溶液中で観測される NOE 相関の例を示す. それぞれの相関の 2 次元 NOESY チャート上での位置を, Table 1 に示す.

始めに, オレイン酸 K のカルボキシル基の隣の 17 番と 16 番の炭素間 (⑤と③) の NOE 体積の mixing time 温度依存性を, Fig. 11 に示す. これらの隣り合った炭素についている H は, 分子構造上常に NOE を示せる位置にあるので, この NOE は, つねにはっきり測定可能である.

Fig. 11 の測定結果は, 理論どおり, NOE 体積が mixing time = 0 ms で原点を通る直線を与える. この直線の傾きからそれぞれの初期勾配が求められる. ここで注目すべきは, 5°C と 10°C の初期勾配の順序が逆転している事である. この理由については, オレイン酸 K の濃度と温度の状態図 (Fig. 14) との関連で, 後ほど議論する.

次に, 17 番の炭素上の水素と隣の 16 番の炭素を飛ばして, 15 番以下のアルキル基の炭素についている H と mixing time に対する NOE 体積の温度依存性を Fig. 12 に示す. これも極めて良い直線関係を与えた.

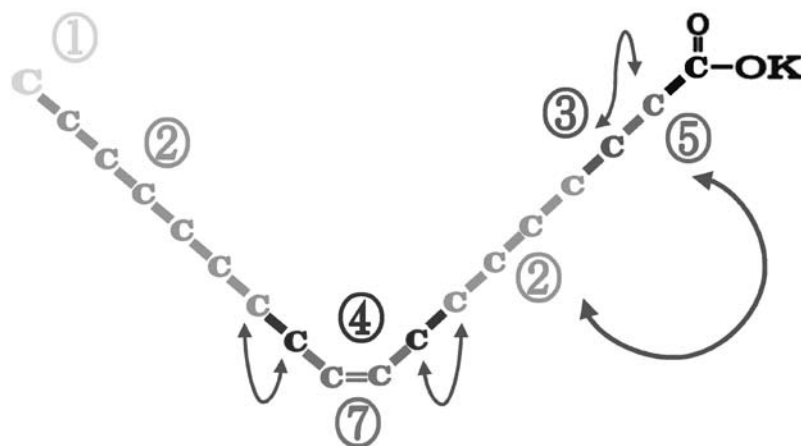


Fig. 10 オレイン酸K 分子上のアルキル基の各部分とのNOE相関

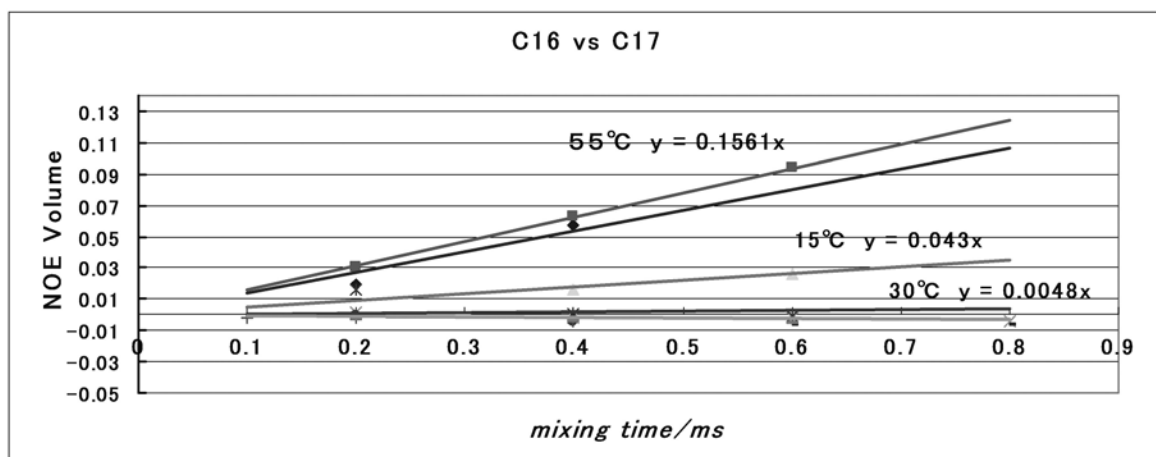


Fig. 11 C₁₆ - C₁₇ のmixing timeに対するNOE体積の温度依存性

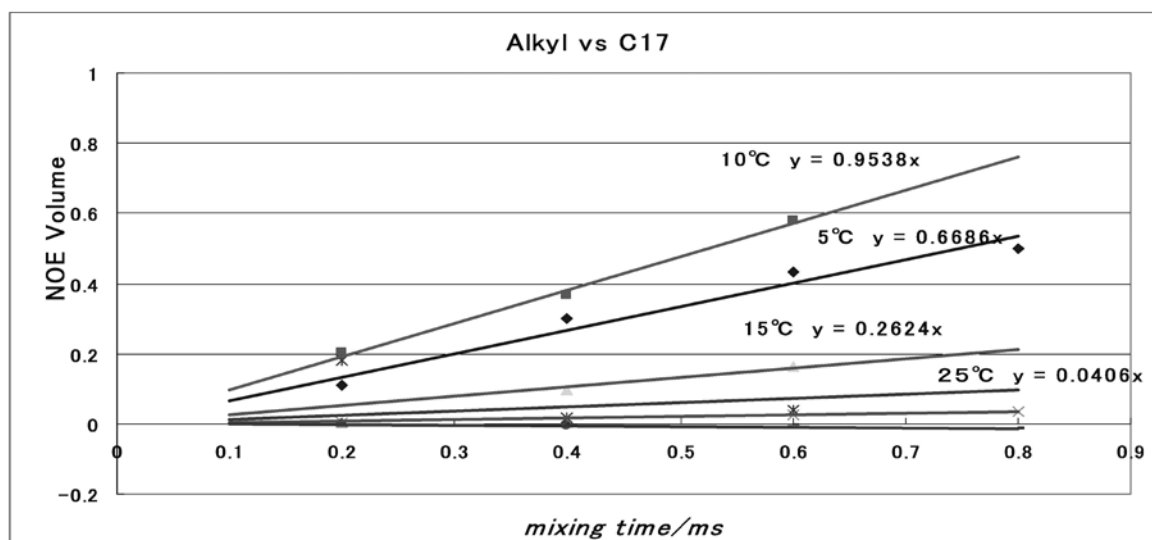


Fig. 12 Alkyl - C₁₇ のmixing timeに対するNOE体積の温度依存性

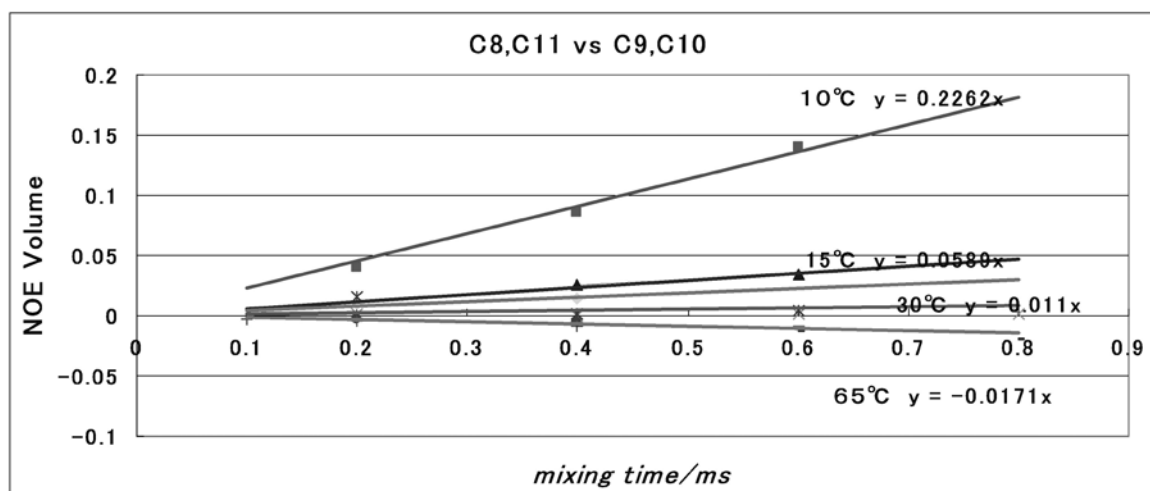


Fig. 13 Alkyl - C₈, C₁₁ のmixing timeに対するNOE体積の温度依存性

最後に、オレイン酸Kの特徴である9番と10番の炭素にある cis 二重結合に隣接している8番目と11番目の炭素とその周囲にあるアルキル基との相互作用を Fig. 13 に表しています。この相関も mixing time に対して非常に良い直線関係を示しています。

Fig. 11 ~ Fig. 13 のグラフより、いずれの交叉ピークの NOE 強度は原点を通り mixing time に比例して増加した。また、この近似直線から、初期勾配を算出できた。さらに、異なる温度での近似直線が、すべて原点を通ることから、この mixing time の範囲では、スピン拡散の影響を受けずこの NOESY 測定法の正確性が分かる。

これは昨年比べて積算回数 (nt) を 20 回から 40 回に飛躍的に大きくさせた効果である。

いずれの相関においても、温度上昇に伴い初期勾配が小さくなっているが、10℃の初期勾配に限り5℃の初期勾配よりも大きいことが観測された。この原因を考察する為に2005年に当研究室の福永が研究したオレイン酸Kの状態図を Fig. 14 に示す¹¹⁾。この状態図は、オレイン酸Kの溶存状態が変化すると、水溶液の散乱光強度の値とその温度に対する勾配が変化することを利用して描いたものである。

つまり、ある一定濃度のオレイン酸K水溶液の散乱光強度とこの勾配が変化した温度、つまり溶存状態が変化した温度を読み取り、その濃度の対数に対してプロットして作成した状態図である。

Fig. 14 中の log C = -3.00 付近の曲線は、表面張力

測定から求めた CMC - 温度 曲線である。

CMC 曲線のすぐ高濃度側にある M の領域は、ミセル領域を示している。また、A ~ E 領域は、それぞれ異なる会合状態および液晶状態にある領域であると思われる。

さらに、斜線で示した領域は、散乱光強度の温度勾配がほぼ0に近いことから、それぞれ上下にある相の共存領域ではないかと推測される¹¹⁾。

今回実験した CMC × 10 の濃度は Fig. 14 の矢印の濃度である。この図から考えると 10℃の NOE の mixing time に対する初期勾配が5℃の初期勾配よりも大きい原因として、5℃は A 領域と B 領域の共存状態であり、これに対して10℃は、B 領域の溶存状態だけの領域であるからだと考えられる。

さらに、Fig. 14 から見られる B 領域から C 領域の 20℃、C 領域から D 領域への 50℃の状態変化が予測されるが、これらの状態変化については、¹H 間距離の議論のところで述べる。

[5] オレイン酸KのNOESYスペクトルからの¹H原子核間距離の算出¹³⁾

Fig. 11 ~ Fig. 13 のグラフにより得られた初期勾配は、(i) 式の交差緩和速度 σ_{IS} であり、この値は、各温度で Fig. 11 ~ Fig. 13 から求まる。この σ_{IS} の値を用いて、下記の式より¹H間距離を求めた⁵⁾。

$$\sigma_{IS} \propto \gamma^4 \left\{ \frac{6}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} - 1 \right\} \frac{\tau_c}{r_{IS}^6} \dots\dots\dots (i)$$

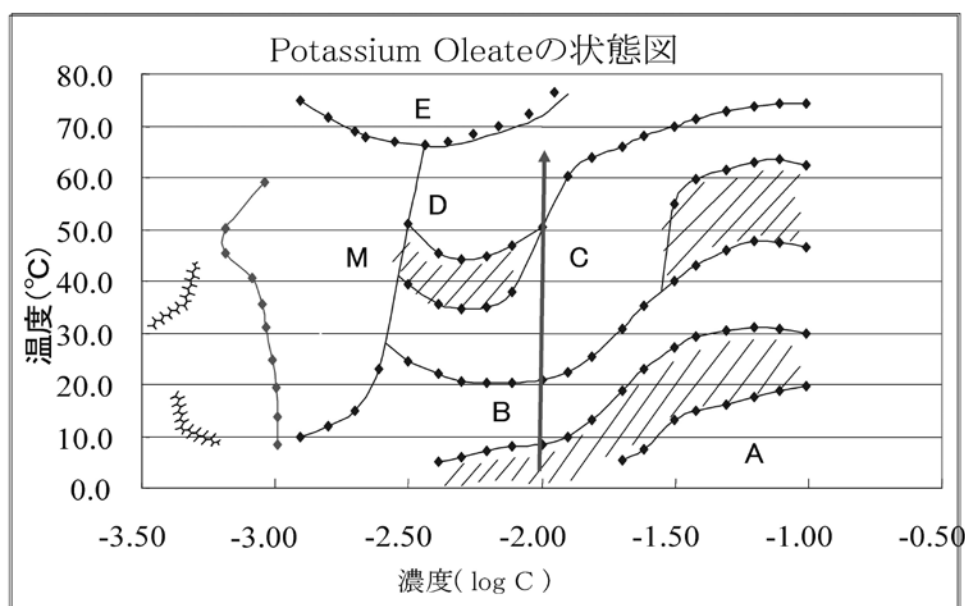


Fig. 14 オレイン酸Kの状態図¹¹⁾

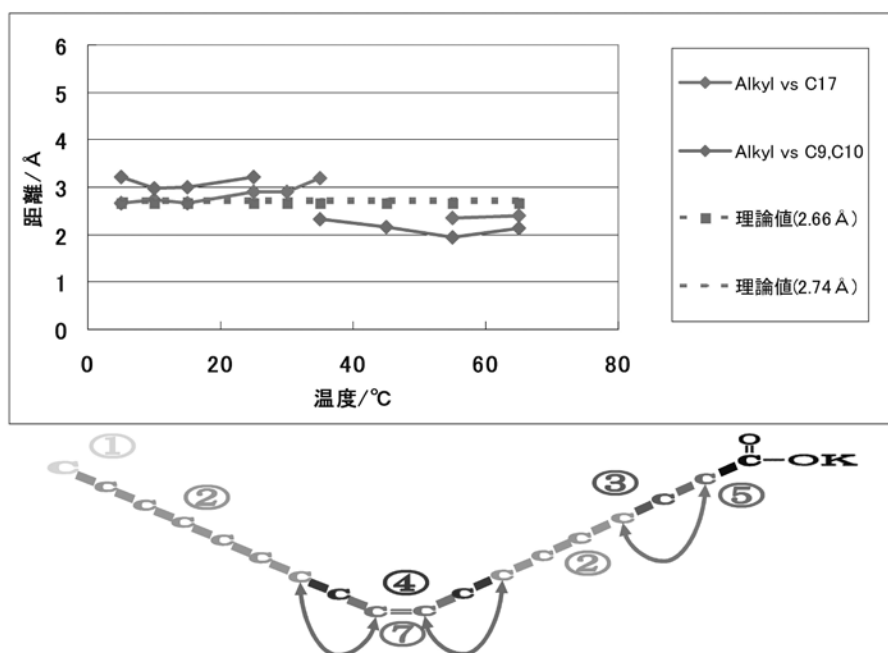


Fig. 15 炭素が隣り合わない場合の¹H間距離の温度依存性

σ_{IS} : 交差緩和速度 γ : 磁気回転比
 ω_0 : ¹H の共鳴周波数 (400MHz)
 τ_c : 回転相関時間 r_{IS} : ¹H 核間距離

(i) 式において, 温度が一定ならば,

$$\gamma^4 \left\{ \frac{6}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} - 1 \right\} \text{は } \tau_c \text{ に依存しない定数である.}$$

よって, 距離算出の式は, 二つの交差緩和速度の比をとることにより, (ii) 式から求められる.

$$\frac{\sigma_{[C2-C3]}}{\sigma_{[C15-C16]}} \approx \frac{\gamma^S_{[C15-C16]}{}^6}{\gamma_{[C2-C3]}^6} \times \frac{\tau_{[C2-C3]}}{\tau^S_{[C15-C16]}} \dots\dots\dots (ii)$$

$\sigma^S_{[C15-C16]}$ = (標準に用いた交差緩和速度)
 $\gamma^S_{[C15-C16]}$ = (標準に用いた¹H核間距離)

ここで, $\sigma^S_{[C15-C16]}$ は, 隣り合う炭素上にある¹H同士のNOE相関体積から求められている為に, 温度を変えても変化がなく一定と考えられるので, 標準の交差緩和速度と考えて, それに対応する¹H間距離 $r_{[C15-C16]}$ は, 2.66ÅとChem 3Dから計算された値を使用した.

まずは回転相関時間の比を一定, つまり

$$\frac{\tau_{[C2-C3]}}{\tau^S_{[C15-C16]}} \approx 1 \text{と仮定して, } ^1\text{H間距離を求めた.}$$

[5-1] 炭素が隣り合わない場合の¹H間距離の温度依存性

Alkyl基 vs C17や, Alkyl基 vs C9, C10といった相関の¹H間距離は, 上の分子構造図からわかるように, 間にCが1つ入るため, Chem3Dプログラムによって分子構造から理論的に求められる¹H間距離は, 前者が2.74Å, 後者が2.66Åである. グラフより, 実験により得られた¹H間距離は理論値とよく一致していることが分かる.

つまり, NOE強度からの¹H間距離の算出法が正しいことが証明できた.

今回の研究はオレイン酸Kに限らず, C10E8¹⁴⁾や胆汁酸¹⁵⁾水溶液系からも, NOE強度から¹H間距離が求まったことから, 我々の研究方法が正しい事を証明した.

次に隣り合う炭素上の¹H-¹H間の距離の温度依存性について議論する.

[5-2] 炭素が隣り合う場合の¹H間距離の温度依存性

いずれの相関も, 35°C以上の高温側で理論値に近い¹H間距離を得た.

一方で, いずれの相関も Fig. 16で25°Cもしくは30°Cで測定された距離に極大値を与えた.

この25°Cもしくは30°Cで極大値を与えた原因は,

Fig. 14 の B 領域から C 領域への相転移に原因があると思われる。

しかし、Chem3D プログラムにより得られた standard の ^1H 間距離は 2.58 \AA であることから、これらの極大値を距離として考えるのは無理がある。

$$\frac{\sigma_{[C2-C3]}}{\sigma_{[C15-C16]}^S} \approx \frac{\gamma_{[C15-C16]}^S{}^6}{\gamma_{[C2-C3]}^6} \times \frac{\tau_{[C2-C3]}}{\tau_{[C15-C16]}^S}$$

上式は、前に紹介した ^1H 間距離を算出する式である。

これまでは回転相関時間の比 $\frac{\tau_{[C2-C3]}}{\tau_{[C15-C16]}^S}$ を一定と仮定して距離を求めてきたが、Fig. 17 のすべての相関の ^1H 間距離は、隣り合う C 上の ^1H が存在するので、この ^1H 間距離が実測の距離に大きく寄与していると考えて、全ての γ^S と γ は 2.58 \AA 、つまり

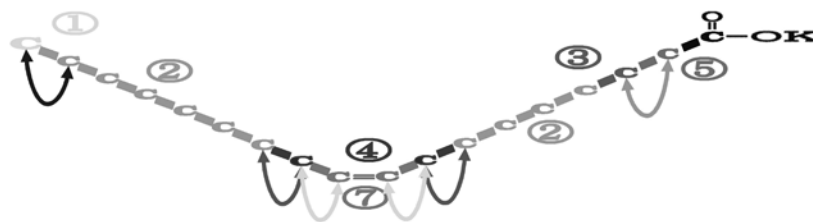
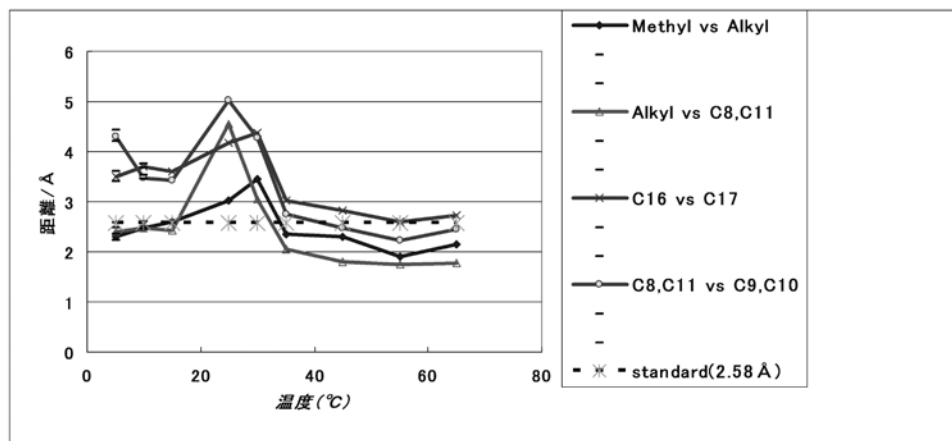


Fig. 16 炭素が隣り合う場合の ^1H 間距離の温度依存性

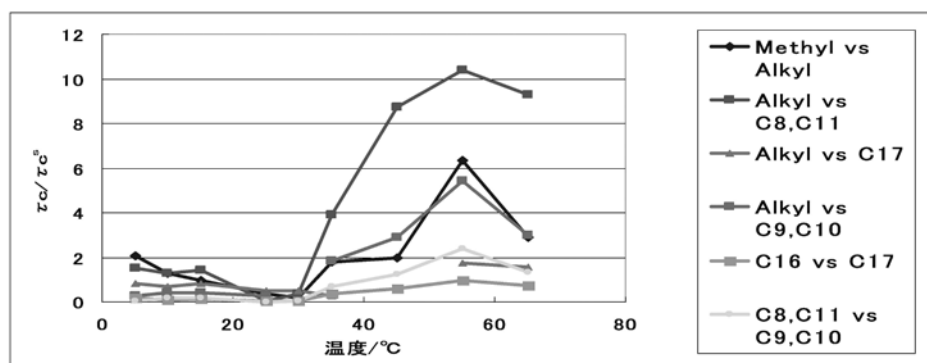


Fig. 17 炭素が隣り合う場合の τ_c の温度依存性

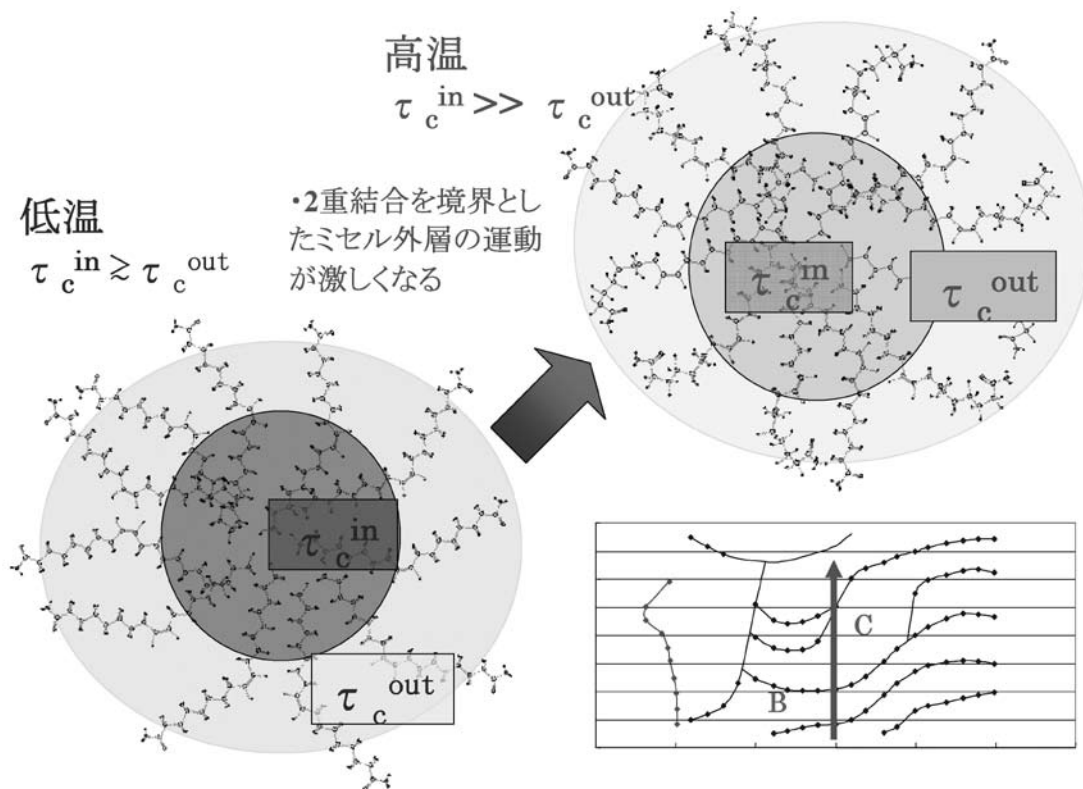


Fig. 18 オレイン酸ミセル中の τ_c の温度依存性

$\frac{\gamma_{[C15-C16]}^S}{\gamma_{[C2-C3]}^S} = 1$ であると仮定して, standard にした C16 とアルキル基の回転相関時間 τ^S (C15 vs C16) に対する他の相関の回転相関時間との比を求める.

[5-3] standard に対する各相関の回転相関時間 τ_c の温度依存性

Fig. 17より, Alkyl基 vs C8,C11, Methyl基 vs Alkyl基, Alkyl基 vs C9,C10の回転相関時間が, standardの回転相関時間よりも30°C以上で5~10倍大きいことがわかる.

一般に, 温度上昇に伴い分子運動が激しくなると, 回転相関時間は小さくなることから, standardの回転相関時間が, それぞれの部分の回転相関時間の1/5~1/10に小さくなっていることがわかる.

つまり, 30°C以上で, standardの回転相関時間で代表される親水基側のAlkyl基の分子運動が激しくなっていることがわかった.

結 論

以上の結果をまとめると, オレイン酸Kのミセルを, 二重結合を境界として主に疎水部から成るを内

層と親水基に近い外層に分けることができる. 低温側では外層の回転相関時間 τ_c^{out} は内層の回転相関時間 τ_c^{in} の半分程度しかないが, 高温側では τ_c^{out} は, τ_c^{in} の1/5~1/10程度に小さくなっている.

つまり, 高温側ではミセル外層の分子運動が激しくなることがわかった.

このことから, 以前紹介したB領域からC領域への相転移は, ミセル外部の変化ではなく, ミセル内部の分子運動による相変化であることがわかった.

参考論文

- 1) F. Bloch, W. W. Hansen, M. E. Packard, *Phys. Rev.*, **1946**, 69, 127.
- 2) E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.*, **1946**, 69, 37.
- 3) R. Sbrham, J. Fisher, P. Loftus, *Introduction to NMR Spectroscopy*, 3rd edn. Wiley, Chichester, **1988**.
(竹内敬人訳 ¹H および ¹³C NMR 概説, 化学同人 (1993))
- 4) O. Soderman, P. Stilbs, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1994**, 26, 445.

- 5) T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* ed. J. E. Baldwin, FRS & R. M. Williams, Elsevier Science Ltd. Oxford, 1999.
(竹内敬人, 西川実貴訳 有機化学のための高分解能 NMR テクニック, 講談社サイエンティフィック (2004))
- 6) P. Roscigno, G. D'Auria, L. Falcigno, G. D'Errico, L. Paduano, *Langmuir* 2005, 21, 8123
- 7) C. Groth, M. Nyden, K. C. Persson, *Langmuir* 2007, 23, 3000.
- 8) J. Singh, Z. Unlu, R. Ranganathan, P. Griffiths, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, 3997.
- 9) P. S. Denkova, L. Van Lokeren, R. Willem, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, 6703.
- 10) J. Borne, T. Nylander, A. Khan, *Langmuir*, 2001, 17, 7742.
- 11) 福永 司, 卒業論文 (2005).
- 12) 大藪 健, 卒業論文 (2006).
- 13) 橋口 康二, 卒業論文 (2007).
- 14) 中村 碧, 卒業論文 (2007).
- 15) 馬場崎 央枝, 卒業論文 (2007).