

第17回NMR討論会

講演要旨集

1978年11月13日(月)・14日(火)
日本都市センター講堂

共 催

日本化学会・日本分析化学会
日本薬学会・日本農芸化学会

第 17 回 N M R 討 論 会

共 催 日本化学会, 日本分析化学会
日本薬学会, 日本農芸化学会

日 時 1978年11月13日(月), 14日(火)

場 所 日本都市センター講堂(東京都千代田区平河町, 電話(03)265-1111)

第 1 日

11月13日(月) (10:00~10:50)

101 フーリエ変換NMRにおけるデータ処理にともなう誤差の評価, SN比と定量性

(東大理)○小野 祥子, 小澤 宏, 荒田 洋治, 藤原 鎮男 ... 1

102 Magic Angle Spinning法を併用した固体の緩和時間の測定

(日本電子)○藤戸 輝昭, 今成 司 ... 5

(11:05~11:55)

103 固体高分子における ^{13}C スペクトルの測定

(京大理)○前田 史郎, 寺尾 武彦, 雑賀 亜幌 ... 9

104 高圧, 高分解能NMR, トリアゼンの研究

(神戸大理)山田 博昭, ○藤野 和彦, 中塚 正勝, 世良 明 ... 13

(13:00~14:00)

I-1 奈良で開催された“生体系の磁気共鳴の国際会議”の報告

(東大理)宮沢 辰雄 ... 17

(14:10~15:25)

105 ベンゼン2置換体の緩和時間による回転状態の検討

(宮崎大工)○竹井 国雄, 萩原 仁 ... 18

106 ベンズニトリルの T_1 に及ぼす常磁性物質の影響

(宮崎大工)○萩原 仁, 竹井 国雄, 徳田龍一郎 ... 21

107 Brによる ^{13}C —スカラー緩和機構(3), sp^2 混成軌道をもつ系への応用

(東工試)○林 繁信, 早水紀久子, 山本 修 ... 25

(15:40~16:55)

108 ab initio法によるフッ化水素のスピン結合定数の計算

(北見工大)○福井 洋之, 三浦 宏一, 算用子淳夫 ... 29

109 加成則による ^{13}C 化学シフトの推定 (Aureola)
(東工試)○山本 修, 柳沢 勝 …33

110 極性プロトンの重水素置換による ^{13}C -NMRシフト効果
(シオノギ研)○照井 彬弘, 通 和夫 …37
(17:10~18:25)

111 双極子会合のNMRによる研究, その3
(阪大薬)藤原 英明, ○山崎 浩, 佐々木喜男 …41

112 ^1H nmr のファンデルワールス・シフトの影響
(電通大)○仁木 国雄, 中川 直哉 …45

113 アセトン分子の ^{13}C -NMR化学シフトの aprotic な溶媒効果及び Protonation の理論的考察
(東工大工)安藤 勲, 西岡 篤夫, 近藤 正広 …49

第 2 日

11月14日(火) (9:00~10:15)

201 有機スズ化合物とピリジン塩基との溶液内錯体形成
(阪大薬)○藤原 英明, 酒井 文彦, 菊月 尚子, 佐々木喜男 …53

202 液晶溶液を用いたアセチレン類の ^{13}C 化学シフトの異方性の決定
(東工試)○早水紀久子, 山本 修 …57

203 各種液晶のFT-NMRスペクトル
(日立日立研¹, 日立那珂²)○亀澤 範正¹, 安部 勝信², 笹渕 仁² …61
(10:30~12:10)

204 ^{11}B -nmrによる, カテコール並びにL-dopaとボレートアニオンの水溶液中における相互作用の研究
(東工大原炉研)○吉野 和夫, 小高 正敬, 岡本 真実, 垣花 秀武 …65

205 Potassium trans-2-PentenoateおよびPotassium trans-2-Hexenoateの ^{13}C -NMRスペクトルとこれらの水溶液中におけるコンホメーション
(日本電子, 名工大)○松下 和弘, 岡林 博文 …69

206 NMRによるイオンの水和に関する研究
(北見工大)○三浦 宏一, 福井 洋之, 千田 秀嗣 …73

207 ゲル中の水の状態分析: T_1 , 線幅, 不凍水量の温度履歴の検出とその解釈
(静薬大, 東大理)^{*}○片山 誠二, 藤原 鎮男^{*} …77

(13:00~14:15)

- 208 アラニン 3 量体化合物の NMR スペクトル
(東工大) ○長谷川 隆, 朝倉 哲郎, 西岡 篤夫 … 81
- 209 ^{13}C -NMR における三重共鳴法 ($^{13}\text{C} \{^1\text{H}\} \{^1\text{H}\}$) の Pentalenolactone
類への応用 (理研, 東大応微研*) ○鵜沢 洵, 瀬戸 治男*, 浦本 昌和,
竹内 節男 … 85
- 210 核酸関連物質の ^{15}N -NMR (味の素中研) ○甲斐荘正恒, 小西 博子 … 89
(14:30~16:10)
- 211 ^{14}N -NMR によるリン脂質二層の研究 I. 卵黄レシチンと DPPC の物性
(九大薬) 古賀けい子, ○金沢 洋子 … 93
- 212 Phosphatidylcholine vesicle の選択的 ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ NOE
(理研) 鵜沢 洵, 柴田 俊之 … 97
- 213 常磁性金属酵素を含んだ水のプロトン緩和
(京大理, 京大工,¹ 滋賀医大生化²) ○遠藤 一央, 小川 諭,¹ 森島 績,¹
佐伯 行一,² 岩城 正佳², 野崎 光洋² … 101
- 214 ^{31}P -NMR 法による細胞内の PH 測定
(京都府医大) ○吉崎 和男, 西川 弘恭, 山田 誠二, 亘 弘 … 105
(16:25~18:05)
- 215 ヒストンの folding 過程の ^{13}C -NMR による研究。ヘリックス依存ピークの
寄与 (国立がんセンター研) 斉藤 肇, 児玉 昌彦, 永田 親義 … 109
- 216 ^2H -NMR, 合成における ^2H - ^{13}C スピン結合の利用
(国立がんセンター研, 共立薬大) 斉藤 肇, 宮田 栄一, 小田 泰子,
佐藤 良博 … 113
- 217 西洋ワサビペリオキシダーゼのヘム近傍構造と基質の結合
(京大工) 森島 績, ○小川 諭, 福沢 信一, 米沢貞次郎 … 117
- 218 ミオグロビン及びヘモグロビンのアルキルイソニトリル誘導体及びそのモデル錯体の
 ^{13}C NMR- ^{13}C 化学シフト, ^{13}C - ^{57}Fe , ^{13}C - ^{15}N スピン結合定数
(京大工) 森島 績, ○林 健, 根矢 三郎, 米沢貞次郎 … 121

I-1は招待講演，その他は一般講演です。

講演時間 特別講演 60分

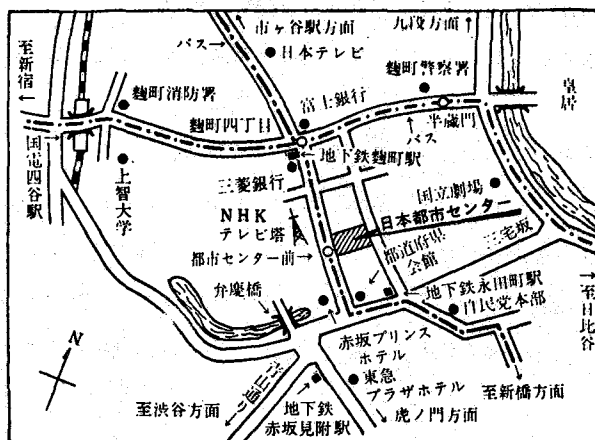
特別講演 25分

懇親会 11月13日(月) 最後の講演終了後，都市センター食堂ホールにて
行います。

日本都市センター

交通のご案内

- 地下鉄
 - 有楽町線 麴町駅・永田町駅より徒歩約3分
 - 丸の内線・銀座線 赤坂見附駅より徒歩約6分
- 国電
 - 中央線 四谷駅(麴町口)より徒歩約12分
- バス
 - 都バス・京王バス(新橋⇄中野哲学堂)
平河町二丁目，都市センター前
 - 都バス(新宿⇄銀座) 麴町四丁目下車徒歩約3分



第 1 日

11 月 13 日 (月)



101 フーリエ変換NMRにおけるデータ処理に伴う誤差の評価

SN比と定量性

(東大理) ○小野祥子・小澤宏

荒田洋治・藤原鎮男

1. 目的

フーリエ変換(FT)NMRにおいては、小型計算機を用い、デジタル化されたスペクトルの処理を行う。したがって、NMRにおける定量性、S/N比の改善を議論する場合、デジタルなデータ処理の検討は不可欠なものである。このデジタルデータ処理過程は、AD変換器によるシグナルのデジタル化、積算、高速フーリエ変換(FFT)、DA変換器によるアナログ化から成っている。Cooperは、ダイナミックレンジの問題にし、研究を行っている¹⁾。また、デジタル信号論においては、DFTにおける誤差、アルゴリズム等の検討が行われている²⁾。しかし、これは雑音に対する解析が主なものであり、いろいろ大きな信号が雑音と共存する場合の解析には不十分である。以上の様に、各々の過程においてはある程度の研究が行われているが、それぞれの過程のつなかりを明確にし、よりよい実験条件の設定、S/N比の改善、定量性を議論するためには十分とはいえない。本研究では、以上の様な段階を総合的に検討し、それぞれの段階における誤差の評価を行うものである。

2. 方法

実験A (FFTによる誤差)

FTNMRのデータ処理に用いられるFIDを作り、FFTによる誤差の見積り、解析を行った。雑音としては、乱数、信号としては、ローレンツ型ピークを逆フーリエ変換して作ったFIDを入力として用いた。入力を仮数部56bitの浮動小数点でフーリエ変換したものを基準とし、これから種々の条件でフーリエ変換したものの誤差のrmsをとり、比較した。ここでは、複素数のFFTのプログラムを用い、sineのTableは漸化式を使い、56bitの浮動小数点で求めておいたものを、それぞれの条件に変えて使った。実験A-1: 雑音を含まないシグナルを用い、FFTによる系統的な誤差を見積った。固定小数点で処理に使う語長(bit数)を変え、入力が一定の場合、計算機いっぱいに入力した場合のそれぞれにおいて誤差を求めた。実験A-2: 大きさを変えた乱数を入力し、16bit、24bitの固定小数点、仮数部24bitの浮動小数点で処理し、誤差を求め、比較した。実験A-3: 入力をシグナル+乱数とし、16bit、24bitの固定小数点、仮数部24bitの浮動小数点で処理し、誤差を求めた。

実験B (ブロック積算におけるS/N比)

ローレンツ型ピーク+乱数を仮数部56bitの浮動小数点で処理して、実験条件にあわせてFIDを作り、入力とした。ここでは、AD変換→時間領域での積算→FFT→周波数領域での積算の全過程を通ったシグナルのS/N比を種々の条件で比較した。S/N比をあらわすパラメータとして、注目するシグナルの半値巾の2倍の領域における標準偏差を期待されるシグナルの高さで割ったものをDDSPとし、これを用いた。また、周波数領域での

おのしょうこ・おざわひろし

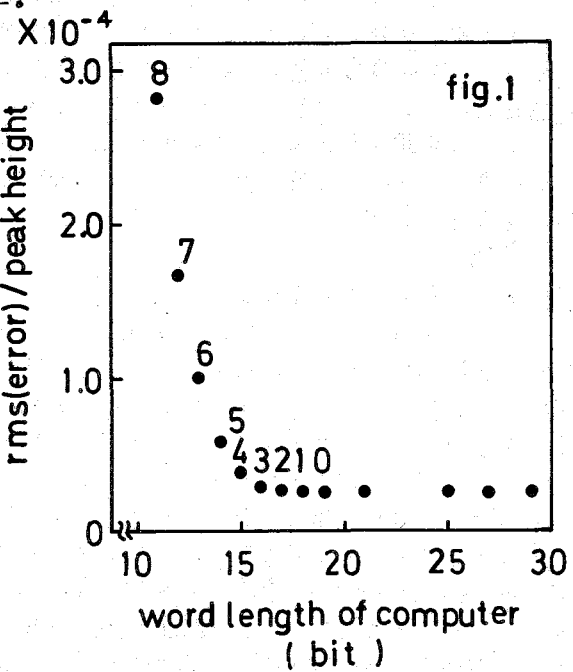
あらたようじ・ふじわらしづみ

overflowもおこさせない様にした。なお、ここでは実験のFFTのプログラムを使った。
実験B-1: 雑音にかくれた1本のシグナル(雑音とシグナルの比が1:1~1:0.13)のFIDを用い、合計400回になる様な何種類かのブロック積算を行い、S/Nを比較した。ADCのbit数は12bit、16bitの固定小数点による処理を行った。なお、比較のため、ADC12bit、24bitの固定小数点処理、ADC24bit、24bitの固定小数点処理、ADC12bit、仮数部24bitの浮動小数点処理、ADCを置さず仮数部24bitの浮動小数点処理を行った。なお、入力はADC11、16位に入る様にしてある。
実験B-2: 大きいシグナルと共存する小さいシグナルのFIDを用い、合計400回になる様な何種類かのブロック積算を行い、S/Nを比較した。大きいシグナルと小さいシグナルとの比は、32:1である。また、雑音と小さいシグナルの比は1:4から1:0.13までである。入力はADC11、16位に入る様にして、処理は実験B-1と同じ条件で行った。

3. 結果及び考察

実験A (FFTによる誤差)

4096点のFFTにおいて、一定の大きさの信号のみを入力し、固定小数で処理した場合の信号が生出る系統的な誤差のピークに対する大きさをfig.1に示した。16bitのコピュータを使った場合、FFTによって生じる系統的な誤差は 10^3 のオーダーである。点の横にoverflowの回数が示してあるが、overflowの影響が統計的に予想されるものほど大きくないことがわかる。また、コンピュータの語長が長くなっても誤差が改善しついにとなり、誤差がsineのtableによるものではないことがわかる。入力を計算機11、16位に行う結果も考え合わせると、シグナルによって生じる誤差は計算機の最後の桁に関するものであり、シグナルの大き



さには関係しついに変わらなかった。また、誤差は乱数のみを入力した場合の方が大きい。16bitで処理した場合、信号によって生じる系統的な誤差は、シグナルの大きさに対して 10^3 のオーダー、乱数によって生出される誤差は、乱数に対して 10^3 のオーダーである。以上より、固定小数点でFFTを行う場合には、大きい信号が共存する場合も、信号が雑音にかくれて11の場合も、計算機11、16位に入力することが望まれないことがわかった。また、固定小数点の語長と同じ長さの仮数部を持つ浮動小数点による処理と比較することにより、FFTによる誤差は、固定小数点によるものの方が1/4倍ほど大きいことがわかった。なお、漸化式を使ってsineのtableを作る時、これをsingleで行うと、doubleの場合の

30倍ぐらいの誤差が出ることがわかった。

実験B (ブロック積算におけるS/N比)

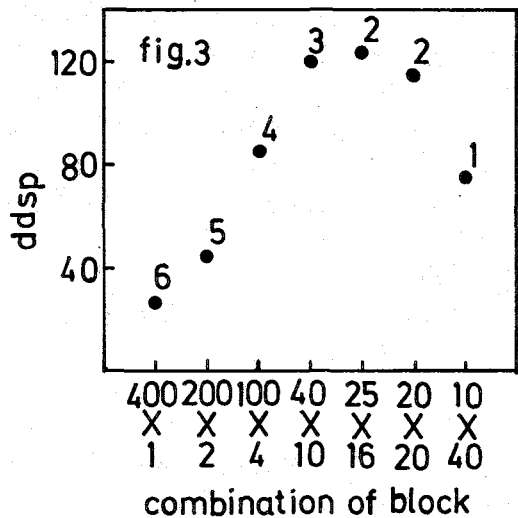
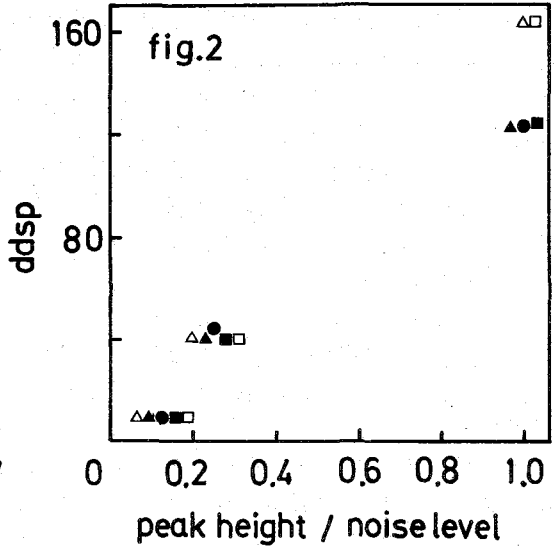
実験B-1: 雑音にかくれた1本のシグナル

時間領域での積算400回、周波数領域での積算1回の組、同様に40×10、20×20の組について、2¹⁰の大きさの雑音に対して、2⁰、2²、2⁶のシグナルを入れてS/Nを見た。ブロック積算の種類による違いはなかった。以下の実験の結果も考え合わせると、これは、時間領域の積算でのスケールダウンが、どの場合も起っていないため、ADCが12bit命令に使用されているからである。40×10の組において、最終的はS/Nに比例する量であるddspと入力シグナルの雑音に対する大きさとの関係は、fig.2の様になる。ADC12bit、16bitの固定小数点処理の場合、入力のS/Nが良ければ、積算によるS/Nの改善が期待してはならないことがわかる。これは、ADCを11bitにしてあげれば、処理のbit数、形式によらず常に起る。しかし、ADCを24bitにしたもの、ADCを通すほかのものでは起らない。以上より、S/Nの改善が期待してはならない原因は、処理の精度によるものでなく、ADCのbit数が十分でなかったためである。これより、この様な場合、ADCのbit数を有効に使うことが最も重要であることがわかる。

実験B-2: 大きいシグナルと共存する雑音にかくれた小さいシグナル

1) 2¹⁰の大きさの大きい信号、2⁶の小さい信号、2⁶の雑音が共存しているものより得られるFIDを用い、時間領域での積算400回、周波数領域での積算1回の組、同様に200×2、100×4、40×10、25×16、20×20、10×40の113通りの種類のブロック積算を行った。ADC12bit、16bitの固定小数点処理の結果はfig.3の様になる。縦軸は、小さいシグナルの積算後のS/Nに比例する量DDSPであり、横軸はブロック積算の種類である。点の付に示したのが、ADCのスケールダウンの回数である。なお、この場合のFFTによるoverflowは5回で、すべて同じである。この様

ADC 12(bit) integer	16(bit)	●
	24(bit)	▲
	floating	■
ADC 24(bit) integer	24(bit)	△
ADC -	floating	□



に、ブロック積算の種類によってS/Nの改善が違ふ原因は、①ADCのスケールダウニによってS/Nの改善が悪くなつた、②FFTを何回もすることにより、大きな信号から系統的な誤差が生ずるS/Nの改善が悪くつた、③周波数領域でのスケールダウニによりS/Nの改善が悪くなつた、の3つが考えられる。400×1から25×16の組にかけてS/Nの改善が良くなつてゆくのは①によるものであり、ADCのスケールダウニが少なくてゆかためである。このADCのスケールダウニは、非常に小さくきいてゐる。20×20から10×40の組でS/Nの改善が悪くなつてゆく理由は②か③である。ここで、実験Aで求めたFFTによる誤差を用ひS/Nの改善を見積ると、FFTによる影響は非常に小さく、オーダーが1桁～2桁下である。他の条件でFFTによる影響を見積つても非常に小さいことがわかつた。また、以上の様子は、ADC 12bit, 24bitの固定小数点処理ではあらわれない、ブロック積算をして、しなしてもS/Nは同じであつた。

ロ) 大きい信号を 2^8 、小さい信号を 2^6 の大きさに固定し、雑音の大きさを 2^0 、 2^2 、 2^4 、 2^6 と変え、400×1の組について、S/Nの改善の様子を計つたものが、fig.4である。

ADC 12bit, 16bitの固定小数点処理では、S/Nの改善が非常に悪い。これは、時間領域の積算によってADCのスケールダウニが起るためである。この効果を除いたものが、ADC 12bit, 24bitの固定小数点処理であり、ADCのスケールダウニが非常に小さくきいてゐることがわかる。ADC 11bitで、24bitの固定小数点処理と24bitの浮動小数点処理の間に差がつかないことから、FFT中のoverflowがきいてゐないことがわかる。

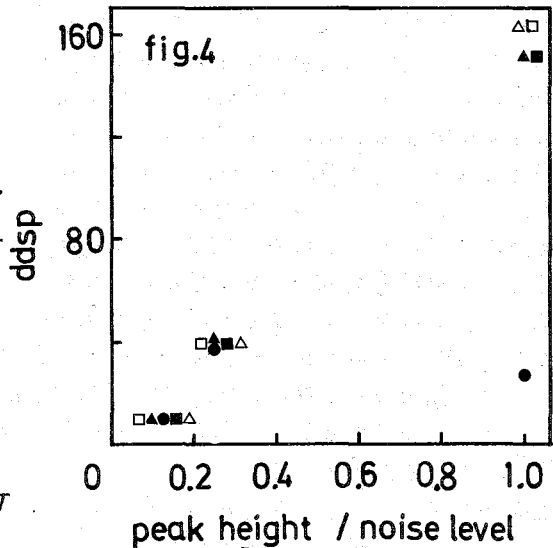
また、ADCを過ぎずに24bitの浮動小数点処理を行うと理想的なS/Nの改善が行われる。これはADC 11bitで浮動小数点処理をしたものの差が、ADCを過ぎたためにあるS/Nの低下であり、雑音との比が1以上の信号ではかたりきいてゐることがわかつた。なお、40×10, 20×20のブロック積算の組でも同様なことが言えた。

4. 結論

以上の実験事実より、AD変換器のresolutionが、S/N比の改善に大きく影響することがわかつた。雑音と同程度、あるいはそれ以上の信号では、大きい信号が共存する場合も、しな場合も、この影響が大きく、ADC 11bitに入力することが望ましい。また、ADCのスケールダウニを起させずに、ADCのbit数を有効に使うことが重要である。なお、FFTによって起る誤差の影響は無視できるほど小さい。

《参考文献》

- 1) J. W. Coopen : J.M.R., 28, 405 (1977) 2) P. D. Welch : IEEE Trans. Audio Electroacoust. AU 17, 151 (1969)



(日本電子) 藤戸輝昭 今成 司

1. はじめに

我々はこれまで、柔粘性結晶のアダマンタン、DL-カンファ-の固体で ^{13}C の T_1 , $T_{1\rho}$ を測定し、固体状態での分子運動について研究してきた¹⁾。またカンファ-については各種の溶媒中で ^{13}C の T_1 , $T_{1\rho}$ を測定して溶液状態での分子運動について調べ、固体と溶液での分子運動のちがいと、それが緩和時間にどのように反映するかについて考察した²⁾。しかしながら、前回までの固体 ^{13}C の緩和時間判定では、溶液状態でのスペクトルのすべてのピークに対応するカーボンを完全に分離することは出来なかつたため、各部分の詳細な緩和時間の比較をするには至らなかつた。

今回、我々は High Speed Magic Angle Spinning 法 (MAS) を併用することによって、DL-カンファ-について各カーボンをすべて分離した状態で測定を行い、A. 溶液状態 B. 固体状態 (^1H デカップルのみ) C. 固体状態 (^1H デカップル/MAS) の3つの状態で得られた緩和時間の比較を行った。

2. M.A.S.法について

実験

装置は、JEOL FX-100 FT-NMR を使用し、MAS プロブは 15mm 用のサンプルコイル内に直径 12mm \times 10mm のダイフロン製の cylindrical type 高速回転カプセルを上から挿入し、下部より細いズルで air を吹きつけて回転する方式をとっている。 ^{13}C 及び ^1H の RF 強度は約 30kHz (1/2 パルス幅で $8\mu\text{Sec}$) である。Cross-Polarization 法での ^{13}C 緩和時間判定には特殊なパルス系列が必要となるが、煩雑なので使用することはさけ、通常のパルス列で Gated decouple 法を用いてサンプリング時のみ high power decouple する方法を用いた。また ^1H 照射による温度上昇 (300W power Amp 使用) をさけるため、サンプリング時間は 200mSec に制限し、Zero filling 法を使用した。このスピナーで使用出来る最高回転数は現在のところ、約 5K 毎である。



Fig.1 M.A.S. spectra of solid camphor

ふじとてるあき いまなりまもる

データ

この方法によって得られたデータの例を次に示す。第1図は3つの状態での DL-カンファアの ^{13}C スペクトルの比較である。固体状態では約 80 Hz の線幅のものが MAS 法では 5 Hz くらいまで減少し、ほとんど溶液状態と変わらないスペクトルが得られた。

第2図はカーボンブラックを添加したゴムの MAS スペクトルである。この場合、左側の3本のピークは分離するが、カンファアほどには線幅がシャープにならない。アダマントンやホルネオールではカンファアと同じ程度にシャープになった MAS スペクトルが得られた。

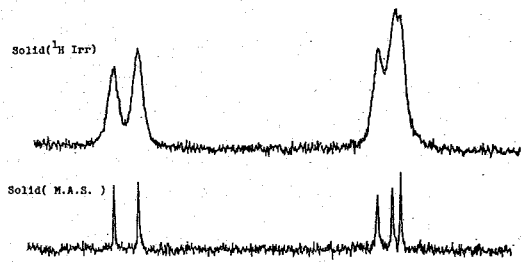


Fig.2 M.A.S. spectra of carbon-filled-rubber

線幅の原因の考察

固体 ^{13}C -NMR スペクトルで線幅の原因となるのは、プロトンからの双極子相互作用とケミカルシフトの異方性による分布 (粉末サンプル) によるものである。前者の双極子場は High Power プロトンデカップルによって除くことができる。カンファアでプロトンの固体スペクトルをとってみたところ、第3図のようになった。双極子場による分離は 9.5 kHz であり、デカップルパワー 30 kHz はこれに比べると十分大きいと考えられる。

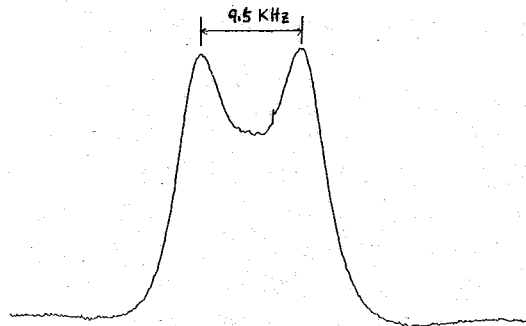


Fig.3 Proton spectrum of solid camphor.

一方ケミカルシフトの異方性は、MAS によって除去される。今、静磁場と β の傾きをなす軸のまわりに粉末サンプルを回転させた時、ケミカルシフトテンソルの時間平均は次式で表わされる。

$$\bar{\sigma}_{zz} = \frac{1}{2} \rho \sin^2 \beta \cdot \text{tr} \sigma_i + \frac{1}{3} (3 \cos^2 \beta - 1) \sum_P \sigma_{ip} \cos^2 \chi_{ip}$$

ここで ρ はケミカル

シフトテンソル、 χ_{ip} は各核が対称テンソル σ_i^* の主軸となす角である。 β を magic angle 即ち $\beta = \cos^{-1} \sqrt{1/3} = 54^\circ 44'$ にセツトすると上式の第2項の異方性項は消え、第1項の等方項のみ残り、液体の場合と同じになる。回転数はケミカルシフトの異方性の1/3 程度以上あれば良いから、カンファアの場合は数百 Hz 以上の回転数で十分である。しかし高分子サンプルではプロトンの線幅が 10 Hz 以上あり、しかもケミカルシフトの異方性による分布が kHz のオーダーになるため、もっと High Power の H デカップルとともに

数kHzに及ぶ高速回転が必要となる。³⁾ (¹³Cは異方性が最大100 ppm. 即ち25MHzに対して2.5kHzである。)なお前記カーボン添加ゴムでのナローイングの不足の原因は回転数の不足ではなく、カーボンブラック添加によるラジカル量の増加からくる双極子幅と考えられる。本実験で用いたような cylindrical type のスピナーでは高速回転時のノイズを減少させるのがむづかしいので、Conical type (コマ型) のものが主流となりつつある。⁴⁾
 従々も現在、新type のスピナーで回転数を上げ、さらにHデカップルパワーも上げることにより、高分子サンプルにおいても同様の測定が出来るよう改良中である。

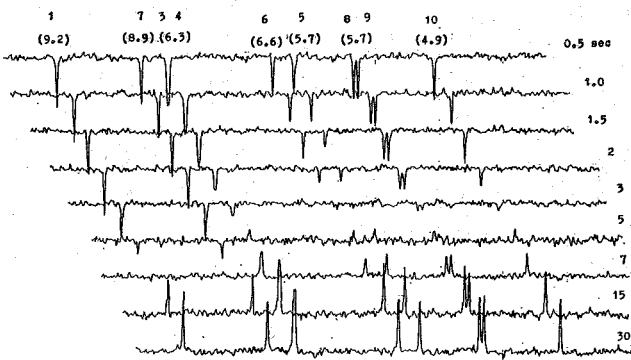


Fig. 5 ¹³C- T_1 of solid camphor by M.A.S.

3. 緩和時間測定

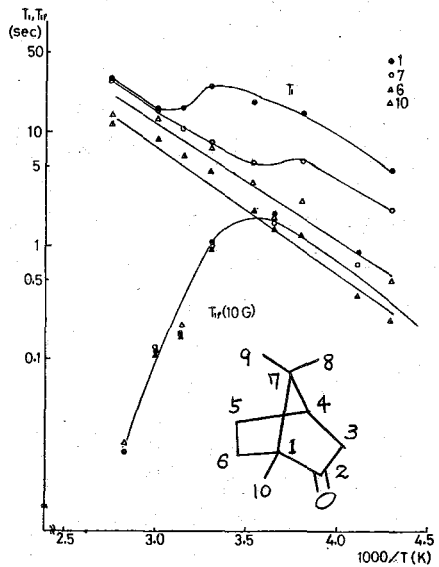
図4は ¹Hデカップルのみの時の Solid Camphor の T_1 及び $T_{1\rho}$ の温度変化をプロットしたものである。

T_1 は温度上昇とともに増加し、その傾きから求めた活性化エネルギーは $E_a = 4.5 \text{ Kcal/mol}$ であった。一方 $T_{1\rho}$ 値はいずれの炭素でもあまりちがいがなく、13℃付近で極大を示し、高温側で減少する。この高温側の傾きから求めた活性化エネルギーは $E_b = 18 \text{ Kcal/mol}$ であった。DL-カンファー固体で MAS を併用して 30℃ で測定した ¹³C- T_1 のチャートを図5に示した。この方法を用いればほとんどすべてのピークが分離して測定出来ること分かる。しかし未だ現在のところ温度可変出来るところまでには至っていない。このサンプルで、A. 溶液状態 B. 固体状態 (¹Hデカップルのみ)

Table 1. T_1 of camphor.

Sample	Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A. liquid (CDCl ₃)		36.4 _{sec}	37.9	5.2	5.8	3.6	4.3	31.9	4.7	5.1	5.2
B. Solid (¹ H decouple)		20.8	—	6.0	—	4.3	4.7	8.3	4.8	—	5.1
C. Solid (MAS)		9.2	49.3	6.3	(6.3)	5.7	6.6	8.9	5.7	(5.7)	4.9

Fig. 4 ¹³C- $T_1, T_{1\rho}$ vs. $1/T$ of Solid Camphor



C. 固体状態 (^1H デカツポル/MAS) と3つの状態で T_1 を測定して比較したデータを表1に示す。

これらの結果から次のことが分る。1位及び7位の4級炭素以外のカーボンの T_1 は、A、B、Cいずれの状態でもあまりちがいが無い。これらの ^{13}C の T_1 は主として分子内の隣接プロトンとの双極子相互作用によって決っており、先の T_1 の温度変化から求めた活性化エネルギー $E_a = 4.5 \text{ Kcal/mol}$ から分るように、カンファーは固体状態でも分子運動が激しく、溶液とほとんど変わらない値を示すのであろう。しかし4級炭素では固体状態の T_1 の方が、液体状態より短くなっている。これは固体状態では結晶内のパッキングのため、分子内のメチルプロトンが近づいてくるためか、又は分子間距離が近くなつて隣りの分子のプロトンの影響が出てくるかのいずれかと考えられる。(カルボニル炭素のデータからは、分子間のプロトンの影響はあまり大きくないことが示唆される。) しかし1位の炭素ではプロトンデカツポルのみの時とMAS併用時とで T_1 値が大きく異つており、この原因が現在のところ不明で、上記いずれの方が緩和機構として妥当か決められない。

我々は T_1 の測定の外に、MASを併用した $T_{1\rho}$ 測定も行ったが、この場合には各炭素の $T_{1\rho}$ 値はいずれも同じような値しか示さなかった。これは $T_{1\rho}$ には $E_b = 18 \text{ Kcal/mol}$ で示されるゆつくりした自己拡散が主としてきいてくるためであらう。

文 献

- 1) 藤戸、大内、平野、細野、今成 : 第16回NMR討論会要旨集 P209 (1977)
- 2) 平野、松下、細野、藤戸、今成 : 日本化学会第37春季年会要旨集 P594 (1978)
- 3) E. O. Stejskal, J. Schaefer and R. A. McKay :
J. Mag. Resonance 25 569 (1977)
- 4) K. W. Zilm, D. W. Alderman and D. M. Grant :
J. Mag. Resonance 30 563 (1978)

103 固体高分子における¹³Cスペクトルの測定

京大理 ○前田史郎・寺尾武彦・雑賀正規

序 proton-enhanced NMR^{1,2} (固体中の¹³C等の微弱信号核の高分解能NMR法)を用いて種々の合成高分子(固体)における¹³Cの化学シフト異方性による粉末スペクトルを測定した結果を報告する。

実験 測定は図1にそのブロックダイアグラムを示す自作の装置を用いて行なった。電磁石は日本電子の3H-60型高分解能NMR装置のものを利用してあり、共鳴周波数は¹H,¹³Cに對して、それぞれ約60MHz, 約15MHzである。フーリエ変換等のデータ処理は、ミニコンピュータ-TI 990/10をオンラインにして行なっている。測定に用いたパルス系列を図2に示す。Iは abundant spin(¹H)を, Sは rare spin(¹³C)を表わし, H₁I, H₂Sはそれぞれ約11G 約44Gである。パルス系列のくり返し時間およびmixing時間の設定は慎重に行なわなければならない。各¹³Cの site で交叉緩和時間は異なる値を持つので、これよりも長くmixing時間を設定しないと正しいスペクトルは得られない。また、mixing時間が¹HのT₁よりも長ければ、一旦enhanceされた¹³Cの信号がその間に減少する。したがって、温度によってT₁, T_{1ρ}が大きく変化する場合、くり返し時間およびmixing時間を最適に選ぶようにしなければならない。T₁が非常に長い場合、T_{1ρ}が非常に短い場合、または交叉緩和が極端

Fig. 1. BLOCK DIAGRAM OF THE DOUBLE-RESONANCE SPECTROMETER

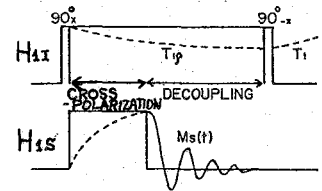
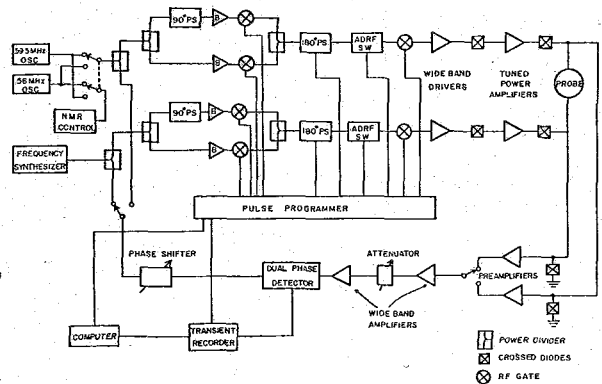
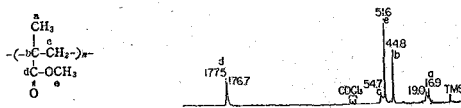
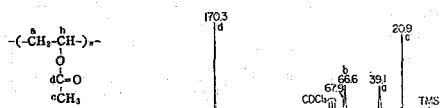


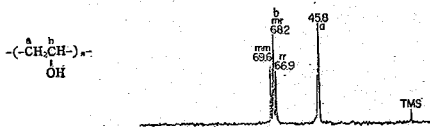
図2. proton-enhanced NMRのパルス系列



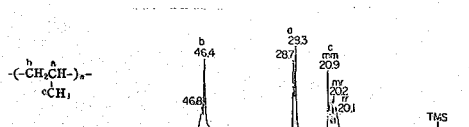
ポリメチルメタクリレートの¹³C-NMR スペクトル



ポリ酢酸ビニルの¹³C-NMR スペクトル



ポリビニルアルコールの¹³C-NMR スペクトル



アタクチックポリプロピレンの¹³C-NMR スペクトル

図3. 溶液での¹³C NMR スペクトル

まえだ しろう・てらお たけひこ・さいか あぼろ

に先磁化している場合(交叉緩和時間が長い)には、この方法では実際上信号が得られないことがある。測定に用いた試料はアタクティック(at-)およびシンジオタクティックポリメタクリル酸メチル(PMMA)、アタクティックポリ酢酸ビニル(PVAc)、アタクティックポリビニルアルコール(PVA)、およびアイソタクティック(is-)ポリプロピレン(PP)である。参考のために各々に對して、溶液で得られているスペクトルを図3に示す。

結果と考察

1. PMMA 常温で得られたスペクトルは at-PMMA と st-PMMA とで違い、すなわち立体規則性による差は見られなかった。図示したスペクトルは全て st-PMMA のものである。図4に80°C以上における st-PMMA の¹³C スペクトルを示す。温度の上昇にともなう異方性の減少が認められるが、これはガラス転移(転移温度約85°C)によって主鎖のマイクロブラウン運動が活発になることによるものと思われる。最も低磁場に現れているカルボニル炭素が特に大きな減少を示している。図5に常温以下における st-PMMA の¹³C スペクトルを示す。200K付近で、

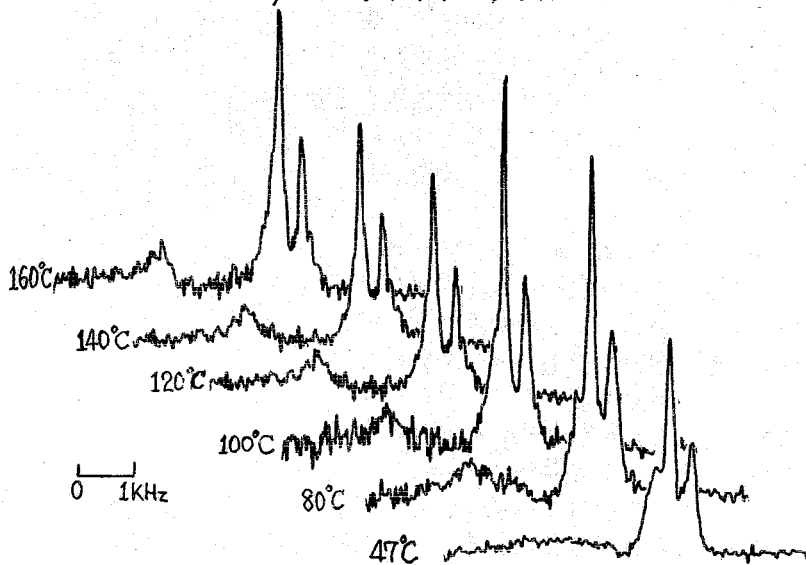


図4. 80°C以上における st-PMMA の¹³C スペクトル

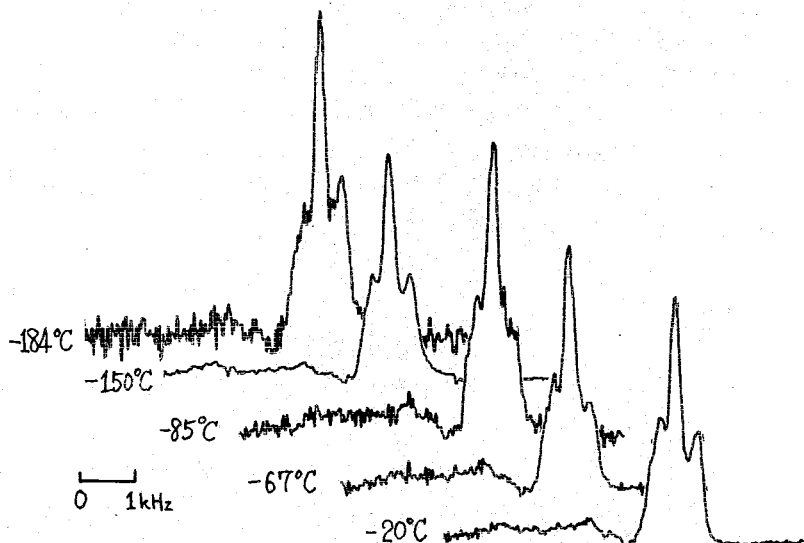


図5. 常温以下における st-PMMA の¹³C スペクトル

α-メチル基の強度の減少が認められるが、この減少が mixing 時間が適当でないことに起因するのではないことを確かめるために同一条件で mixing 時間だけを変化させて測定した。図6に

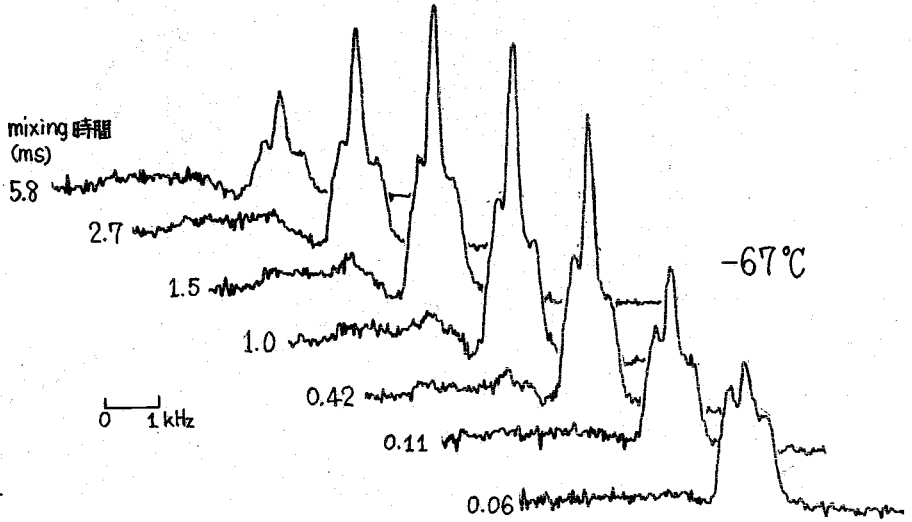


図6. -67°C における st-PMMA のスペクトルの mixing 時間依存性

示したスペクトルを見ると、mixing 時間が短かすぎると吸収線相互間の強度比が正確でなく、また逆に長すぎると全体の強度が減少し、1ms程度が適当であることもよくわかる。α-メチル基の強度の減少の理由は今のところ分からない。 ^1H の二次能率の測定から、液体窒素温度付近ではエステルメチル基は回転しているが、α-メチル基は回転していないことが知られているが、 ^{13}C の粉末スペクトルではそれが観測されなかった。これはメチル基が静止している時のメチル炭素の化学シフトテンソルが軸対称であるためと思われる。

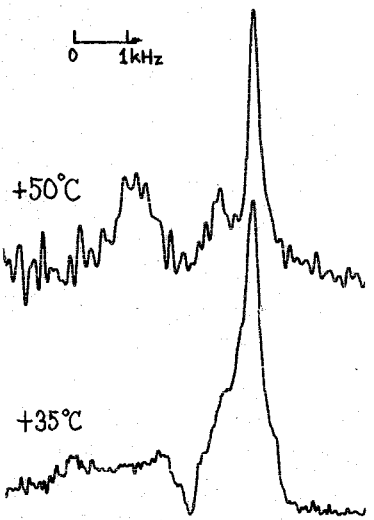


図7. at-PVAc のスペクトル

2. PVAc at-PVAc に関しては、常温(33°C)と 50°C において測定した。その結果を図7に示す。st-PMMA の場合と同じように、温度の上昇にともなう異方性の減少が認められ、 50°C のスペクトルにおいてカルボニル炭素の線幅が先鋭化されるだけでなく、α-メチル炭素の吸収線も分離されている。これも、ガラス転移(転移温度 29°C)によるものと思われる。さらに詳しく温度依存性を調べる予定がある。

3. PVA -50°C , 35°C , 160°C における at-PVA (ガラス転移温度 $65\sim 85^{\circ}\text{C}$)のスペクトルを図8に示す。さらに、我々の調べた範囲では、 ^1H の T_1 , $T_2\rho$ のデータがないので、測定した予備的な結果を図9に示す。 T_1 は短い成分と長い成分が観測されたが図には前者のみをプロットした。 T_1 , $T_2\rho$ の温度依存性は明らかにマイクロブラウン運動による極小値を示している。また、 ^1H の二次能率の大幅な減少も観測されている⁴。レカ

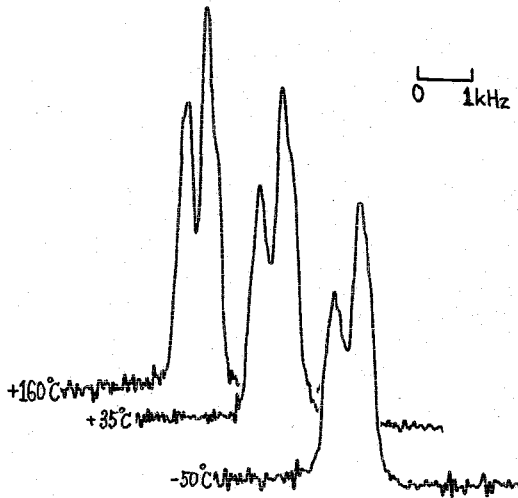


図8. at-PVAの ^{13}C スペクトル

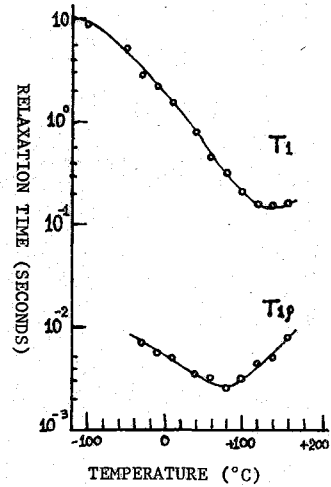


図9. at-PVAの ^1H の $T_1, T_{1\rho}$

しながら、化学シフトの異方性においては、 $-50^\circ\text{C} \sim 160^\circ\text{C}$ の範囲で顕著な変化は見られなかった。これは転移点以上の温度でも試料中の一部では、水素結合が固定されていると仮定すれば説明される。つまり、固定されている部分のみ、双極子相互作用が強くて 'proton-enhance' される結果、高温においても先鋭化は観測されない。上記の仮定はFIDが高温においても、横軸和の短い成分を持つ(我々の測定による)ことにより支持される。

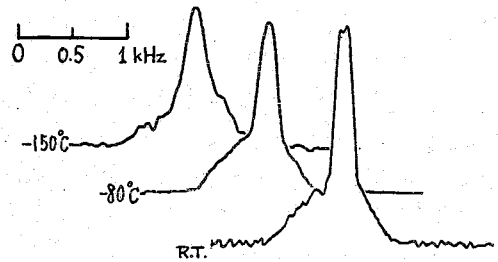


図10. is-PPの ^{13}C スペクトル

4. PP -150°C , -80°C , および室温における is-PP のスペクトルを図10に示す。ガラス転移(転移温度 -15°C , -16°C) による異方性の減少が見られた。今後、さらに詳細な測定を行なう予定である。

なお、二次元フーリエ変換NMRにより、 ω_1 軸上に化学シフト、 ω_2 軸上に双極子相互作用を分離し、立体規則性の双極子相互作用に対する影響および ^1H の位置の決定の可能性を調べる予定である。

文献

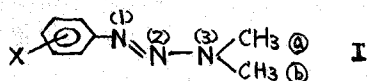
1. 寺尾武彦: '固体の高分解能NMR', "化学の領域", 南江堂, 32(9), 686 (1978)
2. Mehring, M.: 'High Resolution NMR Spectroscopy in Solids', "NMR Basic Principles and Progress" ed., Diehl, P., Fluck, E., Kosfeld, R., Springer-Verlag, Berlin (1976), Vol. 11.
3. 斎藤 純, 田中誠之: 化学増刊第66号 "高分子のNMR(II)" p. 91, 化学同人 (1975)
4. Tanaka, K., Yamagata, M., Yoshida, M., Odajima, M.: Bull. Chem. Soc. Japan 30, 428 (1957)

104 高圧・高分解能 NMR. トリアゼンの研究

(神大・理) 山田博昭・藤野和彦・中塚正勝・世良明

演者らは高圧高分解能 NMR の手法を用い、主として溶媒~溶質分子間相互作用への圧力効果¹⁾について研究を続けてきたが最近、かねての念願であった熱膨張による高圧の発生を応用した“熱膨張高圧分配セル”の試作開発にある程度の成功をおさめた²⁾。この方式によれば高圧下の試料スピニングも可能となり、このため S_N 比、分解能の向上はもとより観測波形についても再現性のある信頼度の高いデータの獲得が保証されるようになったと言える。以上の見通しの上に立って今回は、古くから NMR の研究対象としてよく知られてきた分子内回転の問題を採りあげ、吸収波形の圧力変化からその回転速度に対する圧力効果を検討してみることにした。

測定試料としては、(i)クロロホルムに対する溶解度がかなり大きい、(ii)常圧における文献データが充実している、(iii)置換基を変えることによって分子内回転速度をリモートコントロールできる、などの理由から 1-置換フェニル-3,3-ジメチルトリアゼン (I, 対応す



る置換ベンゼンジアゾニウム塩とジメチルアミンのカップリング反応により合成)を選び、このうち常圧で T_g が 30 °C 付近にある m-NO₂ 体について CH₃ シグナル波形を 2200 bar (約 2200 気圧) まで追跡し、N(2)-N(3) 結合のまわりの回転速度に対する圧力効果を調べた。

〔実験〕

● 熱膨張高圧分配セル²⁾

Fig 1 (a) に示すように、ガラス製の耐圧カプセル内に試料溶液およびフェニルアセチレンを低温下に満たし、両端を熔封したのちスピニング可能な安全ジャケット内に入れて、温度制御されたプローブ内に置いた。熔封直前における内部の液体の冷却程度を調節し、種々の内圧のものを用意した。発生圧力はフェニルアセチレンの C≡CH 化学シフトの圧力依存性¹⁰⁾を利用して決定した。この方式は高圧 NMR の実験法としては、極めて簡便なものであるが、カプセルを熔封後、室温付近にも必ず

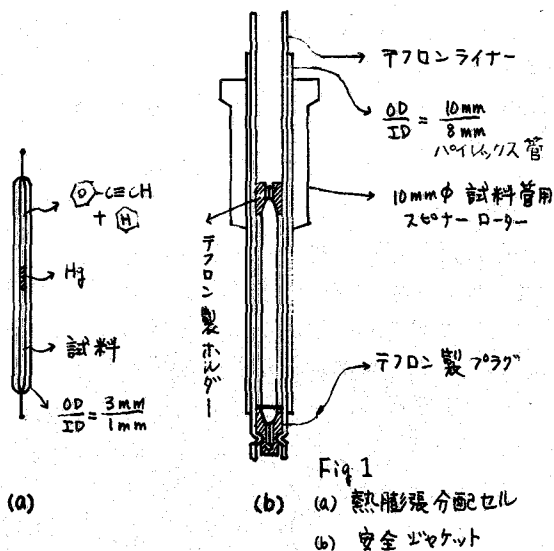


Fig 1
(a) 熱膨張分配セル
(b) 安全ジャケット

やまだひろあき ふじのかづみこ ながつかまさかつ せうあさる

とただちに高圧が発生する虞で危険性も大きい。このため、カプセルの取り扱いには十分な安全対策が必要である。

●測定

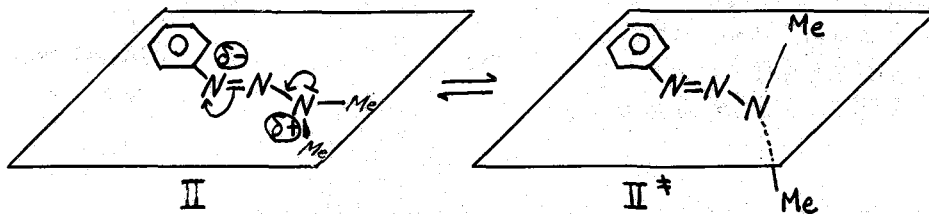
m-NO₂体 5mol% , シクロヘキサン 1 mol% , クロホルム 94 mol% より成る 溶液について、Jeol-PS-100 スペクトロメーター (ν₀ = 100 MHz) を用い、高圧下の測定をおこなった。なお、Fig 1 (b) と同一の構造を持った安全ジャケット中に細い温度計をセットし、スピンニングの条件下で温度を測定した。これにより、試料の温度は実験を通じ 34.6-35.0℃ の範囲にあったと推定した。また、分子内回転が充分遅い場合の CH₃④ ~ CH₃⑤ 間の化学シフト、Δν₀₀ を決定するために、m-NO₂体について低温 (+17℃ ~ -17℃) における測定をおこない、④、⑤ に対応する二本の鋭い singlet 間のシフト差を測定して Δν₀₀ = 34.8 Hz (温度依存性なし) を求めた。さらに、④、⑤ の化学シフトに対する圧力効果がことなる場合は、Δν₀₀ が圧力に依存することになり、以下に述べる Line Shape Analysis が困難となる可能性がある。そこで、回転速度が充分に遅い p-NO₂体 (④、⑤ のシグナルは常に分離して観測される) および、充分に速い p-CH₃体 (④、⑤ の区別がつかず、常に鋭い singlet を与える) について高圧 NMR の測定をおこなった。その結果、前者の場合は④ ~ ⑤ 間のシフト差の圧力変化は認められず、後者では内部基準シクロヘキサンからの化学シフトに対し圧力効果は見出せなかった。以上のことから類推して m-NO₂体の Δν₀₀ は圧力に依存せず、一定であると見なすことができる。

[結果と考察]

m-NO₂体の CH₃スペクトルの圧力変化は Fig 2 (a) に示す通りであるが、圧力の増大とともに線巾は大きくなり N(2) - N(3) のまわりの回転が遅くなっていることが明白である。Fig. 2 (b) は種々の life time における波形を常法³⁾により計算し (Δν₀₀ = 34.8 Hz を用い、いわゆる自然巾の補正をほどこした) 観測値とよくマッチする計算波形を選びだしたものである。このようにして各圧力における回転速度、*k* が求められたが熱力学によれば、*k* に対する圧力、*P* の効果は次の様に活性化体積、Δ*V*[‡] によって記述される。

$$\frac{d \ln k}{dP} = - \frac{\Delta V^{\ddagger}}{RT} \quad (1)$$

Δ*V*[‡] は遷移状態の部分モル体積から原系のそれを差し引いたものであるから、遷移状態で部分モル体積が増大する速度過程では、加圧により反応速度が低下することを示している。ここで (1) 式を積分し、今回得られた *k* を用いて ln *k* vs *P* プロットを調べてみると、Fig 3 のようにきれいな直線関係が得られ、その勾配から活性化体積を求めることができる。すなわち、Δ*V*[‡] = +4.1 ± 0.6 cm³/mol



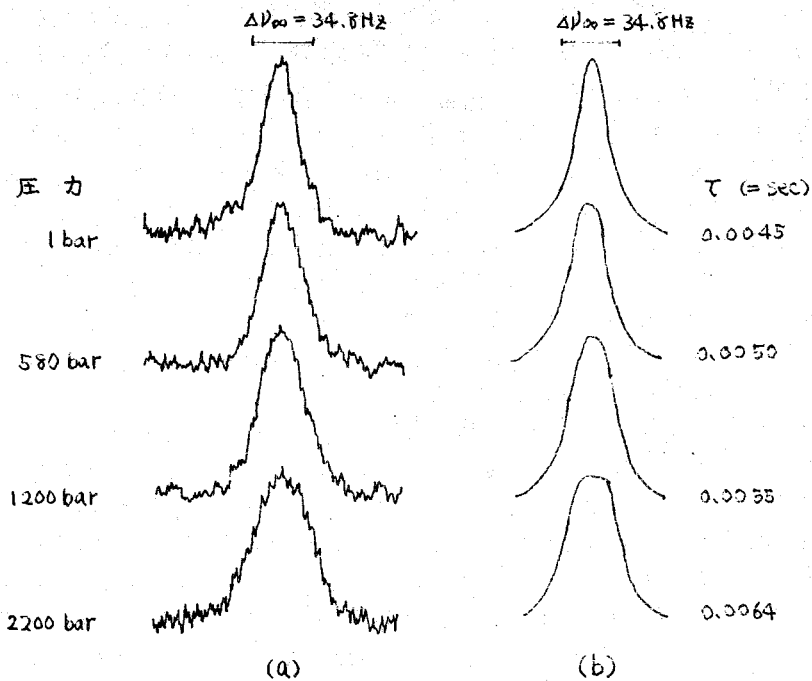


Fig 2 (a) : $-N\langle\text{Me}\rangle_{\text{Me}}$ のメチル基のシグナル (100MHz)
 (b) : (a) の測定スペクトルにて τ を変化させて合わせた計算スペクトル

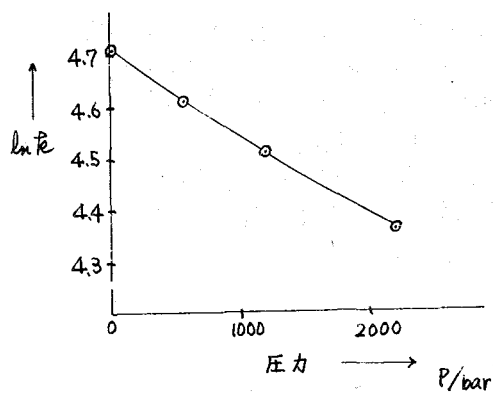


Fig 3 $N-N\langle\text{Me}\rangle$ の N-N 単結合のまわりの回転速度に対する圧力効果

このようにN(2)-N(6)のまわりの回転の遷移状態 II^* において部分モル体積が少々増加することが明らかとなったが、このことは通常の高压化学反応における圧力効果の解級にならって、次のように説明されよう。原系 II と遷移状態 II^* の容積を比較するわけであるが、真の分子容である van der Waals volume の差を無視すると両者の部分モル体積の差は主として各々に対する溶媒和の強弱に支配されていると見なすことができる。そこで、この点に注目して両者の比較をおこなうと、① II の方が II^* に比べて分子の極性が大きく、したがって溶媒分子 HCCl_3 をより親密に引き付けていると考えるのが妥当であろう。② また II は平面構造であるため(極性に関係なく)溶媒分子との充填がより密である公算も大きいと考えられる。以前我々はビフェニルプロトン化学ソフトの圧力変化からビフェニル分子は無極性溶媒中、高压下で平面化する方向にそのコンホメーションを変えると結論を導いたが、このことは平面構造の方が溶媒分子との充填がより密になることを示唆し、②の推論のひとつの支持となる。

以上のように今回の結果はいわゆる静電収縮モデルと充填モデルによってうまく説明できそうであるが、最近、Lüdemann 等によってもたらされたこの分野の研究報告⁵⁾は興味深いものがある。Lüdemann 等はわれわれが従来用いてきた高压セルの方式に改良を加え、すぐれた耐压セル(但しスピニングはおこなわない)を完成して意欲的に研究をおこないつつあるが、そのひとつとしてジメチルアセトアミドの内部回転をアセトン(濃度 60%)中で追跡し、 $\Delta V^* = 10.3 \pm 1.0 \text{ cm}^3/\text{mol}$ という値を得ている。溶媒の誘電率、濃度等が我々の場合と大きくことなっているので詳細な議論を差しひかえるが、このような大きな ΔV^* をもたらしたひとつの原因としてジメチルアセトアミドの原系における、より大きな極性($\rho_{\text{C}} = \rho_{\text{N}}$ の寄与による)、したがってより小さな部分モル体積が挙げられよう。現在のところ種々の溶媒中でのデータが不足していると言えるが、試料スピニングによって大型の耐压セルを用いる高分解能実験が可能となるため、無極性溶媒中での稀薄溶液についての測定も検討中である。

- 1) (a) Yamada, Ishihara, Kinugasa, J. Amer. Chem. Soc., 96 1935 (1974).
 (b) Yamada, Itani, Otsuka, J. Amer. Chem. Soc., 99 3572 (1977).
 (c) 山田, 西谷, 藤野, 世良, 才16回 NMR 討論会(1977) 要旨集 p-44.
- 2) 山田, 西谷, 世良, 才16回 NMR 討論会(1977) 要旨集 p-5.
- 3) H.S. Gutowsky and C.H. Holm, J. Chem. Phys., 25 1228 (1956).
- 4) 山田, 宮田, 衣笠, 才14回 NMR 討論会(1975) 要旨集 p-36.
- 5) Hans-Dietrich Lüdemann, Rudolf Rauchschwable, and Elmar Lang, Angew. Chem., 16 331 (1977).

I—1 特別講演 奈良で開催された“生体系の磁気
共鳴の国際会議”の報告

東大理 宮沢辰雄

(宮崎大工) O竹井 国雄・萩原 仁

1. 目的 スピン-格子緩和機構の研究は液体中での分子運動について、多くの情報を与える。ところが、芳香族炭素のC-13 T₁値を測定した文献は少ない。G.C. Levy¹⁾ はトルエン、ニトロベンゼン、フェノール等モノ置換ベンゼンについてのT₁を測定し、C₂分子対称軸の周りの回転が最もおき易く、ために、パラ位の炭素の相関時間を短くする結果となり、逆に、オルソ位とメタ位の炭素の相関時間を長くする結果となると報告した。ベンゼン2置換体のC-13 T₁値は殆ど文献になく、K.F. KuhlmannとD.M. Grant²⁾はオルソキシレンのT₁値をメジチレンのそれと比較することにより、分子全体のrotational diffusionとメチル基の内部回転とを議論した。そして、オルソキシレンの議論では、この分子が対称性が悪くなるため、結果の解釈も複雑になると説明した。また、R. FreemanとH.D.W. Hill³⁾はオルソジクロロベンゼンのT₁とT₂を測定した。そこで、われわれは、10個の異なる2置換ベンゼンのT₁値を測定し、特に、オルソおよびメタ・2置換ベンゼン分子の液中での回転の様子を検討することにした。

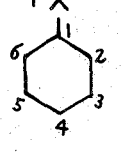
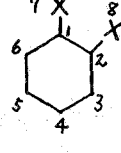
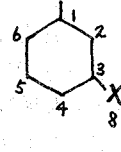
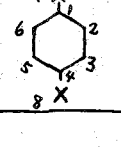
2. 試料と実験方法 C-13 NMR T₁スペクトルは、日本電子(株)製FX-60型FT-NMR系により、T-180°-τ-90°パルス系列で、完全プロトン照射により、15.04 MHzの観測周波数のもとで、室温で測定した。試薬は和光純薬工業製、または、メルク製を用いた。試料はDMSOに30~50重量%になるよう溶解され、溶液は脱ガスしなかった。

3. 実験結果と考察 表1に、1置換、2置換ベンゼンのT₁値(秒)を示す。カッコ内の値は文献値である。トルエン、オルソキシレン、オルソジクロロベンゼンのT₁値(実測値)は文献値とよく一致している。1置換ベンゼンのT₁値は、プロトンのついている炭素のT₁値がベンゼン自身のそれより短く、これは置換基の大きさによる相関時間の増大を示すことを示している。プロトンのついていない炭素のT₁値が大きいことは、双極子-双極子緩和がより少く響いていることを示す。C-4のT₁値は1置換ベンゼン炭素中で最も短い。ただし、X=OCH₃ではそうでない。

オルソ2置換体のC-4とC-5のT₁値は最も短い。これは次のように説明できる。オルソ2置換ハロゲン化ベンゼンはC_{2v}の対称性をもっている。オルソジシアノベンゼンもCN基が直線性であるので、C_{2v}対称性をもっているだろう。オルソクレゾールも同じ対称性をもっているだろう。このような試料では、回転軸はベンゼン環平面内において、その軸を含む鏡面をもっている。従って、ベンゼン環平面内において、2個のX基の角度を2等分する直線が回転軸であろう。もし、そうであれば、オルソ2置換ベンゼンのC-4とC-5のT₁値は、オルソキシレンを除いて、最も短いはずである。実測値はこの通

O たけい くにお', はぎから ひとし

Table 1 T_1 values for X-substituted benzenes (Sec)

	X	CH ₃	CN	COOH	NO ₂	NH ₂	OH	OCH ₃	Cl	Br	I
	1	48 (58)	50	13	64.2 (56)	27	(2.5)	57	59	7.0	8.2
	2, 6	19 (20)	6.5	2.2	7.7 (6.9)	3.9	(4.4)	9.1	11	7.9	6.1
	3, 5	17 (21)	6.6	2.7	7.7 (6.9)	3.7	(3.9)	8.6	12	7.2	6.0
	4	12 (15)	4.6	0.7	6.2 (4.8)	3.4	(2.4)	1.7	9.6	7.0	4.6
	7	16 (16)	41	16	—	—	—	5.9	—	—	—
	1, 2	38 (38)	59	11	53.3	17	9.0	46	63 (66)	6.6	16
	3, 6	12 (13)	3.2	0.8	3.6	1.6	7.4	2.7	8.0 (7.8)	4.4	1.7
	4, 5	9.8 (12)	3.2	0.4	3.3	1.6	6.4	2.3	6.8 (6.3)	3.9	1.7
	7, 8	8.7 (12)	4.9	1.8	—	—	—	3.3	—	—	—
	1, 3	42	35	5.2	42.2	12	5.9	39	49	8.0	11
	2	14	3.8	0.4	3.7	3.6	0.5	4.1	6.2	3.6	2.4
	4, 6	12	3.1	0.3	2.6	1.0	0.4	2.5	5.0	2.9	1.3
	5	14	3.7	0.4	3.5	1.1	0.6	3.4	6.4	3.6	1.9
	7, 8	13	3.8	3.7	—	—	—	3.8	—	—	—
	1, 4	36	40	9.1	—	15	5.8	45	37	9.6	12
	2, 3, 5, 6	12	4.1	1.4	—	1.6	0.8	3.4	5.3	3.6	2.1
	7, 8	12	4.0	4.9	—	—	—	4.3	—	—	—

りになっていることが表1からわかる。KuhlmannとGrant⁴⁾は、オルソキシレンはC_{2v}対称に属するとしているので、オルソキシレンでは、C-4とC-5のT₁は最も短くはならなかったものと判断される。

もし、同様な議論をメタ-2置換ベンゼンにあてはめるならば、C-5とC-2のT₁値がすべての炭素中で最も短くなるはずである。しかるに、実験結果では、C-4とC-6が最短のT₁値をもっていた。それは、C-4とC-6が、置換基Xのパラ位炭素に夫々あたるためと考えられる。従って、これから、C-4とXを結ぶ軸、または、C-6とXを結ぶ軸の周りの回転が、C-2とC-5を結ぶ軸の周りの回転より優勢であると想像される。これらの結果は、メタ2置換体では、Xの如何にかかわらず、すべてのXの種類について成立した。

H. Sporer⁵⁾によると、オルソ-とメタ-ジクロロベンゼンはC_{2v}対称に属するとしている。従って、これら分子はC-2とC-5を結ぶ軸の周りに2回対称であることになる。しかし、表1からは、C-4とX、あるいは、C-6とXとを結ぶ軸の周りの回転を考えざるを得ない。この推論は、G. C. Levyらの3-bromobiphenyl⁶⁾

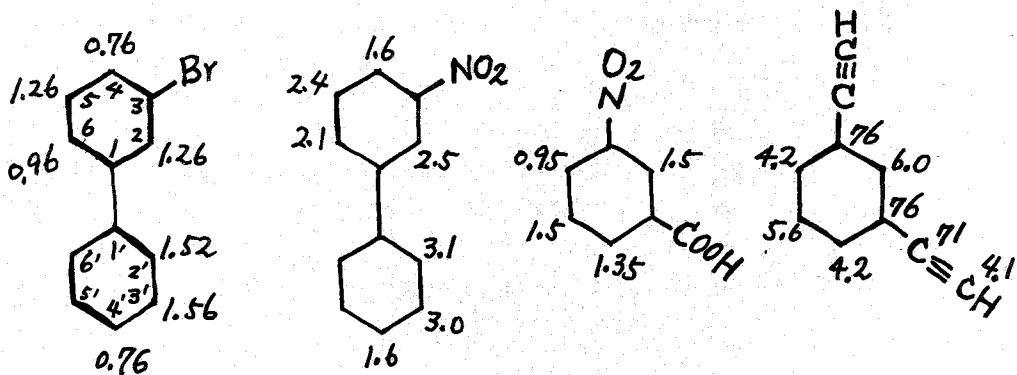


Fig. 1 T_1 values of meta-bromobiphenyl, m-nitrobiphenyl, m-nitrobenzoic acid and m-ethynylbenzene. ⁶⁾

や、メタニトロビフェニル⁶⁾ (図1) についての T_1 値の測定結果と考察からも正しいことがわかる。すなわち、C-6 が最も短い T_1 値をもつのは (C-4' の T_1 値を除いて)、C-6 が Br 置換基のパラ位にあたるため、Br と C-6 とを結ぶ軸の周わりの回転が考えられる。メタニトロビフェニルの場合も同じ。K. Saito⁷⁾ は実際にかかる回転の可能性を説いている。G. C. Levy⁶⁾ は同じ様な考えを meta-nitrobenzoic acid や meta-ethynylbenzene について説いている。すなわち、図1より、C-6 と COOH 基を結ぶ軸のまわりの回転、C-4 と NO₂ 基を結ぶ軸のまわりの回転が考えられる。meta-ethynylbenzene の場合も同じ。

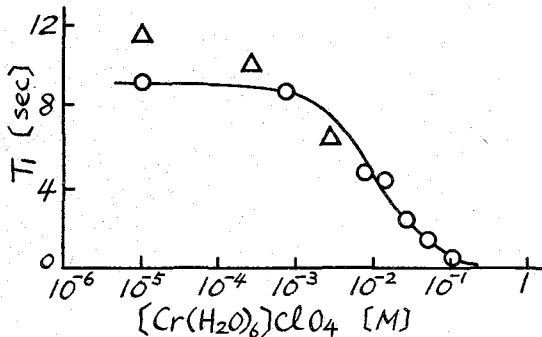
かくして、結論として、われわれは、メタ置換ベンゼンの場合には、液中で、C-4 と X、および、C-6 と X を結ぶ軸の周わりの回転が優勢となり、オルソ置換ベンゼンでは、C-4 と X、および、C-5 と X を結ぶ軸の周わりの回転が最も優勢となる。これら分子は C_{2v} 対称ではなくなる、といえよう。

Reference

- 1) G. C. Levy, J. C. S. Chem. Comm., 47 (1972).
- 2) K. F. Kuhlmann and D. M. Grant, J. C. P., 33, 2998 (1971).
- 3) R. Freeman and H. D. W. Hill, J. C. P., 55, 1985 (1971).
- 4) K. F. Kuhlmann and D. M. Grant, J. C. P., 33, 3005 (1971).
- 5) H. Sponer, Rev. Mod. Phys., 14, 224 (1942).
- 6) G. C. Levy and G. L. Nelson "Yuki Kagakusha no tame no C-13 Kakujiki Kyōmei" (Translated edition of Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance by S. Tanaka etc.), Tokyo Kagaku Dōjin, (1973), P. 80, 185, 188, 90.
- 7) K. Saitō, "Spectrum ni yoru ūkikagōbustu no kōzokaiseki Kōshūkai", Nippon Kagakukai etc., (1978), P. 25.

(宮崎大工) ○萩原 仁・竹井国雄・徳田龍一郎

1. 目的 C-13 NMRにおけるスピン-格子緩和機構は、緩和されている核の近傍に揺動する局所磁場が存在するかどうかによって依存するという特性をもっている。G. C. Levy¹⁾は、ボルネオールに $5 \times 10^{-2} M$ の $Fe(acac)_3$ を加える前と後とでは、プロトン結合した ^{13}C 核の T_1 は $1/10$ 倍に、プロトンの直接結合していない ^{13}C 核の T_1 は $1/100$ 倍に短くなったと報告し、ベンゾニトリルに対し、 $5.73 \times 10^{-2} M$ の $Cr(acac)_3$ の添加により、すべての ^{13}C 核が 0.5 秒程度の T_1 をもつようになったと報告した。また、R. Freeman²⁾ は、ギ酸に種々の濃度のヘキサアクリロム(Ⅲ)過塩素酸化物を加えたときの T_1 を測定し、濃度 $0 \sim 1.0 \times 10^{-1} M$ で T_1 は $11.5 \sim 0.3$ 秒に変化したと報告した(図1)。



われわれは、ベンゾニトリルに種々の濃度の $Fe(acac)_3$, $Co(acac)_2$, $Ni(acac)_2$ を加えて ^{13}C 核の T_1 を測定し、ベンゾニトリルの C-13 NMR 緩和に及ぼす Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} の常磁性イオンの影響を調べた。

図1. ギ酸の ^{13}C 核スピン-格子緩和時間 T_1 (Δ ; 脱ガス, \circ ; 未脱ガス, R. Freeman⁵ の測定結果(1971))

2. 試料および測定方法 本実験に使用した試料はすべて市販のものである。ベンゾニトリルは ^{13}C 核天然存在比のまま用い、 40 mole % DMSO 溶液とした。次に、 $Fe(acac)_3$, $Co(acac)_2$, $Ni(acac)_2$ をそれぞれベンゾニトリルに対し濃度 $0 \sim 1.3$ mole % 加え、 10 mm ϕ NMR 試料管に入れた。C-13 NMR 緩和スペクトルは、日本電子製 FX-60

表1. 1.3 mole % Metal-(acac) を加えたときのベンゾニトリルの T_1 [sec]

型によって、 $T-180^\circ$ - $t-90^\circ$ パルス系列で観測した。観測周波数は 15.04 MHz である。測定はいずれも室温で行い、そのときのプローブの温度は $32 \sim 33^\circ C$ であった。

試料	炭素	脱ガス	未脱ガス			
			未添加	$Fe(acac)_3$	$Ni(acac)_2$	$Co(acac)_2$
^{13}C N 	C-1	61	50	0.2	13	20
	C-2,6	7.2	6.5	0.2	4.6	5.9
	C-3,5	8.6	6.6	0.2	4.7	5.5
	C-4	5.5	4.6	0.2	3.9	4.5
	C-7	7.5	41	0.3	1.8	7.6

\circ はざわらひとし、たけいくにお、とくだりゅういちろう

3. 実験結果と考察 種々の濃度の $Fe(acac)_3$, $Co(acac)_2$, $Ni(acac)_2$ に対するベンズニトリルの各炭素 (C-1~C-7) の T_1 値を図2~4に示す。この濃度と T_1 の関係は図1の結果と一致した。 $Fe(acac)_3$ をベンズニトリルに 10^{-4} mole % 濃度以下に加えたときには、緩和にほとんど影響を与えなかったが、 1.3 mole % において、C-1 の T_1 は $1/250$ 倍にまで短くなった。また、C-2 (オルソ), C-3 (メタ) の T_1 は $1/30$ に、C-4 (パラ) の T_1 は $1/20$ 倍に減少した(図2)。 1.3×10^{-2} mole % 以下の $Co(acac)_2$, $Ni(acac)_2$ をベンズニトリルに加えたときにはどの炭素の T_1 にも変化を与えなかったが、 $Fe(acac)_3$ のときにはすべての炭素の T_1 を減少させていた。

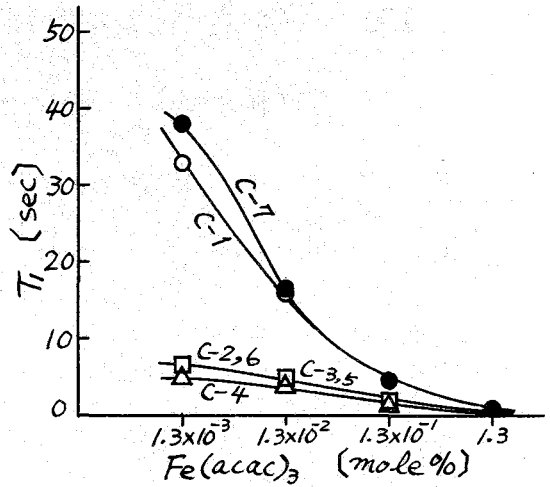


図2. $Fe(acac)_3$ 濃度とベンズニトリル各 ^{13}C 核の T_1

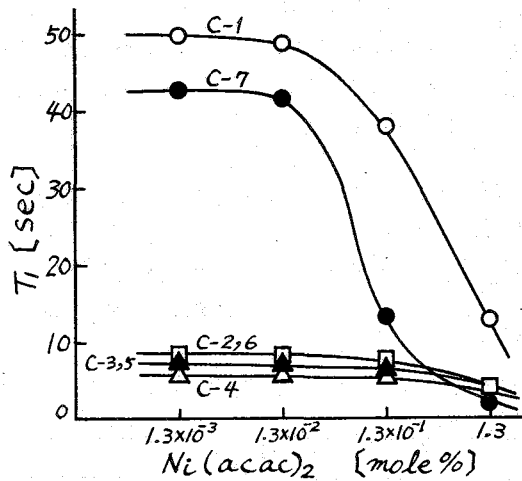


図3. $Co(acac)_2$ 濃度とベンズニトリル各 ^{13}C 核の T_1

図4. $Ni(acac)_2$ 濃度とベンズニトリル各 ^{13}C 核の T_1

ベンズニトリルに対し、 $Fe(acac)_3$, $Co(acac)_2$, $Ni(acac)_2$ をそれぞれ同一濃度に加えたときの各炭素核の T_1 値の比較を図5~7にプロットする。 $Metal-(acac)$ 濃度 $0 \sim 1.3$ mole % の間で、 Fe^{3+} は Co^{2+} , Ni^{2+} に比しベンズニトリルのすべての炭素核の緩和をより促進させることがわかった。特に、C-1 炭素核に対し、 Fe^{3+} の影響が顕著に現われた。一方、 Co^{2+} および Ni^{2+} のベンズニトリル各炭素に対する緩

和の影響はほぼ同じ傾向を示していることがわかった。これら金属イオンの T_1 への寄与の割合を図8, 9にまとめた。

Metal-(acac)濃度 1.3 mole\% の点においてC-1核に対する Fe^{3+} , Ni^{2+} , Co^{2+} の寄与の割合は図8に示すように, 99% , 74% , 61% であった。また, $1.3 \times 10^{-2} \text{ mole\%}$ での Fe^{3+} の寄与の割合は 67% にも及んでいたが, Ni^{2+} および Co^{2+} の寄与は無視できるほど小さかった。

J. C. Levy¹⁾ は, 0.035 M の $\text{Cr}(\text{acac})_3$ ベンゼン溶液中の 33% フェノールについて置換基のついている ^{13}C 核と Cr センター間の距離 $r_{\text{Cr}-\text{C}_i}$ として 5.8 \AA を与え, さらに, $r_{\text{Cr}-\text{C}_i}$ に対するオルソ, メタ, パラ位 ^{13}C 核と Cr センター間距離の6乗比 $(r_{\text{Cr}-x}/r_{\text{Cr}-\text{C}_1})^6$ の値を与えた(表2)。

わがわがは, Metal-(acac) を加えたときのベンゾニトリルにおける $(r_{\text{Metal}-x}/r_{\text{Metal}-\text{C}_1})^6$ の値は表2の $(r_{\text{Cr}-x}/r_{\text{Cr}-\text{C}_1})^6$ の値に等しいと仮定した。種々の濃度の Metal-(acac) によるベンゾニトリル各 ^{13}C 核 T_1 への寄与の割合を表3にまとめた。表3より, $1.3 \times 10^{-1} \text{ mole\%}$ $\text{Ni}(\text{acac})_2$ を加えたときのベンゾニトリルの ^{13}C 核 T_1 への寄与の割合は, C-1 と C-4 とでは Ni センターからの距離と相関がみられた。同じく, C-2 と C-3 の間にも相関がみられた。また, 1.3 mole\% $\text{Co}(\text{acac})_2$ の場合も同様に Co センターからの距離依存性がみられた。しかし, $\text{Fe}(\text{acac})_3$ の場合, 図9の C-2 曲線と C-3 曲線の重なりは, C-2 と Fe センター間の距離と, C-3 と Fe センター間の距離が等しかったことを表わしており, 表3の距離の6乗比の関係にならなかつた。このことは, 金属イオンの磁気モーメントおよびイオン濃度が増大するに従って, ベンゾニトリルのオルソ, メタ, パラ

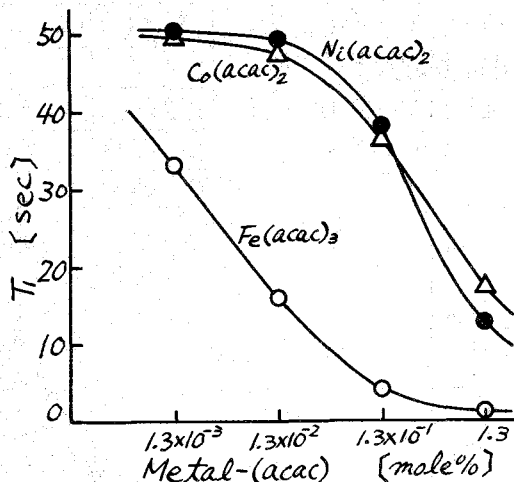


図5. Metal-(acac)濃度とベンゾニトリルのC-1核の T_1

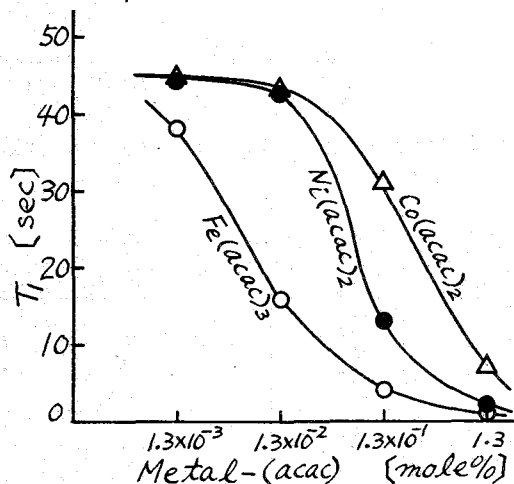


図6. Metal-(acac)濃度とベンゾニトリルのC1核の T_1

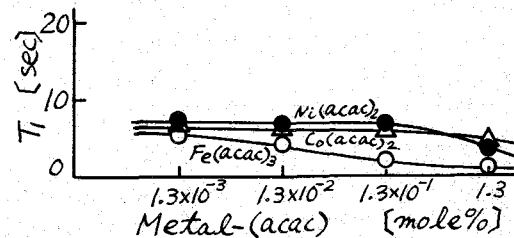


図7. Metal-(acac)濃度とベンゾニトリルのC-4核の T_1

位¹³C核と金属イオン間の距離の差が次第になくなり一定値に近づくことを示唆する。

炭素(X)	$(r_{Cr-x}/r_{Cr-C1})^6$	r_{Cr-x} [Å]
C-1	1.0	5.8
C-2(ortho)	9.8	—
C-3(meta)	2.0	—
C-4(para)	6.2	—

表2. フェノールにおける¹³C核とCrセンター間の距離 (G.C. Levy, R.A. Komoroski (1974))

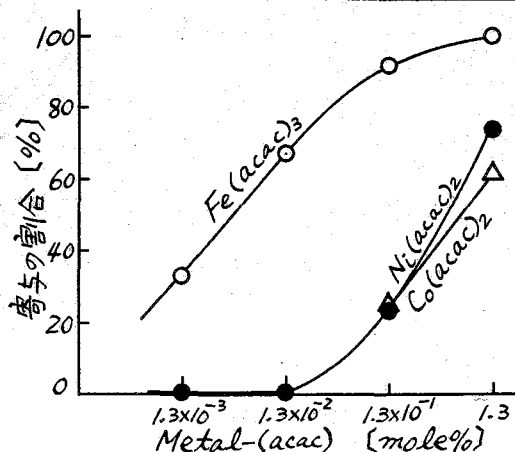


図8. Metal-(acac)濃度とベンゾニトリルのC-1核T₁への寄与

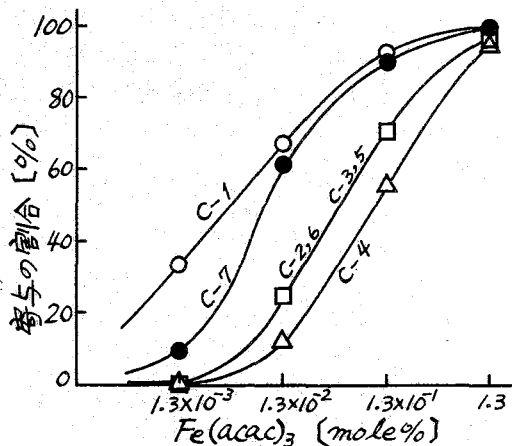


図9. Fe(acac)₃濃度とベンゾニトリルの各¹³C核T₁への寄与

表3. Metal-(acac)によるベンゾニトリル各¹³C核T₁への寄与の割合 (%)

炭素(X)	$(\frac{r_{Metal-x}}{r_{Metal-C1}})^6$	Cr(acac) ₃ 5.8x10 ⁻¹ mole %	Ni(acac) ₂ mole %			Co(acac) ₂ mole %			Fe(acac) ₃ mole %		
			1.3	1.3x10 ⁻¹	1.3x10 ⁻²	1.3	1.3x10 ⁻¹	1.3x10 ⁻²	1.3	1.3x10 ⁻¹	1.3x10 ⁻²
C-1	1.0	99	74	24	0	61	27	4	99	92	67
C-2(ortho)	9.8	72	52	4	0	20	0	0	97	70	25
C-3(meta)	2.0	75	46	17	0	23	0	0	97	70	25
C-4(para)	6.2	89	37	2	0	22	0	0	96	56	12

以上の結果より、高濃度では、常磁性イオンのごく近傍にある¹³C核はイオンの磁気モーメントと大きな相互作用をもち、¹³C核のスピンの方向の分布は常磁性イオンのそれと速かに同調しようとする。Co²⁺は、その共鳴周波数が¹³C核のそれと極めて近いにもかかわらず、緩和を促進しなかったが、その理由はよくわからない。Fe(acac)₃ 10⁻⁴ mole %以下、Ni(acac)₂, Co(acac)₂ 10⁻² mole %以下の濃度の場合に、ベンゾニトリルの¹³C核と常磁性イオンとの間に相互作用がなかったのは、イオンの近傍の¹³C核の数が統計的に少なかったからである。

- 文献 1) G.C. Levy, R.A. Komoroski; J. Amer. Chem. Soc., 96, 678 (1974)
2) R. Freeman, K.G.R. Pachler, G.N. LaMar; J. Chem. Phys., 55, 4586 (1971)

<序論> 日本化学会第36春季年会^{1,2)}において、ブロムメタン類の ^{13}C の緩和では臭素とのスカラーカップリングによる緩和がほとんどであること、臭素には天然存在比がほぼ1対1の同位体 ^{79}Br と ^{81}Br とがあり、ブロムメタン類の ^{13}C 緩和曲線は単一の指数関数的減衰を示さないこと、緩和曲線の解析から CD_2Br_2 , CDBr_3 , CBr_4 の ^{13}C -Brスピン結合定数が得られたことを報告した。

また、前回のNMR討論会³⁾においては、 CD_3Br の ^{13}C -Brスピン結合定数を、スピナー回転相互作用による緩和を考慮した取り扱いにより求めたことを報告した。

本報告では、同様の方法を sp^2 系化合物—たとえば、ブロムベンゼン、ブロムエチレン—に適用し、 ^{13}C -Brのスピン結合定数を決定することができたので報告することにも、 sp^3 系のスピン結合定数との比較検討を行なった。

^{79}Br と結合した ^{13}C の緩和時間は、 ^{81}Br と結合した ^{13}C のそれとは異なっている。プロトンを含む化合物では、プロトンによるNOE因子が ^{79}Br と ^{81}Br の場合で異なり、緩和曲線の解析は困難になる。そのため、ブロムメタン類の場合は重水素化物を用い、 ^{13}C -Hの双極子-双極子相互作用による ^{13}C 緩和は無視することができた。

ところが、 sp^2 系化合物では、重水素化物が必ずしも手に入らないので、プロトンを含む化合物で測定を行なった。NOEを考慮して、前回報告した解析方法を改良し適用したところ、プロトンを含む化合物においても ^{13}C -Brスピン結合定数を決定することができたので、改良した方法についてもあわせて報告を行なう。

<実験> ブロムベンゼン- d_5 (Merck Sharp & Dohme Canada社), 1,2-ジブロムエチレン(東京化成, *cis, trans*の混合物)は精製せずにそのまま用いた。ブロムベンゼン $\text{C}_6\text{H}_5\text{Br}$ は減圧蒸留してから用いた。重水素化物は溶媒なしで用い、重水素化していない化合物は特にこだわらない限り5 vol%のアセトン- d_6 を加えた。試料は高真空系により脱ガス処理をくり返した後、12mmφ及び8mmφのTi測定用試料管に封入した。

^{13}C 緩和時間及びNOE因子測定には、Varian社製のXL-100-15 (25.162 MHz)とNEVA製のNV-14 (15.087 MHz)を用いた。

^{13}C 緩和時間の測定には、通常の 180° - τ - 90° パルス法を用いた。重水素化物は ^{19}F 外部ロック方式をとり ^2D デカップリングを行なった(但し、XL-100-15のみ)。プロトンを含む化合物では、 ^2D 内部ロック方式をとり ^1H デカップリングを行なった。

NOE因子測定はプロトンを含む化合物に対してのみ行なった。XL-100-15では、ゲートッドデカップリングを行ない、デカップリングしたNOEのあるスペクトルとNOEのないスペクトルを測定し、ピークの面積比からNOE因子を求めた。NV-14ではゲートッドデカップリングをせず、デカップラーをオンにしたときとオフにしたときのピーク

はやし しげのぶ, はやみず きくこ, やまもと おさむ

の面積強度比から求めた。

試料室内の温度は、較正した銅-コンスタンタン熱電対を用いて測定した。温度の精度は $\pm 1^\circ\text{C}$ 以内である。

<理論> $180^\circ - \tau - 90^\circ$ パルス法による実験では、時刻 t における磁化 $I(t)$ は、

$$I(t) = I(\infty) [1 - 2 \exp(-t/T_1)] \quad (1)$$

で表わされる。NOEがあるとき、NOE因子を η_R とすると、磁化 $I_R(t)$ は、

$$I_R(t) = I_R^0(\infty) (1 + \eta_R) [1 - 2 \exp(-t/R_1T_1)] \quad (2)$$

と表わされる。ここで ^{13}C は1個の臭素原子のみと結合しているとする。 R は ^{79}Br または ^{81}Br であり、臭素の同位体を表わす。 $I_R^0(\infty)$ の右肩の 0 は、NOEのない時の値であることを示す。実測される磁化 $I(t)$ は、同位体化合物の和であり、

$$\begin{aligned} I(t) &= I_{^{79}\text{Br}}(t) + I_{^{81}\text{Br}}(t) \\ &= I_{^{79}\text{Br}}^0(\infty) (1 + \eta_{^{79}\text{Br}}) [1 - 2 \exp(-t/^{79}\text{T}_1)] + I_{^{81}\text{Br}}^0(\infty) (1 + \eta_{^{81}\text{Br}}) [1 - 2 \exp(-t/^{81}\text{T}_1)] \end{aligned} \quad (3)$$

となる。 $t = \infty$ では、

$$\begin{aligned} I(\infty) &= I_{^{79}\text{Br}}^0(\infty) + I_{^{81}\text{Br}}^0(\infty) \\ &= I_{^{79}\text{Br}}^0(\infty) (1 + \eta_{^{79}\text{Br}}) + I_{^{81}\text{Br}}^0(\infty) (1 + \eta_{^{81}\text{Br}}) \end{aligned} \quad (4)$$

である。 ^{79}Br と ^{81}Br の天然存在比は、それぞれ 50.5%、49.5% であるが、その差を無視すると、

$$I_{^{79}\text{Br}}^0(\infty) = I_{^{81}\text{Br}}^0(\infty) = I^0(\infty) / 2 \quad (5)$$

となる。但し、 $I^0(\infty) = I_{^{79}\text{Br}}^0(\infty) + I_{^{81}\text{Br}}^0(\infty)$ (6)

とした。式(3)、(4)、(5)より

$$\frac{I(\infty) - I(t)}{I(\infty)} = \frac{2}{2 + \eta_{^{79}\text{Br}} + \eta_{^{81}\text{Br}}} \left[(1 + \eta_{^{79}\text{Br}}) \exp\left(-\frac{t}{^{79}\text{T}_1}\right) + (1 + \eta_{^{81}\text{Br}}) \exp\left(-\frac{t}{^{81}\text{T}_1}\right) \right] \quad (7)$$

となる。未知数が、 $^{79}\text{T}_1$ 、 $^{81}\text{T}_1$ 、 $\eta_{^{79}\text{Br}}$ 、 $\eta_{^{81}\text{Br}}$ の4つあるが互いに独立ではない。 $^R\text{T}_1$ は、

$$\frac{1}{^R\text{T}_1} = \frac{1}{\text{T}_1^{\text{CH}}} + \frac{1}{^R\text{T}_1^{\text{CBr}}} \quad (8)$$

と表わすことができる。但し、 T_1^{CH} は $^{13}\text{C}-\text{H}$ の双極子相互作用による緩和時間、 $^R\text{T}_1^{\text{CBr}}$ は $^{13}\text{C}-^R\text{Br}$ 結合による緩和時間である。 η_R は、その最大値を $\eta_{\text{max}} (= 1.99)$ とすると、

$$\eta_R = (\text{T}_1^{\text{CH}} / ^R\text{T}_1) \eta_{\text{max}} \quad (9)$$

と表わすことができる。実測される η は、式(4)、(5)、(6)より

$$\eta = \frac{I(\infty) - I^0(\infty)}{I^0(\infty)} = \frac{\eta_{^{79}\text{Br}} + \eta_{^{81}\text{Br}}}{2} \quad (10)$$

となる。式(9)、(10)より、

$$\text{T}_1^{\text{CH}} = \frac{^{79}\text{T}_1 + ^{81}\text{T}_1}{2} \cdot \frac{\eta_{\text{max}}}{\eta} \quad (11)$$

$$\eta_R = 2\eta \cdot \frac{^R\text{T}_1}{^{79}\text{T}_1 + ^{81}\text{T}_1} \quad (12)$$

となる。式(7)、(12)より、未知数は $^{79}\text{T}_1$ 、 $^{81}\text{T}_1$ の2つのみとなり、式(7)の左辺を t についてプロットして、非線形最小二乗法により2つの指数関数に分離し、 $^{79}\text{T}_1$ 、 $^{81}\text{T}_1$ を求めることができる。求めた $^{79}\text{T}_1$ 、 $^{81}\text{T}_1$ と式(11)とから T_1^{CH} が求まり、式(8)を用いて、 $^R\text{T}_1$ から $^{13}\text{C}-\text{H}$ 双極子相互作用の寄与を取り除いた項 $^R\text{T}_1^{\text{CBr}}$ が求まる。

$$\frac{1}{R_{T_1^{CB_r}}} = \frac{\hbar^2 \gamma_C^2 \gamma_B^2 \tau_C^{Br}}{\gamma_{C-Br}^6} + \frac{2}{3} A_R^2 S(S+1) \frac{T_1(^{81}Br)}{1 + (\omega_C - \omega_R)^2 \cdot T_1(^{81}Br)^2} \quad (13)$$

$R_{T_1^{CB_r}}$ は、式(13)のように表わされる ($T_1(^{81}Br)$ は ^{81}Br の緩和時間、 τ_C^{Br} は双極子緩和の
 相関時間である)。 $A_R (= 2\pi J(^{13}C-^{81}Br))$ を求める手順は前に報告した通りである。¹⁴⁾

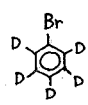
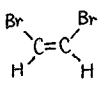
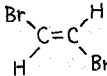
以上述べたように、プロトンを含む化合物でも、全体の NOE 因子の値が測定できれば
 $^{13}C-Br$ のスピン結合定数を決めることができる。

<結果及び考察> 得られた結果を表1に示した。計算に用いた $e^{2Q}q_z$ の値を表2に示し
 た。1,2-ジブロムエチレンの $e^{2Q}q_z$ の値は文献に見あたらなかったので、 $CH_2=CHBr$ の
 値を代用した。代用したことによる J_{C-Br} の誤差は $\pm 2 \sim 3$ Hz 以内であると考えられる。

ブロムベンゼン- d_5 は前回報告した方法により J_{C-Br} を求めたが、重水素化していない
 ブロムベンゼンの J_{C-Br} の値と非常に良い一致を示している。このことから、前述の、NOE
 を考慮した J_{C-Br} を求める方法が妥当であると言える。

NOE 因子の測定誤差は $\pm 0.02 \sim \pm 0.10$ の範囲内であるが、これは、測定中の分解能の
 変動、シグナルのベースラインの引き方などに起因している。 1H との双極子相互作用に
 よる ^{13}C の緩和時間 T_1^{CH} は NOE 因子に非常に敏感なためその誤差は大きく、 T_1^{CH} の値を
 議論することはできないが、 $J(^{13}C-^{79}Br)$ に対する NOE 因子の誤差の寄与は、NOE 因子
 の誤差の最大 ± 0.10 に対し、せいぜい $\pm 7 \sim 8$ Hz である。

表1. sp^2 系化合物の緩和時間とスピン結合定数

化合物	温度 [°C]	測定周波 数 [MHz]	NOE η	$^{79}T_1$ [s]	$^{81}T_1$ [s]	T_1^{CH} [s]	$^{79}T_1^{CB_r}$ [s]	$^{81}T_1^{CB_r}$ [s]	$T_1(^{79}Br)$ [μs]	$J(^{13}C-^{79}Br)$ [Hz]
	1	25	—	6.61	15.6	—	—	—	0.10	121
	28	25	—	3.93	20.2	—	—	—	0.17	125
	55	25	—	2.84	24.1	—	—	—	0.22	128
	85	25	—	2.72	31.8	—	—	—	0.26	121
C_6H_5Br	33	25	0.17	3.55	18.3	128	3.65	21.3	0.18	125
	8	25	0.70	1.88	8.0	14	2.17	18.7	0.22	146
	39	25	0.68	1.20	11.8	19	1.28	30.9	0.39	147
	63	25	0.60	1.04	14.6	26	1.09	33.6	0.44	150
	63 ^{a)}	25	0.51	1.09	14.7	31	1.13	27.9	0.39	156
	95	25	0.57	0.91	18.1	33	0.93	39.9	0.52	150
	8	25	0.64	3.77	6.24	16	4.98	10.4	0.10	146
	39	25	0.46	2.75	8.32	24	3.11	12.8	0.15	150
		15	0.35	2.14	5.33	21	2.38	7.1	0.20	147
	63	25	0.35	2.13	9.30	32	2.28	13.0	0.18	160
	63 ^{a)}	25	0.34	2.23	9.36	34	2.38	12.9	0.17	159
	95	25	0.28	1.39	9.44	39	1.44	12.5	0.22	180

a) アセトン- d_6 を 25 vol% 含む試料

$J(^{13}\text{C}-^{79}\text{Br})$ の誤差の大部分は、緩和曲線を2つの指数関数に分離する操作にともなう誤差と、前述のNOE因子の誤差との2つから生じている。その結果、 $J(^{13}\text{C}-^{79}\text{Br})$ の誤差は ± 10 Hz程度と考えられる。

trans-1,2-ジブロムエチレンでは、温度上昇にともない、 $J(^{13}\text{C}-^{79}\text{Br})$ の実験値が大きくなる傾向を示し、スピン-回転相互作用による緩和が温度上昇とともに無視しえなくなるこがわかった。スピン-回転相互作用による緩和は低温になるほどその寄与が小さくなるので、なるべく低い温度で測定したところ、39°C以下では $J(^{13}\text{C}-^{79}\text{Br})$ は誤差範囲内ではほぼ一致した値を示し、その値は148 Hzとなった。この値は、*cis*-1,2-ジブロムエチレンの値とはほぼ一致しており、妥当であると思われる。

表3に、本研究で得られた $J(^{13}\text{C}-^{79}\text{Br})$ の値と、 $J(^{13}\text{C}-^{19}\text{F})$ 、 $J(^{13}\text{C}-\text{H})$ の文献値との比較、及び、換算スピン結合定数 K の値を示した。いずれの J 値においても sp^2 系化合物の方が sp^3 系化合物より大きいスピン結合定数を持っており、今回得られた値が妥当なものであることを示している。現在までのところ $J(^{13}\text{C}-^{79}\text{Br})$ の値は表3に示した化合物以外では2~3決められているだけで、統一的な議論ができる段階ではない。

<まとめ> NOE因子を考慮すれば、プロトンを含む化合物においても $J(^{13}\text{C}-^{79}\text{Br})$ を決定することができることを示した。但し、NOE因子の測定誤差を低く抑えないと J の誤差が大きくなる。今回得られた sp^2 系化合物の $J(^{13}\text{C}-\text{Br})$ の値は、 sp^2 系化合物の値より大きく、これは、 $J(^{13}\text{C}-^{19}\text{F})$ 、 $J(^{13}\text{C}-\text{H})$ の傾向と一致している。現在、臭化ビニルや、多置換のブロムベンゼンについても検討中である。

<文献> 1) 山本修, 日本化学会第36春季年会 4N30 (1977).

2) 山本修, 柳沢勝, 日本化学会第36春季年会 4N31 (1977).

3) 山本修, 柳沢勝, 第16回NMR討論会 (1977).

4) O. Yamamoto, M. Yanagisawa, *J. Chem. Phys.*, **67**, 3803 (1977).

5) Landolt-Börnstein, "Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology," ed by K.H. Hellwege and A. M. Hellwege, II/6, Molecular Constants, Springer, New York (1974).

6) J.B. Stothers, "Carbon-13 NMR Spectroscopy," Academic Press, New York (1972).

表2. e^2Qq_z の値 [MHz]⁵⁾

化合物	^{79}Br	^{81}Br
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Br}$	558.9	464.1
$\text{CH}_2=\text{CHBr}$	543.8	453.6

表3. スピン結合定数の比較

化合物	J [Hz]	K [$\times 10^{20} \text{cm}^3$]
$^{13}\text{C}-^{79}\text{Br}$		
CD_3Br	40 ³⁾	53
CD_2Br_2	95 ⁴⁾	126
$\text{C}_6\text{D}_5\text{Br}$	124	164
<i>cis</i> - $\text{CHBr}=\text{CHBr}$	150	198
<i>trans</i> - $\text{CHBr}=\text{CHBr}$	148	196
$^{13}\text{C}-^{19}\text{F}$		
CH_3F	158 ⁶⁾	56
CH_2F_2	235 ⁶⁾	83
$\text{C}_6\text{H}_5\text{F}$	244 ⁶⁾	86
$\text{CD}_2=\text{CF}_2$	287 ⁶⁾	101
$^{13}\text{C}-\text{H}$		
CH_4	125 ⁶⁾	41
C_2H_4	157 ⁶⁾	52
C_6H_6	159 ⁶⁾	53

(北見工大) O福井洋え, 三浦宏一, 算用子淳夫

The perturbation theory for the calculation of nuclear spin-spin coupling constants was first formulated by Ramsey,^{1,2} and has been applied to molecular orbital wavefunctions in a number of calculations at various levels of sophistication.³⁻¹⁰ One of the molecules undergoing the most extensive calculations for a nuclear spin coupling constant is hydrogen fluoride, since this is one of the few heteronuclear systems whose coupling has been measured and which is accessible to accurate a priori calculation.

The early empirical calculation on this molecule by Pople and Santry⁴ gave a negative value. At the time of this calculation the sign of J_{HF} was not known, but it had probably been assumed that it was negative on the basis of Pople and Santry's arguments. Recently the sign has been shown by molecular beam experiments to be positive (+530 Hz).¹¹ The next epoch-making calculation on hydrogen fluoride is that of Kato and Saika.⁵ They used self-consistent field orbitals as a basis and calculated the Fermi contact contribution to coupling from the sum-over-states (SOS) perturbation formula. There were two interesting features in the Kato and Saika calculation. These were: (1) All the minimum basis set SCF orbitals led to a large negative coupling constant whereas extended basis orbitals gave a large positive value. (2) There was no sense of convergence in the SOS calculations; the higher energy states gave large oscillating contributions to J_{HF} .

Murrell et al.¹² refined the calculation of Kato and Saika by the inclusion of configuration interaction. However, configuration interaction did not solve the convergence problem. Adam et al.¹³ repeated the type of calculation carried out by Kato and Saika by extending the analysis to larger basis-set calculations on HF. Their theoretical values for HF, by using Nesbet's molecular orbitals¹⁴ (9 σ type orbitals) were +598 Hz, by McLean and Yoshimine (16 σ type orbitals) were +501 Hz, and by Cade (18 σ type orbitals)

ふくい ひろゆき, みうら こういち, さんようし あつお

were -270 Hz, respectively. Their calculations showed no sign of convergence as higher virtual levels were included. Consequently, as more and more virtual states were included, the individual contributions became larger and larger and fluctuated in sign. Oddershede et al.¹⁵ examined this convergence problem and found that with less than 55 excitations the oscillations of the calculated values are very strong. They so concluded that earlier published results^{5,12,13} did not include more than 45 excitations¹³ which is the reason why no one so far had been able to reach convergence in the SOS procedures.

In view of the importance of this molecule to the theory of coupling constants we have therefore performed the finite perturbation (FP) calculations¹⁶ of J_{HF} . The FP method and its application to the calculation of nuclear spin coupling constant have been discussed in detail elsewhere^{7,8} and thus the final expression only will be presented here. The final expression for the coupling constant is

$$J_{\text{AB}} = (16h\gamma_A\gamma_B\beta^2/9\lambda) \sum_{\mu\nu} \rho_{\mu\nu}(\lambda) \langle \mu | \delta(\vec{\gamma}_B^+) | \nu \rangle, \quad (1)$$

where ρ is the induced spin density matrix and λ , the perturbation parameter, represents the perturbation owing to the nuclear moment of nucleus A. The FP theory provides a straightforward expression to the nuclear spin-spin coupling constant. Eq. (1) represents that the nuclear spin-spin coupling energy originates from a local spin density distribution in a closed shell molecule, which arises from the magnetic field due to a nuclear spin dipole moment. The perturbation, λ , induces the negative spin density at the nucleus A, and J_{AB} depends on the response of the spin density at the nucleus B in the condition that its whole space integral is zero. It can be shown that the sign of the coupling constant J_{AB} is equal to the sign of $-\rho(A)\rho(B)\gamma_A\gamma_B$ where $\rho(A)$ and $\rho(B)$ are the local spin densities at the nuclei, A and B, respectively. Namely, if the local spin densities at the both nuclei have the same sign, J_{AB} have a negative sign for a positive sign of $\gamma_A\gamma_B$, and vice versa.

We have employed several contracted Gaussian-type basis sets; STO-6G¹⁷ (with Ransil's¹⁸ best-limited exponents), 4-31G,¹⁹ 6-31G,²⁰ double-zeta,^{21,22} and [5s3p/3s] basis contracted by Dunning²³ from the primitive [9s5p/4s] basis²⁴ with a scale factor of 1.2 for the hydrogen functions. Our results

are given in the Table. Although the data are limited, one may attempt to postulate from the results in the Table that the FP calculations show a clear convergence to the experimental value of J_{HF} as greater bases are used. It seems that the FP method is superior to the SOS perturbation approach in the calculation of the nuclear spin-spin coupling constant. In the SOS procedures the molecular orbitals are normally chosen to minimize the unperturbed ground state energy. This gives a good description of ground state properties (the first order properties) but does not necessarily lead to an optimal choice for excited states. In FP schemes the second order perturbation energy as coupling constants is calculated using only the best ground state wavefunction of the perturbed Hamiltonian.

The calculations were performed on a FACOM 230-75 at the Hokkaido University Computing Center. It is a pleasure to express our appreciation to Dr. F. Sasaki for providing us with several useful computer programs for the two-electron integral.

Table Summary of used molecular orbitals and calculated results.

type of basis function	total energy (a.u.)	J_{HF} (Hz)
STO-6G	-99.5074	-947
4-31G	-99.8874	216
6-31G	-99.9835	259
double-zeta	-100.0152	295
[5s3p/3s]	-100.0254	322
experimental	-100.480 ^a	530 ^b

a J. W. C. Johns and R. F. Barrow, Proc. Roy. Soc. (London)

A251, 504 (1959).

b See Ref. 11.

References

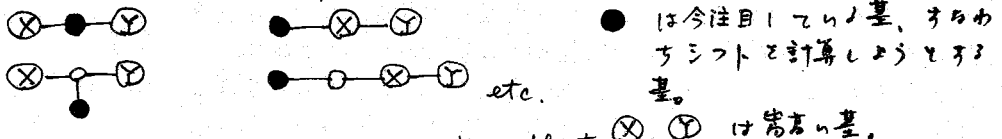
1. N. F. Ramsey and E. M. Purcell, *Phys. Rev.* 85, 143 (1952).
2. N. F. Ramsey, *Phys. Rev.* 91, 303 (1953).
3. H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* 24, 460 (1956).
4. J. A. Pople and D. P. Santry, *Mol. Phys.* 8, 1 (1964).
5. Y. Kato and A. Saika, *J. Chem. Phys.* 46, 1975 (1967).
6. R. Ditchfield and J. N. Murrell, *Mol. Phys.* 14, 481 (1968).
7. J. A. Pople, J. W. McIver, Jr., and N. S. Ostlund, *J. Chem. Phys.* 49, 2965 (1968).
8. N. S. Ostlund, M. D. Newton, J. W. McIver, Jr., and J. A. Pople, *J. Magn. Reson.* 1, 298 (1969).
9. J. Kowalewski, R. Vestin, and B. Roos, *Chem. Phys. Lett.* 12, 25 (1971).
10. J. Kowalewski, *Prog. NMR Spectrosc.* 11, 1 (1977).
11. J. S. Muentzer and W. Klemperer, *J. Chem. Phys.* 52, 6033 (1970).
12. J. N. Murrell, M. A. Turpin, and R. Ditchfield, *Mol. Phys.* 18, 271 (1970).
13. W. Adam, A. Grimison, and P. A. Sprangle, *Theor. Chim. Acta.* 18, 385 (1970).
14. R. K. Nesbet, *J. Chem. Phys.* 36, 1518 (1962).
15. J. Oddershede, P. Jørgensen, and N. H. F. Beebe, *J. Chem. Phys.* 63, 2996 (1975).
16. J. A. Pople, J. W. McIver, Jr., and N. S. Ostlund, *J. Chem. Phys.* 49, 2960 (1968).
17. W. J. Hehre, R. F. Stewart, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* 51, 2657 (1969).
18. B. J. Ransil, *Rev. Mod. Phys.* 32, 245 (1960).
19. R. Ditchfield, W. J. Hehre, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* 54, 724 (1971).
20. W. J. Hehre, R. Ditchfield, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* 56, 2257 (1972).
21. H. Basch, M. B. Robin, and N. A. Kuebler, *J. Chem. Phys.* 47, 1201 (1967).
22. H. Basch, M. B. Robin, and N. A. Kuebler, *J. Chem. Phys.* 49, 5007 (1968).
23. T. H. Dunning, Jr., *J. Chem. Phys.* 53, 2823 (1970).
24. S. Huzinaga, *J. Chem. Phys.* 42, 1293 (1965).

109 加成則による¹³C化学シフトの推定 (Aureola) 芥文報
 オレフィン炭化水素
 (東工誠) 山本修、柳沢勝

演者らは今年の日本化学会春季年会において、加成則により¹³C化学シフト値を推定し、必要に応じて計算機を用いた任意の化合物の¹³Cシフト値を出力できるようなシステム、並びにそれとアルカンの¹³Cシフト値に応用した結果について報告した。その際考慮した事柄は次の通りである。

一般にこのような加成則をつくってゆく場合、パラメータの数をなるべく少なくすることに努力するのが通例であるが、最終的に計算機を使って推定を行おうとすることを考えれば、必ずしもパラメータの数を少なくする必要はなく、むしろ種々の効果を取入れれば、推定値が観測値に近くなるようにすることの方が望ましいと思われる。そこで $\alpha \sim \delta$ までの効果をすべて取入れてこれを independent parameter とした。この際その値が小さくてもこれを0と近似することはしる。何故なら計算機で計算する時は、常に適当な DIMENSION であり、計算を行うのが通例であるから、ある小さい値を0と近似したところで計算の精度は全く同じであるからである。

このような independent parameter の他に correlation parameter というものを考えた。これはいわゆる compression effect を反映するものであり、炭素の基が導入されたことによる効果を補正するものである。correlation parameter には2種あり、今注目している基、またはそれから $\alpha \sim \delta$ 位にある基が炭素の基ではあるものの sandwich 効果 (A) と、今注目している基の $\alpha \sim \delta$ 位で炭素の基が隣接している consecutive 効果 (B) を表わすものがある。



(A) Sandwich effect (B) consecutive effect.

アルカンの場合でも、推定値と観測値との間の誤差は約1.00 ppm以内で抑えようとするのは、このような correlation parameter を導入せざるを得なかった。このことは換言すれば¹³Cシフトにおける構造的因子、すなわち compression shift の重要性を如実に物語っていると考えたことである。

本報においてはオレフィン炭化水素に対し、同様の手法でパラメータを算出した。オレフィンの場合特に重要なことは、構造的因子としてシフトランスの配座の影響をいかにしてうまく取り入れたかという点にある。さらに望ましいことは、アルカンに対して決定されたパラメータはそのまゝ動かさず、それを用いてオレフィンの場合に特有なパラメータを決定し、それによってすべてのシフトが納得なく説明できたことである。このようにすれば、オレフィンに特有なパラメータを算出したパラメータとしてではなく、何号かの意味で

平子也 赤さむ、中野ささむ まさる

物理的意義合いを考へてくさであろう。本研究に於ては上記の如くこのより正確なパラメータを決定することを中心とした。

(資料)

計算に使用した¹³Cシフト値はL. F. Johnson & W. C. JankowskiのVarian Spectra Data⁽¹⁾およびP. A. Couperus⁽²⁾のデータを引用した。新たに測定したデータを使用した。VarianのSpectra Data(以下J. J.と略稱)では溶媒としてシオキサンまたはCDCl₃のうち前者を採用した。Couperus⁽²⁾(以下C. C. D.と略稱)のデータはすべてCDCl₃が溶媒であり、濃度はほぼ40%である。今回新たに測定したものはCDCl₃中25%の試料を用い、測定はNEVAのNT-14(15.087 MHz)を使用した。試料数は表1記載の通りである。若乾のエン化化合物については種々の試料があったが今回は除外した。

表1 試料の数

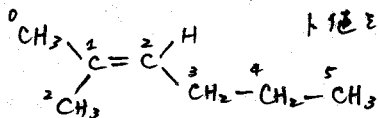
-CH ₃	233
-CH ₂ -	250
-CH-	43
>C<	21
>C=	68
-CH=	158
CH ₂ =	62

計算には通常、最小二乗法を用いたが、後に計算結果によりシフト値を出力できるような手順上、independent parameterはWLNコードを基にして決定した。その簡単な証明については後述する通りである。

(結果および考察)

中立的な結果ではあるが、その一部を別表に示す。この表の値はメチル炭素についての結果である。パラメータのリストについては証明は次の通り。第一欄はパラメータのコードである。これは次の意味をもっている。最初の2ケタは炭素の種類を表わし、24 = 4級炭素, 25 = -CH-, 27 = =C<, 28 = -CH₂-, 29 = -CH₃, 30 = -CH=, 31 = CH₂=

である。次の1ケタは注目している炭素から(例としてメチル炭素から)何番目の位置にあるかを示す。最後の1ケタは配座の符性を表わし、これは次のような意味をもっている。0 = 関係なし。1 = トランス, 2 = シス。今在図のよりの構造において⁰CH₃のシフト値を計算するにこれを考慮しよう。このメチル炭素1番目の位置



には¹C=があるため2710の値17.85に加之する。次に²C<が2番目の位置にあるから、3020の0.29に加之する。2番目の位置には又

²CH₃があるため2920の0.19に加之する。さらにこのメチル炭素に対する位置に置換基があるから2922の0.67に加之する。3番目の位置には³CH₂-があるため、2830の-3.13に加之する。さらにこれは⁰CH₃に対するトランスの位置にあるから2831の2.47に加之する。⁴CH₂-に対しては2840の0.51に加之する。このCH₃の固有値6.81(最上欄: 29として表示)に加之する。その結果シフトの推定値は25.66になり、これに好まぬ測定値は25.74である。

パラメータコードが9000番台のものは前に述べたCorrelation parameterである。この場合、最初の3ケタの数字は単なる識別番号で、その意味は最右欄に示されている。

例之は 91110 は最も概に 25/27 を示しているが、これは 4 番目と 5 番目とにコード 25 および 27 で示されるタイプの炭素が隣接して存在していることを示している。すなわち $-CH-C-$ の構造が存在している時は、余分に 0.58 だけの寄与があることを示している。

パラメータリストの 5 番目の欄は試料の数、4 番目の欄はパラメータの標準偏差である。

PARAMETER LIST FOR CARBON				CODE	29	OLEFIN
TOTAL NO. OF SAMPLES				233	VALUE =	0.441
NO. OF PARAMETERS				MODIFIED =	29	FIXED = 16
				NON-EFFECT = 0		
29	233	6.81	0.00	(FIXED)		
2410	21	25.02	0.00	(FIXED)		
2420	8	-0.57	0.00	(FIXED)		
2421	1	-0.93	0.88			
2430	12	-2.37	0.00	(FIXED)		
2431	4	2.41	0.22			
2432	3	-2.59	0.25			
2440	2	0.52	0.00	(FIXED)		
2510	38	18.17	0.00	(FIXED)		
2520	20	-0.21	0.00	(FIXED)		
2521	1	-0.37	0.44			
2522	1	-0.97	0.44			
2530	17	-3.35	0.00	(FIXED)		
2531	6	2.40	0.16			
2532	5	-2.88	0.20			
2540	8	0.36	0.00	(FIXED)		
2710	66	17.85	0.06			
2720	38	1.07	0.07			
2730	28	-2.84	0.08			
2740	10	0.49	0.14			
2810	76	9.87	0.00	(FIXED)		
2820	100	-0.04	0.00	(FIXED)		
2821	3	-0.60	0.20			
2822	6	1.14	0.19			
2830	99	-3.13	0.00	(FIXED)		
2831	24	2.47	0.09			
2832	22	-2.79	0.10			
2840	70	0.31	0.00	(FIXED)		
2920	88	0.19	0.00	(FIXED)		
2921	12	-2.17	0.14			
2922	18	0.67	0.11			
2930	103	-2.75	0.00	(FIXED)		
2931	13	2.48	0.13			
2932	15	-3.06	0.12			
2940	135	0.38	0.00	(FIXED)		
3010	32	11.00	0.08			
3020	103	0.29	0.05			
3030	61	-2.88	0.06			
3040	-1	0.37	0.07			
3120	22	0.36	0.09			
3130	21	-2.42	0.10			
3140	24	0.20	0.08			
91110	6	0.58	0.18		29/ 27.	
91310	3	3.05	0.26		27/ 24.	
91410	3	1.32	0.25		29/ 27.	

表2 オレフィン・メチル の ^{13}C シフトのリスト

算機のラインプリンターとの都合上及び付与した記号が用いられている。位置の項目は 2 個以上のメチル基が存在する場合、夫々を区別する為の番号であり、WLN コードにおいて左側に近い軽微な番号が付されている。

一般的に δ の観測値と推定値とは 1.00 ppm 以内で良く一致しているようである。誤差が 1 ppm 以上に及ぶものの中で詳しく検討すれば、適当な correlation parameter を導入することにより補正が可能であることがわかる。例之は 1 番目の欄に示す $-CH_2-C-$ 型の構造があるもの (P29 の No. 4, 15699 No. 4, 1570 の No. 4) はいずれも +1.5 ppm またはそれ以上の誤差を示している。今後これらの点を詳細に検討し、パラメータの精査化を行うべく予定である。

文献 (1) L. F. Johnson & W. C. Jamkowski, "Carbon-13 NMR Spectra", Wiley-Interscience Pub. (1972), (2) P. A. Compans et al, Org. Mag. Res., 5, 426 (1976)

(塩野義研)

○ 照井彬弘, 通和夫

これまでに、炭素上のHをDに置換することにより観察されるスピン結合定数($J_{\text{C,D}}$)や同位体シフト(ΔS^{D})を利用し、 ^{13}C シグナルの帰属に役立てた報告はかなりあるが、NH、OH、CONH、COOH、SHなどの極性基内のプロトンを対象とした ^{13}C -NMRにおけるD置換効果の研究例は非常にわずかであり、それが系統的に行われた例は、著者の知る限りほとんどない。おそらく、これらの系でのシフトやJ値が小さいことや、H-D交換速度の影響などが障害となっているためであろう。しかしながら、これらの極性基は生物化学的見地からも、有機化学的見地からも、分子の立体構造支配、あるいは反応の特異性・選択性の発現の重要因子として、しばしば興味深い役割を果すことは周知であり、また、これらに含まれる極性プロトンは炭素上などの極性の低いプロトンに比べれば、簡単で穏やかな条件のもとで容易にD置換が可能である。われわれはこれらの極性プロトンのD置換によって、極性基あるいはその近傍の ^{13}C シグナルに、たとえそれが小さなものであっても、明瞭な変化を観測できるならば、シグナルの帰属や、特殊な役割を果している極性基およびその周辺の挙動追跡に役立てうるかもしれないと考え、簡単な分子について基礎データの集積を行ってみることにした。

通常、OH、NHなどの極性プロトンは、溶液状態では他のプロトン(あるいはD)との交換がかなり速いが、-CONH-、-NHCONH-などでは、常温で交換は非常にゆっくりとしか起らないことが、 ^1H -NMRの挙動から確かめられている。この事実は、アミド、尿素類などの ^{13}C -NMR測定の際、極性基のH体とD体の間で化学シフトの差があれば、両者を同一条件下で同時に観測できる可能性のあることを示している。このような系は非常に小さなシフト差を観測しようとする場合には理想的なものであろう。そこでまず、アミドおよびその類似物質についてD置換効果を観測した。

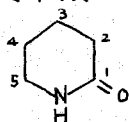
〔実験方法〕 分光器はVarian XL-100-12A型(25.16MHz)を用い、FT測定条件は小さなシフト差を観測可能とするために、スペクトル幅5.5kHz、使用データ点13200、FIDサンプリング時間1.20 sec [シグナル分離能0.8Hz(0.03ppm)]を用いた。溶媒系として CDCl_3 - CD_3OD (10:1)、 CDCl_3 - CD_3OD - CD_3OH (10:1:1)などを用い、濃度は溶解性の良い場合は約2 mmol/cm³に統一し(溶解性の低いものは飽和溶液)、約60°Cで15分間加熱した後常温で測定実験を行った。さらに、H体とD体が分離観測されたスペクトルであることを立証するため、“deuterated protic solvent”(CD₃ODなど)の代わりに、同じ比率の“nondeuterated protic solvent”(CD₃OHなど)を用いた同じ濃度の溶液を標準試料として測定し、その系ではD体に由来するシグナルが現われなことを確認してある。また、D体とH体のシグナルの識別はCD₃ODなどの混合比を少しかえたり、D交換を起させるための加熱時間を変えたりすることによるシグナルの増減の観測により行うことができる。

てるい よしひろ, とおり かずお

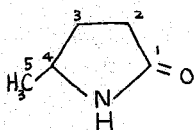
〔実験結果〕 多くのアミド類、尿素類について、極性基のH体とD体に由来する¹³Cシグナルが分離して観測された。代表的なもの数例の化学シフト値を次に記す。〔(H)はH体に、(D)はD体に由来する¹³Cシグナルであることを示し、 $\Delta\delta^D$ はD置換による同位体シフト値(ppm), Δ は標準試料との化学シフト差(ppm)を示し、 Δ はその値の大きなものについてのみ記してある。

アミド類

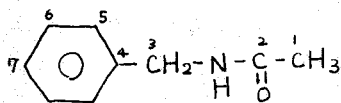
δ in $CDCl_3 : CD_3OD = 10 : 1$



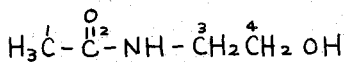
C-1	{	173.02 (H)	C-2	{	31.46 (H,D)	C-3	{	20.98 (H,D)
		172.96 (D)			$\Delta\delta^D \approx 0$			$\Delta\delta^D \approx 0$
		$\Delta\delta^D \approx -0.06$						
C-4	{	22.35 (H,D)	C-5	{	42.04 (H)			
		broad			41.90 (D)			
					$\Delta\delta^D \approx -0.15$			



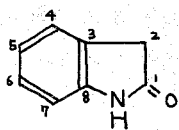
C-1	{	178.96 (H)	C-2	{	30.85 (H,D)	C-3	{	29.19 (H)
		178.88 (D)			$\Delta\delta^D \approx 0$			29.15 (D)
		$\Delta\delta^D \approx -0.08$						$\Delta\delta^D \approx -0.04$
C-4	{	50.50 (H)	C-5	{	22.10 (H,D)			
		50.37 (D)			$\Delta\delta^D \approx 0$			
		$\Delta\delta^D \approx -0.13$						



C-1	{	22.56 (H)	C-2	{	171.09 (H)
		22.52 (D)			171.01 (D)
		$\Delta\delta^D \approx -0.04$			$\Delta\delta^D \approx -0.08$
C-3	{	43.36 (H)	C-4	{	138.61 (H,D)
		43.24 (D)			broad
		$\Delta\delta^D \approx -0.12$			
C-5, C-6, C-7; $\Delta\delta^D \approx 0$					



C-1	{	22.73 (H)	C-2	{	172.18 (H)
		22.69 (D)			172.10 (D)
		$\Delta\delta^D \approx -0.04$			$\Delta\delta^D \approx -0.08$
C-3	{	42.34 (H)	C-4	{	60.95 (H,D)
		42.22 (D)			$\Delta = -0.08^*$
		$\Delta\delta^D \approx -0.12$			

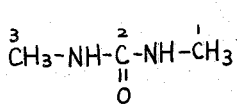


$$\begin{array}{l}
 \text{C-1} \left\{ \begin{array}{l} 178.73 \text{ (H)} \\ 178.62 \text{ (D)} \\ \Delta\delta^D = -0.11 \end{array} \right. \quad \text{C-2} \left\{ \begin{array}{l} 36.34 \text{ (H, D)} \\ \text{broad} \end{array} \right. \quad \text{C-3} \left\{ \begin{array}{l} 125.55 \text{ (H, D)} \\ \text{broad} \end{array} \right.
 \end{array}$$

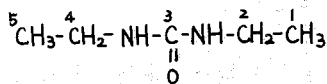
$$\begin{array}{l}
 \text{C-7} \left\{ \begin{array}{l} 110.05 \text{ (H, D)} \\ \text{broad} \end{array} \right. \quad \text{C-8} \left\{ \begin{array}{l} 143.10 \text{ (H)} \\ 142.98 \text{ (D)} \\ \Delta\delta^D = -0.12 \end{array} \right.
 \end{array}$$

$$\text{C-4, C-5, C-6; } \Delta\delta^D \approx 0$$

尿素類



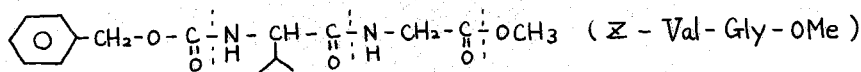
$$\begin{array}{l}
 \text{C-1} \left\{ \begin{array}{l} 26.85 \text{ (H)} \\ 26.72 \text{ (D)} \\ \Delta\delta^D = -0.13 \end{array} \right. \quad \text{C-2} \left\{ \begin{array}{l} 161.41 \text{ (H, D)} \\ \text{broad} \end{array} \right.
 \end{array}$$



$$\begin{array}{l}
 \text{C-1} \left\{ \begin{array}{l} 15.62 \text{ (H, D)} \\ \Delta\delta^D \approx 0 \end{array} \right. \quad \text{C-2} \left\{ \begin{array}{l} 34.99 \text{ (H)} \\ 34.88 \text{ (D)} \\ \Delta\delta^D = 0.11 \end{array} \right.
 \end{array}$$

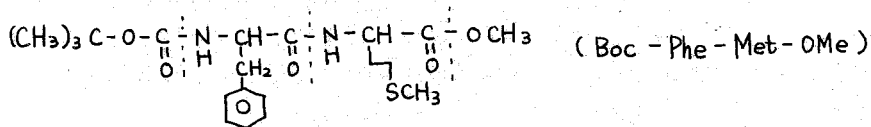
$$\begin{array}{l}
 \text{C-3} \left\{ \begin{array}{l} 159.90 \text{ (H, D)} \\ \text{broad} \end{array} \right.
 \end{array}$$

アミノ酸類



$$\begin{array}{l}
 \text{Gly } \alpha\text{-CH}_2 \left\{ \begin{array}{l} 41.13 \text{ (H)} \\ 41.01 \text{ (D)} \\ \Delta\delta^D = -0.12 \end{array} \right. \quad \text{Val C=O} \left\{ \begin{array}{l} 172.60 \text{ (H)} \\ 172.53 \text{ (D)} \\ \Delta\delta^D = -0.07 \end{array} \right. \quad \text{Val } \alpha\text{-CH} \left\{ \begin{array}{l} 60.43 \text{ (H, D)} \\ \text{broad} \\ \Delta = -0.04^* \end{array} \right.
 \end{array}$$

$$\text{other C; } \Delta\delta^D \approx 0$$



$$\begin{array}{l}
 \text{Met } \alpha\text{-CH} \left\{ \begin{array}{l} 51.65 \text{ (H)} \\ 51.55 \text{ (D)} \\ \Delta\delta^D = -0.10 \end{array} \right. \quad \text{Phe C=O} \left\{ \begin{array}{l} 172.05 \text{ (H)} \\ 171.96 \text{ (D)} \\ \Delta\delta^D = -0.09 \end{array} \right. \quad \text{Phe } \alpha\text{-CH} \left\{ \begin{array}{l} 55.77 \text{ (H, D)} \\ \text{very broad} \\ \Delta = -0.08^* \end{array} \right.
 \end{array}$$

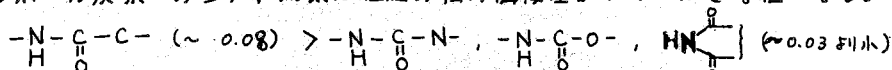
$$\begin{array}{l}
 \left. \begin{array}{l} \text{in CD}_3\text{OH (52.57)} \\ \text{in CD}_3\text{OD (52.47)} \end{array} \right\} \Delta\delta^D = -0.10, \quad \left. \begin{array}{l} \text{in CD}_3\text{OH (174.21)} \\ \text{in CD}_3\text{OD (174.12)} \end{array} \right\} \Delta\delta^D = -0.09, \quad \left. \begin{array}{l} \text{in CDCl}_3 \text{ (57.07)} \\ \text{in CDOD (56.94)} \end{array} \right\} \Delta\delta^D = -0.13
 \end{array}$$

$$\text{other C; } \Delta\delta^D \approx \Delta\delta^D' \approx 0$$

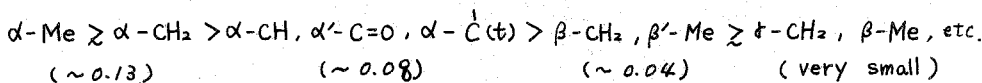
〔結果の考察〕 前記結果を含む種々の化合物の測定結果から、極性プロトンのD置換によって起きる極性基内およびその近傍の¹³C核に対する効果の概略を次にシフト則としてまとめた。

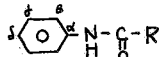
1) $\Delta\delta^D$ は高磁場シフトである。

2) カルボニル炭素へのシフト効果は極性の強い隣接基がつくと小さな値となる。

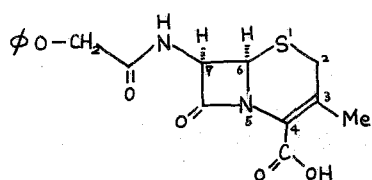


3) 便宜上、NHに直結した側とその反対側を $\dots \overset{\delta}{\text{C}}-\overset{\beta}{\text{C}}-\overset{\alpha}{\text{C}}-\overset{\alpha'}{\text{N}}-\overset{\beta'}{\text{C}}-\overset{\delta'}{\text{C}}$ のように區別すれば、大体の傾向としては次のようになる。

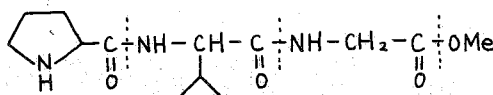


4) 例外。  の場合は、 $\beta\text{-CH} > \alpha\text{-}\overset{\delta}{\text{C}}(\text{t})$ となる。

この規則を利用すれば、¹³Cシグナルの帰属や極性基の挙動追跡の際に、有用な情報を得ることができる。



H-Pro-Val-Gly-OMe



たとえば、上記のセファロスポリニ誘導体のシグナルの帰属を行う際、D置換シフト効果を利用すれば、非常に近い化学シフト値をもつC-6とC-7の區別やカルボニルの區別などを容易に行うことができる。また、ペプチドH-Pro-Val-Gly-OMeに対するD置換シフト効果の様子からPro、Val、Gly部のそれぞれの極性プロトンの脱着のしやすさに大きな差があることがわかる。GlyのNHは通常のアミドプロトンのように非常にゆっくりした交換しか行わず、他方、ProのNHはかなり速い交換を行うのは予想通りであるが、ValのNHが通常のアミドプロトンよりもかなり速い交換を行えるような状態にあることがわかった。

以上の結果、D置換シフト効果は値が小さく、かなり精度を上げた観測が要求されるのが難点であるが、使用対象によっては¹³C-NMR法において充分有効な一手段となりうるものと思われる。

〔References〕

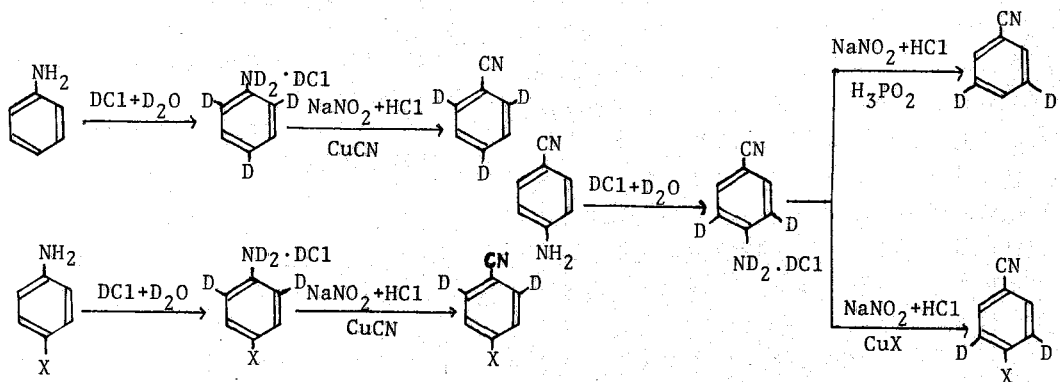
- 1) J. Feeney, P. Partington and G. C. K. Roberts, J. Magn. Resonance **13** 268 (1974)
- 2) R. A. Newmark and J. R. Hill, *ibid* **21** 1 (1976)
- 3) D. Gagnaire and M. Vincendon, Chem. Commun. No. 15 509 (1977)

序論

我々は昨年の討論会において種々の芳香族および脂肪族ニトロ化合物をとりあげ、HMPA(ヘキサメチリン酸アミド)、TMU(テトラメチル尿素)との会合のK, ΔH, ΔSについて報告をした。¹⁾今回は、パラ置換芳香族ニトリル化合物をとりあげ、HMPA, TMU, ジ-*m*-ブチルスルホン(以下DBSNと略), ジ-*m*-ブチルスルホキミド(以下DBSXと略)等の会合を検討した。前回のパラ置換芳香族ニトロ化合物では、*o*-位のプロトンの濃度依存性が非常に小さいため、*m*-位のプロトンについてのみ検討を行ったが、今回用いたパラ置換芳香族ニトリル化合物では、*o*-位のプロトンの濃度依存性は、*m*-位プロトンについてと同様に大きく、*o*-位、*m*-位の両方のプロトンについて検討を行うことができた。

実験

NMRの測定には日立R-22型NMR分光器(90MHz)を用いた。測定温度は34.1°である。シフトの読み取りは周波数カウンターにより行い、その精度は±0.1Hz、シフトの基準には溶媒メチルシクロヘキサンのメチル基の二重線の低磁場ピークを利用した。K, Δ_{AB}の決定は前回と同様である。メチルシクロヘキサンの市販品にはトルエンが混入しているので、混酸で処理し、中和、乾燥、蒸留の後、モレキュラーシーブ4A上に保存した。他の試薬類も市販品を再結晶、蒸留等により精製しデシケター中あるいはモレキュラーシーブ上に保存した。種々の重水素置換体は次の方法で合成した。



(X: Cl, Br)

最終的なDの置換率は95%以上である。

ふじあら ひであき, やまざき ゆたか, ささき よしお

結果と考察

1) 組成比の決定

錯体の組成比を確かめるために連続変化法 (Job法) を行った。全ての系について(図1)の例のように1:1の濃度比において ΔR が最大値を示し、組成比が1:1であることを裏付けた。ここで Δ は、シフトの測定値とfreeな分子のシフト差、 R は濃度分率である。

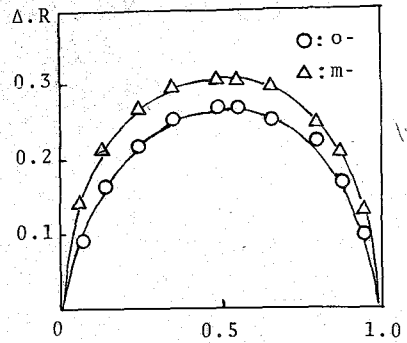


Fig.1 Job plot for the p-tolunitrile + HMPA system in methylcyclohexane
Table 1.

2) 平衡定数と錯体形成シフトの決定

パラ置換芳香族ニトリル化合物の濃度を0.03~0.05Mにて一定とし、HMPA, TMI, DBSN, DBSX等の濃度を0~0.7M程度まで変化させ、得られる希釈シフト曲線をA+B⇌AB型のCollision Complex形成を仮定して解析した。パラ置換芳香族ニトリル化合物のシフトを正確に求めるには、AAB系²⁾の解析を行う必要があるが、実験に用いた濃度範囲ではNMR信号のパターンに顕著な変化が認められないので強度の大きな二本のピークの周波数の平均値を利用した。測定されるシフトの変化量が10~30Hzと小さいため測定誤差をできるだけ小さくするように注意した。今回の実験では、ほとんど全ての場合、計算により得られる K と Δ_{AB} は根平均二乗偏差が0.2Hz以下で実験値を再現した。 K と Δ_{AB} の誤差はそれぞれ±5%及び1Hz程度である。o-, m-位の各々のプロトンについてそれぞれ平衡定数 K 、錯体形成シフト Δ_{AB} を求めたところ表1(A)に例示するように平衡定数はo位とm位で異なることがわかった。この場合、パラ置換芳香族ニトリル化合物のシフトはそれぞれ自身の濃度により変化する(図2)ので、それを補正する目的でfree状態でのシフトとして無限希釈値(δ_o)を用いて計算するとo位とm位における平衡定数は一致した(表1(B))。従ってこれらの系ではfree状態でのシフトとして無限希釈値を用いる方が適切であると考えられる。

		$\delta_A^c)$	$\Delta_{AB}^d)$	$K(M^{-1})$	
A	a	o-	584.2	24.9	2.0
		m-	560.7	33.9	1.4
	b	o-	584.1	12.4	2.6
		m-	560.8	16.2	1.3
		$\delta_o^e)$	$\Delta_{AB}^d)$	$K(M^{-1})$	
B	a	o-	584.3	25.3	1.9
		m-	560.1	32.4	1.7
	b	o-	584.3	12.6	2.2
		m-	560.1	13.6	2.2

a; p-tolunitrile + HMPA system in methylcyclohexane

b; p-tolunitrile + DBSN system in methylcyclohexane

c; chemical shift in a free state

d; units of Hz, $\Delta_{AB} = \delta_{AB} - \delta_A$ or $\Delta_{AB} - \delta_o$

e; infinite dilution shifts

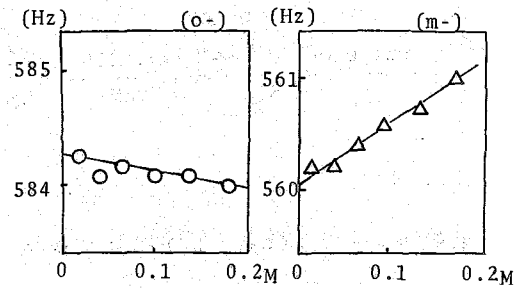


Fig.2 Dilution shifts of p-tolunitrile in methylcyclohexane

3) 錯体形成シフトと双極子モーメントおよび置換基定数との比較検討

錯体形成シフト Δ_{AB} とHMPA, DBSN, DBSX, TMUの双極子モーメント(μ_{ps})との関係は、 μ_{ps} の最も大きいHMPAでは一番大きい、他の3化合物については複雑である。ベンズニトリル誘導体の双極子モーメント(μ_{BN})との関係は、 m -位の Δ_{AB} については置換基依存性が小さく明確ではないが(図3) o -位については直線的である。(図4) Δ_{AB} と置換基定数 σ_i , σ_p^+ との関係は、HMPAとの系については

$$\Delta_{AB,cal} = 0.4646\sigma_i + 0.524\sigma_p^+ + 0.342$$

(図5)の式で表わされ(ppm単位) σ_i と σ_p^+ の両方に関係する。しかし、 σ_i への依存性よりも σ_p^+ への依存性の方が明確である。(図6) HMPA以外の化合物との系では、 σ_i , σ_p^+ の係数が1桁小さく、置換基依存性の小さいことを示した。

- 1: 3,5-d₂-benzonitrile
- 2: 2,4,6-d₃-benzonitrile
- 3: p-tolunitrile
- 4: p-tert-butylbenzonitrile
- 5: p-anisonitrile
- 6: N,N-dimethyl-p-aminobenzonitrile
- 7: 2,6-d₂-p-chlorobenzonitrile
- 8: 3,5-d₂-p-chlorobenzonitrile
- 9: 2,6-d₂-p-bromobenzonitrile

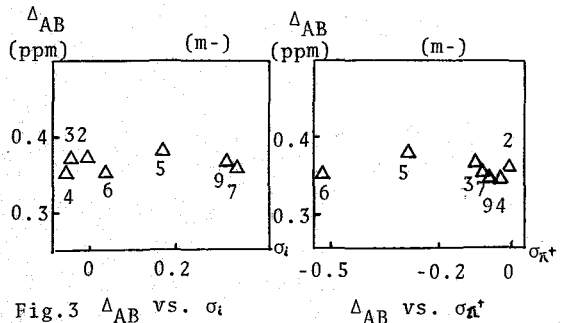


Fig. 3 Δ_{AB} vs. σ_i

Δ_{AB} vs. σ_p^+

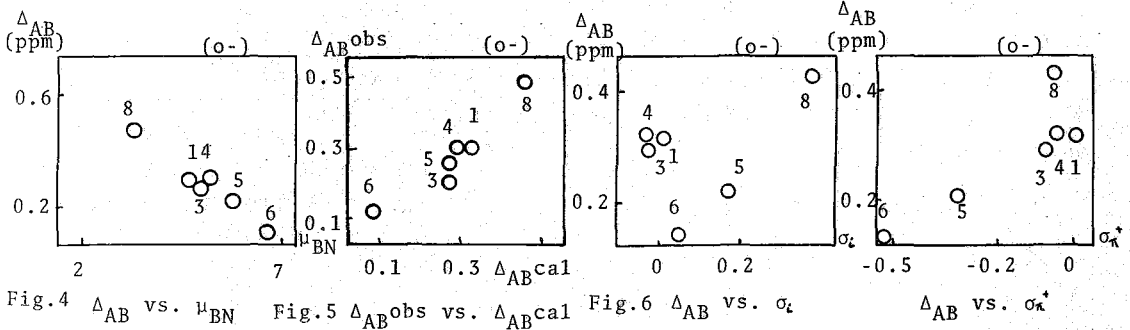


Fig. 4 Δ_{AB} vs. μ_{BN}

Fig. 5 Δ_{AB}^{obs} vs. Δ_{AB}^{cal}

Fig. 6 Δ_{AB} vs. σ_i

Δ_{AB} vs. σ_p^+

4) 平衡定数Kについての検討

パラ置換芳香族ニトリル化合物とHMPA, TMU, DBSN, DBSXとの会合から得られる平衡定数について比較検討した結果、図7の例に見られるように良い相関性が認められる。なお、各々の系について双極子モーメントとの相関性は認められなかった。

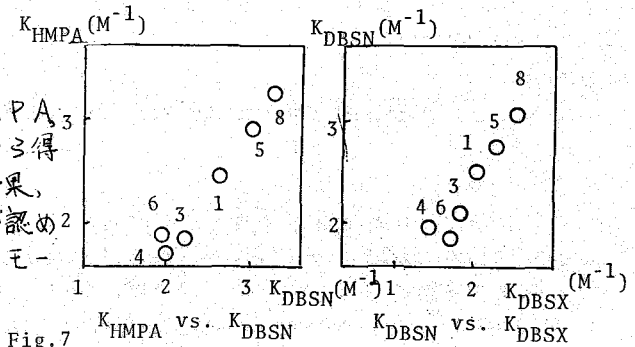


Fig. 7 K_{HMPA} vs. K_{DBSN}

K_{DBSN} vs. K_{DBSX}

5) 置換基の会合に与える影響

p-tolunitrileとp-tert-butylbenzonitrileをとりあげ、 Δ_{AB} , K, 置換基定数等について比較検討を行った。p-tert-butylbenzonitrileは、(図34,5,6,7)に見られるように相関性から大きくはずれることなく表2の例に見られるように両者の大きな差異は認められない。結局、パラ位の置換基の大きさは会合に影響を与えないと結論できる。

Table 2.
Calculation for p-tolunitrile and p-tert-butylbenzonitrile

		HMPA	TMU	DBSN	DBSX	
I	$\Delta_{AB}^a)$	o-	0.28	0.20	0.14	0.17
		m-	0.36	0.27	0.15	0.20
	K		1.8	0.9	2.2	1.8
II	$\Delta_{AB}^a)$	o-	0.32	0.22	0.14	0.21
		m-	0.32	0.22	0.13	0.21
	K		1.5	0.8	2.1	1.4

I:p-tolunitrile

II:p-tert-butylbenzonitrile

a;units of ppm

6) 溶液内の会合状態について 4)

F.E.Murray,W.G.Schneiderらはアセトニトリルの自己会合について(図8)のような考えを示している。今回HMPAと種々の芳香族ベンゾニトリル化合物をとりあげ、 ^{31}P のケミカルシフトの変化を測定した。HMPAの濃度を約2.0Mにして一定の芳香族ニトリル化合物の濃度を約0.2Mとして ^{31}P のシフトを測定した。その結果、表3の例に見られるように ^{31}P のケミカルシフトは低磁場シフトした。結局、HMPAは環上及び環付近にはなく、(図8)の例に見られるようにニトリル基付近での会合が考えられる。

Table 3.

Variation of ^{31}P Chemical shifts

compound	$\Delta^a)$
benzonitrile	-11
p-tolunitrile	-6
p-anisonitrile	-8
p-chlorobenzonitrile	-13
benzene	-1
p-dichlorobenzene	-6
p-dimethoxybenzene	-4
propionitrile	-3

$$a; \Delta = \delta(^{31}\text{P})_{\text{C=O}} - \delta(^{31}\text{P})_{\text{C=O},0.3}$$

All down field shifts in Hz.

Data from INDOR Experiment with R-20B (60MHz)

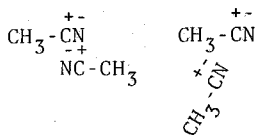


Fig.8 Self-association model of acetonitrile

謝辞

INDOR実験に際し種々御便宜いただいた高橋教授(名工大)に深謝いたします。

References

- 1) 第16回NMR討論会要旨集 221 (D5), 152 (1977)
- 2) 中崎昌雄 有機化学者のための核磁気共鳴スペクトル解析 p150
- 3) 日本化学雑誌 86, 873 (1965)
- 4) F.E.Murray,W.G.Schneider, Can. J. Chem, 33, 797 (1955)

(電通大・化学) 仁木國雄、中川直哉

1. はじめに

液体中に於ける分子間相互作用の中でも、比較的その相互作用エネルギーの小さいもの研究手段として、NMRの溶媒効果が大変有効な場合がある。弱い分子間相互作用の中でも、溶媒知によるもの(水素結合、水素結合様相互作用、 π -コンプレックスなど)は、特定の置換基あるいは構造をもつ分子の場合に起り、相互作用としては特別なものと言えよう。一方分子内の電荷の偏りに起因する静電相互作用あるいはファン・デル・ワールス分散力は一般的であり、いかなどの分子にも起る相互作用と言える。しかしながら現実の問題として、これらの相互作用のエネルギーを正確に測定することはできない。さらに、考えられるいくつかの相互作用のエネルギーが同程度の大きさで予想される場合があり、注目したい相互作用だけを取り出して検討することが困難な場合がほとんどである。

しかし幸いなことに、NMRの溶媒効果として現われる現象の中に、溶媒分子に磁気異方性があると、溶媒-溶質間に溶質分子のまわりの溶媒分子の配向に影響を与える様な、平均熱運動よりも大きな相互作用があれば割合大きな溶媒シフトを示す。これがA δ I δ やCS $_2$ などによるシフトである。¹⁾この場合は比較的弱い相互作用にもかかわらず、その原因となる相互作用を抽出しての議論が可能となる。またこの様な磁気異方性のある溶媒では、それが無極性溶質に対しても、その分子の形によってはシフトが起ることがある。²⁾

また、ファン・デル・ワールス相互作用にもとづく化学シフトに関する報告はあるが、それらは溶媒の違いに重点が置かれた研究であった。³⁾そしてNMR測定の見地からは、無極性溶質ではTMSなどの内部基準物質を用いてシフト値を測定すれば、この効果は打ち消されるとして取り扱われて来た。

今回は、このファン・デル・ワールス相互作用にもとづくシフトが、同じ溶媒中でも、溶質による違いがあるかどうかを検討する。

2. 測定と討論

ファン・デル・ワールスカは、1つの溶質について考えると溶媒の体積分極率($\alpha/V = \alpha/(MNd) = \frac{3}{4\pi} \cdot \frac{n^2-1}{n^2+2}$, n は屈折率)に比例すると考えられる。ここでは種々の値の屈折率の溶媒を用いて、TMS, C $_6$ H $_6$, C $_6$ H $_6$, C $_7$ H $_8$, C $_8$ H $_8$, C $_5$ H $_8$, CH $_2$ Cl $_2$, CH $_3$ CN, CH $_3$ NO $_2$ の ^1H の溶媒シフト($\Delta\sigma$)を測定し、体積分極率に比例する(n^2-1/n^2+2)でプロットした。

実験では同軸試料管を用いて外部基準法でシフト値を決定し、体積磁化率(χ_v)の相違による円筒キャピラリーの影響の補正をした。なおすでに χ_v の知られている物質について、円筒状キャピラリーと球状キャピラリーでの基準物質のシグナル分離を測定し、その値とこの物質の χ_v の値とで検量線をつくり未知の物質のシグナル分離より χ_v の決定をした。 χ_v 測定用の外部基準物質としては、C $_6$ H $_6$ とCH $_2$ I $_2$ を用いて両者で求めた値を平均した。この際の誤差 $\Delta\chi_v$ は $\pm 0.005 \times 10^{-6}$ 以内であった。⁴⁾

につき、なかがかなみや

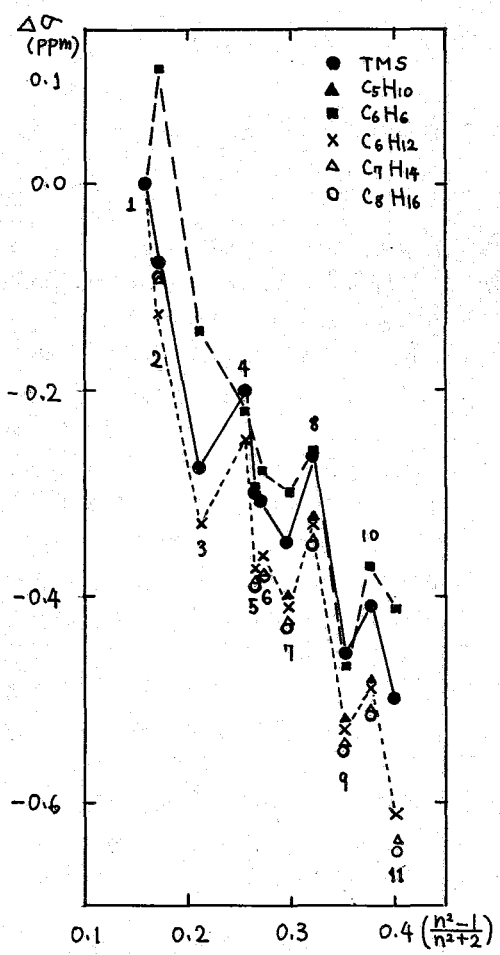


Fig. 1. 無極性溶質の溶媒シフト

8. $\text{Cl}_2\text{C}=\text{CClC}=\text{CCl}_2$, 9. CS_2 , 10. S_2Cl_2 , 11. CH_2I_2 を用いた。

測定結果より、Fig. 1 の無極性溶質では、

- ① 溶媒シフトのパターンが大変似かようであり、全体として見れば、 $\Delta\sigma$ は $(\frac{n^2-1}{n^2+2})$ に比例していると思われる。これは良く知られている様に、ファン・デル・ワールズ相互作用が溶媒シフトを大まかには決定していることを表わす。³⁾
- ② 個々の溶媒による変動がかなり大きい。
- ③ ①②よりは小さいけれども、溶質による相違も確かには有る。

Fig. 2 の極性溶質では、

- ① やはり Fig. 1 と同様、溶媒シフト $\Delta\sigma$ は大まかには $(\frac{n^2-1}{n^2+2})$ に比例していると思われる。しかし全体的に見て $\Delta\sigma$ は Fig. 1 の場合より小さく、溶媒によるパターンも異なる所がある。

にっきくにお、なかがちなおや

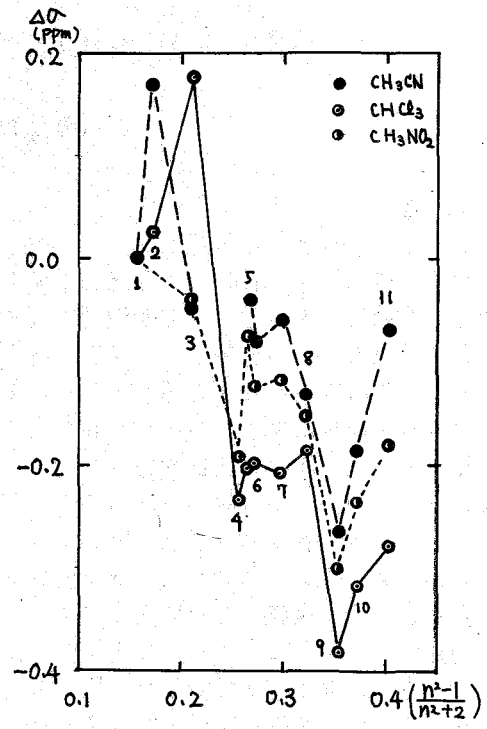


Fig. 2. 極性溶質の溶媒シフト

Fig. 1, 2 は縦軸は $n\text{-C}_6\text{F}_{14}$ 中のシグナル位置を基準にした溶媒シフト ($\Delta\sigma$ ppm), 横軸は体積分極率に比例する $(\frac{n^2-1}{n^2+2})$ とした。溶媒は、1. $n\text{-C}_6\text{F}_{14}$, 2. $(\text{CF}_3)_2\text{CHOH}$, 3. CH_3CN , 4. C_6H_{12} , 5. CHCl_3 , 6. CCl_4 , 7. BrCCl_3 , 8. C_6H_6 , 9. CS_2 , 10. S_2Cl_2 , 11. CH_2I_2 を用いた。

② Fig. 1 に比し、それぞれの溶媒による変動がさらに大きい。

③上のグラフでは、双極子能率の大きい方が $\Delta\sigma$ は小さく、分子の形と電荷分布の似た溶媒分子では、良く似たパターンの $\Delta\sigma$ を示す。

次に、 $\Delta\sigma$ の溶媒による相違点をさらにはっきりさせるために、Fig. 1 は TMS (溶媒) の $\Delta\sigma$ を基準として $\Delta\Delta\sigma$ と $(\frac{n^2-1}{n^2+2})$ とをプロットし (Fig. 3), Fig. 2 は CHCl_3 (溶媒) の $\Delta\sigma$ を基準として $\Delta\Delta\sigma$ と $(\frac{n^2-1}{n^2+2})$ をプロットした (Fig. 4)。

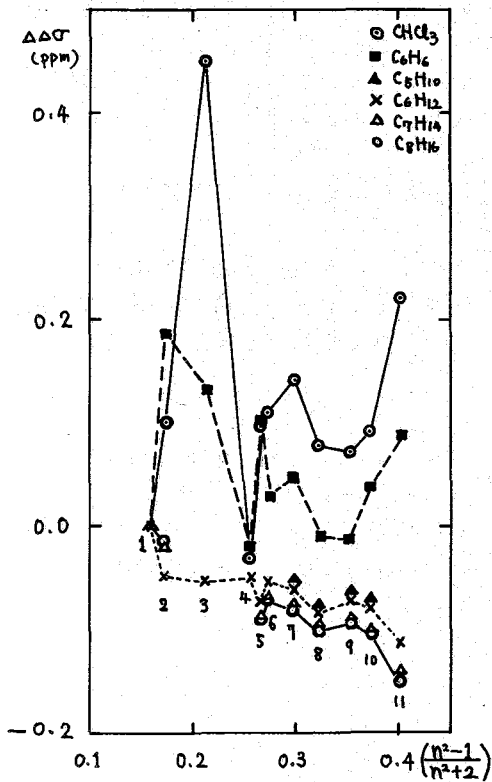


Fig. 3. 無極性溶媒の $\Delta\Delta\sigma$

Fig. 3, 4 では、溶媒-溶質相互作用のうち、溶媒の違いによる部分の効果が抽出されたと考えられる。

結果をまとめると、

④溶媒によるバラツキはあるが、1つ1つの溶媒について考えると、 $\Delta\Delta\sigma$ と $(\frac{n^2-1}{n^2+2})$ との間に大きく見て比例関係がある。このことから、この $\Delta\Delta\sigma$ もファン・デル・ワールスカに起因していると考えられる。

にっきくにお、なかがわなふや

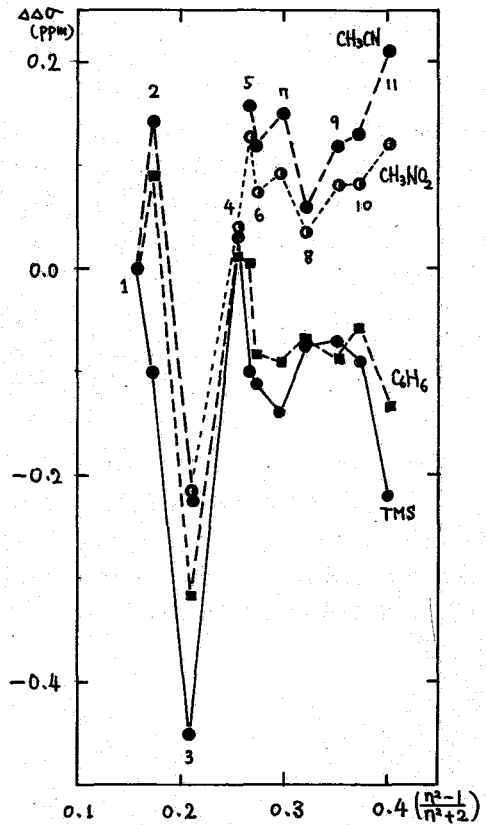


Fig. 4. 極性溶媒の $\Delta\Delta\sigma$

②ここに示された溶質は、構造が良く似かよっているにもかかわらず溶質により $\Delta\sigma$ と $(n^2 - \frac{1}{n^2 + 2})$ との傾斜が異なる。これは、測定した水素の周囲の条件に差があよたためか、あるいはその水素自身に何らかの差があよたためと考えられる。

Fig. 4 の極性溶質では、

①パラッキは Fig. 3 の無極性溶質の $\Delta\sigma$ より大きい。全体として見れば、 $\Delta\sigma$ は $(n^2 - \frac{1}{n^2 + 2})$ と相関があよと見なせる部分がある。

3. まとめ

良く知られている様に、ファン・デル・ワールス力は互いに接している分子間に働き、直接接していない分子との結合エネルギーはほとんどのに等しいと考えてよいだろう。一方実験結果のグラフ Fig. 3 より、無極性分子同志の $\Delta\sigma$ のも比べても、その傾斜が異なることから、溶媒と溶質の間に何らかの相互作用の差があよと予想される。そして、 $\Delta\sigma$ の大きい溶媒中では $\Delta\sigma$ も大きい。

従って、この $\Delta\sigma$ は、問題としている溶質の水素と溶媒分子との直接の相互作用が原因となっていると考えてよいだろう。

また、実験で用いたシクロアルカンでは、Cの数の多いものほど傾斜が大きい。として注目している水素原子が溶媒と接する機会の少ない分子にもかかわらず C_8H_{16} が C_8H_{10} や C_6H_{12} よりファン・デル・ワールス相互作用によるシフトが大きいことがわかった。

References

- 1) K. Nikki, N. Nakagawa, and Y. Takeuchi, Bull. Chem. Soc. Jpn. 48, 2902 (1975).
- 2) D. H. Williams, J. Ronayne, and R. G. Wilson, Chem. Comm., 1967, 1089.
- 3) A. D. Buckingham, T. Schaefer, and W. G. Schneider, J. Chem. Phys., 32, 1227 (1960)
- 4) L. N. Mulay and M. Havenbusch, Rev. Sci. Instr., 35, 756 (1964)

につきくにあ、なかがわなふや

113 アセトン分子の¹³C-NMR化学シフトの aprotic な溶媒効果及び Protonation の理論的考察

東工大 工 〇安藤 勲・西岡 篤夫・近藤 正広

1. はじめに

液体及び溶液で観測した化学シフトは溶媒との相互作用の情報を含んでいる。したがって、その化学シフトを詳しく解析すれば、分子間作用をよりよく理解できる。著者らは化学シフトの aprotic な溶媒効果を量子化学的に理解するため、Klopman¹⁾が化学反応性の溶媒効果を解釈するために提案した solvation 理論を適用してきた²⁾。しかし、この理論は aprotic な溶媒効果にのみ適用されるべきで、Protonation のような場合には別の取扱いをしなければならない。本研究では protonation を取扱うために 英電荷モデルを提出した。そこで、分子としてアセトン分子に注目し、¹³C 化学シフトの aprotic な溶媒効果及び Protonation と両者のモデルを用いて説明するこゝを試みた。

2. Solvation モデル及び英電荷モデルによる¹³C 化学シフトの評価

2.1 Solvation モデル

このモデルについては前報²⁾で詳しく述べたので、ここでは簡単に述べる。この理論では次のことが仮定されている。1) aprotic な溶媒で無限希釈したとき溶媒中に電荷 "solvator" が生ずる。2) 1つの solvation は溶質分子の各Rの原子に associate しており、その電荷は associate している原子の電荷と同じ大きさで、その符号は逆である。3) 溶質-溶媒の相互作用の大きさは溶媒の極性、即ち、誘電率εに依存し Born の式³⁾により評価される。4) solvation 同志は相互作用しない。これらの仮定から、N個の核及びM個の電子をもつた分子のハミルトニアンは分子固有の項 H_{ind} と溶媒との相互作用による項 H_{solv} に分け次のように表わせる。(原子単位)

$$H = H_{ind} + H_{solv} \quad (1)$$

$$H_{ind} = \sum_{i=1}^M \left[-\frac{1}{2} \alpha_i^2 - \sum_{n=1}^N \frac{Z_n}{r_{ni}} \right] + \frac{1}{2} \sum_l^M \sum_j^M \frac{1}{r_{lj}} + \frac{1}{2} \sum_R^N \sum_L^N \frac{Z_R Z_L}{r_{RL}} \quad (2)$$

$$H_{solv} = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon} \left[\sum_l^M \sum_s^N \frac{Q_s}{r_{sl}} - \sum_k^N \sum_s^N \frac{Q_s Z_k}{r_{sk}} \right] \quad (3)$$

但し、 Q_s は誘起された solvation s の電荷、 r_{si} は電子 i と solvation s との距離、 r_{sk} は核 k と solvation s との距離である。(3)式の α 1 項は電子と solvation との相互作用、 α 2 項は核と solvation の相互作用である。 r_{si} は、 s と i が同じ原子中心にあるときはその原子の van der Waals 半径を用い、 s と i が異なる原子中心にあるときはその原子間距離を用いた。 r_{sk} は r_{si} と同様に評価した。これらの近似を MINDO/2 に組み込んで電子状態を ϵ の関数として計算した。

2.2 英電荷モデル

ここではプロトンがある原子(ここではカルボニル基の酸素原子)に protonation する

あんどう いさお, にしおか あつお, こんどう まさひろ

場合を考へる。このモデルではプロトンの代りに電荷 \$Q\$ と考へ、この電荷が酸素原子に近づくとして protonation を取扱う。このモデルに基づいて、\$M\$ 個の核と \$N\$ 個の電子の分子系のハミルトンアンは次のように表わす。(原子単位)

$$H = H_{inh} + H_{prot} \quad (4)$$

$$H_{prot} = - \sum_{k=1}^M \frac{Q_i}{r_{ik}} + \sum_{n=1}^N \frac{Q_i Z_n}{r_{in}} \quad (5)$$

ここで、\$H_{inh}\$ は(2)式と同じである。\$Q_i\$ は酸素原子に近づいてくる正電荷、\$r_{ik}\$ 及び \$r_{in}\$ は正電荷と電子及び負電荷と核の距離である。\$r_{ik}\$ は、\$i\$ と \$k\$ が同じ原子中心にあるときはその原子の van der Waals 半径を用い、\$i\$ と \$k\$ が異なる原子中心にあるときはその原子間距離を用いた。\$r_{in}\$ は \$r_{ik}\$ と同様に評価した。この分子系の全エネルギー \$E_T\$ は次のように計算した。

$$E_T = 2 \sum_i^{occ} C_i^* H C_i + \sum_i^{occ} \sum_j^{occ} C_i (2 J_{ij} - K_{ij}) C_j + \frac{1}{2} \sum_{k=1}^M \sum_{l=1}^M \frac{Z_k Z_l}{r_{kl}} + [2 \sum_i^{occ} C_i D C_i - \sum_n^N \frac{Q_i Z_n}{r_{in}}] \quad (6)$$

\$H_{prot}\$ は protonation による寄与である。\$D\$ の要素は次のように評価した。

$$D_{ij} = \int \psi_i \frac{Q_k}{r_{ki}} \psi_j d\tau \quad (7)$$

積分 \$D_{kk} \equiv D_A\$ は原子の \$s\$ orbital を用いて各々の原子中心 \$A\$ に対して計算した。\$D_{uv}\$ は次のように近似した。

$$D_{uv} = \frac{1}{2} S_{uv} (D_A + D_B) \quad (8)$$

ここで \$S_{uv}\$ は重なり積分、\$u\$ 及び \$v\$ は原子 \$A\$ 及び \$B\$ の valence orbital である。これらと MINDO/2 法を組み込んで電子状態を \$Q\$ の関数の関数として計算した。

2.3 ^{13}C 化学シフトの評価

^{13}C 化学シフト \$D\$ は Pople⁴⁾ が示している、反磁性項 \$\sigma_d\$ と常磁性項 \$\sigma_p\$ の和として評価した。

$$\sigma = \sigma_d + \sigma_p \quad (9)$$

\$\sigma_d\$ は次のように評価した。

$$\sigma_d = 4.45 (3.25 - 0.35 (q_A - 4)) \rho_A \quad (10)$$

ここで \$q_A\$ は着目炭素原子の電子密度である。 ^{13}C 化学シフトを支配する \$\sigma_p\$ は some-over-state 法³⁾ により評価した。化学シフトのテンソルの対角要素 \$\sigma_{xx}\$ は次のように評価した。

$$\sigma_{xx} = - \frac{2e^2 \hbar^2}{m^2 c^2} \langle r^{-3} \rangle_{2p} \sum_i^{occ} \sum_{k(\neq i)}^{uocc} (\Delta E_{i-k})^{-1} (C_{iyA} C_{kzA} - C_{izA} C_{kyA}) \times \sum_B (C_{iyB} C_{kzB} - C_{izB} C_{kyB}) \quad (11)$$

$\langle r^{-3} \rangle_{2p}$ は2p電子の広がり量を表わす量, C_{ik} は2p_z軌道の係数, ΔE_{i-k} は一重項一重項励起エネルギーである。 ΔE_{ik} は次のように評価した。

$$\Delta E_{ik} = \varepsilon_k - \varepsilon_i - J_{ki} + 2K_{ki} \quad (12)$$

ε_k と ε_i は空軌道と被占軌道エネルギー, J_{ki} と K_{ki} は2電子クーロン及び交換積分である。 $\langle r^{-3} \rangle_{2p}$ は次のように評価した。

$$\langle r^{-3} \rangle_{2p} = 34.33 a_0^{-3} (1 - 0.3238 a'_1) / 24 \quad (13)$$

使用した結合距離及び結合角は Pople's²⁾ の標準値を用いた。

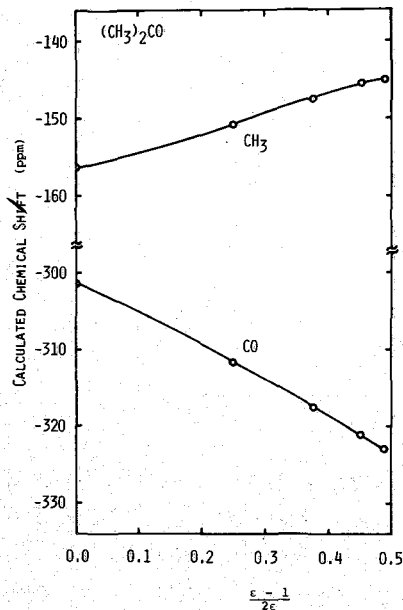
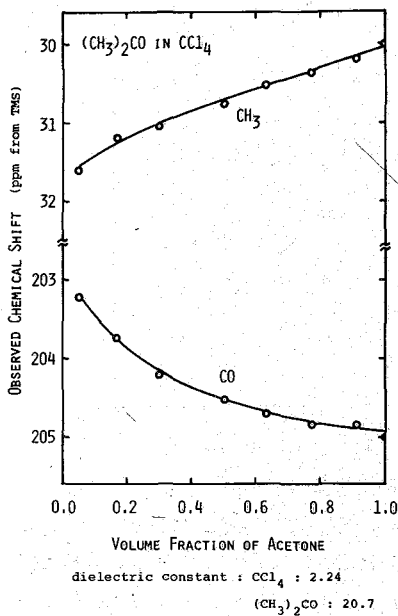
3. ¹³C化学シフトの測定

アセトンの¹³C化学シフトのε依存性は CCl₄ で希釈を行い TMS を外部基準として室温で測定した。 Protonation は硫酸を用いて行った。 種々の濃度の硫酸水溶液中, アセトンの濃度 2 mol % で測定した。 化学シフトは積分値比率の補正を行った。 測定は日本電子製 PS-100 スペクトロメータ (25.15 MHz) でフーリエ変換法により行った。 試料管は外径 8mm のものを用いた。

4. 結果及び考察

i) aprotic な溶媒効果

図1にアセトンと CCl₄ で希釈して測定した¹³C化学シフトのε依存性を示した。 誘電率はアセトン (ε = 20.7) と CCl₄ (ε = 2.24) で希釈してゆくと減少する。 CH₃炭素はεの増



加と共に高磁場シフトしている。またCO炭素は ϵ の増加と共に低磁場シフトしている。図2に計算した化学シフト $\epsilon - 1/2\epsilon$ に対してプロットした。CH₃炭素は ϵ の増加と共に高磁場シフトし、CO炭素は ϵ の増加と共に低磁場シフトしている。これらの傾向は観測と一致している。定量的に見ると、実測ではCH₃炭素は $\epsilon = 2.40^* \rightarrow 20.7$ の変化で1.67 ppm, CO炭素は1.49 ppm シフトし、一方計算ではCH₃炭素は4.8 ppm, CO炭素は10.6 ppm となり計算結果は大きくじている。しかし、このモデルはよく aprotic な溶媒効果をよく説明できることを示している。(*は $\epsilon - 1/2\epsilon + 2 = (\epsilon_1 - 1/2\epsilon_1 + 2)V_1 + (\epsilon_2 - 1/2\epsilon_2 + 2)V_2$ から算出された。 ϵ_1, V_1 は成分1の誘電率及び体積分率である。)

ii) Protonation

図3にK種Rの濃度の硫酸水溶液中の実測の化学シフトを示した。硫酸の濃度の増加と共にCH₃炭素は僅かに低磁場シフトし、またCO炭素は著しく低磁場シフトを示した。(約30 ppm) これらの変化は aprotic な溶媒効果の場合と比べて著しく異なっている。図4にQの大きさの関数として計算した化学シフトを示した。Qの増加は硫酸の濃度を増加させることに対応している。CH₃炭素はQの増加と共に低磁場シフトし、またCO炭素も低磁場シフトを示した。これらの傾向は実測の傾向と一致している。このことから実測のモデルは protonation をよく説明していることと思

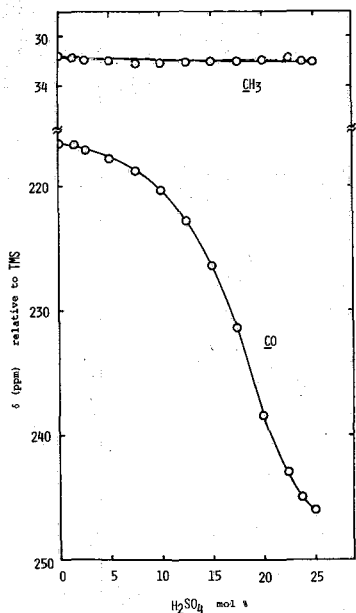


図3

測の傾向と一致している。このことから実測のモデルは protonation をよく説明していることと思

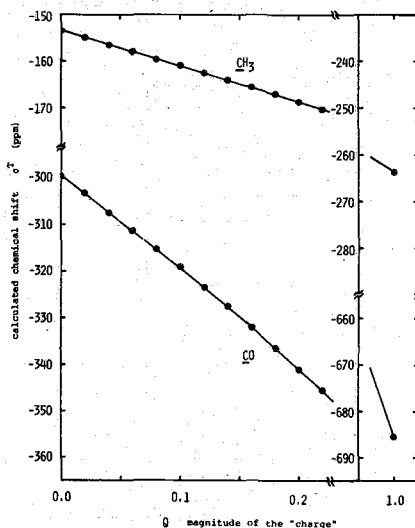


図4

える。以上のようにアセトンの¹³C化学シフトの溶媒効果を2つのモデルを用いてよく説明できることを示したが、今後これらのモデルの広い適用性が期待できるものと思える。

文献: 1) G. Klopman, Chem. Phys. Letts., **L**, 200 (1967), 2) I. Ando et al., J. Magn. Res., **21**, 427 (1978)
 3) M. Born, Z. Phys., **L**, 45 (1920), 4) J. A. Pople, Mol. Phys., **2**, 301 (1964), 5) J. A. Pople, J. Chem. Phys., **37**, 52 (1962), 6) H. J. Höring et al., W. Z. Techn. Hoch. Chem. Leun., **255**, 147 (1974), 7) J. A. Pople et al., J. A. C., **21**, 4253 (1967)

第 2 日

11 月 14 日 (火)

201 有機スズ化合物とピリジン塩基との溶液内錯体形成

ジメタルスズジクロライドについて

(阪大薬) ○藤原英明, 酒井文彦, 菊月尚子, 佐々木善男

有機スズ化合物は触媒, 合成樹脂の安定剤として工業的に重要であるが, 生物殺生剤として有効であり薬劑的にも興味をもたれている。これまで有機スズ化合物と各種ルイス塩基との錯体研究は, 主としてその合成と固体構造に關して行われ, 溶液を対象とする例は少ない^{1,2)}。しかし溶液化学の立場からみても, これらの化合物を含む溶液内での複雑な平衡, 安定化学種, 錯体形成の強さ, および錯体の構造等に関する知見は極めて興味深い。我々は今回, 代表的な有機スズ化合物としてジメタルスズジクロライドを選び, それと, 2,2'-ビピリジン, ピリジン, ピコリンとの錯体形成を(スズに対する)非配位性溶媒中で調べた。溶媒には1,1,2,2-テトラクロロエタン(以下テトラクロロエタンと略)を用いた。一部の実験でクロロホルムを用いたが, 化学的不安定さ, 低沸点による計量誤差のためにテトラクロロエタンの方が好都合であった。

実験

テトラクロロエタンは市販特級品を濃硫酸, 水, 炭酸ソーダ水, 水, により順次洗浄しドライボックス中で蒸留精製した。ピリジン, ピコリンは市販品を酸化バリウムで乾燥しドライボックス中で蒸留した。これらの精製品はモレキュラーシーブ上に保存した。2,2'-ビピリジンは市販品を昇華精製しデシケーター中に保存した。¹H NMRは日立R-22(90MHz)により, また¹³C NMRは日立R-22 FT NMR装置(22.63 MHz)により測定した。シフトの基準は, いずれの場合もTMS内部基準である。

結果と考察

2,2'-ビピリジンとの錯体形成

テトラクロロエタン中における連続変化法の結果より錯体の組成比は1:1であることが確認される(図1)。同様の結果がジメタルスズジクロライドのメタルプロトンのシフト $\delta(\text{SnCH}_3)$, ビピリジンの3,3'および6,6'プロトンのシフトについても得られた。他のプロトンについてはNMRパターンが複雑となるので正確なシフトの測定は困難であった。錯体生成の平衡定数は, Me_2SnCl_2 の濃度を約0.05 Mで一定とし, ビピリジンの濃度を0~0.15 Mまで変化させ, 得られる濃度シフト曲線を $A+B=AB$ の平衡式でシミュレーションすることにより決定した。 $\delta(\text{SnCH}_3)$ および $^2J(^{119}\text{SnH})$ のデータより $K=4180, 4360$ (l/mol)の値が得られた。この値は配位性溶媒アセトニトリル中において報告されている値³⁾ 2600 l/molより大きく, 非配位性溶媒中の値

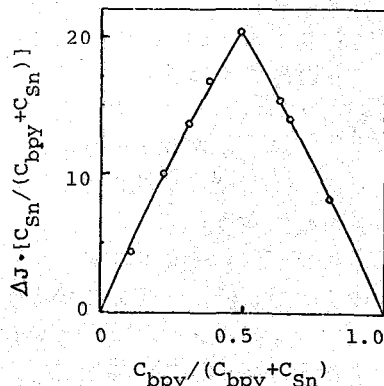


Fig. 1 Job plots of $^2J(\text{SnH})$ for the $\text{Me}_2\text{SnCl}_2 + 2,2'$ -bipyridine system in $\text{CHCl}_2\text{CHCl}_2$
 $\Delta J = J_{\text{obsd}} - J_{\text{free}}$

より大きいためであり, さがいのみみこ, きくづきたがこ, ささきよしお

としては妥当であろう。

ピリジンとの錯体形成

これまで、ピリジンとの1:2錯体は容易に固体状態で単離でき、その構造が知られているが、1:1錯体に関する報告は無い。ピリジンオキシドの場合は1:1錯体が単離され、その構造は下のIとあると言われている。今回の実験でピリジンを含む溶液に於いては特に新しい信号が現われることなく、シフトおよび結合定数の濃度依存性が見られるのみであった。従って、その解析により1:1あるいは1:2錯体の有無、その生成平衡定数を決定することができる。

^1H NMRによる連続変化法の結果(図2)によれば、 $\delta(\text{SnCH}_3)$ については1:1, $^2\text{J}(\text{SnH})$ については1:2錯体が支持される。同様の結果がピコリンでも観察された。 ^{13}C NMRによるピコリンについての連続変化法の結果では、Job plotの最大値は、観察する位置により異なるが、全て1:1と1:2の間に現われた。これらの事実より溶液中では1:1と1:2錯体が混在することが示唆される。

Me_2SnCl_2 の濃度を一定とし、ピリジンの濃度を変えた場合の $\delta(\text{SnCH}_3)$ および $^2\text{J}(\text{SnH})$ の変化は図3($C_{\text{py}} < 0.25\text{M}$) および図4($C_{\text{py}} < 12\text{M}$)のようである。図3において明確な屈曲点が見られないことから平衡定数は小さいと予想できる。ピリジン濃度を100%近くまで変えた場合でも $\delta(\text{SnCH}_3)$ は一定値に近づく漸増の傾向を示した。図4で $^2\text{J}(\text{SnH})$ の最大値112.0 Hz および $^2\text{J}(\text{SnH})$ の107.0 Hzは前述のピピリジンとの六配位錯体における値113.0と

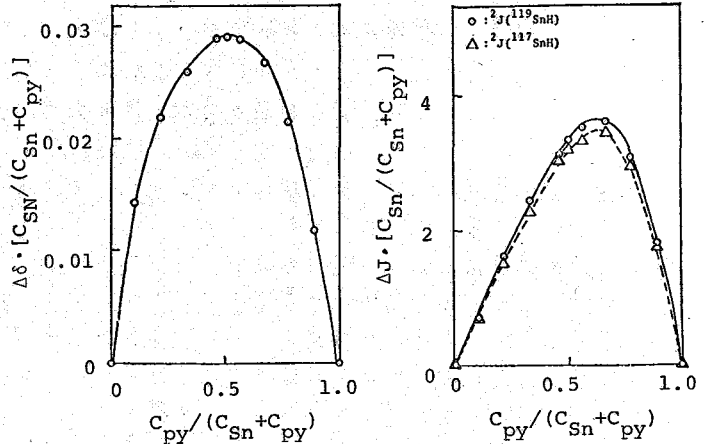


Fig.2 Job plots of ^1H NMR shifts (δ) and coupling constants ($^2\text{J}(\text{SnH})$) for the $\text{Me}_2\text{SnCl}_2 + \text{pyridine}$ system in CHCl_3 .

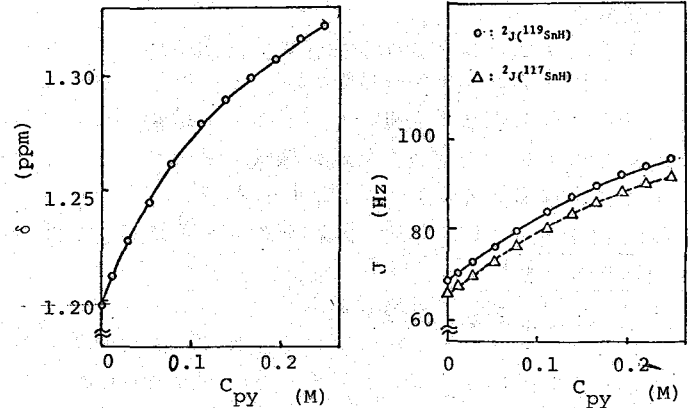


Fig.3 Concentration dependence of ^1H NMR shifts and coupling constants of Me_2SnCl_2 for the $\text{Me}_2\text{SnCl}_2 + \text{pyridine}$ system ($C_{\text{Sn}} = 0.05\text{M}$)

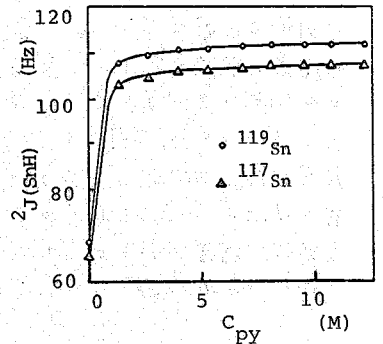
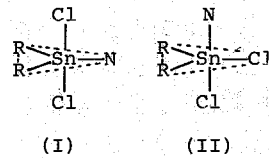
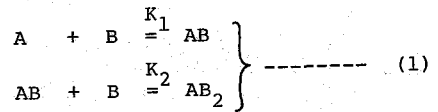


Fig.4 $^2\text{J}(\text{SnH})$ against C_{py} for the $\text{Me}_2\text{SnCl}_2 + \text{pyridine}$ system

108.0 Hz に殆んど等しいことから、ピリジン濃度が濃い領域では 1:2 錯体のみが存在し、その錯体の ${}^2J({}^{119}\text{SnH}) = 112 \text{ Hz}$, ${}^2J({}^{117}\text{SnH}) = 107 \text{ Hz}$ であると言えよう。

図 2 の濃度依存性より平衡定数を求める場合、連続変化法の結果から 1:1 と 1:2 錯体を仮定するのが妥当であるが、1:1 錯体のみを仮定して計算を行うと、 ${}^2J({}^{119}\text{SnH})$ について、計算値と実測値の間の誤差は 0.2 Hz 以下に小さくなるが、ピリジン濃度の中向領域と両端の領域ではその誤差の符号が逆となり系統的誤差が認められた。その他、計算により得られる 1:1 錯体の ${}^2J({}^{119}\text{SnH})$ の値が 119 Hz となり上述の 112 Hz より大きくなり不適当であった。

(1) の平衡式を仮定すると定義により (2), (3) 式が成立する。ここで C_A, C_{AB}, C_{AB2} は各化学種の平衡濃度、 C_A^0, C_B^0 は各々、スズ化合物および塩基の初濃度である。(2) と (3) を C_B について解くと、 C_B



$$\left. \begin{aligned} K_1 &= C_{AB} / (C_A \cdot C_B) \\ K_2 &= C_{AB2} / (C_{AB} \cdot C_B) \end{aligned} \right\} \text{----- (2)}$$

$$\left. \begin{aligned} C_A^0 &= C_A + C_{AB} + C_{AB2} \\ C_B^0 &= C_B + C_{AB} + 2C_{AB2} \end{aligned} \right\} \text{----- (3)}$$

の 3 次式が得られるので与えられた K_1, K_2, C_A^0, C_B^0 に対する各化学種の平衡濃度を計算することができ、(4) 式よりシフトの計算値が求められる。そこで残りは (5) 式を最小とする

$$\delta_{\text{calc}} = \frac{C_A \cdot \delta_A + C_{AB} \cdot \delta_{AB} + C_{AB2} \cdot \delta_{AB2}}{C_A^0} \text{----- (4)}, \quad F = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\delta_{\text{calc}}^i - \delta_{\text{obsd}}^i)^2}{n}} \text{----- (5)}$$

ように $K_1, K_2, \delta_{AB}, \delta_{AB2}$ をシミュレーションにより決定するプログラムを構築し⁽⁵⁾ K_1, K_2 の決定を試みた。その際、 K_1, K_2 の代わりに $1/K_1, 1/K_2$ をパラメーターとする方が収束が早いのでこれを利用した。J について (4) と同様の式で表されるので全く同じ計算が適用できる。J の場合には 1:2 錯体の値が図 4 より確認できるので計算結果の検討に都合があり、濃度依存性も大きいので、主に J について計算を行った。 $K_1, K_2, J_{AB}, J_{AB2}$ の 4 パラメーターによる計算では、2 回の実験で $K_1 = 8 \sim 18 \text{ l/mol}$, $K_2 = 4.4 \sim 4.7 \text{ l/mol}$, $J_{AB} = 88 \sim 110 \text{ Hz}$, $J_{AB2} = 102 \sim 112 \text{ Hz}$ の値が得られ、 K_2 以外のバラツキが大きかった。一つの実験に関する計算では、 K_1, K_2 の初期値を変えた場合、最終値が異なることがあった。この結果より、ここで取り上げた系については、4 パラメーターを同時に正確に決定することは困難と考えられる。そこで図 4 の結果を利用し、 $J_{AB2} = 112.0 \text{ Hz}$ とし K_1, K_2, J_{AB} の 3 パラメーターによる計算を試みた。この場合、同一のデータについて、 K_1, K_2 の初期値を変えても最終値は不変であり、2 回の実験において表 I のように再現性の

Table I Equilibrium Constants and ${}^2J({}^{119}\text{SnH})$ Coupling Constants for $\text{Me}_2\text{SnCl}_2 + \text{Pyridine}$ System in $\text{CHCl}_2\text{CHCl}_2$ at $34.1 \text{ }^\circ\text{C}$

Experiments	K_1	K_2	J_{free}^a	J_{AB}	J_{AB2}^b	rmsd ^c
1	18.9 l/mol	4.68 l/mol	68.4 Hz	87.8 Hz	112.0 Hz	0.065 Hz
2	18.1	4.68	68.4	88.6	112.0	0.069
average	18.5	4.68	68.4	88.2	112.0	0.067

a: ${}^2J({}^{119}\text{SnH})$ value for samples without pyridine.

b: ${}^2J({}^{119}\text{SnH})$ value from Fig. 4.

c: Root mean square deviation.

良い結果が得られた。得られた K_1, K_2 の値より Me_2SnCl_2 分子の各化学種への分布を図示すると図5のようであり、1:1錯体の割合が最大値となるのはピリジンの濃度が0.14Mの時であり最大値は50%である。表Iで、 J_{AB} が J_{free} と J_{AB_2} の真ん中にあることは興味深い結果である。

α-ピコリンとの錯体形成

合計濃度 0.2 M での連続変化法の実験では、 Me_2SnCl_2 のメタルプロトンのピークが3本に分裂することが観察された(図6のA, B, C)。ピークAのシフトおよび $2J(\text{SnH})$ は濃度および温度依存性を示すのに対して、ピークBとCのシフトおよび $2J(\text{SnH})$ は濃度依存性を全く示さない(モル比の変化が0.3~0.9の間で、シフトは±0.1 Hz, Jは±0.3 Hz 内で一定である)。さらにピークBとCの強度は濃度および温度によらず等しく、ピークAに対するそれらの強度比は濃度および Me_2SnCl_2 の割合が上がるにつれ減少した。これらの結果から、ピークBとCは単一の化学種に帰属でき、その $2J(^{119}\text{SnH}) = 84.3 \text{ Hz}$, および 79.8 Hz であることから、1:1錯体とするのが妥当であろう。前2頁の(I)と(II)においては、同じSn原子に結合している2つのメタルプロトンのシフトは等しいはずであるから、ピークBとCは、(I), (II) 以外の1:1錯体によるが、あるいは、(I)と(II)の混合物でそれらの存在割合が等しいことが考えられる。この点については、さらにSn核のシフト測定などにより検討中である。 Me_2SnCl_2 の濃度を0.3 M程度に高めた場合には、BとCのピークがブロードになり重なる傾向を示すことから、両者の間に交換のあることがわかる。

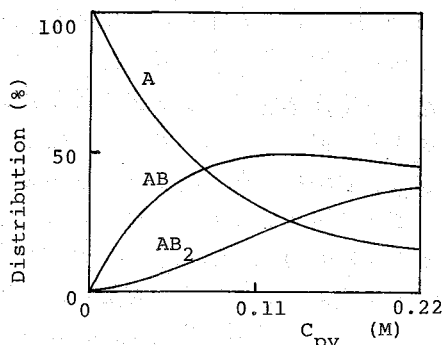


Fig.5 Distribution of Me_2SnCl_2 molecule in the Me_2SnCl_2 (A) + pyridine(B) system, $C_A^0 = 0.04 \text{ M}$

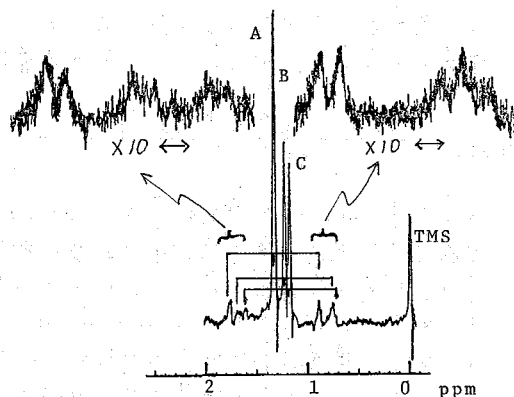


Fig.6 ^1H NMR spectra of Me_2SnCl_2 in $\text{CHCl}_2\text{CHCl}_2$, containing 0.13 M α -picoline. $C_{\text{Sn}} = 0.07 \text{ M}$

References

- 1) V.S.Petrosyan, N.S.Yashina, and O.A.Reutov, Adv. Organomet. Chem., **14**, 63 (1976).
- 2) G.Matsubayashi, M.Okunaka, and T.Tanaka, J. Organomet. Chem., **56**, 215 (1973).
- 3) W.D.Honnick, M.C.Hughes, C.D.Schaeffer, Jr., and J.J.Zuckerman, Inorg. Chem., **15**, 1391(1976), and refs. cited therein.
- 4) B.V.Liengme, R.S.Randall, and J.R.Sams, Can. J. Chem., **50**, 3212 (1972).
- 5) H. Kawaki, H.Fujiwara, and Y.Sasaki, Chem. Pharm. Bull., **26**, 2694 (1978).

(東工試) 早水紀久子・山本 修

液晶溶液中に小さな分子を配向させてNMRを測定することによって、分子構造に関する知見が得られると同時に、化学シフトの異方性の決定ができることはよく知られている。我々はこの手法によって、ハロゲン化メチルの¹H化学シフトの異方性を決定し発表しているが、今回はアセチレンおよびメチルアセチレンの¹³C化学シフトの異方性を決定するため、常温液晶を用いて天然存在比における¹³C NMRスペクトルの測定を試みた。双極子-双極子結合による分裂と得るためには、¹H-¹³Cカップリングの正確なスペクトルの測定が必要であり、天然存在比のまま液晶中に配向した分子の¹³Cスペクトルを得る例はあまり見かけない。同一サンプルの¹H共鳴スペクトルも測定し、解析の参考にした。

1) 液晶中に配向した分子のNMRスペクトル

液晶中に配向した分子では、直接的な双極子-双極子結合は平均化されず、スペクトルに分裂を生ずる。核*i*と核*j*の間の双極子結合定数 D_{ij} は次のように書ける。

$$D_{ij} = -\frac{\hbar \gamma_i \gamma_j}{4\pi^2} \cdot \frac{1}{r_{ij}^3} \cdot S_{ij} \quad (1)$$

r_{ij} は核*i*, *j*間の距離であり、オー-2-パラメータ S_{ij} は

$$S_{ij} = \langle (3\cos^2\alpha_{ij} - 1)/2 \rangle_{ave} \quad (2)$$

で表わされ、 α_{ij} は核*i*, *j*と結合ベクトルと磁場とがなす角度であり、 S_{ij} は D_{ij} の平均的な配向の度合いを示す量である。今アセチレンまたはメチルアセチレンの分子軸(3回対称軸)のオー-2-パラメータを S_{33} で表わすと、任意の核*i*, *j*の S_{ij} と S_{33} との間には次のような関係式が成立する。

$$S_{ij} = \frac{3\cos^2\alpha_{ij} - 1}{2} \cdot S_{33} \quad (3)$$

ここで α_{ij} は D_{ij} と分子軸とがなす角度である。

また液晶中に配向した分子では化学シフトテンソルの完全な平均化が行なわれず、異方性を含んだ値が測定される。今、等方的な化学シフトを Δ_{iso} とし、異方的な化学シフトを $\Delta\sigma = \sigma_{33} - \frac{1}{2}(\sigma_{11} + \sigma_{22}) = \sigma_{11} - \sigma_{22}$ とすると、液晶相における化学シフトの測定値 Δ_{obs} は(4)式で表わされる。

$$\Delta_{obs} = \Delta_{iso} + \frac{2}{3} S_{33} \Delta\sigma \quad (4)$$

(4)式から明らかなように、液晶溶液の温度と S_{33} を等方性溶液にし、その化学シフト値を Δ_{iso} とすれば、 $\Delta\sigma$ は算出できる。しかし¹H化学シフトの場合には、溶媒効果が大きいためにこの方法は信頼性が低いので、我々は液晶相において温度を変えて S_{33} を変化させて Δ_{obs} を測定し、 Δ_{obs} 対 S_{33} の直線の勾配から $\Delta\sigma$ を求める方法を提案した。²⁾ ¹³C化学シフトの場合には、一般に化学シフトに対する溶媒効果は小さいので、勾配法を用いる必要はないように考えられるので、この案について検討することにした。

はやみ可 子くこ・やまもと あつひ

(i) 液晶中に配向したアセチレンの¹Hおよび¹³C NMRスペクトル

¹H NMRスペクトルは強度比1:1のdoubletであり、その間隔 $\Delta\nu_{HH} = -3D_{HH}$ である。¹³C NMRスペクトルは、直接結合したプロトンにより先ずdoubletに分裂し、その分裂幅 $\Delta\nu_{CH} = J_{CH} + 2D_{CH}$ となる。またさらにdoubletに分裂し、その小さなdoubletの幅 $\Delta\nu_{CCH} = J_{CCH} + 2D_{CCH}$ である。J値は符号を含めて決定されており⁽²⁾ $J_{CH} = 248.7 \text{ Hz}$, $J_{CCH} = 49.7 \text{ Hz}$ を用いた。

(ii) 液晶中に配向したメチルアセチレンの¹Hおよび¹³C NMRスペクトル

CH₃とCHのプロトン化学シフト値の差が小さいため、一次近似のスペクトルは得られず、¹H NMRスペクトルはA₃Bスピン系、¹³C NMRスペクトルはA₃BXスピン系のX部分となる。メチルアセチレンの¹H NMRスペクトルは解析例があるが⁽³⁾ここでは省略する。スペクトルを計算する際に必要なJ値は、符号を含めて文献値を用いた。⁽⁴⁾A₃BX系として適当な数値を代入して計算すると、C≡H炭素のスペクトルは、ほぼ一次近似のスペクトルになり、直接結合したプロトンとの相互作用により、間隔 $J_{CH} + 2D_{CH}$ でdoubletに分裂し、その各々の線がメチルプロトンとの相互作用によって、1:4:4:1の強度比でさらに小さく分裂するが、この時の分裂幅は等間隔ではない。四級炭素はほぼ1:4:6:4:1の強度比で分裂するが、この分裂幅も等間隔でない。またメチル炭素は直接結合したメチルプロトンにより4本に分裂し、さらにCHプロトンによって小さなdoubletに作るが、それらの間隔は必ずしも一次近似の間隔 $J + 2D$ に等しくなるない。従って本報告ではスペクトルの解析とコンピュータシミュレーションで行った。D値を得た。

2) 実験

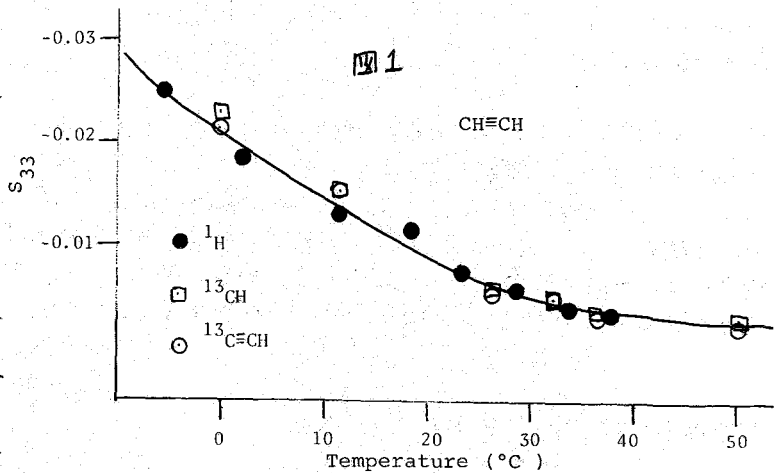
液晶溶液として、メルクのPhase 5を用いた。これはアソキエチレン系の混合液晶であり、-5°C ~ 75°Cの間で液晶状態になる。直径12mmのサンプル管を用い、これに液晶を入れた後に脱気を行い、その中にアセチレンまたはメチルアセチレンガスを入れ、さらに内部規準としてネオペンタンを凝集させた後密封した。

測定はVarian XL-100 NMRスペクトロメータを用い、サンプルスピニングは行わなかった。パルス幅を短くし、繰返し時間を短くする方法で測定すると、緩和時間の短い液晶そのもののシグナルが相対的に強くなり、スペクトルの質は低下するので、パルス間隔を長くする測定法を採用せざるを得なかった。¹H NMRスペクトルはC₁₃法で得た。

3) 結果と考察

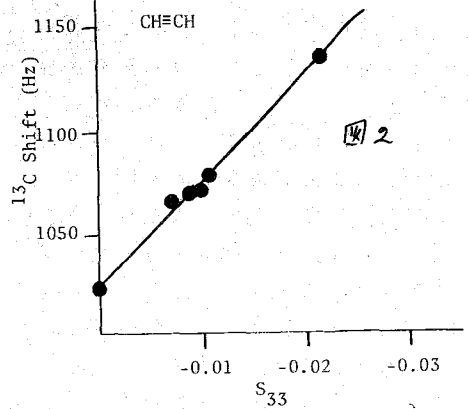
(i) アセチレン

¹³CエンリッチアセチレンをメルクのPhase 4およびEBBA中に配向させた時の分子構造およびPhase 4中の異常な挙動について詳細な研究がDiehlらによって行われているがPhase 4中ではアセチレンの原子間距離が見掛け上温度上昇とともに短くなるという現象が



みうれ、これは異性化した二つのサイトに配向するためとして説明されている。今回我々が用いた Phasos 中では、EBBA の時と同様にこのような異常はみうれなかつた。

アセチレン分子の平衡構造は分光学的方法で $r_{CH} = 1.061 \text{ \AA}$, $r_{C\equiv C} = 1.207 \text{ \AA}$ と決定されている。この時 $r_{CH}/r_{C\equiv C} = 0.879$ となる。一方液晶中に配向したアセチレンの ^{13}C スペクトルから得られる D_{CH} と $D_{C\equiv C}$ には $\sqrt{D_{CH}/D_{C\equiv C}} = (r_{C\equiv C} + r_{CH})/r_{CH}$ という関係式が成立する。各温度での測定結果から平均値を求めると、 $(r_{CH}/r_{C\equiv C})_{obs} = 0.851$ となる。このような傾向は EBBA 中に配向したアセチレンの場合にも見られ、Diehl は振動振幅による原子間距離の補正をすることによって説明した。すなわち $r_{CH} = 1.0355 \text{ \AA}$, $r_{C\equiv C} = 1.207 \text{ \AA}$ ($r_{CH}/r_{C\equiv C} = 0.858$) とした。



ここでは一応 Diehl の値を使ってオーダーパラメータ S_{33} を求め、その温度依存性を図 1 に示す。 ^1H スペクトルから求めた S_{33} と ^{13}C スペクトルから得た S_{33} とは実験誤差内で一致する。 S_{33} の温度依存性は次に述べるメチルアセチレンや一般液晶の場合とはかなり異なっている。一つの原因としては温度上昇とともに液晶中のアセチレン濃度が低くなる事が考えられる。

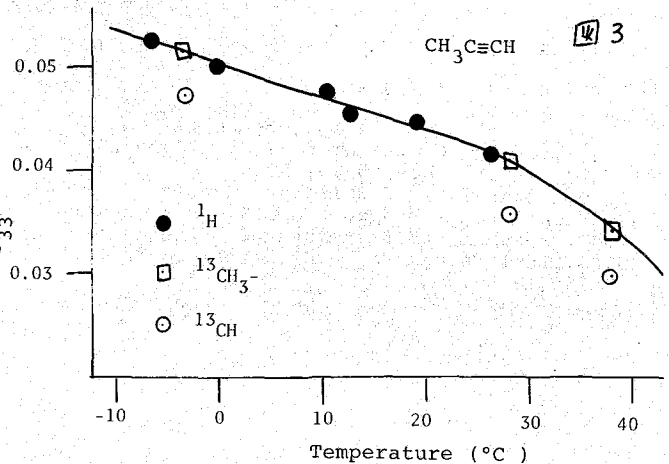
^{13}C 化学シフトの異方性を決定するために、液晶中における化学シフトの測定値 S_{33} に対してプロットし、図 2 に示す。この図には、等方性液体の時の化学シフト値 $S_{33} = 0$ の時の周としてプロットしたが、液晶状態からの外挿値と一致している。即ち (4) 式における Δ_{iso} は、等方性液体状態における測定値と一致している。図 2 の勾配より求めた ^{13}C 化学シフトの異方性を表 1 に示す。

(ii) メチルアセチレン

^1H 共鳴では A_3B スピン系 ^1H のスペクトルになり、メチルプロトン間の双極子結合定数 D_A とメチルアセチレンプロトン間の双極子結合定数 D_{AB} が求まる。すでに示されているように³⁾、プロトン間距離をそれぞれ r_{CH_3} , r_{CH-CH_3} とし、 $\gamma = r_{CH_3}/r_{CH-CH_3}$ とすると、

$$\frac{D_A}{D_{AB}} = \frac{1}{\gamma^3} \left(\frac{1}{\gamma^2} - 2 \right)$$

の関係式が成立する。分光学的方法で得られた値から $\gamma = 2.355$ であり、各温度での測定値から求めた γ の平均値は 2.370 となり、ほぼ一致している。また D_{AB} および D_A から求めた S_{33} は、各温度で実験誤差内で一致している。図 3 に ^1H 共鳴から得た S_{33} の温度依存性を ● で示す。この曲線は通常の液晶の S_{33} の挙動と同じ傾向を示している。



一方¹³C共鳴スペクトルからは種々のDが得られるが、今回は分裂幅の大きい直接結合したプロトンとの結合定数にのみ着目した。分子の平衡構造に基づいてS₃₃を計算すると、CH₃とCHとから求めた値にはかなり大きなずれがあることが判った。¹³C共鳴から得たS₃₃の温度依存性を図3に示す。H共鳴から得た値と比較すると、CH₃のS₃₃はH共鳴とはほぼ一致しているが、CHから得た値はかなり小さい。アセチレンの場合と同様に振幅による補正を行なうと、CHのS₃₃はさらに小さくなり一致しない。この不一致については現在検討中である。

また¹³C化学シフトをS₃₃でプロットすると、S₃₃の大きい部分即ち低温部では直線になる。そこで温度に対し¹³Cシフトをプロットすると、図4のようになり、低温部では¹³Cシフト値は温度に依存しない。従って(4)式に基づき、¹³CシフトのS₃₃によるプロットが直線になる高温部と等方性液体状態における¹³C化学シフト値から、¹³C化学シフトの異方性を決定し、表1に示した。この時のS₃₃はメチル炭素の分裂幅から求めた値を用いた。CH炭素から求めたS₃₃を使えば、異方性の大きさは幾分か増加する。

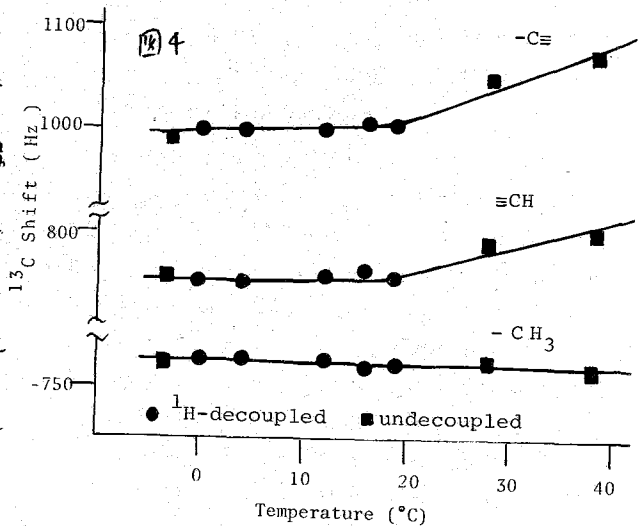
表1

	¹³ C Shift Anisotropy (ppm)	
	CH=CH	CH ₃ C≡CH
≡CH	298	195
-C≡	-	241
CH ₃	-	~0

固体状態のベンゼンの¹³Cスペクトルから求めた¹³C化学シフトの異方性の値は180 ppmである。本研究で得たアセチレンの¹³Cシフトの異方性298 ppmは、ほぼ妥当な値に思われるが、メチルアセチレンの値がかなり小さいことは、直感的な原因がみあたらない。しかしアセチレンプロトンの化学シフトの異方性の値が、アセチレンでは約23 ppmであるのに、メチルアセチレンでは8 ppmであって、約3分の1になっていることを考えれば、¹³C化学シフトの場合にもメチルアセチレンの異方性が小さいのは妥当なのかもしれない。

文献

1. K.Hayamizu & O.Yamamoto, J.Chem.Phys., 51, 1676 (1969), J.Magnetic Resonance 2, 377 (1970), *ibid*, 5, 94 (1971).
2. D.M.Graham & C.E.Holloway, Can. J. Chem., 41, 2114 (1963).
3. G.Englert, A.Saupe, and J.P.Weber, Z.Naturforsch. 23a, 152 (1968).
4. H.Dreeskamp, E.Sackmann and G.Stegmeier, Ber.Bunsenges., 67, 860 (1963).
5. P.Diehl, s.Sykora, W.Niederberger and E.E.Burnel, J.Magnetic Resonance, 14, 260 (1974).
6. M.G.Gibby, A.Pines and J.S.Waugh, Chem.Phys.Letters 16, 296 (1972).



203 各種液晶のFT-NMRスペクトル

(日立・日立研) 亀澤範正

(日立・那珂) 安部勝信, 笹刈仁

1. 緒言

液晶状態で測定したNMRスペクトルは、液晶の基本物理量である order parameter をはじめとして種々の重要な情報を与えることは周知の通りである。最近、ようやく液晶のFT-NMRスペクトルが報告されるようになり、液晶構造に関するより詳細な情報が得られるに至っている。しかし、液晶を単に磁場方向に配向させた状態から得られる情報には限りがある。そこで、液晶の director が磁場方向からはずれた場合のスペクトルも測定できるようにするため、特殊な試料回転機能を兼備した¹H FT-NMR測定システムを開発し、より広汎な情報を得ようとした。

2. 実験

(1) Spectrometer :

ハード構成をFig.1に示した。磁場強度の選定に当っては、液晶を配向させるのに十分であり、かつ director を磁場方向からはずれた後に磁場方向へ復帰してゆく過程が測定可能になるように配慮した。また、分解能調整用のゴレーコイル、なすびに90°パルスの照射位置を変えるための磁場OFF SET機構を併設した。得られたFID

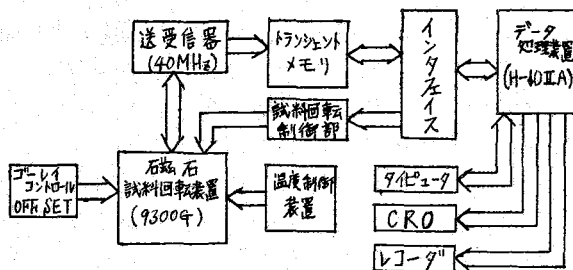


Fig.1 ハード構成

を高速で sampling するために、トランジエント・メモリ (8 bit, 2k W) を設け、一旦これに取込んだデータをミニコン HITAC-10IIA (磁気ドラム併設) に転送して処理するようにした。試料管の回転にはパルスモータを用い、ギヤを介して spinner と連絡し (回転角度の誤差 1° 以下)、更に回転角度は任意に設定できるようにした。回転制御にはクロックパルス発生器を用い、その周波数により回転速度を、またそのパルス数により回転角度をコントロールした。

試料管の回転から測定、データ処理迄の全ての作業を H-10IIA でコントロールさせた。回転後、任意に設定したパルス間隔で 90° パルスを増加し、最大 8 ケまで独立に FID を収集できるようにメモリ内に 8 ケのデータ領域を設けた。もちろん、積算によるシグナル平均化も可能にした。

(2) 試料 :

用いた液晶を Table 1 に示した。NEAX-12 (富士色素) の組成は、シフト試薬添加 (溶媒 CCl₄) により、シフトした CH₃O のシグナル面積から求めた。NP-5 (メルク) については、ガスクロマトのピーク面積比から求めた。TN-101 の組成はホフマン社

かめざわ のりまさ, あべ かつのぶ, ささぶち むとし

から、そのモル比が公表されている。光学活性物には、*d*-CaYnoneを用いた。

3. 結果と考察

NEAX-12の35°CにおけるスペクトルをFig. 2に示した。centerと2つのwing signalとの面積比は6:10であった。ベンゼン環の4組のオルトプロトン崗の dipolar couplingには大差ないことは *p*-azoxyanisole (PAA) のスペクトルから明らかである。従って、8ヶの環プロトンはwingのシグナルに帰属される。従って、CH₂プロトンもwingのシグナルに帰属されることになる。その結果、CH₃OとCH₃の6ヶのプロトンがcenterのシグナルである。両wingのシグナルは夫々2本に分裂しているが、面積比からみて内側のシグナルを環プロトンに、外側のシグナルをCH₂に夫々帰属できる。center signalの分裂は、CH₃OとCH₃夫々の dipolar couplingによる tripletの重ね合せの結果と思われるが、このスペクトルだけではそれ以上の詳細は定かにできなかった。

NP-5とTN-101について、試料を90°回転させた後にみられるスペクトルの経時変化をFig. 3に示した。図中に示した時間は、試料管回転後90°パルスを加える迄の時間である。環プロトンの *ortho* dipolar couplingによるシグナルの分裂幅 $\Delta\nu$ は式(1)で与えられる。

$$\Delta\nu = D \cdot \frac{3\cos^2\alpha - 1}{2} S \quad \dots (1)$$

ここで、 D は定数、 S はorder parameter、 α はdirectorと磁場のなす角度である。式(1)から $\cos^2\alpha = 1/3$ ($\alpha = 54.7^\circ$) のとき $\Delta\nu = 0$ となるが、実測スペクトルにもこの状態が観測されている。従ってFig. 3は、試料管の回転に追従してdirectorも回転し、時間の経過に伴ってdirectorが次第に磁場方向へ復帰してゆく様子を示している。

NP-5の帰属はNEAX-12の場合と全く同様にして行なうことができ、やはりwing signalのうち内側の大きなピークを環プロトンに帰属させることができた。TN-101の場合、wing signalには環プロトンのみでなく、いくつかのCH₂プロトンのシグナルも重なっていると考へざるを得ない。TN-101の組成から環プロトンとメチレンプロトンの

液晶	成分と組成比	
NEAX-12	<chem>COc1ccc(cc1)/N=N/c2ccc(cc2)CC</chem>	3
	<chem>COc1ccc(cc1)/N=N/c2ccc(cc2)CC</chem>	2
NP-5	<chem>COc1ccc(cc1)/N=N/c2ccc(cc2)CC</chem>	3
	<chem>COc1ccc(cc1)/N=N/c2ccc(cc2)CC</chem>	2
TN-101	<chem>CCCC1=CC=C(C=C1)C(=O)OC2=CC=C(C=C2)C#N</chem>	1
	<chem>CCCC1=CC=C(C=C1)C(=O)OC2=CC=C(C=C2)C#N</chem>	1
	<chem>CCCC1=CC=C(C=C1)C(=O)OC2=CC=C(C=C2)C#N</chem>	1
	<chem>CCCC1=CC=C(C=C1)C(=O)OC2=CC=C(C=C2)C#N</chem>	1

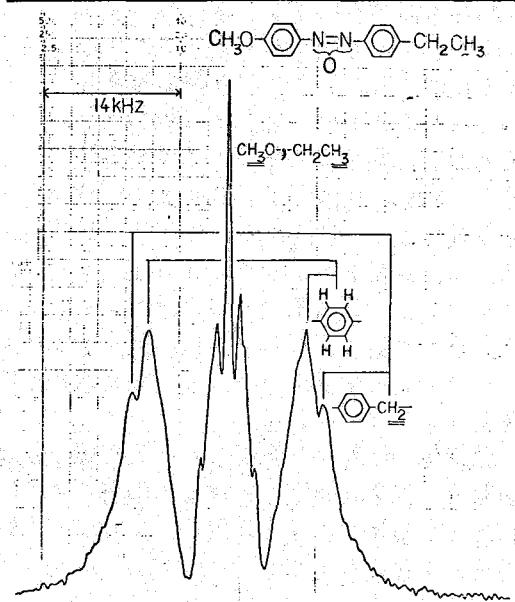


Fig. 2. NEAX-12の¹Hスペクトル at 35°C

平均個数を求めると、
両者は同個数である。
従って、環プロトン
のシグナル強度が特
に弱いわけではない
から、両Wingのシ
グナルを環プロトン
に帰属することがで
きる。

ところで、磁気異
方性物質と磁場との
間には式(2)で与えら
れるトルク M_h が生
ずる²⁾。一方、 M_h に
よって director が
回転すると、これを
止めようとする粘性により逆トルク M_i が生ずる²⁾。

$$M_h = \frac{1}{2} \Delta\chi H^2 \sin 2\alpha \quad \text{--- (2)} \quad M_i = \gamma_i \frac{d\alpha}{dt} \quad \text{--- (3)}$$

ここで、 $\Delta\chi$ は液晶の磁化率の異方性、 H は磁場の強さ、 γ_i はツイストの粘性係数、 t は時間である。式(2),(3)が釣り合えば director が磁場方向に復帰してゆくから、次式が得られる。

$$\tan \alpha = \exp(-\omega t), \quad \omega \equiv (\Delta\chi / \gamma_i) \cdot H^2 \quad \text{--- (4)}$$

従って、 $\tan \alpha$ の時間変化から $\Delta\chi / \gamma_i$ を求めることができる。Fig. 3 の夫々の ΔV を使って式(1)から求めた α と t の関係を Fig. 4 に示した。なお、 β の値は回転しないスペクトル ($\alpha = 0$) から求めた。Fig. 4 の直線は最小二乗して求めた。NP-5 の 160 ms 付近と、TN-101 の 500 ms 付近の測定値が直線からはずれるのは、マジックアングル ($\alpha = 54.7^\circ$) 付近で Wing signal のピーク位置の読取り精度が落ちるためである。最小二乗に当て、これらの値の weight は他の値の 1/2 とした。Fig. 4 の勾配から求めた $\Delta\chi / \gamma_i$ を Table 2 に示した。 $\Delta\chi$ (体積磁化率) が判れば γ_i を求めることができる。 $\Delta\chi$ がベンゼン環と二重結合の π 電子に起因することから考え、NP-5 や TN-101 に対しては PAA の $\Delta\chi$ をそのまま用いて、 γ_i の概算が可能であると考えられる。PAA の分子固有の $\Delta\chi_a = 2.42 \times 10^{-7} \text{ CGS emu g}^{-1}$ である⁴⁾。 $\Delta\chi$



Fig. 3. 90°回転後のスペクトル経時変化
上: TN-101, 下: NP-5, at 35°C

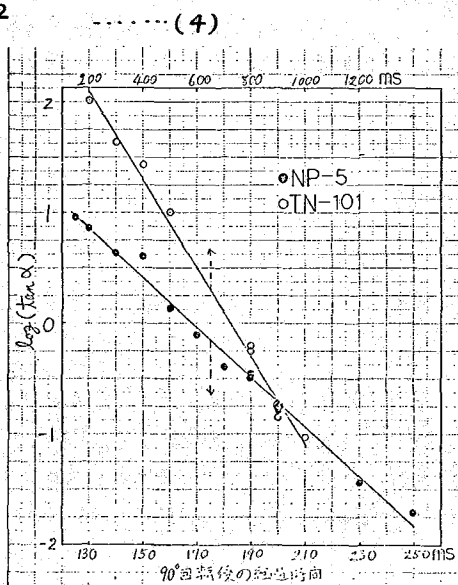


Fig. 4. 90°回転後の director の
角度変化.

と実測される ΔX_m (質量磁化率)との間には次の関係がある。

$$\Delta X_m = \Delta X_a S \quad \dots\dots (5)$$

Fig. 3 中の回転しないスペクトルから得られる S を用いて計算した ΔX_m を Table 2 に示しておいた。この ΔX_m と先に求めた $\Delta X/\gamma_i$ とから

γ_i/ρ (ρ : 密度) を求めることができ、その値も Table 2 に示した。一般に液晶の密度は、ほぼ 1 g/cm^3 であるから、通常粘度の単位として用いられるポアズ単位にしても、 γ_i の値は Table 2 の γ_i/ρ とさほど変らない。

次に、ネマティック液晶に光学活性物を混合した場合、スペクトルが如何に変化するのを測定してみた。なお、こうした混合系は一般に螺旋構造を呈するといわれている。NP-5 に *d*-carvone を 6 mole % の濃度にならように混合し、NP-5 のスペクトルと比較して Fig. 5 に示した。光学活性物の混合により明らかにスペクトルが変化している。B のスペクトルは、試料に回転をかけても何らの変化も呈さなかった。このことは、B の液晶状態が螺旋構造であることを示唆しているように思われる。光学活性物の種類や濃度、あるいは測定温度を変えることによるスペクトルの変化から、こうした混合系の液晶構造を知るための情報が得られるものと期待される。

以上述べたように、単に磁場方向に director を配向させた状態のスペクトルに止まらず、director を磁場方向からはずした状態のスペクトルを合せて測定することにより、これ迄に得られなかったような多くの興味ある情報が得られ、液晶の構造解明に対する有力な手掛が与えられることが判った。

	$\frac{\Delta X}{\gamma_i} \times 10^7$ ($\text{g}^{-1}\text{cm}^2\text{s}$)	$\Delta X_m \times 10^7$ (CGS emug^{-1})	$\frac{\gamma_i}{\rho} \times 10^2$ (cm^2s^{-1})
NP-5	2.58	1.79	69.4
TN-101	0.462	1.56	338

at 35°C

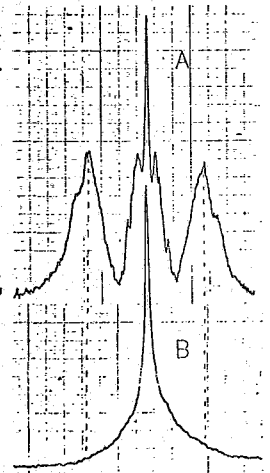


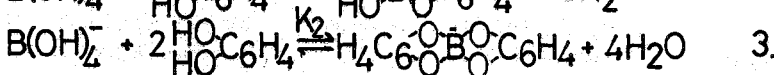
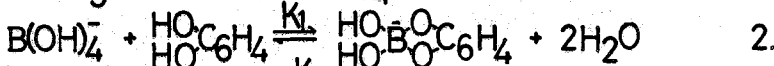
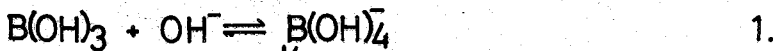
Fig. 5. 光学活性物添加によるスペクトル変化

- 1) R. E. Rondeau et. al., J. Am. Chem. Soc., 94, 1096 (1972)
- 2) H. Gasparoux et. al., J. Phys. (Paris), 32, 953 (1971)
- 3) A. A. Bothner-by et. al., Ann. Rev. Phys. Chem., 43 (1965)
- 4) F. Föex, Trans. Faraday Soc., 29, 958 (1933)

204 $^{11}\text{B-NMR}$ による、カテコール並びに *L-dopa* とボレートアニオンの水溶液中における相互作用の研究

(東工大原予炉) 吉野 和夫, 小高 正敬, 岡本 真実, 垣花 秀武

[序] 中性子捕捉療法試薬「*dopa borate*」が、水溶液中においては、*L-dopa* とホウ酸の 1:1 混合水溶液と同じ挙動を示すことは UV スペクトルの研究から明らかにされ、¹⁾ *L-dopa* とホウ酸の水溶液中における相互作用の詳細な研究が要請されている。演者らは $^{11}\text{B-NMR}$ を用いてこの系の研究を行ない、その一部は本年春の化学会の年会において報告した²⁾。今回はその詳細を報告する。一般にカテコールとホウ酸の相互作用は 1.~3. 式で表わされるように、イオン化しないカテコールの化学種と B(OH)_4^- の間の錯形成反応であり、1:1 錯体のみならず 2:1 錯体が形成すると考えられている。これらの反応を電位差



滴定法で証明することは、カテコールの酸の強さがホウ酸と同程度であることを考慮する必要があるので、容易ではない。(カテコールの pK は 9.3)。この方法を *L-dopa* と B(OH)_4^- の錯形成反応の研究に応用することは、*L-dopa* のアミノ基の酸としての強さをホウ酸と同じ位のため、カテコールの場合よりさらに解析が複雑となり、より困難である。一方、この系を UV スペクトルを用いて解析することは、1:1 錯体はカテコールとスペクトルの形が異なるため、2. 式に対しては行なえるが、2:1 錯体と 1:1 錯体の UV スペクトルは区別がつかないため、3. 式に対してはむずかしいと思われる。

$^{11}\text{B-NMR}$ はジオールと B(OH)_4^- の間の錯形成反応の研究に用いられて、2:1 のジオール錯体は 1:1 錯体と異なるケミカルシフトを持ち、しかもこれらの値は B(OH)_3 と B(OH)_4^- と異なることが明らかとなっている。³⁾ したがってカテコール誘導体と B(OH)_4^- との錯形成反応の研究には最も適した方法と思われる。

[実験] カテコール、*L-dopa* 両者共、特にアルカリ溶液においては酸化しやすいためサンプルの作成は N_2 雰囲気で行なった。試料は 8mm の管に密封し、 D_2O Lock で測定した。測定装置は日本電子製 FX100 で、FT 法により、31.96 MHz で $^{11}\text{B-NMR}$ スペクトルを測定した。積算回数はホウ素濃度が 0.5 M のサンプルは 100 回、0.25 M のサンプルは 400 回である。試料管はガラスに含まれるホウ素の影響を防ぐため石英製のものを用いたが、0.5 M のホウ素濃度溶液ではパイレックス製と石英製の差はほとんどない。しかし希薄ホウ素溶液を測定する時は無視できない。NaBF₄ を基準として ($\delta 0.0 \text{ p.p.m.}$) 用いた。測定温度は約 27°C。

よしのかずお こながまさひろ おむもとまこと かまはなひでたけ

[結果と考察] 1. ホウ砂のみの水溶液の¹¹B-NMRスペクトルに対するpHの影響。 図1に示すように pH 7, 9, 11におけるホウ砂のみの水溶液のスペクトルは1本のシグナルのみを与えている。(ホウ素濃度は0.5 M) pH 11のシグナルは $B(OH)_4^-$ によるものであり, pH 7の鋭いピークは $B(OH)_3$ に帰属されるが shoulder peakの存在から, ホリマーが生成していることがわかる²⁾。pH 9では $B(OH)_3$, $B(OH)_4^-$ 両者が存在するが一本のシグナルのみを与えることは, 反応1.が早い交換反応であることを示している。³⁾

2. pH 11におけるカテコールとホウ砂, L-dopaとホウ砂の水溶液の¹¹B-NMRスペクトル。 図2は pH 11におけるカテコールとホウ砂の水溶液で, ホウ素濃度を0.5 Mに保ち, カテコール量を変化させている。このスペクトルの変化から 9.0, 14.5各ppm. におけるシグナルは 1:1ならびに 2:1錯体によるものであることがわかる。図3は pH 11における L-dopaとホウ砂の水溶液で, ホウ素濃度を0.5 Mに保ち, L-dopa量を変化させている。カテコールの時と同じく 9.0 ppm. のシグナルはみられるが, 2:1のシグナルは分離されて観測できない。L-dopaの割合が増すと鋭い, 9.0 ppm. のシグナルの線幅が増している。1.0 M以上の L-dopa の濃度の水溶液は溶解させるのがむずかしい。

図1 Borax水溶液のpH変化に伴う¹¹B-NMRスペクトルの変化

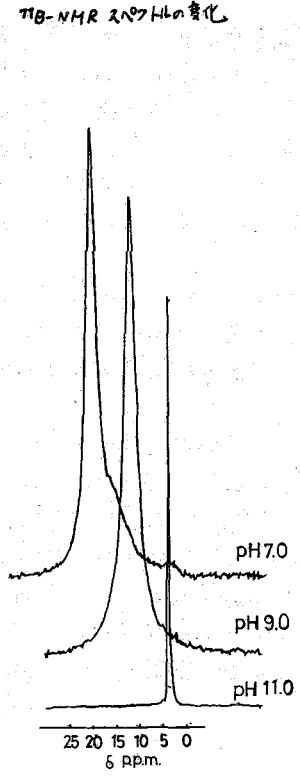


図2 pH 11における Catechol-borax水溶液の¹¹B-NMRスペクトル

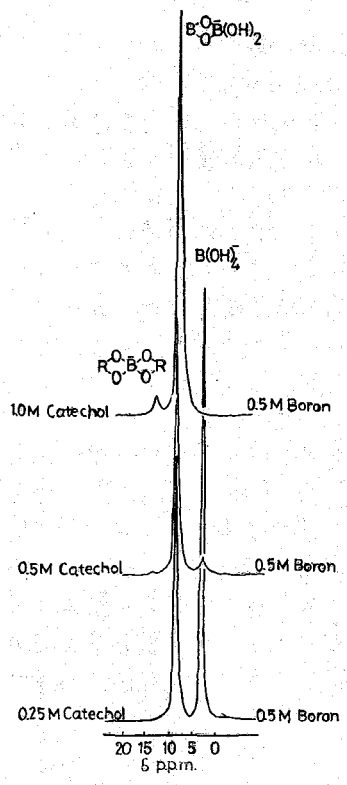
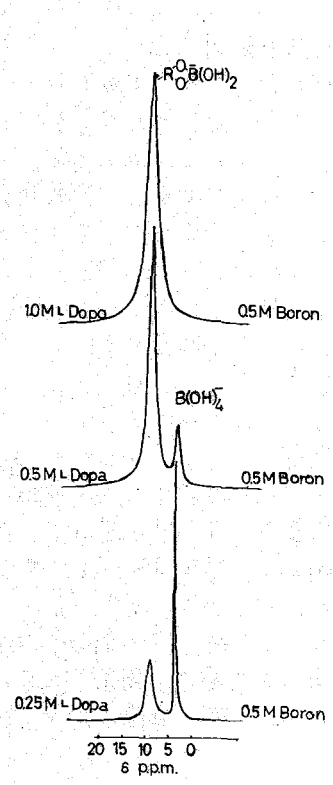


図3 pH 11における L-dopa-borax水溶液の¹¹B-NMRスペクトル



3. pHを変化させた時の、L-dopa : ホウ素が1 : 1である L-dopa とホウ砂の水溶液の¹¹B-NMRスペクトル。

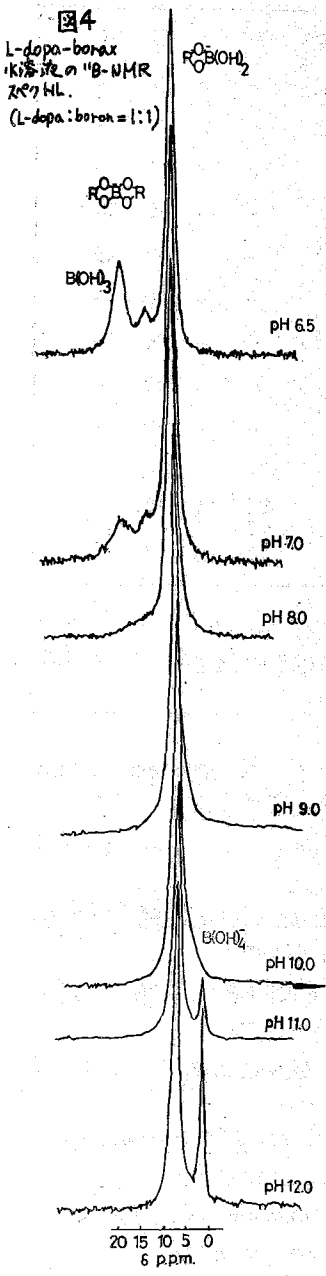
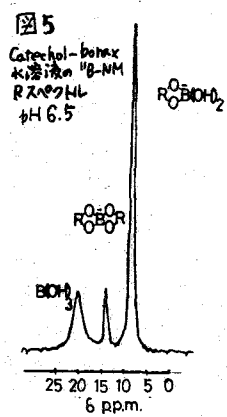


図4は L-dopa とホウ素濃度が 0.5 M の水溶液の pH を変化させた時の ¹¹B-NMR スペクトルを示す。pH が 9 以上では、B(OH)₄⁻ と 1 : 1 錯体のピークだけ見られるが、pH をさらに下げるに伴い、さらに 2 つのシグナルが現われる。pH 7 において観測される 14.4 ppm のものは 2 : 1 の L-dopa-boron 錯体のものであり、これは pH 11 で L-dopa の濃度を変化させた時には見られなかったものである。29.7 ppm のシグナルは遊離のホウ素の化学種 (大部分は B(OH)₃) によるものである。これは図 1 より明らかである。これら 2 つのシグナルは pH 6.5 にすると明確に現われる。(この溶液は L-dopa とホウ素濃度はどちらも 0.25 M である。)

図5にカテコール : ホウ素が 1 : 1 であるカテコールとホウ砂の水溶液の ¹¹B-NMR スペクトルを示す。ホウ素濃度は 0.25 M である。図より明らかに 3 つのシグナルが分離されている。



カテコールと L-dopa を含むホウ砂水溶液の ¹¹B-NMR スペクトルのデータを表 1 にまとめた。4 つのケミカルシフト値 δ₂ ~ δ₄ は、それぞれ B(OH)₄⁻, 1 : 1 錯体, 2 : 1 錯体, B(OH)₃ に帰属される。

4. 1 : 1, 2 : 1 錯形成定数の算出。

錯形成定数を決定するには、遊離のカテコールや L-dopa の化学種の中の、水酸基のイオン化している化学種の量 (L-dopa の場合は 2 種が錯形成すると思われる。図 6) を決定する必要がある。これらの量をアルカリ領域で決定するには、カテコールや L-dopa の解離定数が必要となる。(しかし L-dopa の場合は複雑な解離定数のすべては現在もとめられていない。それに反して pH 6.5 では、遊離のカテコール、L-dopa は、水酸基の解離していない化学種のみで見られる。また pH 6.5 の ¹¹B-NMR スペ

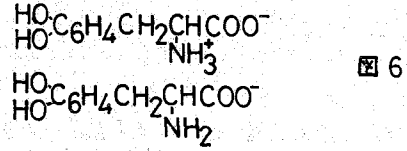


図 6

表1 ¹¹B-NMR Spectroscopic Data

Diol	Diol-Boron Ratio	pH	δ_4	δ_3	δ_2	δ_1	A ₄	A ₃	A ₂	A ₁
Catechol	0.5:1	11	-	-	8.9(27)	3.5(17)	-	-	51	49
	1:1	11	-	-	9.0(26)	3.4(45)	-	-	91	9
	2:1	11	-	14.5	8.9(28)	-	-	9	91	-
	1:1*	6.5	20.6(73)	14.4(20)	9.0(23)	-	30	11	59	-
L-dopa	0.5:1	11	-	-	9.0(50)	3.3(12)	-	-	50	50
	1:1	11	-	-	9.0(57)	3.3(43)	-	-	87	13
	2:1	11	-	-	9.0(73)	-	-	-	100	-
	1:1	12	-	-	9.0(55)	3.3(43)	-	-	76	24
	1:1	10	-	-	9.0(62)	-	-	-	100	-
	1:1	9	-	-	9.2(64)	-	-	-	100	-
	1:1	8	-	13.6(sh)	9.1(63)	-	-	-	100	-
	1:1	7	19.7	14.4	9.1(67)	-	14	*8	*8	-
1:1*	6.5	20.4(103)	14.7	9.1(56)	-	27	10	63	-	

総ホウ素濃度は0.5M>(*は0.25M) δ_n はNaBF₄からのケミカルシフト(p.p.m.) ()内は半値中でHz単位。(測定で得られた場合のみ記した。) A_nは各シグナルの相対面積(%). **の場合は重なり、各シグナルを分離して決めた。

クトルは 1:1 錯体, 2:1 錯体, B(OH)₃ の濃度を与える。従って、ホウ酸のpK値(9.00)を用いることにより、錯形成反応2.3.における、すべての化学種の濃度を決定できる。表2には計算して得られた結果を他の方法と比較しているが、L-dopaについてのK₂は他の方法では得られていない。

表2

Diol	Method	T°C	logK ₁	logK ₂	Remarks
Catechol	pH-Change ⁵⁾	25	3.972	4.263	
	UV ⁶⁾		4.3	-	pH 7.8
	¹¹ B-NMR	27	4.1	4.7	pH 6.5
L-dopa	pH-Change		-	-	
	UV ⁶⁾		4.2	-	pH 7.8
	¹¹ B-NMR	27	4.3	5.0	pH 6.5

2) 吉野・堀本・小高, 日化第16春季年会議講演稿集II P1224(1977)

2) 吉野・小高・堀本・堀花, 日化第17春季年会議講演稿集II P1119(1978)

3) W. G. Henderson et al., *Carbohydr. Res.*, **22**, 1(1973)

4) H. D. Smith and R. J. Niersema, *Inorg. Chem.*, **11**, 1152(1972).

5) P. J. Antikainen and I. P. Pitkanen,

Suomen Kem., **41**, 65(1968) 6) K. T. Yasunobu and E. R. Norris, *J. Biol. Chem.*, **227**, 473(1957)

205 Potassium trans-2-pentenoate および potassium trans-2-hexenoate 重水
溶液の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルとこれら分子のコンホメーション
(日本電子・名工大) ○松下和弘 岡林博文

一、緒言

飽和炭化水素鎖をもつ界面活性分子については、ミセル化に伴い *all-trans* 型分子が多くなること、ラマンスペクトルにより確認されている(1)。このコンホメーション変化は、これら分子の $^{13}\text{C-NMR}$ のケミカルシフトおよびスピン-格子緩和時間にも影響することが最近報告されている(2,3)。Persson等(2)は、*n*-ニルアンモニウムブロマイド水溶液の $^{13}\text{C-NMR}$ のケミカルシフトがミセル化に伴い低磁場シフトすることを観測し、この現象を炭素鎖のコンホメーション変化に基づくものと考えた。Henriksson等(3)は sodium *n*-hexanoate 水溶液の ^{13}C -スピン格子緩和時間が、ミセル化に伴って小さくなることを観測し、これがミセル化によって C-C 結合のまわりの内部回転が束縛されるためであると考えた。最近岡林等(4)はトランス-2-ヘキセン酸の K 塩 (PT2H) の水溶液のラマンスペクトルを測定し、この分子の二重結合の隣りの一重結合 ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) のまわりのコンホメーションがミセル化に伴って変化することを見出した。

今回は PT2H のこのコンホメーション変化が、この分子の $^{13}\text{C-NMR}$ ケミカルシフトおよびスピン格子緩和時間 T_1 におよぼす影響について報告する。

二、試料および実験方法

一試料一 トランス-2-ヘキセン酸 (T2HA) およびその K 塩 (PT2H)、トランス-2-ペンテン酸の K 塩 (PT2P) を用いた。これらの試料は、Merck 社製の 99% 以上の酸をアルコール性 KOH で K 塩とし、メタノールで再結晶した。PT2H および PT2P は 99% 重水に溶解し、ミリポアフィルターでろ過し、球形又は卵型試料管に入れ、この試料管をさらにロック用 D_2O を入れた 10mm ϕ 試料管に入れて用いた。

一 $^{13}\text{C-NMR}$ 測定一 T_1 値の測定は JEOL-FX-60 を用いて、Inversion Recovery Fourier Transform 法 ($\pi-\tau-\pi/2$ パルス系列) で求めた (測定温度: 室温)。Pulse Repetition は、80.0 ~ 300.0 sec の範囲で、試料濃度に応じて、 $P.R. \geq 5T_1$ を満たすよう充分長く設定した。Window 処理条件は濃度に応じて変化させた。スペクトルのデータポイント数は 8192 である。測定した T_1 値の誤差は $\pm 5\%$ と推定される。

^{13}C ケミカルシフトの測定は JEOL-FX-100 を用い、室温で行なった。観測周波数幅は、5000 Hz、測定データポイントは 16384 で行なった。

三、結果— T_1 値の濃度依存性—

PT2H 重水溶液の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルを図 1 に示した。帰属は構造類似化合物のケミカルシフトデータをもとにして行なった。PT2H の各炭素のスピン-格子緩和速度を濃度の逆数に対してプロットすると図 2 の如くなる。すべての炭素について、1.9 ~ 2.0M の濃度で、緩和速度の顕著な増加がみられる。この濃度は臨界ミセル濃度 (CMC) に対応している。図 2 から、CMC 以上では、緩和速度は濃度の逆数と共に直線的に変化する。

CMC以上でモノマー濃度が一定で、かつCMCに等しいと仮定すると、CMC以上の任意の濃度で、次式が成立する。

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{obs} = \frac{CMC}{C_t} \left(\frac{1}{T_1}\right)_{monomer} + \frac{C_t - CMC}{C_t} \left(\frac{1}{T_1}\right)_{micelle} \quad \dots (1)$$

ここで、 C_t は界面活性分子の全濃度、 $(1/T_1)_{micelle}$ 及び $(1/T_1)_{monomer}$ は一定とする。

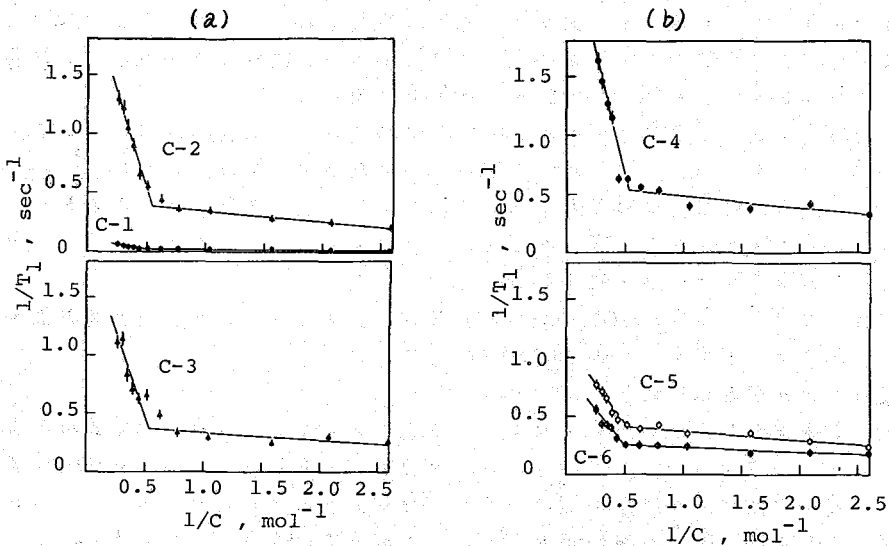
本実験で得られた緩和速度の濃度依存性は(1)式に従う。

モノマー状態の界面活性分子の回転運動がミセルを構成する分子のそれよりも速いので、

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{monomer} < \left(\frac{1}{T_1}\right)_{micelle} \quad \dots (2)$$

故に、(2)式と(1)式から、 $T_{1,obs} > T_{1,micelle}$ が成立するので、実測の T_1 値は、 $T_{1,micelle}$ の上限であるといえる。100%ミセル状態にある界面活性分子の $T_{1,micelle}$ 値は図2で濃度 C を無限大に外挿して得られる。Table Iには、PT2H-ミセル系、PT2H-モノマー系、PT2H- CD_3OD 系およびTZHA-dioxane系の $N T_1$ を示した。図2からみると、十分にCMC以下の希薄溶液では、各炭素の緩和速度はあまり異ならなくて一定値に収斂する傾向をもつ。この事実、この濃度範囲における緩和速度が主にトランス-2-ヘキセノエイトイオンの全体運動で決まっていることを示す。次第に濃度がCMCに近づくにつれて、各炭素の緩和速度はますます異なる

図2 PT2Hの $^{13}C-T_1$ の濃度依存性



まつしたかずひろ・おかばやしひろふみ

図1. PT2H- D_2O 溶液の ^{13}C -NMRスペクトルとスピン-格子緩和時間の測定

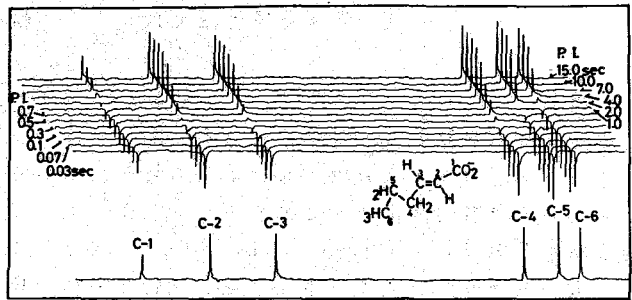


Table 1. ^{13}C spin-lattice relaxation times, NT_1 (sec), of PT2H and T2HA.

		C-1*	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
PT2H-D ₂ O	Micelles	10.0	0.50	0.46	0.73	1.77	3.53
	Monomers	71.3	5.6	4.0	6.4	8.6	16.8
PT2H-CD ₃ OD		41.1	2.5	2.6	4.4	5.6	13.2
T2HA-Dioxane		11.9	1.7	2.5	2.0	3.4	5.4

C-1*: T_1 values

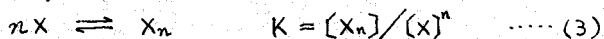
てくる。この事は、全体運動よりも分子内の運動が緩和速度に寄与するようになることを示す。つまり、ミセル化により炭素鎖のセグメントの運動がおさえられてくると考えられる。ミセル濃度の増加と共にこの傾向はますます大きくなるといえる。PT2H-CD₃OD系の ^{13}C 緩和時間はPT2H-D₂Oモノマーのそれとあまり異ならない。これはメタノール中で、PT2Hがモノマー状であることを示す。一方、T2HAの ^{13}C 緩和速度はPT2Hモノマーのそれより少し小さい。これは恐らく、この酸が水素結合による二量体で存在するためであると考えられる。

ミセル化による炭素鎖のセグメントの運動が束縛されるという事は炭素鎖のコンホメーション変化に関連している。岡林等(4)は、PT2H水溶液のラマンスペクトルをいろいろの濃度で測定し、トランス-2-ヘキセノイトイオンが濃度と共にコンホメーション変化を起こすことを示した。 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ 構造では、二重結合の隣りの一重結合のまわりに、*cis* と *skew* の2つのコンホメーションが考えられる。したがって、PT2Hの場合、*trans-cis*, *gauche-cis*, *trans-skew*, *gauche-skew*, *gauche'-skew* の5つの回転異性体が考えられる。PT2H水溶液のラマンスペクトルの解析結果から、*cis* 型の回転異性体は殆んど存在せず、*skew* 型の回転異性体にかたよっていることがわかった。又濃度の増加に伴い、*skew* 型の3つの回転異性体のうち *trans-skew* 型の割合が次第に多くなることがわかっていく。

従って、Table I および図2が示す NT_1 値の変化は、このようなコンホメーション変化の寄与が大きくなったためであると考えられる。ミセル状態におけるC-4とC-5の NT_1 値を比較すると、C-4の方がC-5の NT_1 値より小さくなっている。この事実は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ のまわりの回転異性体が *trans-skew* 型に偏在するようになるためと考えられる。

一ケミカルシフトの濃度依存性—

図1はPT2H-D₂O溶液の ^{13}C -ケミカルシフト(TMS外部基準)の濃度依存性を示す。ミセル溶液では次の平衡が成立する。



全濃度を C_t , 100% ミセル状態における ^{13}C -ケミカルシフトを δ_m (モノマーのそれを *Ref.* とする), 任意の濃度におけるケミカルシフトを δ_{obsd} とすると、モノマー濃度 $[X]$, ミセル濃度 $[X_n]$ は次の式で表わされる。

$$[X] = C_t (\delta_m - \delta_{\text{obsd}}) / \delta_m, \quad n[X_n] = C_t \delta_{\text{obsd}} / \delta_m \quad \dots (4)$$

$$\ln(C_t \delta_{\text{obsd}}) = n \ln(C_t (\delta_m - \delta_{\text{obsd}})) + \ln K + \ln n - (n-1) \ln \delta_m \quad \dots (5)$$

Table 2. ^{13}C Chemical shifts (ppm) for PT2H-D₂O solution (Ex. Rf. :TMS).

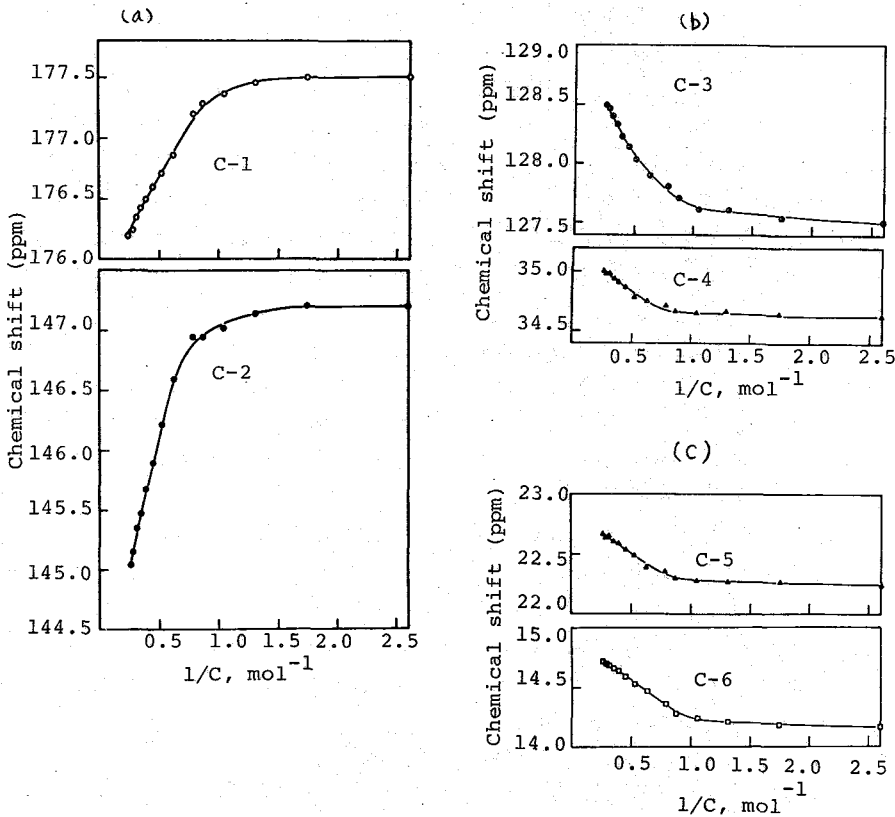
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Micelles	175.80	143.95	128.92	35.12	22.85	14.92
Monomers	177.51	147.21	127.49	34.62	22.24	14.16
δ_m	-1.71	-3.26	1.43	0.50	0.61	0.76

$\ln C_t \delta_{\text{obsd}}$ と $\ln \{C_t(\delta_m - \delta_{\text{obsd}})\}$ をプロットすれば、その直線の勾配から会合数 n が求まる。C-3 と C-4 とのケミカルシフトデータを使って n を求めると、C-3 で $n=5$ 、C-4 で $n=7$ を得た。

C-1 と C-2 のピークはミセル化により高磁場シフトをし、C-3 ~ C-6 のピークは低磁場シフトをする (Table 2)。このようなケミカルシフト変化とコンホメーション変化との関連は今後の問題である。

(文献) (1) H. OKABAYASHI *et. al.* Bull. Chem. Soc. Japan, 1975, 48, 2264, (2) B. Persson, J. Phys. Chem. 1976, 80, 2124, (3) U. Henriksson *et. al.* Colloid & Polym. Sci., 1976, 254, 35, (4) H. OKABAYASHI *et. al.* to be published.

図3 PT2H-D₂O 溶液の ^{13}C -ケミカルシフトの濃度依存性



まつしたかずひろ・おかばやしひろふみ

(北見工大) O三浦宏一, 福井洋え, 千田秀嗣

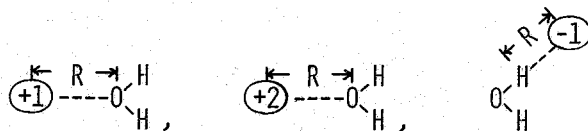
〈序〉 化学シフトはNMRから得られる情報の中では、簡単にしかも正確に求める事ができる量である。我々は、水が単独に存在した時とカチオンに配位した時のプロトン化学シフトの差から、カチオンと水の酸素までの距離を求める事を目的として実験を行った。水を直接溶媒として用いると、水の水素結合状態の変化とアニオンに依る化学シフトの影響が生ずるため、比較的塩基性の強い溶媒であるアセトン中に0.1M濃度の水を加えたものを溶媒として用いた。こうする事により水のプロトン側にはアセトンが配位してアニオンと水の結合を妨害すると考えられ、しかも水の濃度が極めて薄いため水分子同士の水素結合は除かれると考えた。即ちこのような系における水の化学シフトの変化はカチオンと水の結合のみによると考えられる。また水とある距離に点電荷を置いたモデルを用いて、プロトン化学シフトの計算を行い、実験より求められた化学シフトとの比較研究を行ったので報告する。

〈実験〉 実験は水の濃度を0.1Mに調整したアセトン中に金属塩の濃度を変えて溶解させたサンプルをつくり、各Rについて水のプロトンシフトを測定した。

プロトンNMRスペクトルは、日立R-20A型核磁気共鳴装置(60 MHz)を用い、TMSを内部標準として34°Cで測定した。

水とイオンが1:1錯体を形成するとして、最小二乗法により実験データの解析を行い、錯体形成シフト($\Delta\sigma = \sigma_b - \sigma_f$)と平衡定数Kを求めた。ここで σ_b, σ_f は各R、イオンが配位した時と配位していない時のプロトンシフトである。本報告では平衡定数に関する議論は行わない。

〈計算〉 次の様な点電荷モデルを考え、距離(R)を変えて σ の計算²⁾を行った。



核Nの shielding constant σ_N は

$$\sigma_N = \sigma_N^d + \sigma_N^e$$

である。

原子単位では

$$\sigma_N^d = 17.750 \times 10^{-6} \sum_{\mu} P_{\mu} \left\langle \mu \left| \frac{\vec{r}_0 \cdot \vec{r}_N}{r_N^3} \right| \nu \right\rangle$$

みうら こういち, ふくい ひろゆき, ちだ しゅうじ

$$\sigma_N^a = 35.501 \times 10^{-6} \sum_{\substack{j, \text{occ} \\ i, \text{unocc}}} (\epsilon_j - \epsilon_i - J_{ij} + 2 K_{ij})^{-1} \\ \times \sum_{\mu\nu\lambda\sigma} C_{\mu i} C_{\nu j} C_{\lambda k} C_{\sigma l} \langle \mu | \vec{r}_N^3 | \nu \rangle \langle \lambda | l_{\alpha} | \sigma \rangle \\ \vec{l}_N = \vec{r}_N \times \vec{\nabla}, \quad \vec{l}_0 = \vec{r}_0 \times \vec{\nabla}$$

となる。但し \vec{r}_0 はゲージ中心からの位置ベクトル、 \vec{r}_N は核 N からのそれを表す。尚ゲージ中心は酸素原子とした。

上記の積分は

$$\langle \mu | \frac{\vec{r}_N}{r_N^3} | \nu \rangle = \frac{\partial}{\partial X_N} \langle \mu | \frac{1}{r_N} | \nu \rangle$$

の関係を用いて計算した。但し (X_N, Y_N, Z_N) は核 N の座標である。

本計算は Sum-Over-States 法を用いた *ab initio* 法で行った。計算に用いた基底関数は 4-31G³¹ である。

本計算は北海道大学大型計算機センターの FACOM 230-75 に依り行った。

<結果および考察>

A. アセトン中ではアセトンと水が水素結合をつくり、アニオンと水のプロトンは錯体をつくりにくい事を前述した。この事を確認するためテトラブチルアンモニウム塩を用いて行った我々の実験結果と、Martin 等³² が四塩化炭素を溶媒としてテトラブチルアンモニウム塩による、クロロホルムのプロトンの Δc を求めた結果を Table I に示す。また (-1) の点電荷モデルを用いて行った計算結果を Fig. 1 に示す。Table I からわかる様にアセトン中での水の $|\Delta c|$ は、Martin 等の四塩化炭素中のクロロホルムの $|\Delta c|$ に比較して極めて小さい。また Cl^- に水が配位した時の Cl^- と H の距離は約 2.2 \AA ³³ である事が X 線により知られており、この距離から Fig. 1 により Δc を求めると -3.3 ppm となり Martin 等の Δc とほぼ一致する。アセトン中での水の $|\Delta c|$ はこれよりもはるかに小さい事がわかる。よってアセトン中ではアニオンは水に配位しない。

Table I. Polarization Shifts, Δc (ppm), by Tetra-n-butylammonium Halides.

Salt	Δc (ppm)	Δc (ppm) ^a
$(n-C_4H_9)_4NCl$	-0.75	-2.92
$(n-C_4H_9)_4NBr$	-0.48	-2.51
$(n-C_4H_9)_4NI$	-0.06	-2.30 ^b

a Ref. (4).

b Used salt was tetra-n-heptylammonium iodide.

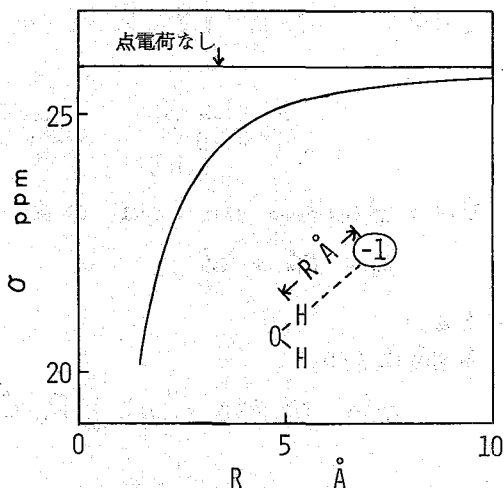


Fig. 1. Hydroxyl proton shielding curve calculated by using point charge model.

B. A. の結果を更に確認するためカチオンの種類を一定とし、アニオン種類のみを変えた金属塩を用いて Δ_C の測定を行った。この結果を Table II に示す。この結果からアニオンの種類を変えた事による Δ_C の変化は非常に小さい事がわかる。故にアセトン中では、水のプロトンはアセトン分子と水素結合をつくる事によってブロックされ、カチオンのみが水分子に配位すると思われる。

C. カチオンと酸素の距離を求めるために、カチオンとしてアルカリ及びアルカリ土類金属イオンを用いた実験結果を Table III に示す。また (+1) 価、(+2) 価の点電荷モデルを用いて計算した結果を Fig. 2 に示す。本研究の主目的は金属イオンに配位した時の水の化学シフトから、金属イオンと水の距離を求める事ができるか否かを検討する事にある。Table III をみると 1 価、2 価の金属イオンとも金属イオンのイオン半径が大きくなるにつれて明らかに $|\Delta_C|$ は小さくなっており、Fig. 2 における点電荷モデルの計算結果とよく一致している。次に個々のイオンについて Table III の Δ_C を Fig. 2 にあてはめて求めたイオンと酸素間の距離 R を文献値と比較してみる。まず(+1) 価のイオンである Li^+ についてみると、 $\Delta_C = -1.84$ ppm における距離 R は 2.2 \AA となり、X線による実験値 $1.95 \sim 2.25 \text{ \AA}$ とよく一致している。また R の量子化学的計算値は 1.85 \AA である。 Na^+ では求めた R は 3.2 \AA 、文献値(量子化学的計算値)は 2.20 \AA である。(+2) 価のイオンについて比べてみると Mg^{2+} 、 Ca^{2+} について求めた R は各々 2.3 \AA 、 2.8 \AA であり、文献値は各々 1.95 \AA 、 2.40 \AA である。カチオンと酸素間の距離の実験値が Li^+ についてしか得られていないので、我々の方法を正確に評価する事はできないが、 R の量子化学的計算値がX線からの実験値よりも約20%小さい事を考慮すると我々の方法はかなり良い結果を与えているものと思われる。

Table II. Anion Dependence of Δ_C for Lithium and Calcium Salts in Acetone.

Cation	Anion	Δ_C (ppm)
Li^+	ClO_4^-	-1.84
Li^+	NO_3^-	-1.92
Li^+	Br^-	-1.86
Li^+	I^-	-1.88
Ca^{2+}	ClO_4^-	-2.33
Ca^{2+}	NO_3^-	-2.22

Table III. Δ_C by Alkali and Alkaline Earth Perchlorates in Acetone.

Salt	Δ_C (ppm)
$LiClO_4$	-1.84
$NaClO_4$	-0.90
$Mg(ClO_4)_2$	-3.36
$Ca(ClO_4)_2$	-2.33
$Sr(ClO_4)_2$	-1.67
$Ba(ClO_4)_2$	-1.46

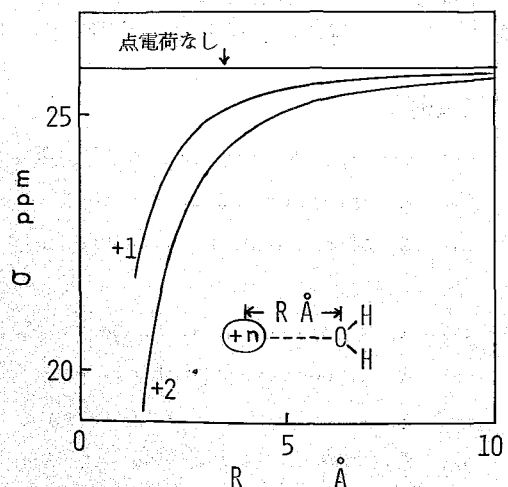


Fig. 2. Hydroxyl proton shielding curve calculated by using point charge model.

D. アルカリ及びアルカリ土類以外の金属イオンである Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Sb^{3+} を用いて行った実験結果を Table IV に示す。この結果をみると $|\Delta c|$ は同程度のイオン半径を持つ、アルカリ及びアルカリ土類金属イオンの $|\Delta c|$ より大きいがこの理由についてはよくわからない。また Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} についてはアニオンの種類を変えて実験を行ってみたが、 Zn^{2+} , Cd^{2+} は Li^+ , Ca^{2+} と同様 Δc のアニオン依存性を示さなかった。しかし Hg^{2+} についてはアニオンの種類によつて Δc の値が非常に大きく変化している事がわかる。この Hg^{2+} のアニオン依存性の原因については今のところ不明である。 Zn^{2+} については X 線により R の値が 2.08 \AA と測定されている。一方 $\Delta c = -4.42 \text{ ppm}$ を Fig. 2 にあてはめて R を求めてみると 1.9 \AA となり、X 線からの結果とよく一致する。

Table IV. Δc by Some Cations Other Than the Alkali and Alkaline Earth Metal Ions in Acetone.

Cation	Salt	Δc (ppm)
Zn^{2+}	$ZnCl_2$	-4.42
Zn^{2+}	$ZnBr_2$	-4.75
Zn^{2+}	$Zn(SCN)_2$	-5.23
Cd^{2+}	CdI_2	-3.43
Cd^{2+}	$Cd(NO_3)_2$	-3.78
Hg^{2+}	$HgCl_2$	-6.42
Hg^{2+}	$HgBr_2$	-2.84
Hg^{2+}	$Hg(NO_3)_2$	-9.54
Sn^{2+}	$SnCl_2$	-5.27
Sb^{3+}	$SbCl_3$	-5.49

<結論> アセトンを溶媒として金属塩による水の化学シフトを求めた場合、得られた化学シフトは金属イオンのみの影響を受けている事がわかった。またこの時得られた $\Delta c = \sigma_c - \sigma_f$ から金属イオンと水までの距離を求める事が可能である事がわかった。

<謝辞> 本研究において、化学シフトを計算するための 2 電子積分のプログラムを提供していただいた、北海道大学理学部、佐々木助教に深く感謝いたします。

<文献>

- (1) 藤原 鎮男, 中川 直哉, 清水 博, 「高分解能核磁気共鳴」, 丸善, p.99, 1962.
- (2) M. Barfield and D. M. Grant, J. Chem. Phys., 67, 3322 (1977).
- (3) R. Ditchfield, W. J. Hehre, and J. A. Pople, J. Chem. Phys., 54, 724 (1971).
- (4) R. D. Green and J. S. Martin, J. Amer. Chem. Soc., 90, 3659 (1968).
- (5) A. H. Narten, F. Vaslow, and H. A. Levy, J. Chem. Phys., 58, 5017 (1973).
- (6) P. A. Kollman and I. D. Kuntz, J. Amer. Chem. Soc., 94, 9236 (1972).
- (7) 前田 益伸 日本化学会第 32 回春季年会プログラム, p.76, 1975.

207 ゲル中の水の状態分析; T_1 , 稜中, 不凍水量の温度履歴とその解釈

(静岡薬大) 〇片山 誠二, (東大, 理) 藤原 鎮男

(序) 水溶性高分子ゲル (PVA*, PAA**, PEG*** etc.) 中に含まれる水の状態は, タンパク質溶液やアガー, ゼラチンゲル中に含まれる水と同様に, 自由水 (free water) と水和水 (associated water) の存在がよく知られている。この水和水を研究する有力な手段の一つとして不凍水があげられる。¹⁾ 自由水は, 0°C で氷結するのに対し, 水和水は氷結せず, 氷点よりはるかに低い温度に冷却した時, ブロードな不凍成分の水が検出される。即ち, 冷却により水和水成分が不凍水成分に変化したと考えられている。この不凍水の量は, 著しく温度依存性を示すため, 不凍水即水和水とするのは早計ではあるが, すくなくともその origin は同じだと考えられる。従って不凍水をもって水和水を研究するためには不凍水そのものの性質, 状態を知り, 両者の間の関連性を把握しておく必要がある。讀者らは, 既にゲル中の水の T_1 及び不凍水量が著しくゲルの性質 (重合度・架橋度) を反映することを示し, ゲルのもつ空間の効果について言及して来たが,²⁾ 今回 30% ポリアクリルアミド (PAA) ゲルを用いて, 不凍水の T_1 , 稜中, 不凍水量の温度依存性について調べた。その結果, いずれも特異な温度履歴 (temperature hysteresis) loop が見いだされた。そして, その結果は又, 低温域におけるゲル中の水には, 四つの相状態 (後述) が存在することを示唆した。

(実験) 30% PAA ゲルは, アクリルアミド水溶液を, 微量の過硫酸アンモニウムを添加し, 光重合にて調製した。低温破壊を防ぐため, ポリエチレン tube (≒ 3.5 mm o.d.) 内で調製したサンプルを, 5 mm o.d. の NMR 試料管に入れ, NMR 測定に供した。NMR 測定は JNM FX 100 スペクトルメーターを用い, 温度制御は, NM 547 / 温度可変装置を用いた。水の T_1 測定は, パルス法により, 180- τ -90 パルス系列による Inversion Recovery を観測し行なったが, ブロードな不凍水の T_1 は, 磁化 $M = 0$ までの時間 T_{null} ($T_{null} = T_1 / 1.44$) を用いて算出した。不凍水量は, 共鳴線の面積の重量から算出した。この際, LiCl₂, Mn²⁺ を含む 90% D₂O 水溶液を, 不凍水量算出の標準にした。温度依存性の測定方法は, 温度上昇-温度下降の cyclic な手順で行なった。

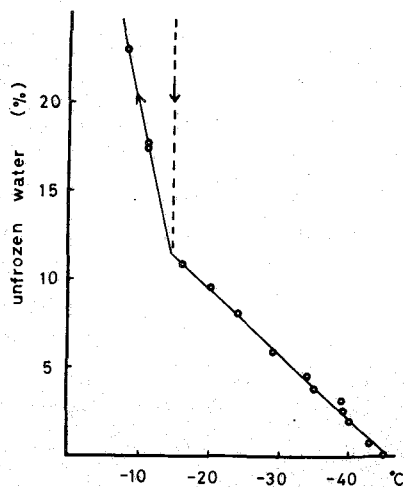


図1 30% PAA ゲル中の不凍水量の温度依存性。矢印は温度変化の方向を示す。

* ポリビニールアルコール

** ポリアクリルアミド

*** ポリエチレングリコール

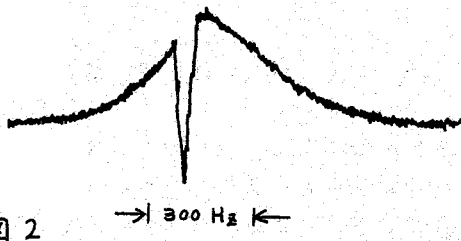


図2

なお各温度での測定は、10分程度で平衡に達したサンプルをさらに30分程放置した後行なった。

(結果及び考察) ① 30% PAAゲル中の不凍水量の温度依存性を調べたのが図1である。あらかじめ液体窒素温度に急冷し水結させたサンプルを、プローブ内で徐々に昇温していくと $\approx -46^{\circ}\text{C}$ に至りブロードな不凍水(半値中 $\approx 2000\text{ Hz}$)が現われ始める。さらに昇温すると、線形は徐々に尖鋭化するとともに不凍水量はlinearに増加する。この増加は $\approx -14^{\circ}\text{C}$ 付近を境として、以後一層激しくなった。この -14°C 以上での不凍水量の急増加の現象は、不凍水量そのものが増加したのではなく、溶解した自由水と不凍水とが早い交換のためブロードな一本の共鳴線をあたえるために、みかけ上、不凍水量があたかも増加したかのように現われたと解することができる。この時、溶解した自由水の中で交換にあずからない自由水の存在が、磁化ゼロ($M=0$)付近のスペクトルによって確かめられる。図2に示されるように、交換していない自由水成分のシャープな共鳴線と、上記のみかけ上のブロードな不凍水成分とが分離よく観測される。このことは $-14^{\circ}\text{C} \sim 0^{\circ}\text{C}$ の温度範囲においてのみ観測できる特有の現象であった。又、このことは後に述べる状態B)の証明の一つともなっている。逆に室温から除冷していくと、不凍水成分のブロードな共鳴線は、 -14°C まで現われないうちに -14°C 付近に至り突然現われる。この不凍水量は、さらに除冷するに従って、昇温過程と同じ経路を通してlinearに減少し、 -46°C に至り消失してしまう。このように不凍水量の温度変化は、特異な temperature hysteresis を示すことがわかる。

② 図3は、ゲル中の不凍水の T_1 の温度依存性を調べたものである。室温より除冷していくと、ゲル中の水の T_1 はlinearに減少していく。 $\approx -14^{\circ}\text{C}$ に至り、その値は急激に $\approx 30\text{ msec}$ に降下する。この変化は、自由水は水へ、水和水は不凍水への相変化の現象と対応している。 -14°C からさらに除冷していても、 T_1 の値にはほとんど変化がみられなかった。そして -46°C に至り測定不可能となった。逆に、低温域から昇温していくと、不凍水の T_1 の値は、 -46°C から -14°C の温度範囲においては、除冷時と同じ経路を通り変化するが、 -14°C 以上の温度範囲においては、除冷時の経路とは異

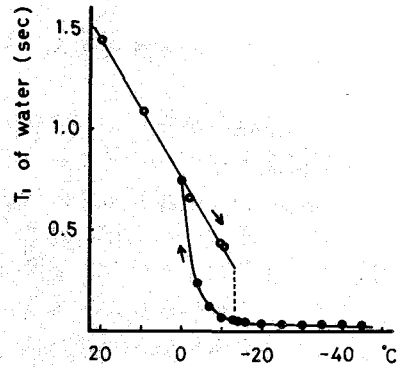


図3 30% PAAゲル中の水の T_1 の温度依存性。矢印は温度変化の方向を示す。

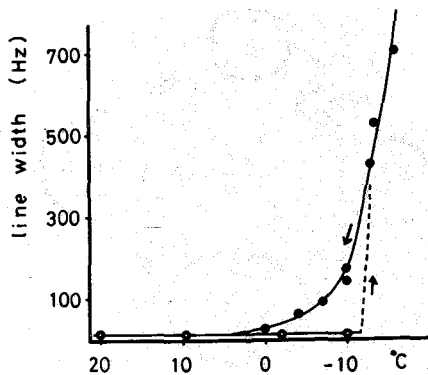


図4 30% PAAゲル中の水の線中の温度依存性(25°C ~ -20°C)。矢印は温度変化の方向を示す。

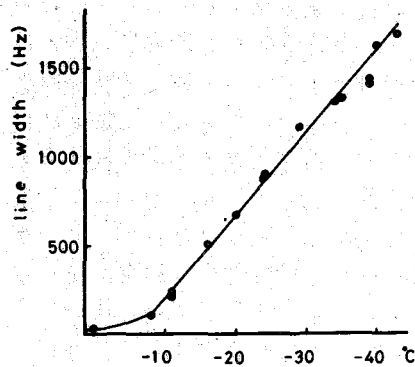


図5 30% PAAゲル中の水の線中の温度依存性(0°C ~ -50°C)。

なり、低温側から連続的にかつ緩慢に増加する。0°Cに至りて、除冷時の経路の値に到達し、その後その除冷時の経路に沿って増加する。このようにT₁においても hysteresis loop がみられた。

③ ゲル中の水の線中の温度依存性を示したのが図4、5である。室温からの除冷に対し、-14°Cまでの温度範囲においては、観測される鋭い共鳴線の線中はほとんど変化しないが、 $\approx 14^\circ\text{C}$ に至り、その鋭い共鳴線は消失し、 $\approx 500\text{ Hz}$ の半値中をもった不凍水が出現する。さらに除冷していくと、半値中は linear に増加し、 -46°C に至り、 $\approx 2000\text{ Hz}$ にも達するが、それ以下の温度では測定不可能となる。逆に低温側から昇温していくと、 -46°C に至りブロードな不凍水が検出可能になり、以後そのブロードな共鳴線は、しだいに narrowing していく。 -14°C から0°Cに至る温度範囲においては低温側から連続的に減衰して、0°Cに至り降温過程の値に到達した。さらに0°C以上の温度範囲において、線中は降温時と同じ過程に沿って変化した。以上、不凍水量、T₁線中のいずれにおいても、0°Cと -14°C の間に loop をもった温度履歴現象を観測することができた。

④ -14°C から -46°C の温度範囲において、不凍水量乃至半値中の linear な変化は不凍水の氷結、融解現象の温度レスポンスが linear に起こることを示している。即ち、不凍水の氷結、融解機構は、不凍水が何層かの性質の異なる相からなるのではなく、均一な相からなっていて、不凍水と氷の境界表面において、氷結乃至融解現象が起こっていると考えられる。

一般にゲルや生体高分子中における水の状態変化(運動構造)は、まわりの雰囲気(media)の状態変化の影響を受け、相補的に変化する。この時得られる温度履歴は大別し

て次の三つのパターンに分類される。

i) タンパク質溶液中の水のような場合
 helix-coilのような可逆的变化は別として、熱変性のような不可逆な変化を起した時、その時得られる水の状態変化は複雑であり、再現性ある温度履歴を得ることは困難である。

ii) アガー-水系のような場合。水はアガールのゾル-ゲル転移に伴う構造変化の影響を受けるにもかかわらず、大きな temperature hysteresis loop が観測されている。

iii) PAAゲルのように水溶性合成高分子ゲルのような場合。一旦、重合によってゲルの framework が出来あがってしまうと、温度変化によるこの framework の構造変化はほとんど起こらないため、水の状態への影響はほとんど無視できる。従って、ゲルの空間は単に固定環境として働くのみで、得られる temperature hysteresis は水の状態変化のみを反映する。この意味で、PAAゲルはゲルの束縛分子空間にトラップされた水の低温域での状態分析を行なううえで理想的なモデル系であると考えられる。

結局得られた温度履歴の結果は、低温域におけるPAAゲル中の水に四つの相状態が存在することを示唆した。A) 自由水-水和水 ($\sim 0^\circ\text{C}$ or -14°C)、B) 自由水-不凍水-氷 ($0^\circ\text{C} \sim -14^\circ\text{C}$)、C) 不凍水-氷 ($-14^\circ\text{C} \sim -46^\circ\text{C}$)、D) 氷 ($-46^\circ\text{C} \sim$)。状態A)中の水は液体の水と同じ挙動を示し、自由水と水和水との早い交換のため二相モデルで取扱うことができる。⁴⁾ A)を急冷すればD)に、除冷すればC)→D)の順に相変化していく。A)からのいかなる冷却方法によってもB)は現出しない。一方、D)から昇温によりC)→B)→A)と相変化する。ここで、状態B)は、NMR諸量の hysteresis loop の因となっている。

NMR (FX-100) の使用にあたり、終始、便宜を図って下さった分子科学研究所ならびに同所の岩村秀教授、高谷秀正助教授に謝意を表したい。

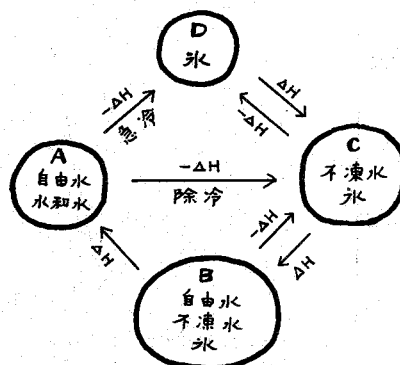


図6. PAAゲル中の水の低温域 ($25^\circ\text{C} \sim -179^\circ\text{C}$)における相状態

1. I. D. Kuntz, Jr., T. S. Brassfield, G. D. Law, and G. V. Purcell, *Science*, **163**, 1329 (1969)
2. S. Katayama, Y. Arata, and S. Fujiwara, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **51**, 1545 (1978)
3. D. E. Woessner, B. S. Snowden, Jr., and Y. C. Chiu, *J. Coll. Inter. Sci.*, **34**, 283 (1970)
4. J. R. Zimmerman and W. E. Brittin, *J. Phys. Chem.*, **61**, 1328 (1957)

(東工大工)・長谷川 隆, 朝倉 哲郎, 西岡 篤夫

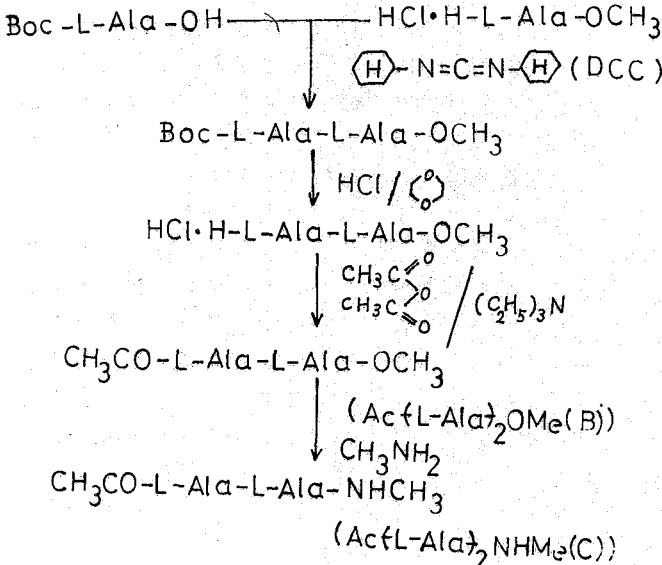
1. 緒言

ポリペプチド主鎖の屈曲性は、本質的にα炭素をはさんだN-C^α及びC^α-C^α結合のまわりの回転の自由度に由来すると共に、このペプチド結合部分と極性溶媒とは、短距離相互作用する故、ポリペプチド主鎖の溶媒効果に関連して、そのモデル化合物の溶媒効果を研究することは意義のあることと思われる。

既に我々は、ポリ-L-アラニンの二量体モデル化合物であるN-アセチル-L-アラニンメチルアミド分子について、そのNMRスペクトルの挙動から、会合状態に関する知見を得り、更にTFA-CDCl₃系で、TFAとこの化合物の溶媒効果について研究した。TFA濃度の比較的低い所では、TFA2分子とこの二量体モデル化合物/分子が関与した水素結合を形成していることを示唆した。²⁾しかしながらこのモデル化合物のα-CH及びNHプロトンピークの挙動については、ポリ-L-アラニンの場合と異なっており、二量体モデル化合物のデータのみから、ポリマー鎖の溶媒効果を推定することは不適当であろう。実際、ビニルポリマーでは、二量体モデル化合物と三量体モデル化合物では、そのNMRスペクトルが、かなり異なっていることが報告されているので、ここでは、ポリ-L-アラニンの三量体モデル化合物である、N-アセチル-L-アラニル-L-アラニンメチルアミド分子(C)を合成し、種々の溶媒系でそのNMRスペクトルを測定し、その会合状態と溶媒効果について研究した。

2. 実験

試料は、以下の如く合成した。



試料として、左図中の(B), (C)の化合物を用いた。測定は、JEO-LPS-100型分光計にFTユニットをつけて行ない、NMR化学シフトは、体積磁化率を補正後、TMSから低磁場にppmで表わした。

3. 結果と議論

3.1 Ac(L-Ala)₂NHMeの会合状態

Ac-Ala-NHMe (A) 及び Ac(L-Ala)₂OMe (B) 分子と比較して、Ac(L-Ala)₂NHMe (C) 分子の方がより強固な会合体を形成し、CDCl₃溶媒には殆んど溶解せず、極く微量の

はせがわ たかし・あさくら てつお・にしおか あつお

TFAを加えることにより溶解する。一方DMSO- d_6 溶媒には、2.5%程度まで溶解するが、Fig.1. に示したように(C)分子の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルに濃度依存性が見い出された。一方、(A)及び(B)の場合、濃度依存性は見い出されず、DMSO- d_6 中で、孤立した分子と見なすことができたが、(C)の場合は、DMSO- d_6 中でも分子間会合を形成していることを示唆する。(尚、個々のNH基の帰属は、CH α プロトンとのカップリングパターンの相違、個々の化学シフトの値、溶媒効果の大きさの相違からおこなった。)

又、微量のTFAを含むCDC $_3$ 溶液中(試料濃度2.5%)において、中央のNHとC α H α プロトンの $^3J_{\text{NH}^\alpha\text{CH}}$ 値及び、N末端のNHとC α H α プロトンの $^3J_{\text{NH}^\alpha\text{CH}}$ 値はそれぞれ $7.4 \pm 0.5 \text{ Hz}$ 及び 6.8

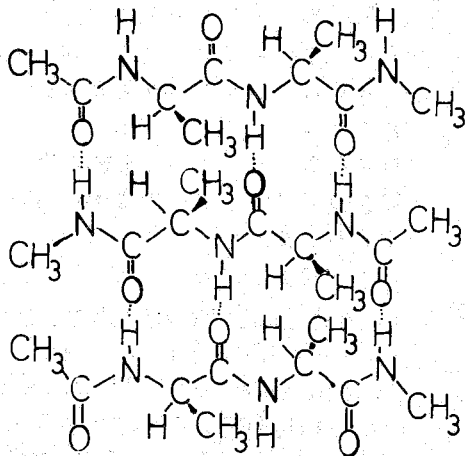


Fig.2. Structure of associated molecules of Ac-(Ala) $_2$ NHMe (anti-parallel- β -pleated sheet conformation)

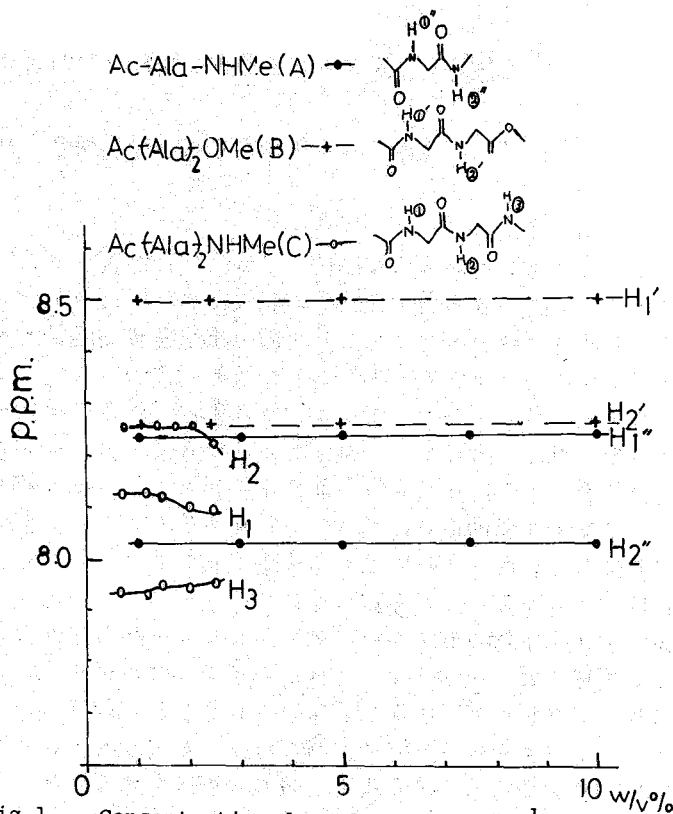


Fig.1. Concentration dependences of the $^1\text{H-nmr}$ chemical shifts of NH protons in Ac-Ala-NHMe (A), Ac-(Ala) $_2$ OMe (B) and Ac-(Ala) $_2$ NHMe (C) molecules in $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ solutions.

$\pm 0.5 \text{ Hz}$ であった。(A)の場合、 $^3J_{\text{NH}^\alpha\text{CH}}$ の値は、10 w/v%で 7.5 Hz 、1 w/v%で 7.8 Hz で、会合が切れるにしたがって増加していた。(C)分子のJ値は、10 w/v%の所の(A)値と概ね一致することから、会合状態では、同様のコンホメーションをヒッていると考えられる(N末端近傍のコンホメーションは若干異なっている可能性がある)。従って(A)の会合状態のコンホメーション(逆平行 β シート型)を参考にし、更に、中央のNH基が末端の2つのNH基と比較し、内部に埋もれた分子間会合モデルとして、例えばFig.2に示した会合モデルが考えられる。しかしながら、分子間会合に關する分子の数に關する詳細な議論は、これらのデータからは不可能である。(又、 $J_{\text{NH}^\alpha\text{CH}}$ のカッ

ポリマー定数の値から見積もった NH-C α H の内部回転角の値は約 100 $^\circ$ となり、平面型のコンホメーションから幾分ずれている。

3.2 Ac-(Ala) $_n$ NHMe の溶解効果 (CDCl $_3$ -TFA系)

Fig. 3. に (C) の NH プロトンの化学シフトを、CDCl $_3$ -TFA 溶解系で、TFA 濃度の関数として示した (試料濃度は、2.5, 5, 10 W/V%)。

最も、低磁場に出現した中央残基の NH プロトンは、TFA 濃度が増加してもほとんどシフトしないが、N 末端及び C 末端 NH プロトンは、低磁場にシフトする。特に N 末端は、アミドと TFA のモル比が 1:2 の近傍で、シグモイド型の変化をしている (Fig. 3. 図中 ↓ の部分)。これらの結果から、この TFA 濃度範囲では、末端のみが TFA との水素結合に関与していると考えられる。また、N 末端のシフト変化の量は、C 末端よりも若干大きい。

3.3 アラニンニ及び三量体化合物 A, B, C とポリ-L-アラニン, D との比較

アラニン二量体、三量体モデル化合物及び、ポリ-L-アラニン³⁾ の重クロロホルム中での、NH プロトンの化学シフトの値を、棒スペクトルで Fig. 4. に示した。(A 及び D の場合は、極く少量の TFA を加えてある。又このポリマーの重合度は 16 \times 、旋光度のデータは、*helix* の形成を示唆している)。個々の NH ピークは、二量体、三量体、ポリマーとなるにつれて、総じて低磁場シフトする傾向がある。そして C 分子の中央の NH プロトンのピークは、最も低磁場に出現し、その濃度依存性も殆んどない。又、そのシフト位置は、ポリマーの場合に

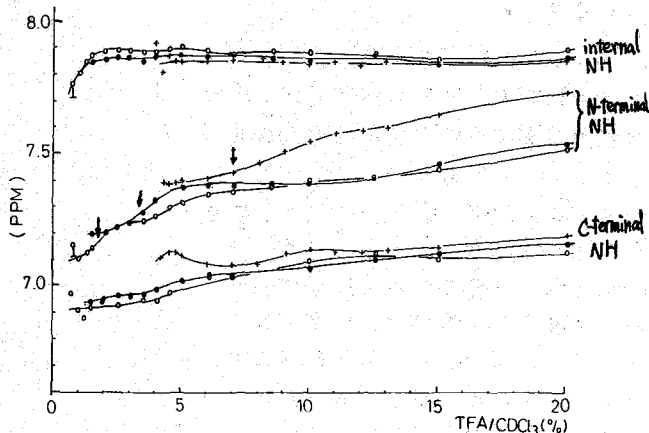


Fig. 3. ^1H chemical shift of three kind of NH protons in $\text{Ac}-(\text{Ala})_n\text{-NHMe}$ at 10W/V% (+), at 5W/V% (●), and at 2.5 W/V% (○), respectively as a function of TFA concentrations.

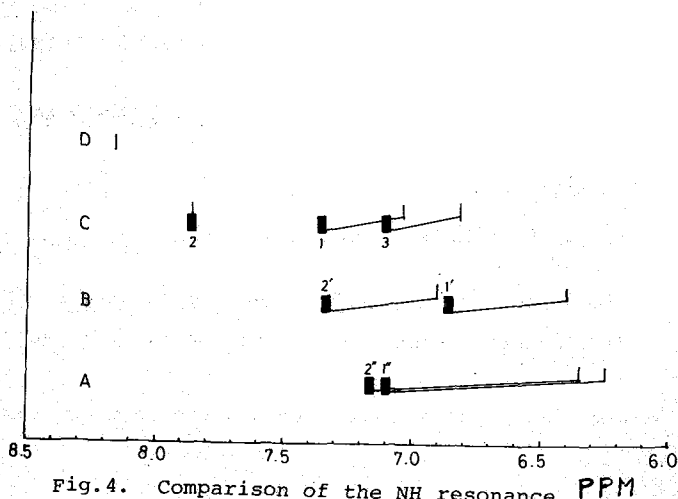


Fig. 4. Comparison of the NH resonance positions of poly-L-alanine with those of its model compounds A, B, C, in CDCl $_3$ solution (■ 5W/V%, □ 1W/V%)

近くなる。

一方, Fig. 5. に示したように, ポリマーの α -CHプロトンの共鳴位置は, モデル化合物の位置に比較してかなり高磁場シフトしていることがわかる。A及びCは, 試料濃度が高い場合, 逆平行 β シート型をとり, 分子間水素結合を形成している。そして希釈に伴ない, 分子間水素結合が切れると同時に, 分子内水素結合を形成するようになり, α -CHプロトンは高磁場にシフトする(エステル基の隣りの α -CHプロトンは分子間水素結合が切れるに伴ない高磁場シフトする傾向がある)。しかし尚, 0.3~0.4 ppm程, *helix*の方が, 高磁場に出現している。したがってこのことは, 分子内水素結合を形成した場合の α -CHプロトンのピーク位置より, *helix*の場合のピーク位置の方が高磁場に出現することを示唆している。

一方TFA中では, α -CHプロトンのピーク位置は, 二及び三量体モデル化合物とポリマーの場合で殆んど差はなく, TFAとペプチド鎖の相互作用は短距離で, ポリマー鎖上でC α をはさんだ2コのペプチドグループまでの鎖長範囲が, TFAと相互作用する単位となっているように思える。

尚, 蒸気圧浸透法による会合分子の分子量測定の結果も合わせて発表する予定である。

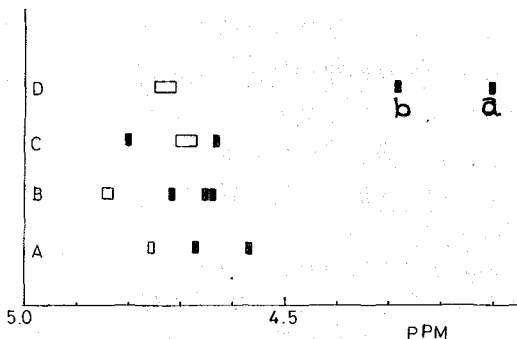


Fig. 5. Comparison of the α -CH resonance positions of poly-L-alanine with those of its model compounds A, B, C, in CDCl₃ (■ 5W/V, □ 1W/V) and in TFA solutions (○)

a, (ref. 3, Sample Conc. 1W/V%, TFA composition 0.4%, external reference, TMS,)
b, (ref. 4, Sample Conc. 0.1%, TFA composition 5%, internal reference, TMS,)

参考文献

- 1) T. Asakura, M. Kamio and A. Nishioka, Biopolymers, 17 (1978) in press
- 2) 朝倉, 神尾, 長谷川, 西岡, 第16回NMR討論会要旨集 P. 65 (1977)
- 3) T. Asakura, I. Ando and A. Nishioka, Makromol. chem., 178, 1111 (1977)
- 4) M. Goodman, F. Toda and N. Ueyama, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 331 (1973)

(理研、*東大応微研) 鷗 潤、*瀬戸治男、浦本昌和、竹内節男

1 序

演者らは、第14~16回NMR討論会において、 $^{13}\text{C-NMR}$ の一手法である long-range selective decoupling (LSPD) について、その技術と応用例を報告した。

LSPD は四級炭素の直接的な帰属が行えること、窒素や酸素を含む2~3 bond 経たC-H間の coupling constant を確実に読みとれること等の特長を持っている。これらの特長を活用して、すでに数例の応用例を報告した¹⁾。低電力 ^1H 照射技術としてのLSPDは2つの方向へと発展した。1つは選択的な $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$ NOEであり²⁾、1つは三重共鳴である。

本講演は三重共鳴 ($^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}\{^1\text{H}\}$) について技術的検討を行った結果と pentalenolactone-G への応用例、さらに関連化合物に応用して構造と long-range coupling constant について知見を得たのでこれを報告する。

2 実験

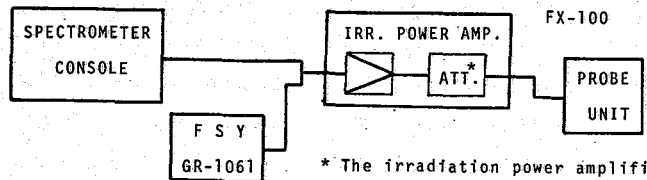
Fig. 1 にブロック図を示す。FT-NMR 装置は日本電子製FX-100型スペクトロメータを使い、 ^1H 照射パワーアンプの最終段は低電力動作時の安定性、直線性、操作性を考慮してattenuator (ATT) のみで構成する low power irradiation unit におきかえた。

第2の ^1H 照射周波数発振器はGenRad製frequency synthesizer (FSY) を使い、照射用パワーアンプのIrr. 1端子にT型BNCコネクタを使って接続した。FSYの出力レベルを内蔵発振器のレベルと同一にし、ATTの減衰量を調整して測定を行った。

3 LSPDの限界と三重共鳴の問題点

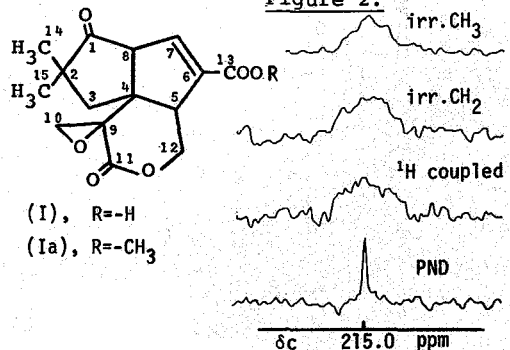
例えば、(Ia)のような化合物の場合、ジメチル、メチレン(H-3)、H-8等をそれぞれ/個所ずつdecouplingしても1位のカルボニルにはFig. 2のように明らかな変化は見られない。このように多数の ^1H からのcouplingがある ^{13}C シグナルの場合は ^1H を2個所decouplingする三重共鳴を行うことにより、より明確な知見が得られるはずである。

Figure 1

Schematic diagram of $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrometer

* The irradiation power amplifier was replaced to attenuator unit.

Figure 2.



(I), R=-H
(Ia), R=-CH₃

演者らはacetophenone (carbonyl- ^{13}C)を使って三重共鳴の実験を行い、測定条件の検討を行った。まず始めに、従来のLSPD (/個所の ^1H 照射)の場合をFig. 3に示す。観測はいずれもカルボニルのシグナルである。 CH_3 とphenylをそれぞれ照射すると、照射してない方からのcouplingが残り、照射パワーを強くすると照射してない方からのcouplingが若干小さくなる程度の変化しかない。図に示すように、 $\gamma\text{H}_2 = 37 \sim 208 \text{ Hz}$ の範囲ではほとんど変化がなかった。この図では示していないが、 $\gamma\text{H}_2 = 15 \text{ Hz}$ でも同様であった。

しかし、2個所のLSPDではFig. 4に示すようにカルボニル炭素は照射パワーが強いときに分裂があらわれる等の変化が見られるように、最適の照射パワーの範囲はせまく、通常のLSPDにくらべパワーの選択はより厳しく要求される。

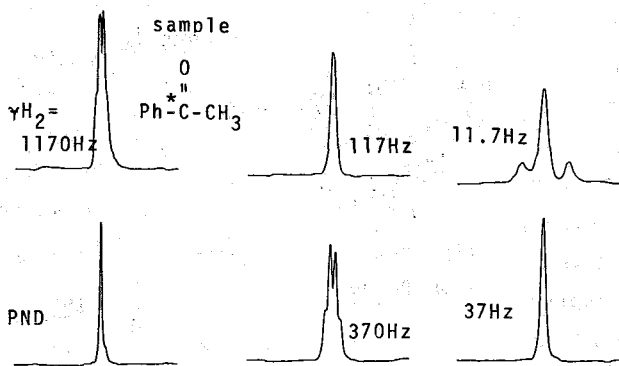
γH_2 が1170Hzや370Hzと照射パワーが強い場合に分裂が残る現象はBloch-Siegert shift (BSシフト)によるものと考えられ、H.J. Jakobsenらによれば次式であらわされる関係にある³⁾。

$$S_A^S = (v_A - v_2) \left(\left[\frac{(\gamma\text{H}_2)^2}{(v_A - v_2)^2} + 1 \right]^{1/2} - 1 \right) \dots \dots \dots (1)$$

S_A^S はBSシフト、 $(v_A - v_2)$ は照射周波数の差である。この式から γH_2 が小さくなれば S_A^S 小さくなること、 $(v_A - v_2)$ と S_A^S は一定の相関々係があることを示している。

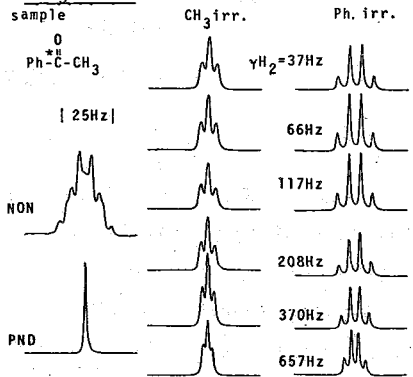
Jakobsenらはtolueneを用いて、benzene環のortho位とpara位の ^1H を $\gamma\text{H}_2 = 486 \text{ Hz}$ で照射し、 CH_3 を58Hzで照射して三重共鳴スペクトルを測定したが、このときのBSシフトは200Hzもあった。この値は(1)式によって計算した値と一致した。BSシフトが200Hzあるということは、実験上の問題として見ると、実際のシグナルの位置から200Hz離れたところを照射することであり、未知化合物には到底応用できない。

Figure 4



にcouplingが残るので、以後の実験は37~30Hzで行うこととした。

Figure 3

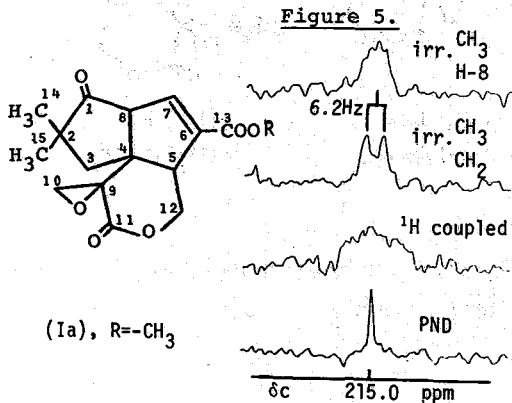


彼らの実験は、 /個所はC-H direct couplingをdecouplingするために、強いパワーで照射したのでBSシフトが大きくなったが、演者らの目的はindirect couplingのdecouplingにあり、パワーを弱くしても良いのでBSシフトは小さい。

Fig. 4において、singletになった117Hzでも照射パワーが強すぎて、約30Hz程度に近接した ^1H にも影響するので好しくない。また、25Hz以下では弱すぎて、11.7Hzの場合のよう

4 三重共鳴 ($^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}\{^1\text{H}\}$) による pentalenolactone 類の構造解析

pentalenolactone (II) の生合成中間体 pentalenolactone-G (I) は瀬戸らによって単離され、メチルエステル体を使って LSPD や selective $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$ NOE 等の手法により、短時間で構造決定された¹⁾⁻⁴⁾。(I) の C-1 ~ C-8 を含む 5 員環のケトン、ジメチル、メチレンの関係は



三重共鳴が成功していなかったため、1 位にケトンのあることは (I) を還元して得たアルコール体で新しく生じたメチンシグナルが H-8 と coupling していることにより確認した。LSPD によるケトンのシグナルは Fig. 1 のように明りょうな変化は見られないが、三重共鳴を行うことによりメチル、メチレン、H-8 の関係を明らかにすることができた。すなわち、Fig. 5 に示すように、 CH_3 と CH_2 (H-3) の三重共鳴によって C-1 ケトンのシグナルは 6.2 Hz の doublet になり、H-8 との 2 bond coupling を示唆している。

次に、Fig. 6 に (I) の三重共鳴の高磁場部分のスペクトルを示す。3 位のメチレンの triplet は先端が 5.9 Hz の doublet に分裂している。この分裂は CH_3 と H-8 の decoupling では消えないが、 CH_3 と H-5 の decoupling によって消滅する (Fig. 6 d, c)。これを driving model により検討してみると Fig. 7 のようになった。

一般に 3 bond の coupling constant ($^3J_{\text{C-H}}$) の大きさは C-H 間の dihedral angle と密接な関係があると考えられている。pentalenolactone (II) の関連代謝物である (I)

Figure 6.

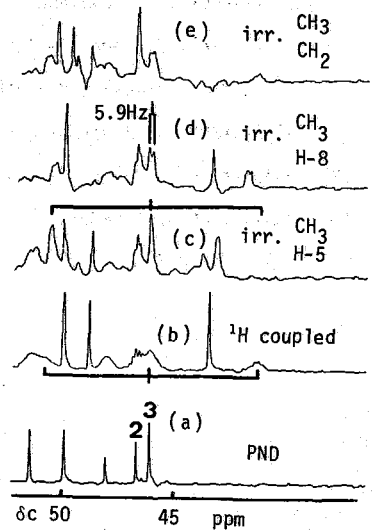
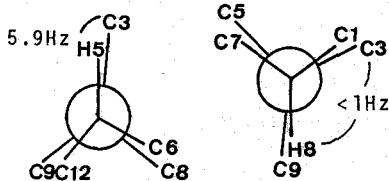


Figure 7



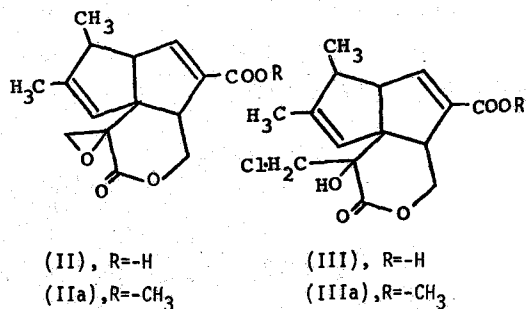
および (III)⁴⁾ に共通するラクトン環の H-12 と C-11、C-6 および H-10 と C-11 の $^3J_{\text{C-H}}$ は各化合物で異っている (Table 1)。

従ってラクトン環の conformation はそれぞれの化合物で異っているものと考えられ、 $^1\text{H-NMR}$ の coupling constant と合せ検討することにより、溶液中での conformation を推定できると考えられる。

三重共鳴はスペクトロメーターの感度が向上し、autostacking program が一般化してきた今日、有機化合物の構造解析にとって有効な手法と考えられる。

Table 1

		(I _a)	(II _a)	(III _a)
C-11	H-12 _h	7.0	5.5	6.7
	H-12 _l	3.0	3.7	0
	H-10 _h			7.3
	H-10 _l	≠1.5	≠1.5	
C-6	H-12 _h	<2	4.3	6.7
	H-12 _l	<2	4.9	4.0



おわりに、化合物 (III) を提供していただいた科研化学株式会の相沢昭二郎氏に、三重共鳴の実験で御助言いただきました今成 司氏に感謝いたします。

References :

- (1), a) S.Takeuchi, J.Uzawa, H.Seto and H.Yonehara, *Tetrahedron Lett.*, 2943(1977).
 b) K.Sakata, J.Uzawa and A.Sakurai, *Org.Magn.Reson.*, 10, 230(1977).
 c) T.Ogawa, J.Uzawa and M.Matsui, *Carbohydr.Res.*, 59, C23(1977).
 d) H.Seto, T.Sasaki, H.Yonehara and J.Uzawa, *Tetrahedron Lett.*, 923(1978).
 e) J.Uzawa and M.Uramoto, *Org.Magn.Reson.*, recieved.
- (2), J.Uzawa and S.Takeuchi, *ibid*, in press.
- (3), H.J.Jakobsen, T.Liptaj, T.Bundgaard and S.Sørensen, *J.Magn.Reson.* 26, 71(1977).
- (4), S.Aizawa, H.Akutsu, T.Satomi, S.Kawabata and K.Sasaki, *J.Antibiotics*, 31, 729(1978).

(味の素・中研) 甲斐荘正恒 小西博子

はじめに

NMRスペクトルによる種々の生体物質の構造研究においては、必要な情報を引き出すのに適した試料を調製することが一つの要点となる¹⁾。生体物質に組み込まれている核種の中で、現在のところ、最も重要なものは¹H, ¹³C, 及び³¹Pである。ところで、生体物質には分子の極めて限られた部分に、それらの機能をなす活性部位があり、この部分を他の部分と区別して扱い、できるならばその部分のみの情報を手に入れたいと我々は考える。良く知られているように、このような活性部位は、水素結合を含めたH⁺の受授、互変異性、金属イオンとの結合、酸化還元反応等に直接関与しており、その主たる役割りを活性部位を形成する窒素と酸素が果たしている。生体物質の構造研究にとってこれらの核、つまり¹⁵Nと¹⁷O, のNMRスペクトルが重要となる理由がここにあり、最近のNMR測定装置の著しい改良の一つの動機は、これらの核種の測定感度の向上をめざしたものである。

さて、¹⁵N核は天然存在比が0.37%と低く、NMR感度は同一磁場強度で¹Hのわずか 1.04×10^{-3} %にすぎない。したがって、現在ある最も高感度な¹⁵N NMR測定装置 Bruker WH-180 (25 mm管使用) をもってしても、モノヌクレオチド類の天然存在比での¹⁵N NMRスペクトルの測定には、0.5—1 Mの高濃度試料溶液で3—6時間を要する²⁾。将来の画期的な測定技術の進歩を考慮に入れてとしてもなを、¹⁵Nラベル核酸の調製が必須であることは疑いのないところであろう³⁾⁴⁾。演者等はここ数年来安定同位体の利用によるNMRスペクトルの生体物質の構造化学的手法の開発に努力しているが^{1,5,6)}、本報では核酸関連物質の¹⁵Nラベル化合物の調製と¹⁵N-及び¹³C-NMRスペクトルについて述べ、種々のNMRパラメーターの構造化学的有用性とそれらの問題点について議論したい。本研究と極めて密接した内容の報告が、極く最近 Rüterjans 等によって発表されているので⁷⁾、彼らの研究との比較検討も行なう。

実験

本報で用いた¹⁵N-核酸関連物質は次の二種類の方法で調製した；(1) 重窒素硫酸を唯一の窒素源としてパン酵母を培養し、菌体のRNA区分を単離精製し、非特異的ヌクレアーゼPiを用いて各5'-ヌクレオチドを得る；(2) 培地中の軽窒素源を最小限にし、且つ多量の重窒素硫酸を与え、アリンヌクレオチドの醜醜生産を行ない、得られたヌクレオチドを必要に応じてリン酸しヌクレオチドに導く。

¹⁵N (10.1 MHz), ¹³C (25.2 MHz) NMRスペクトルは Varian 社 XL-100 スペクトロメーターを用いて測定した。但し、本装置は感度が低いために、¹⁵N NMRスペクトルは全て Nicolet NT-440 多核測定ユニットを用い、18 mm管で測定した。¹⁵N ケミ

かいのしょう まさつね, こにし ひろこ

カルシフトは外部キャピラリー中の重窒素硫酸のアンモニウムイオンの ^{15}N スペクトルから ppm で示した。

結果と考察 — 核酸塩基の電子状態とNMRパラメーター —

(I) ^{15}N ケミカルシフト

^{15}N ケミカルシフトは、当然のことながら、塩基の電子状態に大きく影響される。図Ia, bは $5'-[^{15}\text{N}]\text{CMP}$ (シチジル酸) と $5'-[^{15}\text{N}]\text{UMP}$ (ウリジル酸) の ^{15}N NMRシフトのpH変化(2%重水中)を示している。プロトン化部位のシフト変化は極めて大きいが、直接プロトン化に関与しない窒素核のシフト変化ははるかに小さい。このシフトの滴定曲線から得られた pK_a 値は文献値とよく一致する。又、我々のデータはRüterjans等の $3'-\text{CMP}$, $3'-\text{UMP}$ のシフト値と非常によく一致していることから、塩基窒素シフトのリン酸基解離の影響は ^1H , ^{13}C NMRのシフト変化と異なり、無視しうる程度に小さいことが明らかである。 ^{15}N シフトのpH変化 profile はプロトン化部位の決定、信号の帰属等にも有用であることはいうまでもないだろう。

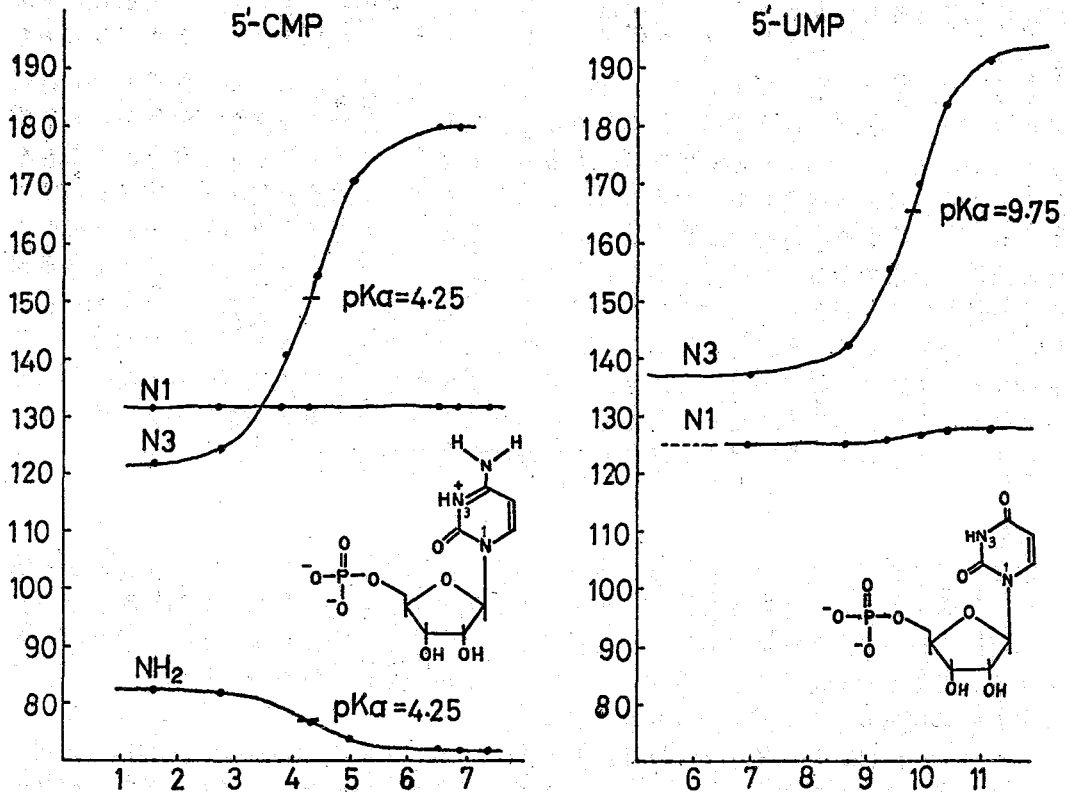


図-I $5'-\text{CMP}$ (a) と $5'-\text{UMP}$ (b) のケミカルシフトのpH変化

(II) ^{15}N - ^{15}N スピン結合定数

核酸関連物質の ^{15}N - ^{15}N スピン結合はこれまで、Rüterjans 等による不完全なデータのみが知られている⁷⁾。種々のモノヌクレオチド、モノヌクレオチドの $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NMR スペクトルは多重線構造を示し、 J_{NN} 結合の存在が明らかであり、long-range 結合が小さいために比較的単純なスペクトルとなり、帰属も容易に行なえた。図-II に例としてピリミジンヌクレオチドの $^2J_{\text{NN}}$ に及ぼす塩基のイオン化状態の影響を示した。

5'-CMP における N3-NH₂ 間のスピン結合定数の絶対値は N3 のプロトン化により 5.2 Hz から 0.9 Hz へと大きく減少する。この傾向は 5'-AMP の N3 と NH₂ の間の $^2J_{\text{NN}}$ でも全く同様である。又、 $^2J_{\text{N1-N3}}$ は N3 がプロトン化すると 0 から 2.7 Hz へと増大する。UMP の場合にアミドの部分二重結合性を考慮に入れれば、geminal ^{15}N - ^{15}N 結合定数の値は、ほぼ局所的な構造の類似性によって定まっており、この点、次に述べる $J_{\text{NN-OC}}$ と非常に異なっている。 $^2J_{\text{NN}}$ は ^{15}N シグナルの帰属に有用であるとともに核酸塩基の部分構造との関連で有用なパラメーターである。

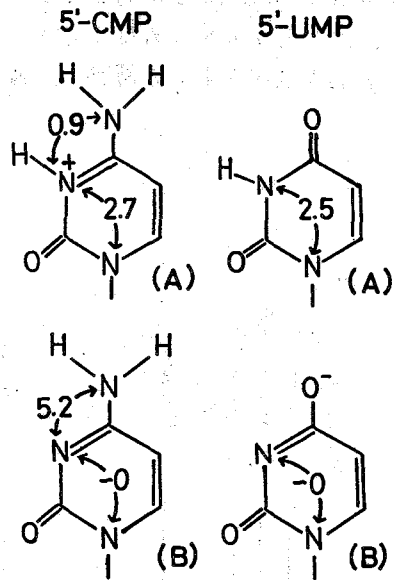


図-II. 5'-CMP と 5'-UMP の $|^2J_{\text{NN}}|$ (Hz.) A: 酸性型, B: 塩基性型 (図-I の pH 滴定曲線参考)。

(III) ^{15}N - ^{13}C スピン結合定数

$J_{^{15}\text{N}-^{13}\text{C}}$, 特に直接に結合した J_{NC} は結合の次数と簡単な関係で結ばれるのが普通であることから興味を持たれる。しかしながら核酸関連物質についてまとめた研究は報告されておらず、わずかに極く最近、鈴木等のアデニンのデータが知られているのみである⁸⁾。演者等は ^{15}N - ^{15}N 結合が比較的単純に塩基の電子状態と関連づけられることを見出したので、 ^{15}N - ^{13}C 結合を測定してみた。ところが予想に反して、 ^{13}C と ^{15}N 間のスピン結合は非常に複雑であり、特にスピン結合定数の大きさと、途中にはさまれた結合の数との間に必ずしも単純な関係はない点が重要である。したがって、 J_{NC} の帰属は困難であり、特定の位置のみに ^{15}N ラベルするか、 $\{^1\text{H}, ^{15}\text{N}\}$ - ^{13}C の三重共鳴実験を行なう必要がある。現在のところ、後者の実験による帰属を考慮中である。

一例として図-III にアデニンの DMSO 溶液中での $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C スペクトルを示す。最も注目すべきは、C2 が中広いながら一重線として、C8 が二重線としてあらわれた点であ

る。この事実は J_{NC} 結合はある場合には測定できない程小さいことを示しており、この点 J_{CC} や J_{CH} 等と非常に異なっている。我々は他の $[^{15}N]$ -ヌクレオシド、ヌクレオチドの ^{13}C NMR スペクトルを解析し、更に J_{NC} の値について検討を加える予定にしている。

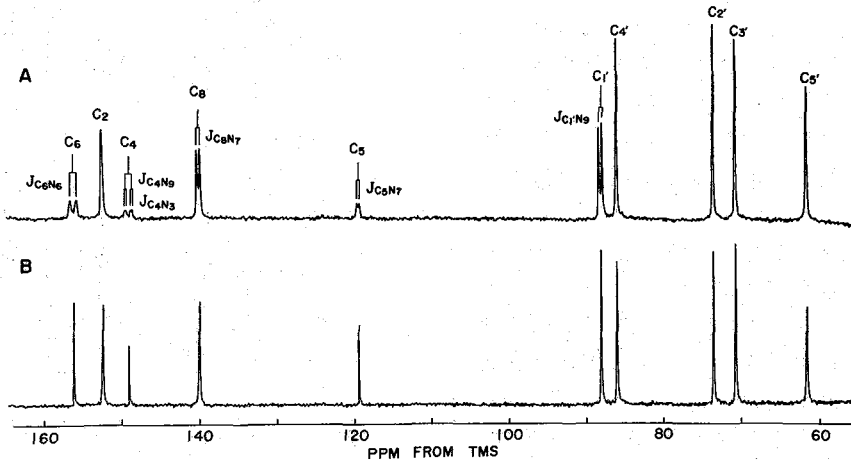


図-III. アデノシンの $\{^1H\}$ - ^{13}C NMR スペクトル。A; $[^{15}N]$ -アデノシン。
B; $[^{14}N]$ -アデノシン。溶媒; $DMSO-d_6$ 帰属は仮りのもの

終りに

本報は $[^{15}N]$ -核酸誘導体を用いて ^{15}N NMR による生体関連物質の構造研究の第一報として、 $[^{15}N]$ -ヌクレオシド、ヌクレオチドの種々のパラメーターについて実験事実を中心に簡単な考察を加えるのが目的である。現在、更に進んだ応用として、特異的塩基相互作用、抗生物質との相互作用、 $RNase T_1$ と $3'-GMP$ との相互作用等幅広い研究を蛋白質研究極研究室と計画している。

文献

1. 甲斐荘; "NMRの生体高分子への応用" 和田編, 共立出版 (1973)
2. U. Markowski, G. R. Sullivan, and J. D. Roberts, *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 714(1977).
3. J. A. Happe and Morales, *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**, 2077(1966).
4. K. Yagi, N. Ohishi, A. Takai, K. Kawano, and Y. Kyogoku, *Biochemistry*, **15**, 2877(1976).
5. M. Kainosho and K. Ajisaka, *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 5630(1975).
6. M. Kainosho, K. Ajisaka, M. Kamisaku, A. Murai, and Y. Kyogoku, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 425(1975)
7. P. Büchner, W. Maurer, and H. Rüterjans, *J. Magn. Resonance*, **29**, 45(1978).
8. H. Yamada, M. Hirobe, K. Higashiyama, H. Takahashi, and K. T. Suzuki, *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 4617(1978).

211 ^{14}N NMR によるリン脂質二層膜の研究

I. 卵黄レシチンと DPPC の物性

(丸大・素) 古賀けい子, 金沢洋子

〔序論〕

磁気共鳴法は、生体膜モデル系の物性研究において、多くのすぐれた知見をもたらしている。しかし、膜系全体の性質とマイクロな個々の分子の性質との分離解析は必ずしも十分ではない。

今回、膜モデル系の基礎研究として、ジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) 二層膜と、卵黄レシチン二層膜の ^{14}N 核の T_1 , T_2 、さらにそれらの温度依存性を測定した。レシチン・有機溶媒・水系の逆ミセルの ^{14}N NMR の結果とあわせて解析することにより、レシチンの極性基部分の局所運動と集合体全体としての運動を分けて考察することができた。

〔実験〕

DPPC はフルカ社製、卵黄レシチンは Singleton らの方法により抽出・精製した。多重層膜を約 1 時間超音波処理して二層膜を調製した。超音波装置は、水冷型、40 kHz で手製。最終的なレシチン濃度は約 0.2 M である。

^{14}N NMR は、JNM-PS-100 用電磁石を H 外部ロック方式で用い、7.2 MHz の自家製パルス・フォーリエ変換システム⁽¹⁾により FT スペクトルとして得た。 T_1 は $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ パルス系列により求め、 T_2 としては共鳴ゼーウの周波数分布がな...ものとして $T_2^* = (\pi \cdot \text{線中})^{-1}$ とそのまゝ用いている。

〔結果〕

DPPC 二層膜と、卵黄レシチン二層膜の、いくつかの温度における ^{14}N NMR スペクトルの例を図 1 に示す。DPPC 二層膜では炭素鎖のゲル-液晶転移温度 (T_c) は、約 40°C であり、 50°C 、 43°C のスペクトルは液晶状態、 35°C 、 24°C のスペクトルはゲル状態に対応している。卵黄レシチン二層膜の炭素鎖は、いずれの温度においても液晶状態である。DPPC 二層膜、卵黄レシチン二層膜共に温度上昇に伴い、線中が減少する。特に DPPC 二層膜の場合には、 T_c 近傍において急激な線中の変化がみられる。みかけの T_2^* ($T_2^* = (\pi \cdot \text{線中})^{-1}$) と T_2 とした、アレキサプロット (1) に結果を図 2 に示す。温度上昇に伴う T_2 の増加、および DPPC 二層膜では T_c 近傍での不連続な T_2 の変化が明瞭である。さらに DPPC 二層膜、卵黄レシチン二層膜における T_1 の測定結果も図 2 にあわせて示した。測定温度範囲では、どちらの二層膜においても $T_1 \gg T_2$ であることがわかる。

これらの測定結果の解析に先づ、二層膜よりさらに単純なレシチンの集合体であるレシチン・有機溶媒・水系の逆ミセルについての測定結果を次に示す。逆ミセルの調製はすべて卵黄レシチンを用いている。レシチン・有機溶媒の系では、溶媒の種類により異なる線中をもつ。たとえば、塩化炭素中では、 29°C で 400 Hz 、ベンゼン中では 180 Hz である。これに少量の水を添加すると、図 3 に示されるような急激な線中の減少がみられ

二かけ二、八万ざわろ二

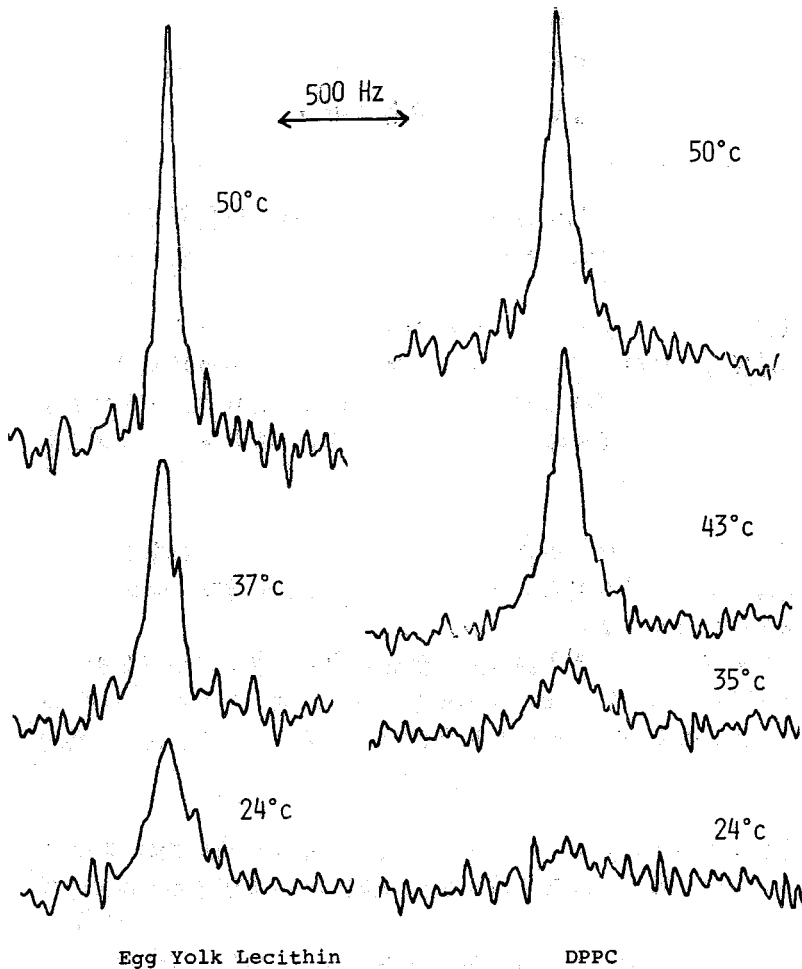


Fig. 1. ^{14}N NMR Spectra of Lecithin Vesicles

木の増加とともに線
 中は漸近的に一定値
 に近づく。この状態
 に対応する組成では
 糸は木を中心とした
 球状逆ミセルであると
 知られており、極
 性基部分の運動が自
 由にたすため線中の
 減少がみこると考え
 られる。十分水を含
 んだ場合の、レシチ
 ン・有機溶媒・水の
 逆ミセル系の T_1 , T_2
 値を表1に示す。な
 ら、レシチンがほ
 とんど単独で自由な
 分子として存在して
 いるとみられている
 水相中では
 線中は 2Hz 以下 ($T_2 > 160\text{ms}$), $T_1 =$
 267ms (29°C), 444
 ms (50°C) であり、
 この温度変化に対応
 する活性化エネルギー
 は 20 kJ/mol であ
 る。

〔考察〕

ユリシンの N [$\text{CH}_2 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$] は、3回対称軸を持つ二重の、 $N - \text{CH}_2$ 軸の空間的
 な運動から ^{14}N の核四極子相互作用による緩和時間を支配する。ミセルや二層膜などの集
 合体において $N - \text{CH}_2$ 軸方向の変化を与える運動には (i) 個々の分子の分子軸まわりの
 回転や極性基部分の振動などは、(ii) 溶媒中での集合体全体の回転 (相関時間 τ_R) と考
 えられる。後者は、集合体の半径 a がわかれば、ストークス・アインシュタインモデル $\tau_R = 4\pi a^3 \eta / 3kT$ を用
 い簡単に算出できる。測定周波数は 7 MHz ($\omega_0 \sim 2 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$) に限れば局所運動の相関時
 間 τ は extreme narrowing $\omega_0 \tau \ll 1$ の条件 $\tau \ll 5 \times 10^{-8} \text{ s}$ を十分満足するとみら

される。

$\omega_0 \tau_R \ll 1$ の条件下では、(2)

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \pi^2 \left(\frac{e^2 q_0}{h} \right)^2 \left[\left\{ \frac{\tau_R}{1 + \omega_0^2 \tau_R^2} + \frac{4\tau_R}{1 + 4\omega_0^2 \tau_R^2} \right\} S^2 + f(S) 5\tau_R \right] \quad (1)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{10} \pi^2 \left(\frac{e^2 q_0}{h} \right)^2 \left[\left\{ \frac{3}{2} \tau_R + \frac{5}{2} \frac{\tau_R}{(1 + \omega_0^2 \tau_R^2)} + \frac{\tau_R}{(1 + 4\omega_0^2 \tau_R^2)} \right\} S^2 + f(S) 5\tau_R \right] \quad (2)$$

ここで S は $N-CH_2$ 軸の集合体表面に垂直な軸に関するオーダーパラメータ、 $f(S)$ は

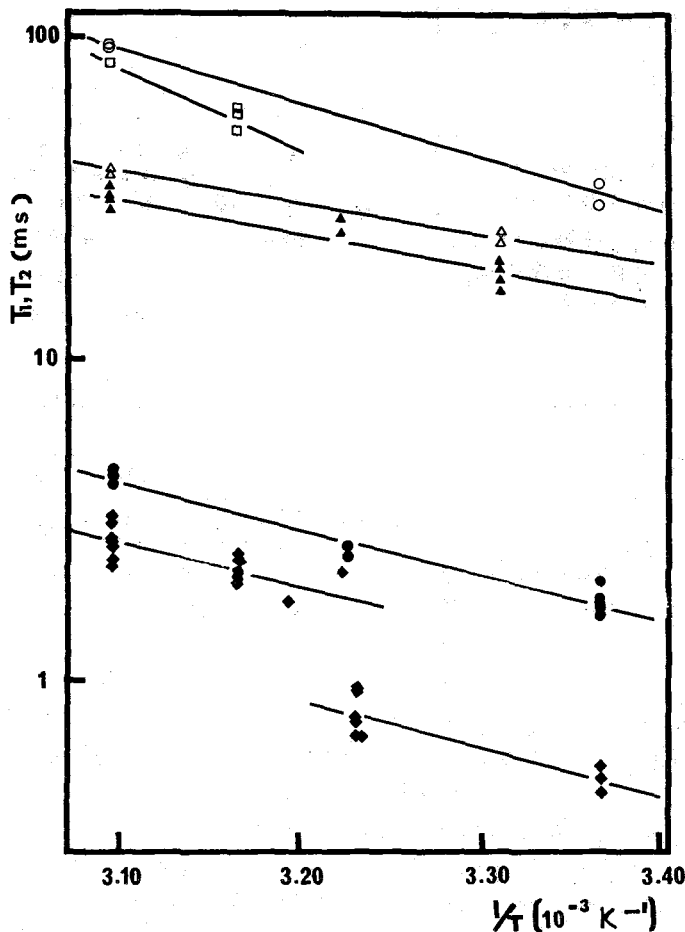


Fig. 2. Arrhenius plot of T_1 and T_2
 $\circ T_1$ and $\bullet T_2$ of Egg yolk lecithin vesicle
 $\square T_1$ and $\blacklozenge T_2$ of DPPC vesicle, $\triangle T_1$ and
 $\blacktriangle T_2$ of Egg yolk lecithin micelle

S の関数であり、 S が小さい時 1 に近い値をとる。

図 2 において明らかになるように二層膜とミセルにおいて、 T_1 は似た値をとっているが、 T_2 は系および温度により非常に異なっている。可能な限りミセルの T_2 は、 T_1 と同程度の値であり、一層膜の T_2 は、 T_1 以上で T_1 より (桁小さい) 値 T_2 以下で さらに 1 桁小さい値をもつ。これらの異なった挙動は次のように説明できる。

γ = 脂質の一層膜では一般に $a = 20 \sim 150 \text{ \AA}$ であると知られているが、 $a = 120 \text{ \AA}$ の場合、 $\tau_R = 2 \times 10^{-6} \text{ s}$ (20°C) となり $\omega_0 \tau_R \gg 1$ を満足する。したがって $1/T_1$ は主として τ_R 可能な局所運動による支配され、 $1/T_2$ は主に τ_R (集合体全体の回転運動) によって決定され、 $T_1 \gg T_2$ という測定結果は当然予測される。一方 $a = 35 \text{ \AA}$ の球では (20°C) 水中で $\tau_R = 5 \times 10^{-8} \text{ s}$ となり $\omega_0 \tau_R = 1$ の条件を満たす。ミセルではその半径は 35 \AA に近い値をとっていること、有機溶媒の γ は水の γ より小さい

11とより、(2)式の第1項は第2項に比べて、必ずしも十分大きくはなり得ないと思われ、 $1/T_1$ と $1/T_2$ との差が小さい事実はこの予想とよく合った共振周波数の分布を無視したとき ($T_2 = T_2^*$) を支持している。

また、 T_1 が、二層膜とミセルとにおいてよく似た値を示すことより、この2種の集合体において、局所運動は同質であるとみなすことができ。

次に、 T_c 以上において、 $(1/T_2 - 1/T_1)$ の大きさをみると、DPPC = 二層膜の値が、卵黄レシチン = 二層膜の値より大きい。これは式(1)より、 $S^2 \tau_R$ の違い、すなわちDPPC = 二層膜の径が、卵黄レシチン = 二層膜の径より大きい。という場合と、DPPC = 二層膜における τ_R の方が大きい場合と二通り考えられる。このうち、DPPCと異なり卵黄レシチンの炭素鎖は不飽和脂肪酸を含んでいることと、 T_c の値がDPPC = 二層膜の方が卵黄レシチンより高く同一温度においてはDPPCの方が T_c に近いことより S の値が卵黄レシチンにおけるより大きいことは十分考えられる。

二層膜とミセルの T_1 を比較する

と前述のように逆い値ではあるが、二層膜における T_1 の方がミセルにおけるより大きい。ミセルの中では、炭素鎖は二層膜中より自由度が大きいと予想されるが、極性部は逆ミセルの大きな曲率のため空間的にのみ自由度が小さいと考えられる。

今回の実験では以上のようにより二層膜の ^{14}N NMR スペクトルが T_1 を含めて観測された。しかも、二層膜とミセルの両方の系を観測周波数7MHzで測定したことより、ほゞ局所運動と集合体全体としての運動を分け考察するのに好都合であった。また、 ^{14}N は相互作用を考ふる際重要な核であり、我々により二層膜と薬品との相互作用系について研究がある。

参考文献

- (1) 倉沢・田中・豊井、第16回NMR討論会(1977年、京都)
- (2) U. Henriksson et al., J.Phys.Chem. 81, 76 (1977) 等

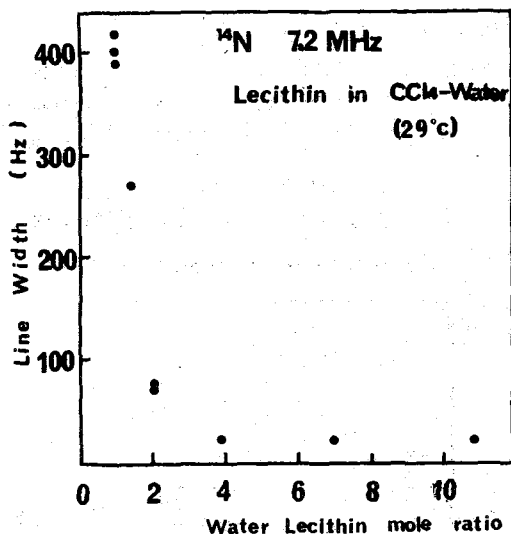


Fig. 3. Line widths of ^{14}N NMR spectra of Lecithin in CCl_4 -Water at various water concentrations

Table 1. T_1 and T_2 of lecithin-organic solvent-water micelle

solvent	T_1 (ms)		ΔE_a ($\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$)	T_2 (ms)		ΔE_a ($\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$)
	29°C	50°C		29°C	50°C	
Chloroform	36	—	—	32	—	—
Benzene	34	48	13	29	40	13
Carbontetra chloride	24	39	19	19	32	20

212 Phosphatidylcholine vesicle の選択的 ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ NOE

理 研 鷗沢 洵, 柴田 俊之

Introduction

^{31}P 磁気共鳴の chemical shift の異方性, ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ Nuclear Overhauser Effect (NOE) 等によってリン脂質 bilayer の親水基の conformation と運動状態に関する研究が進展している。リン脂質の親水基の構造解析は無水の状態ですら、単結晶が得難いため phosphatidylethanolamine (PE)-酢酸 complex の X 線回折 (Hitchock)、phosphatidylcholine (PC) のエネルギー計算による研究 (Sundralingam) など数少く、今後の研究が待たれている現状である。 ^{31}P 共鳴, ^{14}N 共鳴はリン脂質親水基の局所的 conformation, 運動状態を知る上で有望な手段を提供すると思われる。Yeagle らは D_2O 中での PC vesicle の ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ NOE の研究を行い、 ^{31}P の NOE Enhancement (NOEE) 40% のうち 30% は $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ からの寄与であり、extreme narrowing の条件が成立するときに期待される値 $\text{NOEE} = 124\%$ よりも小さい原因は $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 基の束縛された運動であるとした。

我々は PC の ^{31}P - $\{^1\text{H}\}$ NOE と ^{14}N 共鳴から得られる polar head の運動性とを結びつけて研究を行った。特に今回は egg PC polar head に対する水の効果をj知るために、無水 PC に D_2O を添加した後、重クロロホルム中に溶解し、inverted micelle の状態 (図 1) で、 ^{31}P , ^{14}N 共鳴の測定を行った。PC はクロロホルム中で、60~70 分子が会合した球状ミセルの状態にあると考えられている。⁴⁾

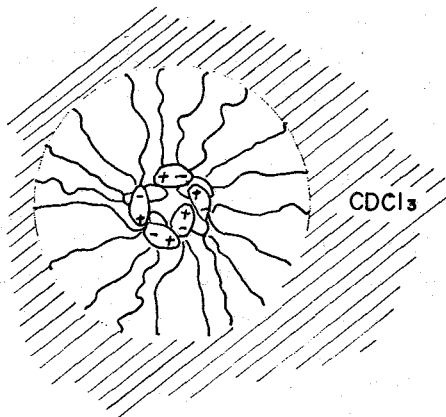
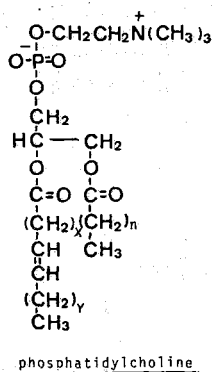


Fig. 1

Experimental

測定は JEOL FX-100 spectrometer と Multinuclear Observed System を組み合わせて行った。selective NOE の測定には鷗沢²⁾が selective ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE の実験に用いた low power ^1H irradiation unit を使用した。 ^{31}P の測定はパルス繰り返し時間 3.6 sec, flip angle 45° , 積算回数 100 回で行った。 ^{14}N の測定はパルス繰り返し時間 0.12 sec, flip angle 45° , 積算回数 2 万回で行った。

egg PC は Singleton らの方法により卵黄から抽出した。試料は dry PC に既知の D_2O を mix した後、 CDCl_3 に溶解した。dry な egg PC は約 1% の H_2O を含んでいる。

うざわ じゅん, しばた としゆき

Results and Discussion

(1) ^{14}N 共鳴

図2はPCのpolar headの先端近くに位置する ^{14}N 共鳴のスペクトルの半値中と温度の関係である。 ^{14}N と ^1H とのcouplingは ^1H に対するnoise decouplingで除いてあるので、半値中の大きさを決めているのは、分子運動によってmodifiedされた極四重極相互作用のみである。分子の回転運動の相関時間 τ_c が $\omega^2\tau_c^2 \ll 1$ の条件を満たす時、極四重極相互作用によるスピン-スピン緩和速度($\propto \Delta\omega$)は

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{40} \frac{2I+3}{I(2I-1)} \left(1 + \frac{\gamma^2}{3}\right) \left(\frac{e^2Qq}{h}\right)^2 \tau_c \quad (1)$$

である。ここで e^2Qq/h は四重極結合定数である。 ^{14}N の幅の変化の原因として、電場勾配 q の変化と分子運動の変化を考へなければならぬ。分子運動に関しては、lipidが会合した球状ミセルでは、分子の内部運動とミセル全体の媒質中での回転運動の両方を考へなければならぬ。ミセル全体の回転運動は

$$\tau_c = \frac{4\pi^2 a^2}{3kT} \quad (2)$$

で与えられる。 a は球状ミセルの半径である。

図2の如く $\Delta\omega$ vs. $1/T$ の関係が直線にのって

ないのは内部運動の寄与によるものと思われる。温度の上昇に伴って内部運動が活発になっている。

図3は 26°C における、半値中と添加した D_2O の濃度との関係である。 $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 基のN atomの周りの電子分布はもともとかなりsymmetricだと思われる。 D_2O が結合したために電場勾配が減少するとは考へ難い。従って D_2O の添加によって幅が減少したことはpolar headの運動が次第に活発になっていることを示している。四塩炭素中のPCのプロトンNMR⁵⁾によって H_2O は PO_4^- に水素結合すると推定されている。 D_2O は PO_4^- と $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ の静電的相互作用を弱めその結果、運動性が増すと思われる。

(2) ^{31}P 共鳴

Table 1は無水PCの CDCl_3 中でのnoise変調された連続波で照射したときの $^{31}\text{P}-\{^1\text{H}\}$ NOEEの値である。温度と共にNOEEの値が増大している。PCミセルの運動は束縛されていて測定

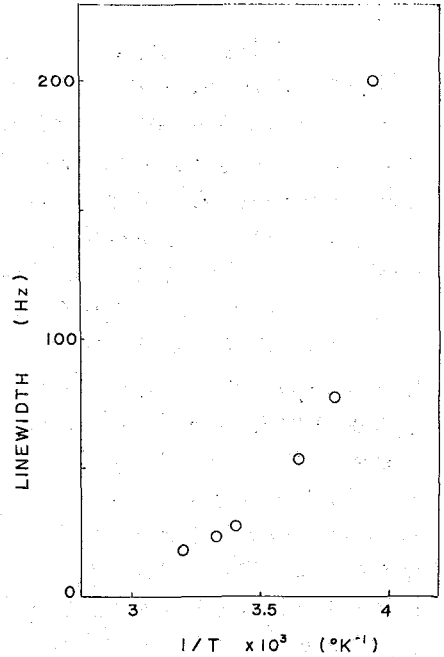


Fig. 2. ^{14}N のlinewidth, PC in CDCl_3 , 無水.

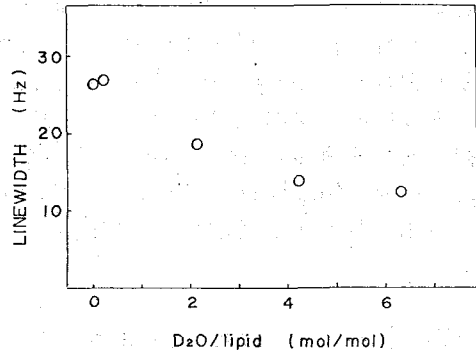


Fig. 3 ^{14}N のlinewidth, 26°C .

の温度範囲では extreme narrowing の条件 $\omega_0^2 \tau_c \ll 1$ は満たされて
 いる。温度の上昇とともに、 $\omega_0^2 \tau_c \ll 1$ の条件の時の NOEE の値

$$\text{NOEE} = \gamma_H / 2\gamma_{31P} = 1/24\%$$

に近づくことが示される。

図4は 12°C と 38°C における $H_2 = 5 \text{ mG}$ の連続波の照射による選
 択的 $^{31P}\text{-}\{^1H\}$ NOE である。NOEE のピークは $N^+(\text{CH}_3)_3$ 上には

なく、むしろ PO_4^- に隣
 接する CH_2 基による NOE
 が支配的であることを示し
 ている。 $N^+(\text{CH}_3)_3$ の上に
 小さい“肩”が認められ、
 $N^+(\text{CH}_3)_3$ からの NOE へ
 の寄与があることがわかる。
 従って CDCl_3 中において
 $N^+(\text{CH}_3)_3$ 基は PO_4^- 基の近く
 に位置していることになる。
 12°C から 38°C への温度の
 上昇によってピーク値は
 30% から 35% へ、 $N^+(\text{CH}_3)_3$
 上の肩は 18% から 28% へ
 増加しており $N^+(\text{CH}_3)_3$ からの
 寄与の増大が顕著である。

このことは図2の ^{14}N
 の幅の結果と考へ合わせ、温度の上昇によって特
 に polar head の先端の運動性が増してゐるこ
 とを示しているのかもしれない。

図5は $^{31P}\text{-}\{^1H\}$ NOE (noise irradiation)
 に対する D_2O の影響である。図3の如く ^{14}N
 の運動性は添加した D_2O の量とともに増大して
 いる。従って Yeagle らの考へに従えば、NOE
 は D_2O の量とともに増大するはずであるが、図5
 の様に実験結果は D_2O の添加によって逆に減少
 している。図5の結果の説明として (1) polar
 group の conformation が変化して $N^+(\text{CH}_3)_3$
 その他からの寄与が減少した。(2) PO_4^- に結合
 していた少量の H_2O (“無水 PC” は約 1% の H_2O
 をもっている。) が D_2O に置き変わったため、 H_2O
 からの NOE への寄与が減少した、の二つの可能
 性が考へられるが現在検討中である。

Table 1

$^{31P}\text{-}\{^1H\}$ NOEE	
温度(°C)	NOEE (%)
12	47
26	57
38	62

SELECTIVE $^{31P}\text{-}\{^1H\}$ NOE

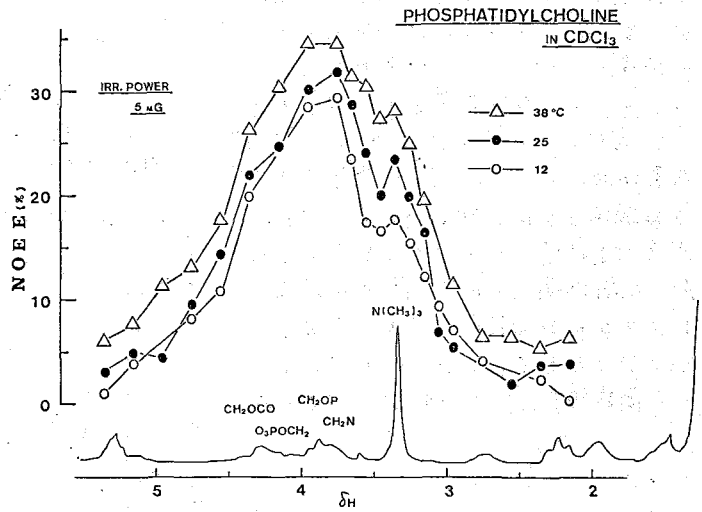


Fig.4 選択的 $^{31P}\text{-}\{^1H\}$ NOEE

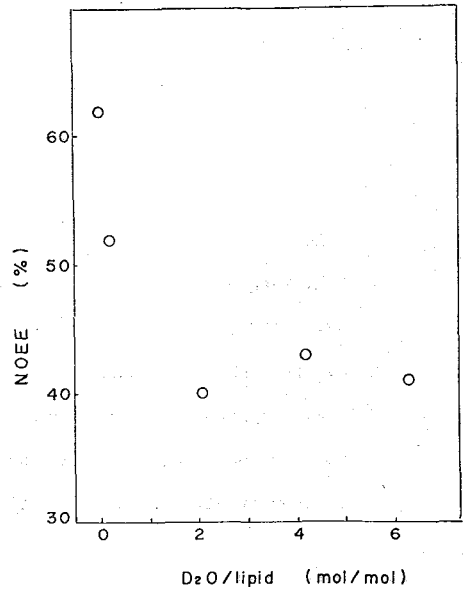


Fig.5 $^{31P}\text{-}\{^1H\}$ NOEE, 38°C.

(3) chemical shift

図6, 図7は ^{14}N と ^{31}P のchemical shiftと D_2O の濃度との関係を示している。 ^{31}P のchemical shiftは85%無機リン酸を external referenceとした。 ^{14}N は無水PCのシフトを基準にした相対的なchemical shiftである。いずれも正の方向が高磁場シフトを表わしている。 ^{31}P のshiftは高磁場シフトと低磁場シフトの二つの現象が存在するようである。四塩化炭素中のPCのプロトンNMRの研究でShawらは H_2O の水素結合によって PO_2^- に隣接する CH_2 基は低磁場シフト、 N^+ に隣接する CH_3 , CH_2 基は高磁場シフトすることを示した。 ^{14}N の高磁場シフト, ^{31}P の低磁場シフトはプロトンNMRと同様に水分子のeffectと考えて良いかもしれなり。 ^{31}P の高磁場シフトの原因は不明である。

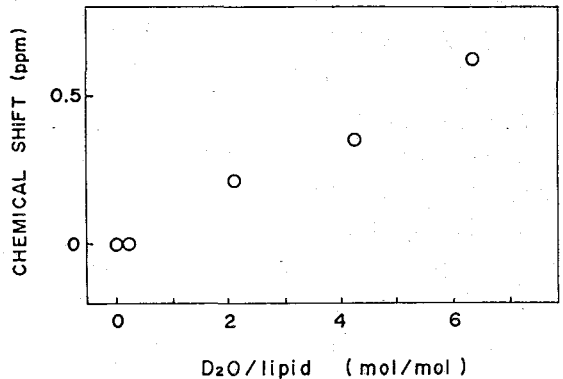


Fig.6 ^{14}N のchemical shift. 正の方向は upfield shiftを示す。

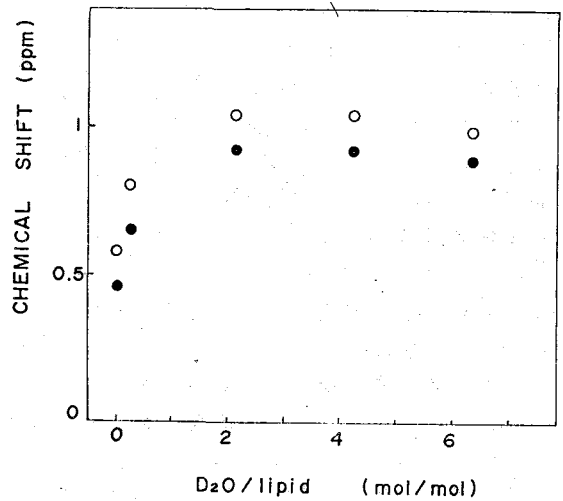


Fig.7 ^{31}P のchemical shift. 正の方向は upfield shiftを示す。 (○) 26°C, (●) 38°C。

Reference

1. P.L. Yeagle et al.; Proc. Nat. Accad. Sci. USA 72 3477 (1975), Biochemistry 16 4344 (1977)
2. J. Uzawa and S. Takeuchi; Org. Mag. Res. in press
3. W.S. Singleton et al.; J. Amer. Oil Chem. Soc. 42 53 (1965)
4. Y.K. Levine et al.; Biochemistry 11 1416 (1972)
5. Y. Shaw et al.; J. Mag. Res. 12 209 (1973)

常磁性金属酵素を含んだ水のプロトン緩和

(京大理・京大工²・滋賀医大)○ 遠藤一夫・小川諭²・森島系²・佐伯行一²
岩城正佳²・野崎光洋

序) NMRの創始以来、常磁性金属イオンを含んだ水のプロトン緩和の研究は、数多く報告されている。近年X線回折による酵素の立体構造解析の急速な進歩により、酵素反応機構の研究が、本質的な段階にはいらてきた。そこで演者らも常磁性金属イオンを

持った酵素の反応機構を知る上で、鉄イオンを持った常磁性金属酵素を含んだ水のプロトンの緩和時間を測定した。酵素は酸化、高スピン型($F_{22}^0, S=5/2$)のハム酵素西洋わかさびペルオキシダーゼ(HRP)、非ハム鉄プロトカテキナーゼ₃・4ジオキシゲナーゼ(PCCase)及び非ハム鉄プロトカテキナーゼ(PCCase)を用いた。酵素溶液の水のプロトンのスピン格子緩和時間の周波数依存性(5~100MHz)及び温度依存性(5~40°C)を調べた。この実験値に対する、理論的解釈については、問題点があるが、測定値はSolomon-Bloembergenの式によって解析された。HRPを含んだ試料の解析は検討中であるが、PCCase及びPCCaseを含んだ試料では鉄イオンに水分子が配位していることが分かった。

方法)

HRPはジマタイプロVIを直接0.1M, PH=7.0 リン酸緩衝液に溶かしたものを用いた。その酵素濃度は、2.5mMである。又PCCase及びPCCaseは50mM, PH=8.5 トリス塩酸緩衝液にし、酵素濃度はPCCase及びPCCaseは1.93及び1.28mMにした。周波数依存性は、(5~60MHz) Bruker K-100 NMR (阪大・産研・桐山研究室)により、100MHzはJEOL-PS100 NMRによる。T₁は(180°-τ-90°)パルスシーケンス法で、T₂はCPMG法で測定した。

結果及び考察)

1. 理論的背景

常磁性金属イオンを含む水のプロトン緩和は、

$$1/T_{ip} = f_{pr} / (T_{1M} + T_M) \quad (1)$$

で与えられる。(ここでT_{1M}は金属イオンのみによる与えられる緩和時間、T_Mは化学交換速度、f_{pr}はモル分率である)

常磁性鉄イオンを含む水の系では、たいていT_Mは、鉄イオン中の電子スピン緩和時間によって支配されるので、T_{1M} >> T_Mで系結局

$$1/T_{ip} = f_{pr} / T_{1M} \quad (2)$$

が与えられる。

○ えんどうがづなが・おがわさとし・もりしまいさお・さえきゆきかず・いわけまさよし
・のぞきみつひろ

このT_{1M}についてS=5/2の常磁性金属イオンを含んだ水のプロトン緩和の式は Rubinstein¹⁾によって与えられているが、Z.F.F. (quadratic zero field splitting) << ω_s (電子スピンラモア周波数) 及び 電子スピン緩和時間 T_{1eλ} = T_{2eλ} (λ=1, 2, ...) を用いるば Solomon-Blaumbergenの式に帰着できる。
 さらに ω_s >> ω_L を用いて

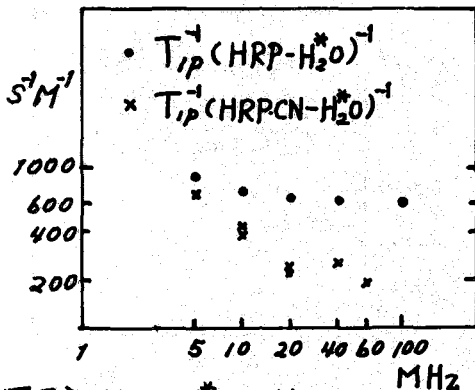
$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{20\pi^2 \omega_s^2 h^2 S(S+1)}{15\tau_c} \left\{ 3\tau_c + \frac{7\tau_c}{1 + \omega_s^2 \tau_c^2} \right\} + \frac{2}{3} S(S+1) \frac{A^2}{h^2} \left\{ \frac{\tau_c}{1 + \omega_s^2 \tau_c^2} \right\} \quad (3)$$

となり、今回の測定値は⁽¹⁾(2), (3)式によって解析された。

[表I] 水及びFe³⁺付した酵素を含んだ水の
 プロトン緩和時間

試料	温度	¹ H周波数 (MHz)					
		5	10	20	40	60	100
H ₂ O*	(20°C) T ₁	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25
HRP-H ₂ O*	(20°C) T ₁	0.45	0.53	0.58	0.60	0.61	0.62
	T ₂			0.22	0.24	0.25	
HRPCN-H ₂ O*	(20°C) T ₁	0.51	0.82	1.12	1.18	1.23	
	T ₂			0.28	0.29	0.26	
PC ^{III} -H ₂ O*	(23°C) T ₁	0.10	0.12	0.14		0.16	
PCA ^{III} -H ₂ O*	(23°C) T ₁	0.080	0.087	0.097		0.12	
PC ^{II} -H ₂ O*	(23°C) T ₁	0.60	0.76	0.83		0.98	
PCA ^{II} -H ₂ O*	(23°C) T ₁	0.43	0.52	0.70		0.80	
PCA ^{III} EI-H ₂ O*	(23°C) T ₁	0.14	0.17	0.19		0.17	
PC ^{III} ES-H ₂ O*	(23°C) T ₁	0.12	0.13	0.15		0.17	
PCA ^{III} ES-H ₂ O*	(23°C) T ₁	0.083	0.098	0.107		0.132	

ただし PCA^{III}EI-H₂Oの系では PCA濃度 1.16 mM.



〔図1〕 $\text{HRP-H}_2\text{O}$ と $\text{HRPCN-H}_2\text{O}$ の水プロトン緩和速度の周波数依存性

2. $\text{HRP-H}_2\text{O}$ の系

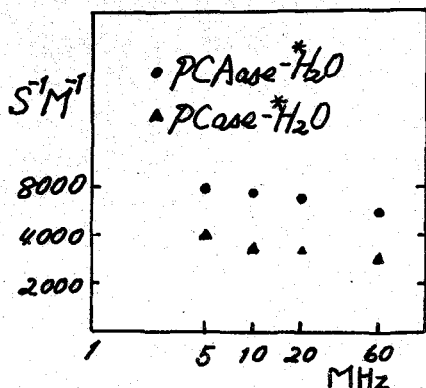
過酸化水素分解酵素 HRP の酸-アルカリ転移は、メチオグロビン (met Mb) に比べて高い pH で起こること (HRP pK11, met Mb pK 8.9), 又外部配位子 (CN⁻, F⁻ など) との結合定数が pH に依存することなどから、第六配位子としてチロシンなどのアミノ酸残基の可能性も示唆されているが、我々は、HRP がハム鉄第六配位子に水分子を持つと推定し、酵素溶液の水プロトンの緩和時間を測定した。表1及び図1に

酵素及び酵素シアン錯体の水プロトンの緩和速度の周波数依存性を示した。図1の水プロトン核緩和への酵素の寄与 $T_{1\rho}$ は、リン酸緩衝液の水プロトン $T_1 = 2.2\text{S}$ を差し引くことにより算出した。HRP-CN 錯体 ($S = 1/2$) - 水の系では、異常な周波数依存性がある。又演者らは、 $\text{HRP-H}_2\text{O}$ の系及び $\text{HRP-CN-H}_2\text{O}$ の系共に 5MHz 付近で磁化ベクトルの奇妙な挙動を観測した。 $\text{HRPCN-H}_2\text{O}$ の系は、 $S = 1/2$ であるから測定値は、(3)式に従う結果になるはずである。 HRP は ZFS が ($\omega_s \approx 10^9 \text{ Hz}$) にかなり近いことから、理論式として Rubinstein らの式 ($\omega_s \gg \text{ZFS}$ でなく ZFS が ω_s に比べてかなり小さい) や Solomon-Bloembergen の式を用いることができない。 従って $\text{HRP-H}_2\text{O}$ 系についての解析は検討中である。(以上下線の部分は講演の時に、もう少し詳しく述べた。))

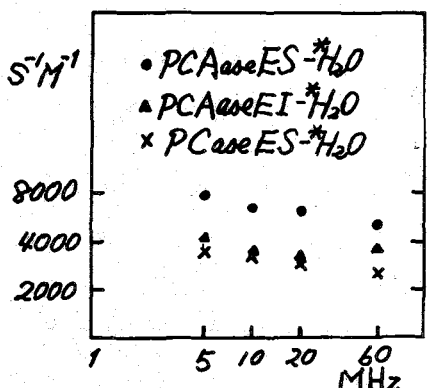
3. PCase 及び PCAase を含んだ水の系

非ハム鉄二原子酸素添加酵素 PCase 及び PCAase は、カテコール体の水酸基の間を開裂する反応を触媒とする二原子酸素添加酵素であり、共に三個の非ハム鉄を唯一の補因子として持っている。PCAase は分子量 700,000 で $\alpha_2\beta_2$ のプロトマー 8ヶからできており、酵素 1モル当り 8ヶの Fe^{II} を持っている。PCase は分子量 63,000 で酵素 1モル当り 1ヶの Fe^{II} を持ち $\alpha\beta$ のサブユニット構造を持っている。龍野ら²⁾によると、共鳴ラマンスペクトルの解析から PCAase の鉄の配位子の一つが酵素タンパクのチロシン残基であることを明らかにした。

PCAase 及び PCase の ZFS は実測周波数領域における ω_s より小さいと云えるので、これらの系に対しては Solomon-



〔図2〕 PCAase-H₂OとPCase-H₂Oの水プロトンの緩和速度



〔図3〕 酵素基質複合体-H₂Oの水プロトンの緩和速度

Bloembergen式が充分用いられることと考えられる。測定値は表1にPCAase-H₂O及びPCase-H₂Oの系が図2に示されている。その緩和速度は、それぞれ還元型酵素の緩和への寄与を引くことにより算出された。図3は、同様な緩和速度の周波数依存性が酵素基質複合体について表わされたが、理論値の比較からPCase, PCAase共に金鉄に水分子が配位していることが分かった。そのFe^{III}と水プロトンとの距離を表2のように概算することができた。

(文献)

- 1) Rubinstein et al. Mol. Phys. 20, 67 (1971).
- 2) 龍野・佐伯・岩城・野崎ら J. Am. Chem. Soc. 100, 4614 (1978).

(謝辞)

Bruker SXP4-100 NMRの測定に関し、充分協力を下さった村山清子先生、又測定に助力して頂いた吉川助幸に深く感謝致します。

	r(H ₂ O... Fe ^{III}) Å	
	g=1	g=2
PCase	2.8	...
PCAase	2.5	2.8
PCES	2.9	...
PCAES	2.6	2.9
PCAEI	2.7	3.0

(ただし $\tau_c = 0.9 \times 10^{-11}$ s)

g=2 $S = \frac{5}{2}$

〔表 2〕

214 ^{31}P -NMR 法による細胞内 pH 測定

(京府医大)・吉崎和男, 西川弘恭, 山田誠二
(生理学研究所) 直弘

〔序〕細胞内 pH (pHi) の測定には、従来、微細ガラス電極法や DMO (5,5-dimethyl-2,4-oxazolinedione) 法などが用いられてきた。¹⁾ 前者を用いる時、細胞膜電位の影響を除くための複合電極の製作や長時間にわたる電極の固定の困難さなど、多くの難点を克服しなければならぬ。しかもこの方法によると細胞の損傷は避けられない。一方 DMO 法は DMO の非解離型のみが細胞膜を透過することを利用し、細胞内外での解離平衡から細胞内 pH を求める方法である。この場合、DMO は生体にとって異物であることは否定できず、細胞内 pH の算出にあたっては細胞内・外液量の正確な測定と試料を木モジナイズして DMO の測定を行う必要がある。このように従来の細胞内 pH の測定は破壊的計測で、かつ高度な技術を必要とした。

最近、 ^{31}P -NMR 法により生体組織中の磷化合物の非破壊的測定が可能となり、著者らも報告してきた。²⁾ さらに無機磷酸の化学シフトが pH 依存性を示すことを利用し、細胞内の無機磷酸の化学シフトより細胞内 pH が非破壊的に、容易に測定できるようになった。本研究は、この方法を用いカエル筋肉の種々の条件下での細胞内 pH の変化を追跡した。

〔方法〕試料は食用カエルの大腿二頭筋の一対 (約 1.6g) を用いた。筋はリンゲル液 (pH 7.40 Tris buffer) とともに試料管に入れ、さらに 1M methylene diphosphonic acid と重水とを封入した毛細管を入れ外部基準とした。(通常、嫌氣的条件とする。) 装置は JEOL PFT-100 NMR (^{31}P , $\omega = 40.29$ MHz) で、測定は室温 (24°C) に 30° パルス を 1000 回積算 (約 30 分) してスペクトルを得た。

〔結果および考察〕1. 筋細胞内 pH 測定。カエル筋肉の磷のスペクトルを Fig. 1 に示す。左の低磁場側より外部基準の methylene diphosphonic acid (ext. ref.), 無機磷酸 (Pi), クレアチン磷酸 (C-P), および ATP の γ , α , β 位の磷のシグナルである。次に 10 mM 磷酸緩衝液の pH とそ

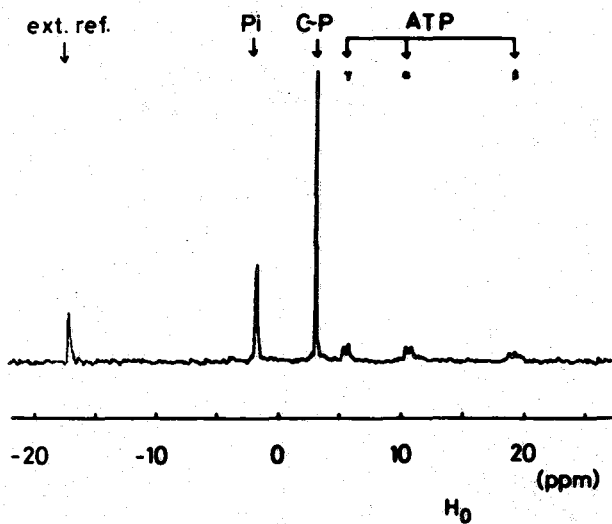


Fig. 1. Phosphorus spectrum of bullfrog muscle.

よしごき かずお, にしかわ ひろやす, やまだ せいじ, わたり ひろし.

の化学シフトを Fig. 2 に示す。
 点は実測値で、実線は第 1 磷酸
 イオンとオスリン酸イオンとが
 rapid exchange をなすとし、
 Henderson-Hasselbalch の解
 離平衡の式から得た式

$$pH = pK_2' + \log \frac{\omega_m - \omega_1}{\omega_2 - \omega_m}$$

より描いたもので、ほぼ一致し
 ている。なお K_2' は磷酸の第 2
 級の解離定数、 ω_1 , ω_2 は第 1
 および第 2 磷酸の化学シフトで、
 ω_m は測定される化学シフトで
 ある。筋肉内の無機磷酸の化学
 シフトは -1.79 ± 0.10 ppm で、Fig. 2
 より対応する pH を求めると、 7.32
 ± 0.10 となる (14例、新鮮の試料)。

2. 筋肉内 pH の不均一性の測定。

細胞内 P_i のシグナルは水溶液中の P_i のそれよりも中が広い。この原因として考えられる
 磁場の不均一性の寄与は Fig. 1 における C-mp のシグナルの半値巾が P_i よりも狭いゆえ否定
 できる。次に細胞内での P_i の運動の束縛度や、種々の交換反応などによる半値巾への寄与
 を見積るために、この緩和時間 (T_2) の測定を Meiboom-Gill 法で求めた。Fig. 3 に示
 す様に、79, 83, 78

msec となり、平均値
 80 msec である。
 これは 0.099 ppm の
 半値巾に相当する。
 細胞内の P_i の半値巾
 は 0.24 ± 0.07 ppm
 となり、0.099 ppm
 のシグナルが重たっ
 ているものと考えら
 れ、pH の不均一性
 を反映している。こ
 の不均一性 (ΔpH)
 は 0.24 pH unit と
 なる。

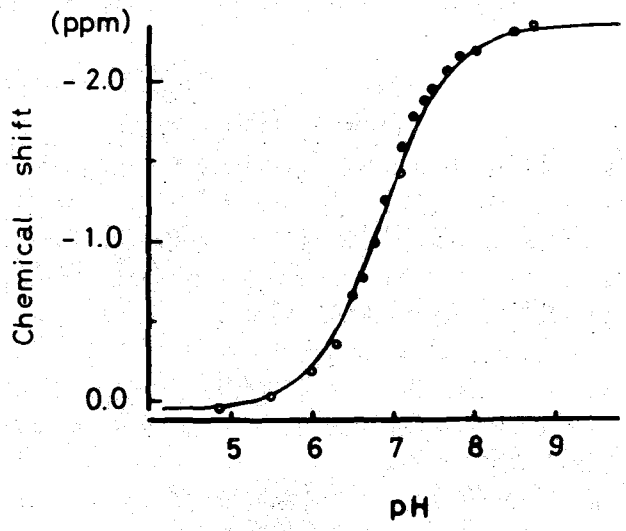


Fig. 2 pH titration curve of 10 mM P_i .

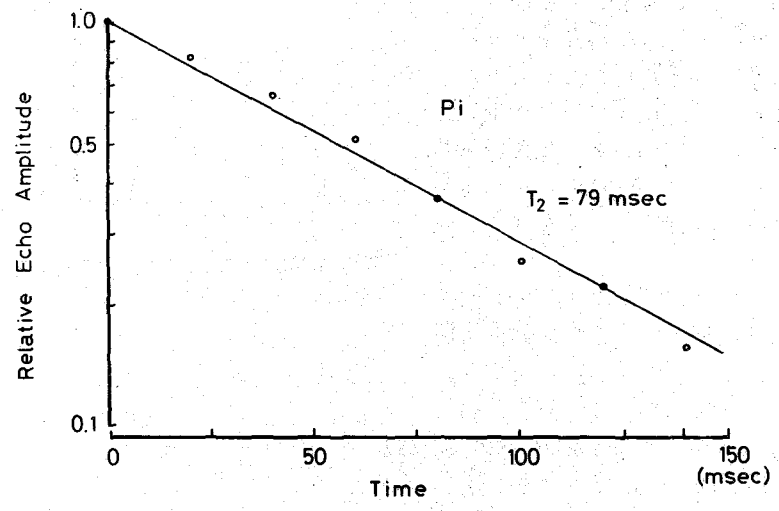


Fig. 3. Transverse relaxation rate of P_i in bullfrog muscle.

3. 嫌氣的条件下での細胞内 pH (pHi) とその不均一性 (Δ pH) の時間変化。

嫌氣的条件下の筋肉では、解糖系乳酸産生による緩徐な細胞内 pH の酸性化が認められ、 Δ pH は減少した (Fig. 4a)。解糖系をヨード酢酸 (IAA) で抑制するとこの酸性化は生じず、逆に若干のアルカリ化が認められ Δ pH は減少し、そして C~P が消失し、ATP が減少した直後に酸性化を生じた (Fig. 4b)。次に Lohmann 反応 ($C\sim P + ADP \rightleftharpoons C + ATP$) をジニトロフルオロベンゼン (DNFB) で抑制した場合、急速な細胞内の酸性化を認め、さらに ATP の減少とともに新しい酸性の分画の出現をみる (Fig. 4c, 5d)。この新しい酸性の分画はグリセリン処理にて筋肉内の横行小管系を破壊すると出現しなかった (Fig. 5b) ため、この新しい分画は細胞間に由来するものでなく細胞内に由来するものと考えられる。

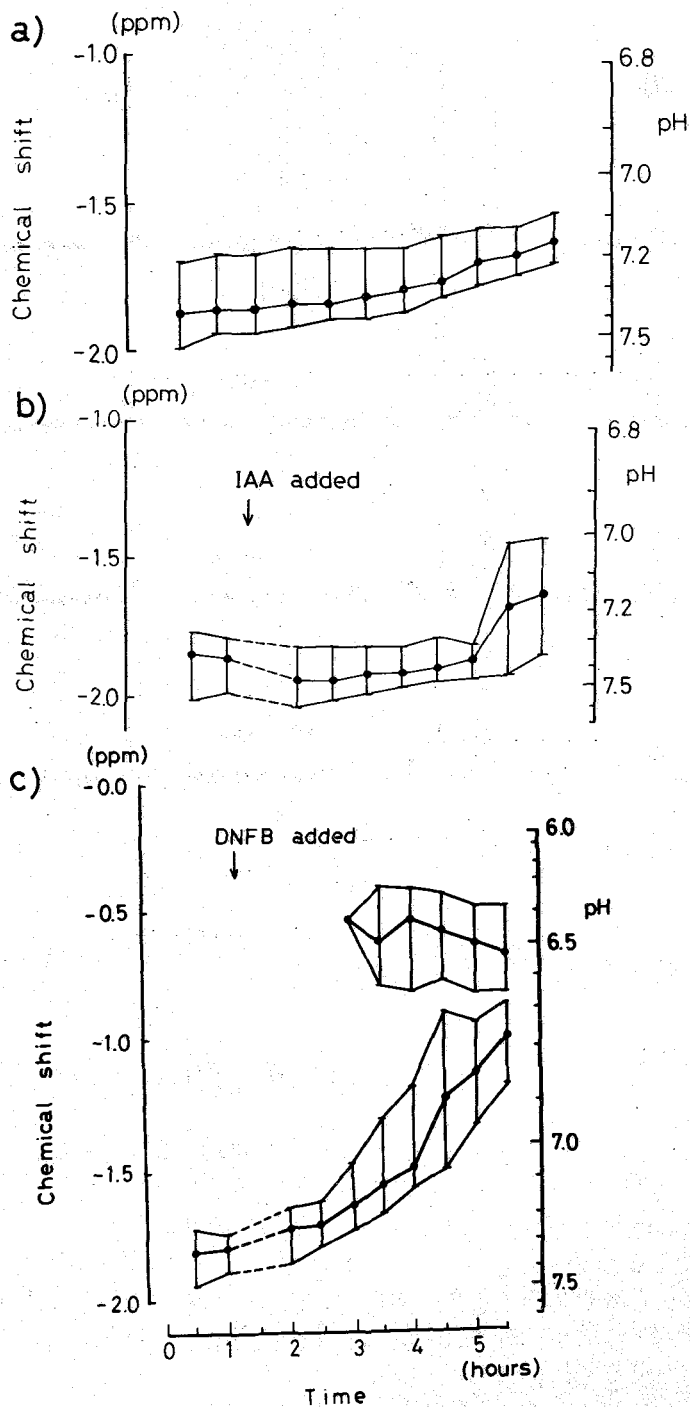


Fig. 4. Time course of pHi and Δ pH change on living muscle (a), IAA-treated muscle (b), and DNFB-treated muscle (c) under anaerobic conditions. The

solid point shows the chemical shift for the peak of Pi signal, and the bar shows that for the half-maximum height of it on both sides.

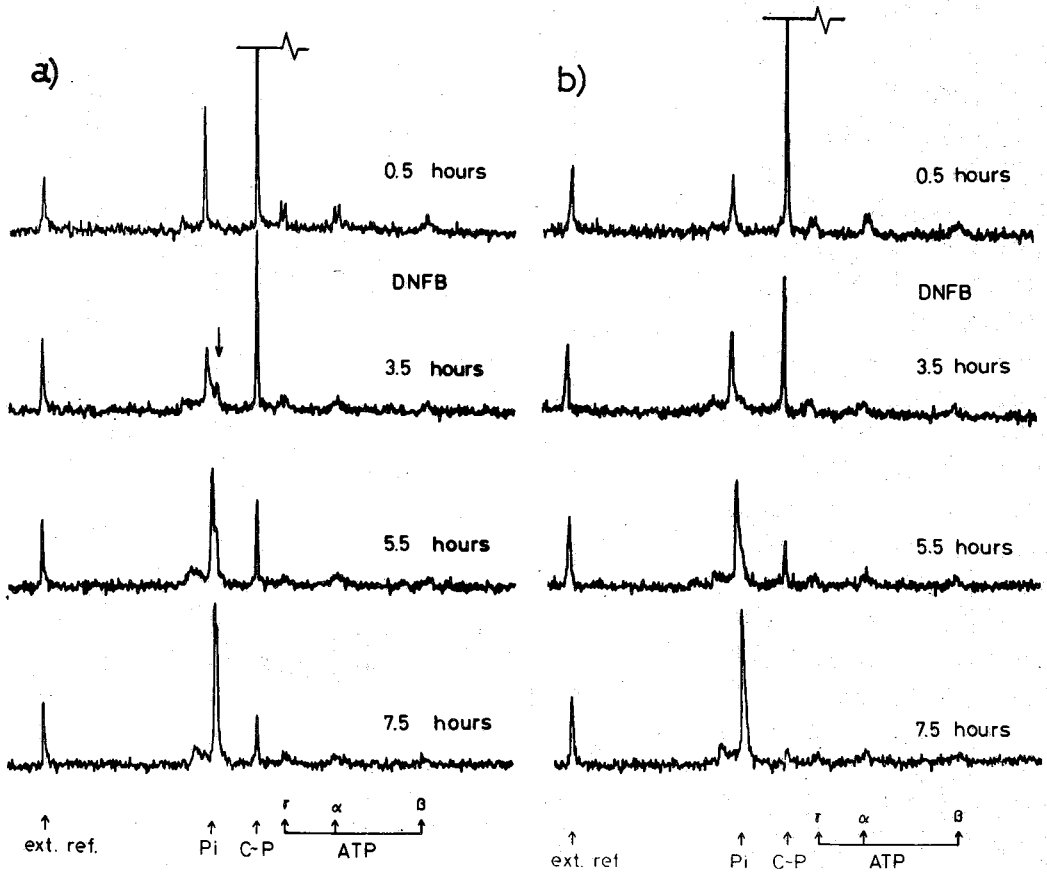


Fig. 5. The spectra of DNFB-treated muscles. a). The chemical shifts for Pi are plotted in Fig. 4c. b). The muscle was previously treated by glycerol to disrupt the transverse tubules.

【まとめ】

1. ^{31}P -NMR法を用いたカエル筋肉の無機磷酸の化学シフトから細胞内pHをもとめると7.3と行った。
2. 筋肉内無機磷酸のシグナルには磁場の不均一性や細胞内での分子運動などの緩和機構に由来するものではなく、筋肉内pHの不均一性(0.24 pH unit)を反映している。
3. 嫌気下での筋細胞内pHは、生筋では緩徐な酸性化を生じ、ヨード酢酸にて解糖系を抑制すると酸性化を生じずに若干のアルカリ化を生じた。ジトロロクロベンソンにてローマン反応を抑制すると急速な酸性化を生じるとともに新しい酸性の分画の出現をみた。この分画はグリセリン処理にて横行小管系を破壊した筋肉では出現せず、細胞内の分画に由来するものと思われる。

【文献】 1). 森本武利, 臨床生理 1, 378 (1971) 2). Yoshizaki, K., J. Biochem. 84, 11 (1978). 3). Eisenberg, B. and Eisenberg, R. S., J. Cell Biol. 39, 451 (1968).

215 ヒストンの folding 過程の ^{13}C NMR。ヘリックス後存ピークの影響

(国立がんセンター研)

○斎藤 肇, 見玉昌彦, 永田親義

1. はじめに

たん白の folding 過程の研究に、現在 ^1H NMR スペクトルが広く用いられている。 ^{13}C NMR は低分子量化合物の多数のスペクトル線の分離には強力な手段として認められているものの、高分子量の分子にはそれほど広く用いられていないわけでは無い。感度面の問題もさることながら、コンホメーション化学シフトとの関係が今ひとつ明確にされていないのも一つの要因であらうと考えられる。われわれは、ヒストンの folding 過程を調べる一助として、 ^{13}C NMR ビークとポリペプチドの骨格のコンホメーションとの関係をモデル系について求め、ヘリックス生成に伴って、 $\text{C}\alpha$: -3 ppm, $\text{C}\beta$: +0.6 ppm, $\text{C}=\text{O}$: -2 ppm の ^{13}C ビーク変化があることを報告した。実際にこのような変化がたん白において存在し続けるかどうか、あるいは存在するのであればヘリックス領域の同定に有用であるかどうか、を明らかにする必要がある。ヒストンは、有核生物の核クロマチンと構成する塩基性たん白で、分子量 1 万~2 万の H1, H2A, H2B, H3, H4 の 5 種類の成分の総称である。これは、イオン強度あるいは溶媒組成によって、folding 状態が変化することが知られており、上記の問題を解決するのには有用な系であることがわかる。ここでは、NaCl および、最大限に folding が進む 2-クロロエタノール溶液中での folding にもとづく ^{13}C NMR ビークの変化、とくにヘリックス生成シフトについて論じることにする。

2. 実験方法

ヒストンの抽出は、仔牛胸腺から Johnson の方法で行った。各分子種の分離はさらに、Bio Gel P-60, Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーにより行った。これらの分子種の純度は、SDS 存在下のポリアクリルアミド電気泳動法によって調べた。

水溶液中での ^{13}C NMR スペクトルの測定は、重水溶液 (220 mg/ml), pH 5 で、日本電子 PFT-100 スペクトロメーターによった。パルス・アングル 45° , クリカエシ時間 2 sec, 8000 データポイントを用いた。2-クロロエタノールの重水素化物が得られなかったため、プロトン NMR の場合と同様に、強い溶媒ピーク強度のためのベースラインのうねり、積算効率の低下がみられた。このため、 180° - 180° - 90° パルス・シーケンスを用いて、 $\tau = 500 \text{ msec} \sim 600 \text{ msec}$ の間各溶媒ピークの強度が最小になる条件を選んだ。ヒストンの種々の分子種の T_2 測定値を調べてみると、最も T_2 の長いものは Lys C ϵ : 350 msec, Lys C δ : 250 msec であり、その他のものは 150 msec であるから、この測定法でピーク強度に影響が及ぶのは、Lys C ϵ , Lys C δ およびフェニル、アルギニン C γ など 4 炭素のみである。

さいとう・はじめ, こだま・まさひこ, ながた・ちかよし

3. 実験結果と考察

A. 2-クロロエタノール中でのヒストンの folding

すでに, Boublíkら, Jirgensonsらによつて, 2-クロロエタノール中では, ヒストンのヘリックス含有量は50%に達することが報告されている。水溶液中ではこのよりは

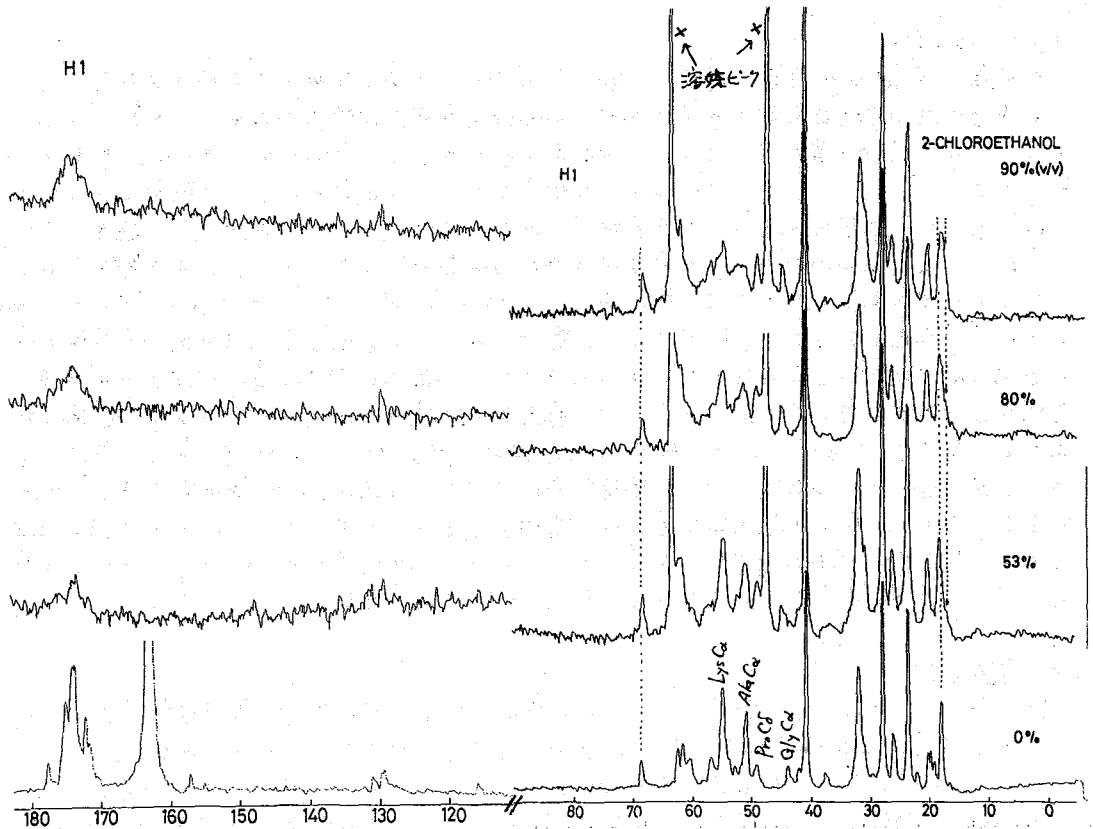


図1. 2-クロロエタノール中でのヒストンH1のfoldingに伴う¹H NMRスペクトルの変化 (100mg/ml)

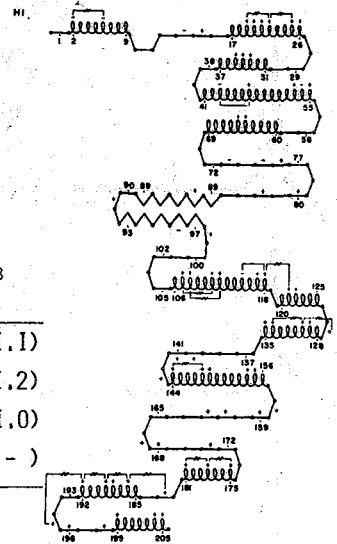
るかに低く, 分子種によつて異なるものの20%前後にすぎない。それゆえ, ヘリックス生成にもとづくピーク位置の同定には, 2-クロロエタノール中での測定がより有利であることは明らかである。

図1は, 2-クロロエタノール/D₂O混合溶媒系で, 2-クロロエタノールの組成を変えると, ヒストンH1のfolding状態が変化し, スペクトルピークにどのような影響を与えるかを調べたものである。最下段のスペクトルは, 重水のみでしかも0M尿素を加えて, 完全にランダムコイル化したものに由来する。50~60ppmのC α 領域をみると, 2-クロロエタノールの組成比が上昇するとともに, そのピーク強度が減少してゆくことがわかる。これはいうまでもなく, foldingによつて α mobilityを失い, 線巾の広がりと共に, NOEが減少するからである。しかし, Pro α , Gly α のピーク強度は, 2-クロロ

エタノールの組成比が上がることも、ほとんど変化していないことがわかる。これらの残基は、図2に与えた Fasman, Chou による二次構造の Prediction にあて、 β -turn 構造を作り、ヘリックス領域にくらべてより flexible な状態にあるためと考えられる。実際は、Gly, Ala の ^{13}C シフト

CONC. OF H4 の ^{13}C シフトの変化 (ppm from TMS)

2-CHLORO-ETHANOL	THR. C_β	GLY. C_α	TYR. C_β PHE. C_β ASN. C_β	LYS. C_β	ALA. C_β
90%	67.4(0.6)	43.8(-0.6)	35.7(1.3)	30.6(0.6)	16.2(1.1)
80%	67.5(0.5)	43.9(-0.3)	35.8(1.2)	30.7(0.5)	16.1(1.2)
53%	67.7(0.3)	44.2(-1.0)	36.1(0.9)	31.1(0.1)	16.3(1.0)
0%	68.0(-)	43.6(-0.4) 43.2(-)	37.0(-)	31.2(-)	17.3(-)



トは、上の表から明らかのように $0.6 \sim 1$ ppm の低磁場シフト(他のヒストン分子種についても同じ傾向)から図2. Fasman, Chou による H4 の二次構造の Prediction

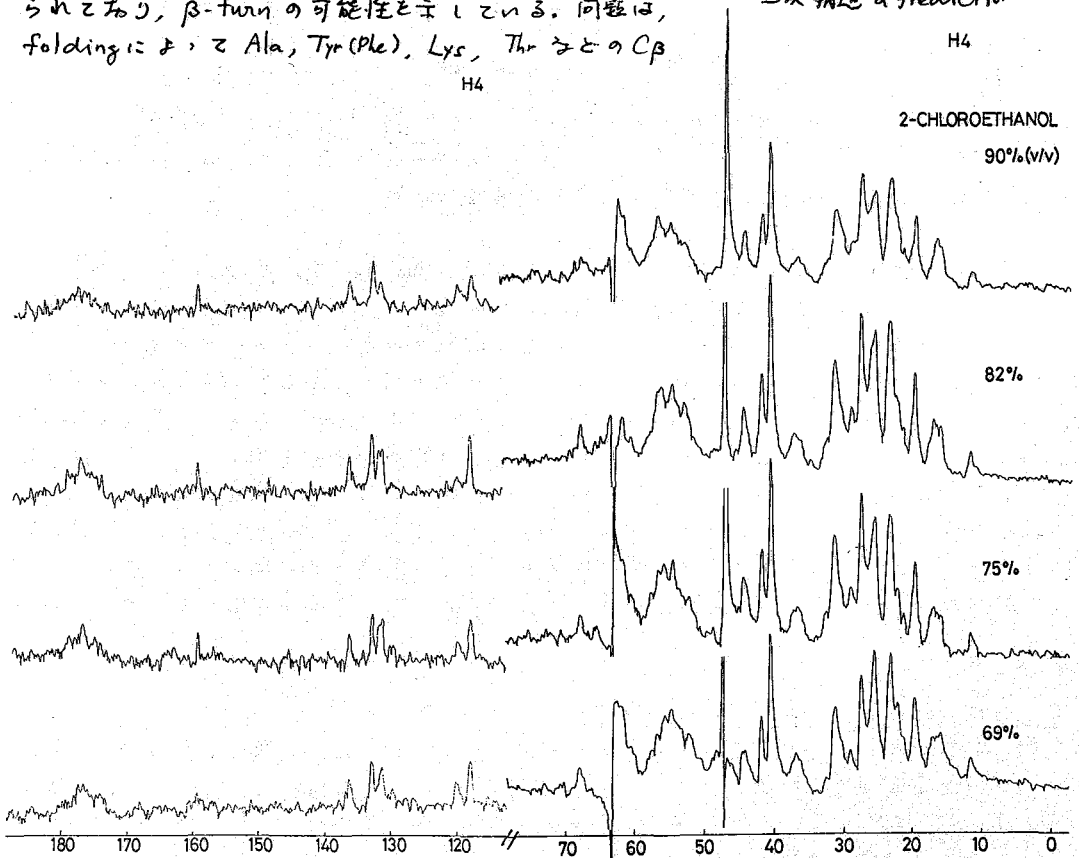


図3. ヒストン H4 の 2-クロロエタノール中の ^{13}C NMR スペクトル

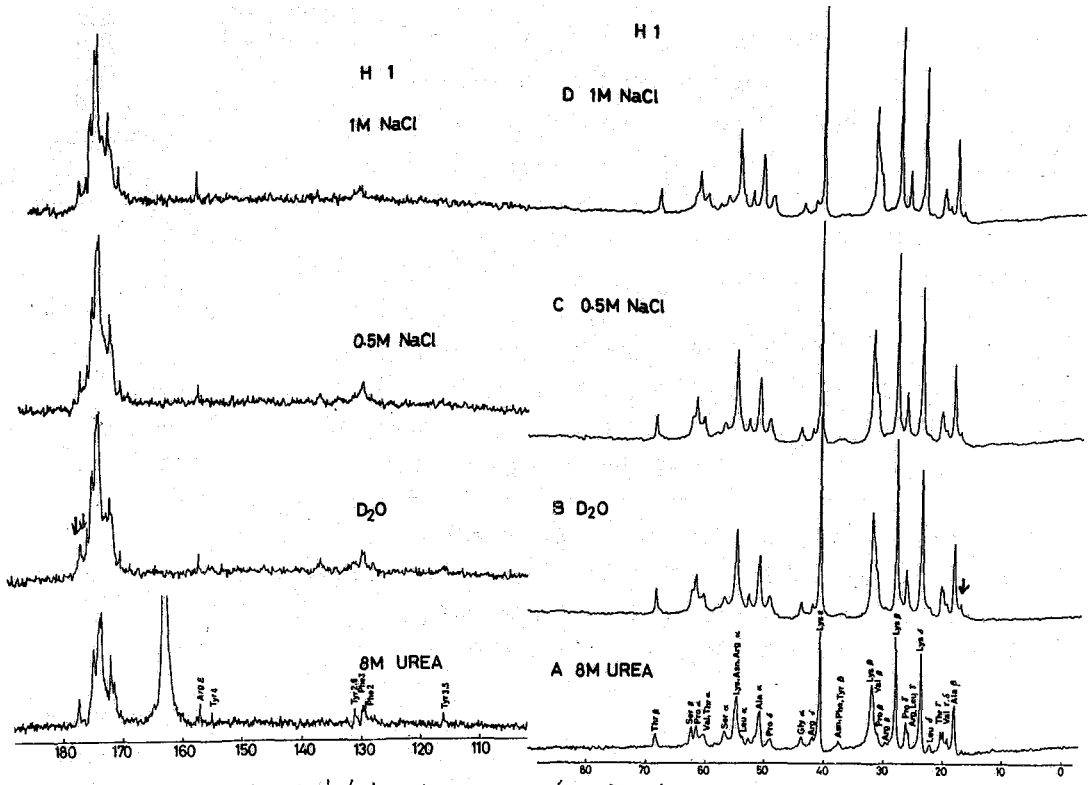


図4. ヒストンH1の水溶液中の¹³C-NMRと塩濃度の効果

シグナルが高磁場にシフトすることである。さらに、Ala Cp, Tyr, Phe, Asn Cpのように、2-クロロエタノールの濃度変化に対して変化しないものと、Lys, Thr Cpのように濃度に応じて変化することの二種類に分けられる。モデル系の研究から、言うまでもなくこの高磁場シフトはヘリックス生成に由来するわけだが、同じ傾向が図3に与えたH4においてもみられる。図1からわかるように、Ala Cpの場合、ヘリックスとランダムコイル構造とはslow exchangeで、2-クロロエタノール量に応じてピーク強度が変化している。一方、Thr, Lys Cpの場合は、fast exchangeにあるため、2-クロロエタノール含量が増加し、ヘリックス含有量が増加するにつれて高磁場シフトがみられるのである。それゆえ、これらの残基があるヘリックスの相対的な安定性にも関係するわけだ、図2のPredictionのうちでRで示した部位にあるとは、側鎖にあり同種向の静電反発のため、不安定なヘリックスを形成しにくいためである。

B. ヒストンH1の水溶液中での folding

図4に示すように、水溶液中での¹³C-NMRスペクトルは、図1と著しく異なる。これはヘリックス含量が著しく低いため、矢印のAla Cpのピーク強度は全体の14%しか占めない。図2のヘリックスのうち、最も安定なヘリックス領域は41-55, 60-69の4であり、この領域に存在するAla残基は15%と実験結果によく一致する。また、カルボニル部分にも矢印で示したヘリックス生成に由来するシフトがみられ、その値は-2 ppmである。

216 $^2\text{H-NMR}$. 生合成における $^2\text{H-}^{13}\text{C}$ スピンの結合の利用

(国立がんセンター研, 共立薬大)

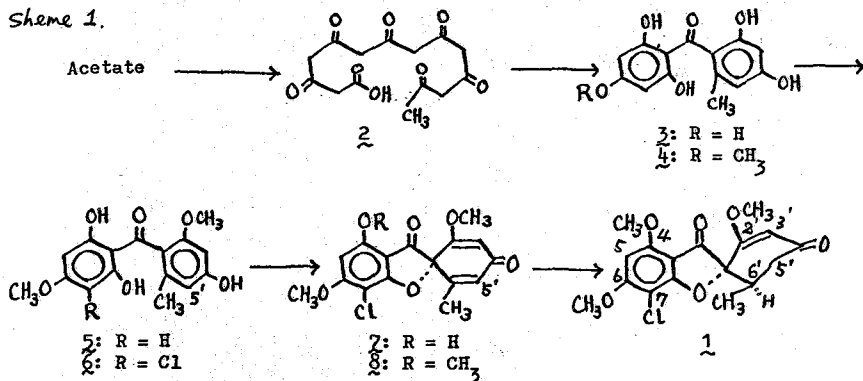
齊藤 肇, 宮田 栄一, 小田 泰子, 佐藤 良博

1. はじめに

生合成, 微生物変換過程で, 水素原子の挙動とくに立体化学的親和からの水素原子の動きを調べる上で, $^2\text{H-NMR}$ はきわめて有用であることが明らかになってきている。¹⁾ 特に, ^2H のとりこみが1%程度と非常に低い場合でも, 天然存在比の0.02%に比べて高く, また現在のNMRスペクトロメーターの感度で十分実験が可能である。これは ^1H , $^{13}\text{C-NMR}$ 法のような固着的な方法にまさる点である。

わかれはグリセオフルビン(2)の[2- $^2\text{H}_3$]酢酸塩からの生合成において, 6'-メチ

Scheme 1.



ル基の1個の水素が, 培地中の水と水素交換が起り得ることと, $^2\text{H-NMR}$ スペクトルから見出した。²⁾ これは, 6'-メチルが chain-starter グループであることと考えると, きわめて興味ある現象である。この点とさらに確認するために, (1) [2- ^{13}C , 2- $^2\text{H}_3$]酢酸塩, (2) 3-つの酢酸塩および培地中の D_2O , (3) [2- ^{13}C]酢酸塩および培地中の D_2O , の3種類のソースから ^2H 標識とうけたグリセオフルビンの $^2\text{H-NMR}$ の測定を行った。特に, (1)および(3)の実験では, ^2H に隣接した炭素が ^{13}C 標識とうけるため, $^2\text{H-}^{13}\text{C}$ スピンの結合による ^2H シグナルの分裂がみられる。それゆえ, $^2\text{H-}^{13}\text{C}$, $^2\text{H-}^{12}\text{C}$ のそれぞれに由来する ^2H を容易に識別することができるので, $^1\text{H-}^2\text{H}$ 交換交換の追跡に有用となるのである。

2. 実験方法

$^2\text{H-NMR}$ の測定は日本電子PFT-100スペクトロメーターを用い, 15.28MHz, パルスフリー交換法によった。試料はクロホルム溶液とし, 10mm o.d. NMR試料管に詰め, さらに磁場-同位安定用に C_6F_6 を数滴加えた。スペクトルの観測中は, 通常500Hz, 2Kデューポイント, くり返しし時間を2.25に設定した。このもののT₂は100m秒以下

さいとう・はじめ, みやた・えいいち, おだ・たけこ, さとう・よしひろ

下であるが、測定には90°パルス(28μs)を用いた。

グリセオフルビンの生合成実験では、通常の培地で7日間培養の後、それぞれ[2-¹³C, 2-⁴H]酢酸塩、酢酸塩+50% D₂O, [2-¹³C]酢酸塩+50% D₂Oを3.5倍培地に移しかえて3日間培養の後、グリセオフルビンと単離した。

3. 実験結果

A. [2-¹³C, 2H₃]酢酸塩より得た [1³C, 2H]グリセオフルビン

図1Aに二重標識したグリセオフルビンの²H NMRスペクトルを示す。図1Cの[2H]グリセオフルビンの²H NMRスペクトルと異なっており、¹³Cに結合したHシグナルは、

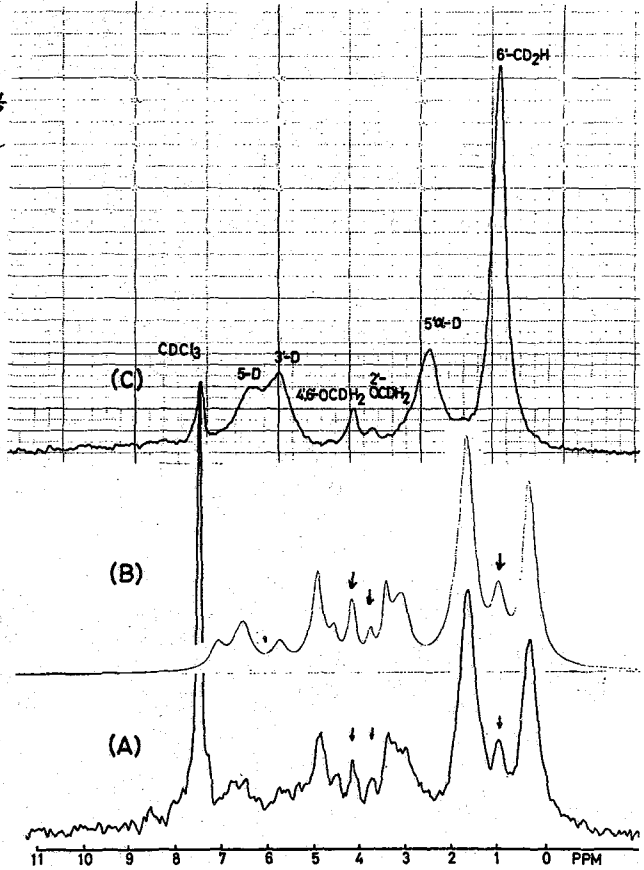


図1. [2H], [2H, ¹³C]-グリセオフルビンの²H NMRスペクトルおよびそのシミュレーション
(A) [2H, ¹³C]グリセオフルビンの²H NMR
(B) (A)のスペクトルシミュレーション
(C) [2H]グリセオフルビンの²H NMR.

¹³C-²Hスピンの結合により、必ず二本に分裂する。分裂の間隔 $J_{H-^{13}C}$ は、¹³C-¹Hスピン結合定数 J_{H-^1H}

$$J_{H-^{13}C} = \frac{1}{6.51} J_{H-^1H} \quad (1)$$

から、(1)式を用いて容易に求めることもできる。図1Cのパターンは比較的複雑であるが、グリセオフルビンの¹³C NMRを測定して $J_{H-^{13}C}$ スピン結合を求めておき、図1Cの[2H]グリセオフルビンの各ピークがそれぞれ $J_{H-^{13}C}$ により二本に分裂すると

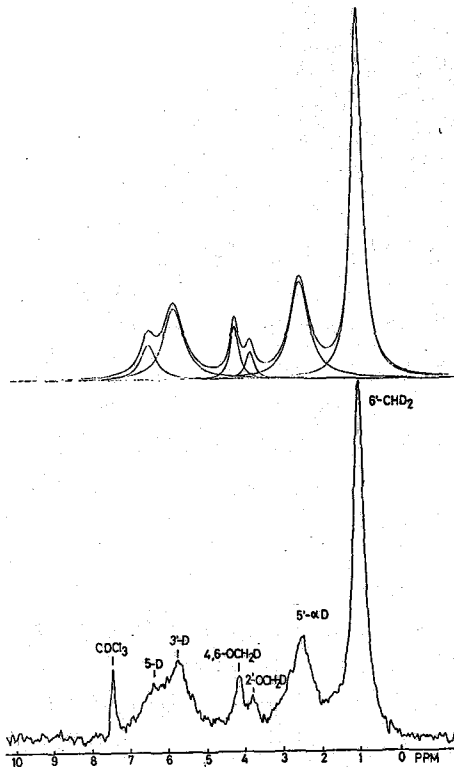


図2. [2H]グリセオフルビンの²H NMR (下段) とそのシミュレーション (上段)。

考えてスペクトルシミュレーションを行なうことにした。各ピークがローレンツ曲線からなると考えれば、スペクトルは

$$f_i(\omega) = \frac{2aT_2}{1 + 4\pi^2T_2^2(\omega - \omega_i)^2} \quad (2)$$

の重ねあわせによる。ここで線巾 $1/T_2$ 、化学シフト ω_i 、ピーク強度 a と実測スペクトルに合うよう選び、X-Y プロッターに書かせる。図2上段のスペクトルは、[2H] グリセオフルビンの¹H NMR計算スペクトルと各成分をアロツトしたもので、下段の実測値とよく一致している。同様の操作を [2H, ¹³C] グリセオフルビンに対して行ったのが、図1Bである。ただし、矢印で示した3本のピークは、シングレットピークで、¹³Cに隣接した¹Hに由来するものである。図1Cの [2H] グリセオフルビンの¹H NMRスペクトルと比較して、高純度側から、6'-メチル、2'-メトキシ、4,6-メトキシピークであることがわかる。2H-¹²C と 2H-¹³C の比は、スペクトルシミュレーションから容易に決定することができ、それぞれ 14.3%、30.4%、38.5% となる。前駆体の [2-³H₂, ¹³C] 酢酸塩についての上記の比は、²H NMRスペクトルのピーク強度比から容易に決定することができ、12.5% である。したがって、6'-メチルに関してはこの比は、原料もグリセオフルビンもほぼ同じであるに対し、メトキシに関してはグリセオフルビンの値が原料の2倍に達している。メトキシの²Hは直接酢酸塩に由来するのではなく、C-1 フェルを基由すると考えられるので、この 2H-¹²C、2H-¹³C の交換現象は毎当である。さらに、6'-メチルと 5'-²H の比は 2.3:1 と計算されるので、この割合も1個の²Hが¹Hに置換されていることがわかる。

B. 標識しない酢酸塩と培地の D₂O から得た [2H] グリセオフルビン

図3Aは 50% D₂O とよく培地から²H とリコんだグリセオフルビンの²H NMRスペクトルである。培地からの²H とリコぬは、2'-メトキシ、4,6-メトキシのみならず、6'-メチル、3'-²H、5'-²H にもあふんでいる。特に、6'-メチルに培地由来の水素が存在することは、前節のデータと一致し、より直接的な証拠となる。

C. [2-¹³C] 酢酸塩と培地の D₂O から得た [¹³C, ²H] グリセオフルビン

6'-メチルおよび 2'-メトキシ、4,6-メトキシの水素交換現象は、[2-¹³C] 酢酸塩によって作られた骨格に、培地からの²H

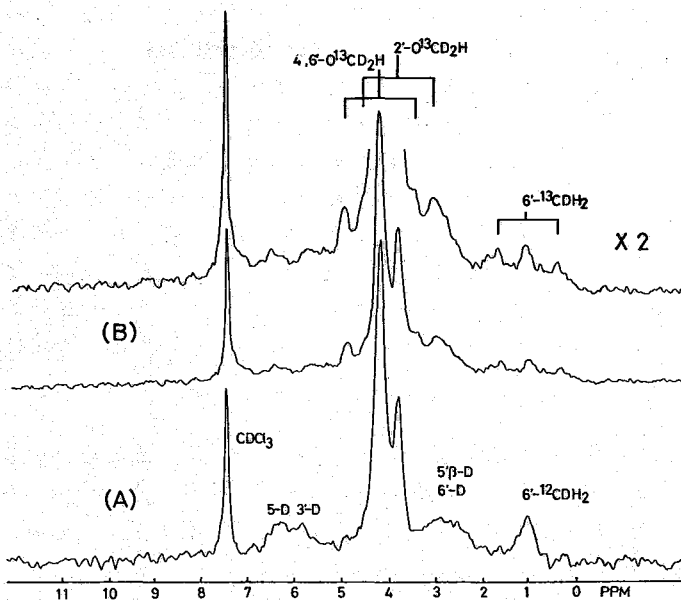


図3. (A) 培地の D₂O から得た [2H] グリセオフルビンの²H NMR。 (B) [2-¹³C] 酢酸塩と培地の D₂O から得た [¹³C, ²H] グリセオフルビンの²H NMRスペクトル。

が"ロック"して生成した ^{24}H - ^{13}C 結合にもとづく、スペクトル線の分裂を観測することにより明確になるであろう。上でのべたデータから考へて、この場合の ^2H NMRスペクトルは、 ^{13}C , ^{24}H -、 ^{24}H -グリセオフルビンのスペクトルの重ねあわせにすることは明らかである。実際に、図3Bに示した ^2H NMRスペクトルは、図1Aと図3Aの重ねあわせに当てはまることかわかる。図3Bの上段のスペクトルは下段のスペクトルのたて軸と2倍に拡大したものである。6'-メチル、2'-メトキシ、4,6'-メトキシビ-7にみられるダブルットパターンは、培地からの D_2O のとりこみ(水素交換反応)の最も確実な証拠になるわけである。 ^2H - ^{13}C スピン結合定数の値は、6'-メチル、メトキシそれぞれ20.0 Hz, 22.4 Hzであり、 ^1H - ^{13}C スピン結合定数から(1)式を使って求めた ^2H - ^{13}C スピン結合定数、19.3 Hz, 22.5 Hzによく一致する。このことは、図3Bに与えたダブルットビ-7の解釈が正しいことを示している。

4. 考察

以上の結果から、グリセオフルビンの酢酸塩よりの生合成経路は6'-メチルの約1個の水素が培地中の水と交換されることと明確になった。実際この交換反応は、Scheme 1で示されている、ホリケトメチレン(2)、フェノール(3, 4)、ジエノン(5, 6)の中間体のいずれかど、起り得るわけである。特に、3, 5-位置の水素は隣接に水酸基があるために、培地の水と容易に交換し得るわけであり、上でのべた結論によく一致する。もう少し定量的にいえば、6'-メチル、5'-D, 3'-D, 5'-Dの ^2H とりこみ率は、 ^{13}C 酢酸塩からの生合成実験では、48, 25, 19, 8%になる。5'-Dには水素交換が起らないとした時の ^2H 含有量は、それぞれ1.9(3), 1(4), 0.7(5), 0.3(1)となる。カッコ内の値は、水素交換反応が起らないとした時の期待値である。それゆへ、5'-D位置では、少なくとも2/3個の水素が培地との交換によって、置きかえられることになる。水素交換のもうひとつの可能性は、Krebsサイクル中での ^{13}C 酢酸塩のランダム化による、ラベルの移動である³⁾。この場合、標識されている ^2H 酢酸塩の2位置に培地からの ^2H が入り得る。または、 ^2H 標識酢酸塩から ^2H が培地の ^1H と置きかわり得るわけである。

これらの結果はまた、生合成反応に限らず、 ^2H - ^{13}C 結合生成ともなう反応操作の解析にも広く応用され得ることを示している。すなわち、Scheme 1のグリセオフルビン生合成経路の解析に、 ^2H 標識された底質が元から ^{24}H グリセオフルビンが得られ、底質が元が中間体として存在し得ることを ^2H NMRスペクトルから確認することができた⁴⁾ことを付け加えておく。

- 1) 斎藤肇, フォルマシア, 13, 922(1977); 斎藤肇, 日本電子=ニュース, 18, 2(1978); H.H. Mantsch, H. Saito, and J.C.P. Smith, Progress in NMR Spectroscopy, 11, 211(1977)
- 2) Y. Sato, T. Oda and H. Saito, Tetrahedron Lett, 1976, 2695
- 3) T. J. Simpson and J.S.E. Halker, Phytochemistry, 16, 229(1977)
- 4) Y. Sato, T. Oda and H. Saito, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1976, 135.

217 西洋ワサビペルオキシダーゼのヘム近傍構造と基質の結合

(京大工) 森島 績, 小川 諭
福沢 信一, 米沢 貞次郎

序

Fe^{III}-プロトポルフィリン(III)を活性中心に持つヘム酵素ペルオキシダーゼは過酸化水素(H₂O₂)を電子供与体と見做れるが、基質の存在下水中に分解する。



この酵素の特徴として、その基質に対する基質特異性が小さく、フェノール系芳香族アミンなど多くの芳香族分子がその基質となりうる。ペルオキシダーゼ酵素反応サイクルについては B. Chance により (1)~(4) の反応サイクルで角虫が示される事が明らかにされている。酵素(E)は H₂O₂ と反応し Compound-I と見做れる赤色の化合物となり、Compound-I はその基質 AH₂ を電子酸化し赤色の

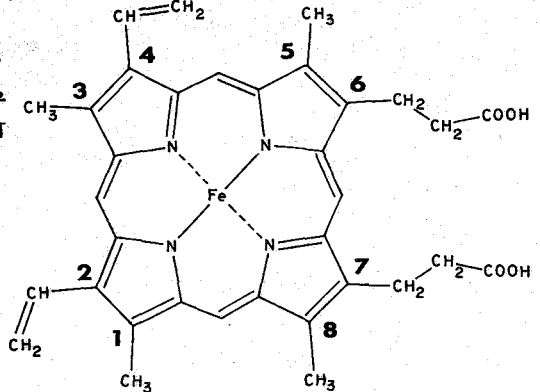
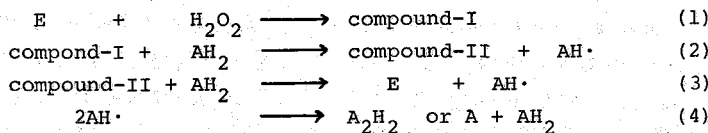


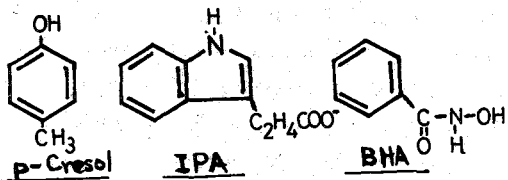
図1 プロトヘム基

Compound-II となる。Compound-II はさらに AH₂ を電子酸化し元の酵素に戻る。



この反応サイクルによれば、基質 AH₂ の酵素活性部位又はその近傍への結合が考えられている。

今回我々は西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish Peroxidase, HRP, MW ≈ 40,000) の ¹H-NMR 測定により p-クレゾール, インドールプロピオン酸 (IPA), ベンゾヒドロキノン酸 (BHA) 等その基質の酵素上結合部位を明らかにしたので報告したい。



実験

ペルオキシダーゼは東洋紡社より購入し (Type G-C-I, Isoenzyme C, RZ=3.4), 定量は ε₄₀₃ = 1.02 × 10⁵ M⁻¹ cm⁻¹ においた。

¹H-NMR 測定には Nicolet-TT-100

パルスフーリエトランスフォームシステムを付備した Varian-HR-220 スペクトル Xター, 220 MHz, を用い、スペクトル中 40 KHz, 4K テータポイント, 5° パルス (27 μs), 繰り返し時間 0.05 s を用いた。

もしも いさあ, おがわ 工とし, ふくざわ しんいち, よねざわ ていじろう。

結果

Substrate Binding by HRP at pH 7.0, 21°C

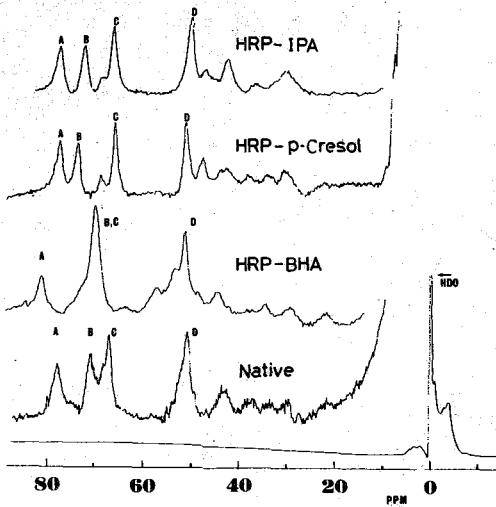


図2 西洋ウサギペルオキシダーゼ及びそのIPA, p-cresol, BHAコンプレックスのNMRスペクトル。pH7.0 21°C。

と示す。基質結合により誘導された各シグナルの化学シフト(リミテッドシフト, δF)及び解離定数(K_d)を変数とし基質滴定曲線を最小二乗法により計算機シミュレーションの結果 K_d p-cresol = 3.8mM, K_d IPA = 1.7mM を得た。BHAのネーティブ酵素への結合の場合、p-cresol, IPAの場合とは異なりNMR時間スケールより遅い酵素スペクトル変化が誘起され、スペクトルは大きく変化した。なお、これら2基質の酵素への結合は全て競合的であり、酵素上の結合部位が同じ事をしてしている。

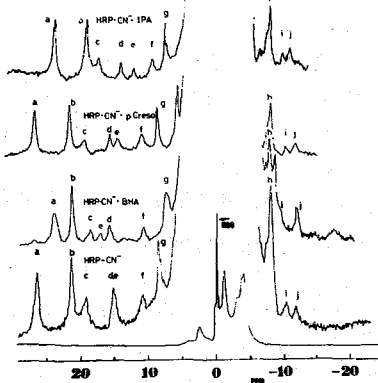


図3 ペルオキシダーゼ ミアンイオン体及びそのIPA, p-cresol, BHA含有体のスペクトル

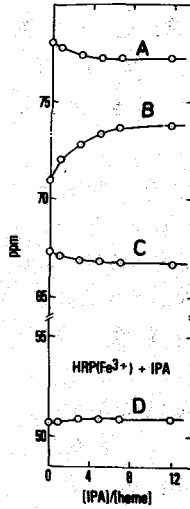


図2に HRPのネーティブ及び p-cresol, IPA, BHA存在下における¹H-NMRスペクトルを比較した。スペクトルはH₂O基準10ppm以下の常磁性シフト領域を示し、A-Dのピークは4本のヘム側鎖メチル基プロトンシグナルを示す。IPA, p-cresolの場合各メチル基ピークは基質-酵素濃度比に従ってシフトし図中右の基質滴定曲線(IPAの場合のみを示す)を得た。この結果はネーティブ酵素とIPA及びp-cresol結合

酵素の化学交換がNMR時間スケール($\sim 10^{-4}$ s)より早い事

図3にヘム鉄原子6配位子をCN⁻に置換したHRPミアンイオン体(HRP-CN⁻)及びそのIPA, p-cresol, BHA存在下のスペクトルを示す。a-f)のNMRピークはヘム側鎖又はヘム鉄原子5配位子であるプロキミナルヒスチジンに由来するプロトンシグナルと考へる。a, bのシグナルは2本のヘムメチル基プロトンのシグナルである。HRP-CN⁻においても基質の存在により酵素スペクトルの変化が見られ、基質の酵素への結合を示している。なおIPA, p-cresol, BHAのHRP-CN⁻への結合は全て競合的でありかつNMR時間スケールより早い。基質滴定曲線より各基質とHRP-CN⁻の K_d は K_d p-cresol = 3.8mM, K_d IPA = 2.0mM, K_d BHA = 0.6

mM と得られた。

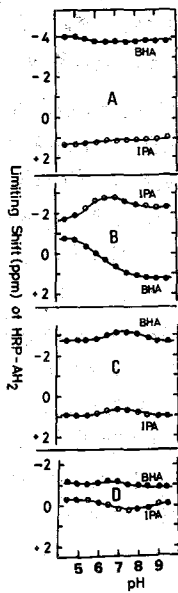


図4にネーティブ酵素に対するA-Dの4本のヘム側鎖メチル基プロトンシフトの基質(IPA, BHA)誘導化学シフトのpH(4-10)依存性を示す。中及び上は基質の結合により各シフトが高磁場側及び低磁場側にシフトした事を示す。图中、 $pK \sim 6$ 及び8.5のpH滴定曲線が得られ、酵素蛋白質部の解離性アミノ酸残基が基質の結合に関与していると考えられる。なお、HRP-CN⁻についても同様の結果を得た。

考察

ネーティブ酵素と各種電子供与体との相互作用はすでに吸光スペクトル(UV)より研究され、結合定数及び基質結合による酵素スペクトルの変化が小さい事より2基質は活性中心(第6配位子近傍)とは別の部位で結合すると推定されていた。確かに本研究においても、各基質はヘム鉄の6配位子をCN⁻で置換したHRP-CN⁻に結合し、これらの基質がヘム鉄に直接結合するものでは無い。しかしBHAのネーティブ酵素への結合の場合 p-cresol, IPAの場合とは異なり表1

図4 基質誘導シフトに示す様にその結合がCN⁻の酵素への結合と競合的であり、そのpH依存性かつ結合に伴う酵素スペクトル変化も大きい。さらにBHAの

Dissociation constant (mM) at pH 7.0 and 21°C.

	HRP	cyano-HRP
p-cresol	3.8	3.8
IPA	1.7	2.0
BHA	0.003*	0.6

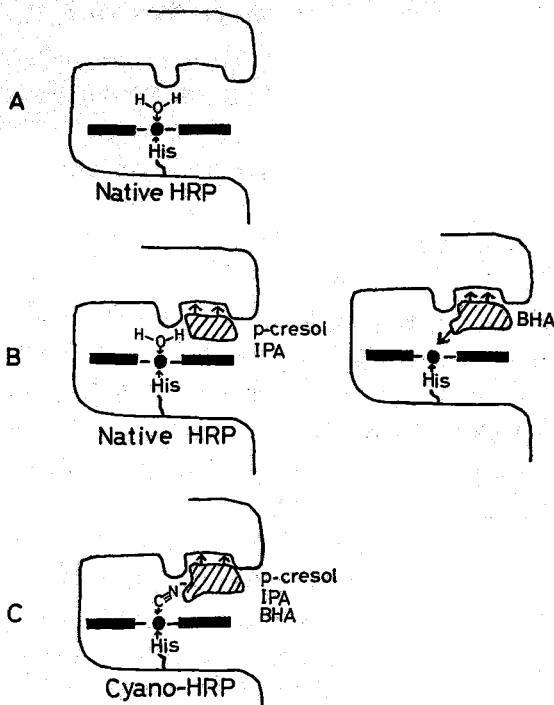
* This value is taken from Schonbaum, J. Biol. Chem. 248, 502 (1973).

表1 ヘルツニシフト及びそのシフトの基質との解離定数

図4に示した基質結合による各メチルシフトのpH依存性は、 $pK 6.0$ と 8.5 の解離性アミノ酸残基が基質の結合に関与していると考えられる。HRPのアミノ酸一次構造、反応速度論的研究より酵素第6配位子近傍に $pK 6$ の解離性アミノ酸残基、 pK 値よりヒスチジン残基と推定、の存在が示唆されており本研究で得られた $pK 6$ もこの"distal-Histidine"によるものと推定される。 $pK 8.5$ のアミノ酸残基については我々は pK 値よりリジン残基と推定している。

以上の結果より図5に p-cresol, IPA, BHA の HRP及び HRP-CN⁻への結合と

モデル的に図示した。BHAはペルオキシ酵素のヘム鉄及びタンパク部の両方に結合し、p-cresol, IPAは酵素タンパク部のみにも結合する。この基質のタンパク部での結合にはヘム鉄の配位子近傍に存在する $pK \sim 6.0$ の "distal-base" 及び $pK 8.5$ の解離性アミノ酸残基が関与する。これらの結果はペルオキシ酵素反応において Compound-I = FeH_2 , Compound-II = FeH_2 の "ternary complex" を得て反応が進む事を示唆している。我々は反応中間体である Compounds I, II の ^1H-NMR 測定に成功したのでペルオキシ酵素反応機構についても議論したい。



図と基質のペルオキシ酵素への結合

モデル

結論

1. HRPには各種芳香族電子供与体と結合する結合部位が活性中心近傍に存在する。
2. 基質の結合には酵素タンパク上のヒスチジンと思われる $pK 6.0$ の "distal-base" 及び $pK 8.5$ の解離性アミノ酸残基が関与する。

文献

Schonbaum, G. R. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 502-511
 Critchlow, J. E. and Dunford, H. B. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 3703-3713
 Schejter, A., Lami, A. and Epstein, N. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* **174** 36-44
 Morishima, I., Ogawa, S., Imubushi, T., Yonezawa, T. and Iizuka, I. (1977) *Biochemistry* **16**, 5109-5115
 Morishima, I. and Ogawa, S. (1978) *Biochemistry* in press
 Morishima, I., Ogawa, S., Imubushi, T., and Yonezawa, I. (1977) *FEBS Letter* **80**, 177-180
 Morishima, I., and Ogawa, S. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **83** 946-953

218 ミオグロビンおよびヘモグロビンのアルキルイソトリル誘導体、およびそのモデル錯体の¹³C NMR-⁵⁷Fe化学シフト、¹³C-⁵⁷Fe, ¹³C-¹⁵Nスピン結合定数

(京大工) 森島 績 小林 健, 根矢 三郎, 米沢 貞次郎

〔序〕 生体内でヘモグロビン、ミオグロビンなどが酸素と結合できる状態である還元型低スピン状態のヘム蛋白質のNMRについては、それが常磁性シフトを示さない為、研究は少ない。著者はヘム鉄に配位したアルキルイソトリル(Fig. 1参照)の¹³C化学シフト、¹³C-⁵⁷Fe, ¹³C-¹⁵Nスピン結合定数等を還元型低スピン状態にあるミオグロビンの構造研究におけるプローブとして有用である事を明らかにした。⁽¹⁾ 今回著者は、このプローブをヘモグロビンに適用しヘモグロビンのα鎖、β鎖の差異を調べる上で¹³COよりすぐれたプローブとなる事を示し、かつそのモデル錯体におけるアルキルイソトリルの¹³C化学シフト、¹³C-⁵⁷Fe, ¹³C-¹⁵Nスピン結合定数を測定し、これらをヘム蛋白質の値と比較して、ヘム鉄の電子状態、ヘム鉄と配位子の結合に因りて新しい知見を得た。

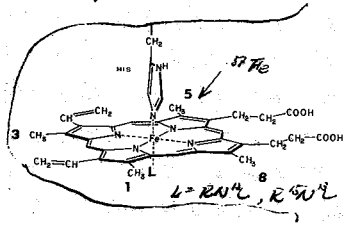


Fig. 1 ヘム近傍の図

〔実験〕 ミオグロビンはシゲマ社のものを精製し、ヘモグロビンはヒト血液より所定の方法に従って得た。(試料濃度はミオグロビン、ヘモグロビン共に約10 mM)。ヘムモデル化合物として、テトラフェニルホルフィン鉄(II) (TPPF₂Fe(II)Cl⁻)を用い、トリジン及びNN'-ジメチルホルムアミド中で還元したアルキルイソトリルを添加した。(試料濃度トリジン中では20 mM, NN'-ジメチルホルムアミド中では約5 mM) ¹³C NMR測定は日本電子JNM FX-100(25.0 MHz)を用い、ヘム蛋白質では数万回、ヘムモデル化合物では数千-1万回の積算を行った。¹³C 15.5%に¹⁵Nを濃縮したアルキルイソトリル(CR¹³C, R¹⁵N¹³C)は対応するR¹³CN, R¹³C¹⁵Nより合成した。RとしてはEt, n-Pr, n-Buの3種類を用いた。

〔結果考察〕

(I) ミオグロビンのアルキルイソトリル誘導体の¹³C NMR
 先の日化春季年会で示した様に、ヘム鉄に配位したアルキルイソトリルの¹³C化学シフトはアルキル鎖が太き(なるに従ってアルキル基とアポ蛋白質の立体的相互作用により、高磁場へシフトし、ヘム鉄をFig. 1のアロトヘムから2.4位がエチル基であるメリヘムに変えるや低磁場へシフトする。¹³C-⁵⁷Feスピン結合定数は25.6 Hzとほぼ一定の値を示す。ヘム鉄に配位したアルキルイソトリルの線幅はfreeに比べて狭く、¹³C-¹⁵Nスピン結合定数がfreeな状態で5.8 Hz、ヘム鉄に配位した状態で19.6 Hzとなる事から、アルキルイソトリルはヘム鉄に配位する事により結合状態が変わり、Nの混成状態が変化する事が示唆された。

(Ⅴ) γ モグロビンのアルキルイソニトリル誘体の ^{13}C NMR

Fig. 2, Fig. 3に γ モグロビンに種々のアルキルイソニトリルを配位させた誘体の ^{13}C NMRスペクトルを示した。ミオグロビンで観測された ^{13}C 化学シフトの傾向は γ モグロビンでも観測され、かつ γ モグロビンの α 鎖と β 鎖が約2 ppm分離し、 ^{13}C Oでは0.6 ppmしか分離しないのに対して(2)アルキルイソニトリルは α 鎖と β 鎖の差を鋭敏に反映する事がわかった。Fig. 3の上段には原田(3)の方法に従って β 鎖だけを凍結したもののアルキルイソニトリル誘体の ^{13}C NMRスペクトルを示した。この結果より低磁場側を α 鎖、高磁場側を β 鎖と帰属した。Fig. 3の下の図は γ モグロビンにおける ^{14}C - ^{15}N スピン結合定数の測定結果を示した。Freeのアルキルイソニトリルの ^{14}C - ^{15}N スピン結合定数は9.8 Hzとミオグロビンの場合と同じであるのに、 γ モグロビンの α 鎖、 β 鎖に配位したアルキルイソニトリルのそれは、それぞれ約9 Hz, 19.6 Hzであった。これより β 鎖に配位したアルキルイソニトリルが α 鎖に配位したものより、Nの濃成変化が大きい事を示唆している。このようにアルキルイソニトリルは γ モグロビンの α 鎖と β 鎖の差を研究する上で非常に有用なプローブとなる事がわかった。なお当日は γ モグロビンにおけるアルキルイソニトリルの ^{13}C 化学シフトのpH依存性を含めて更に詳細に議論したい。

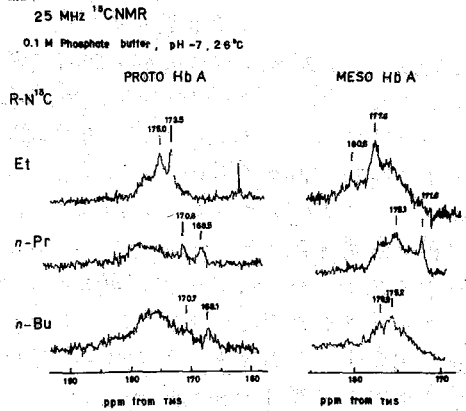


Fig. 2 γ Hb-RN ^{13}C の ^{13}C NMRスペクトル

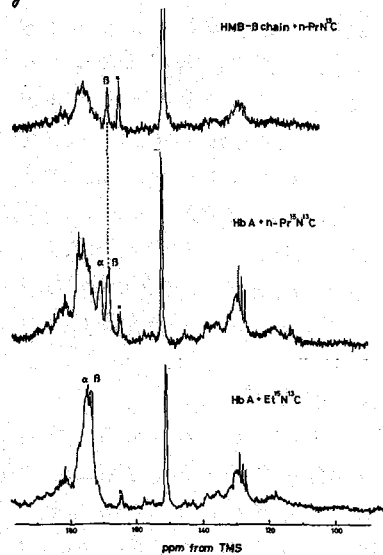


Fig. 3 γ Hb-R $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ の ^{13}C NMRスペクトル

(Ⅵ) γ モグロビン化合物のアルキルイソニトリル誘体の ^{13}C NMR

(1) ビスアルキルイソニトリル錯体

Fig. 4にテトラフェニルアルファリン酸(Ⅱ)にアルキルイソニトリルをビス配位させた錯体の ^{13}C NMRスペクトル(溶媒トリジン)を示した。軸配位子アルキルイソニトリルの

シグナルは $n\text{-Pr-}^{13}\text{C}$ で 154.8 ppm (TMS 規準) であり、 $\gamma\text{-H}$ 鉄を ^{57}Fe ($I = \frac{1}{2}$) に変えると $^{13}\text{C}-^{57}\text{Fe}$ スピン結合定数 25.4 Hz のダブルットとなり、 $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ スピン結合定数は 22.4 Hz である。これらの値を $\gamma\text{-H}$ 蛋白質における値との比較により以下の事が示唆される。

a) $^{13}\text{C}-^{57}\text{Fe}$ スピン結合定数はミオグロビンと $\gamma\text{-H}$ モデル化合物とでは全く同じ値をとる。この事よりミオグロビンとモデル錯体で、アルキルイソニトリルが $\gamma\text{-H}$ 鉄に対して同じ角度をなしていると考えられる。

b) $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ スピン結合定数はミオグロビン、 γ モデル β 鎖、 γ モデル α 鎖でそれぞれ 19.6 , 14.6 及び 22.4 Hz であり $\gamma\text{-H}$ モデル錯体では 22.4 Hz であった。free の $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ スピン結合定数の差を溶媒効果によるものと考えれば、N の混成状態の変化の大きさは、以下の順になると考えられる。

モデル $>$ ミオグロビン $>$ γ モデル β 鎖 $>$ γ モデル α 鎖
 なおヒスアルキルイソニトリル錯体の ^{13}C 化学シフトに因りては次のミックスリガント錯体の項で述べて述べる。

(2) ミックスリガント錯体

Fig 5 にテトラフェニルポルフィリン鉄(II)に一方にはアルキルイソニトリル、他方にはピリジン、あるいはイミダゾール類が配位したミックスリガント錯体の ^{13}C NMR スペクトルを示した。共にヒスアルキル錯体、ヒスイミダゾール錯体にアルキルイソニトリルを添加したもので、ピリジンの場合は少し不明確であるが、イミダゾール類の場合はミオグロビンと同じシフト位置 (TMS より 167.5 ppm 倍磁場側) に新しいピークが見られた。 ^{13}C 化学シフトに因りては以下のデータを次のページでスティックダイアグラムで示し、併せて $^{13}\text{C}-^{57}\text{Fe}$, $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ スピン結合定数も示した。モノピリジンモノイソニトリル錯体とモノイミダゾール

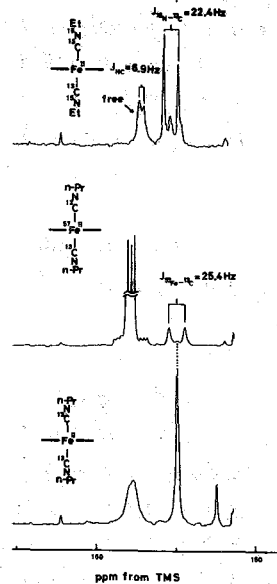


Fig 4 ^{13}C NMR SPECTRA OF $\text{TPPFe}(\text{n-PrN})_2$

$\text{TPPFe}(\text{Py})(\text{n-PrN})$

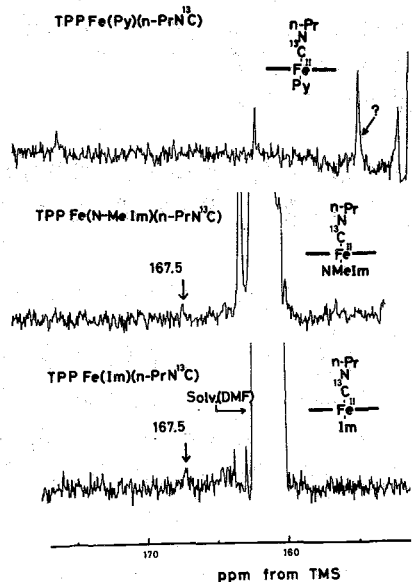


Fig 5 ミックスリガント錯体の ^{13}C NMR スペクトル

ルモノイソニトリル錯体で大きなシフト差があり、これはイミダゾールのπの寄与が大きい事を示唆している。又モノイミダゾールモノイソニトリル錯体では、ミオグロビンにおけるγ-Feに配位したアルキルイソニトリルの¹³C化学シフトが再現できる。この事よりアルキルイソニトリルの¹³C化学シフトは、π-σ配位子の作用が極めて大きい事が示唆される。なお現在、ミックスリコンビン錯体の濃度を高めるべく検討中である。

[結論] γ-Feに配位したアルキルイソニトリルの¹³C化学シフトは①π-σ配位子の作用 ②γ-Feピコ-ル環のbasicity ③アルキル基の大きさの順で寄与が大きいと考えられる。この事より鉄(II)γ-Fe蛋白質では、シス効果よりトランス効果の方が鋭敏にシフトに反映される事を示唆しており、当研究室で鉄(II)γ-Fe蛋白質に対して得られた結果と一致する。(4) 以上述べた様にアルキルイソニトリルは還元型鉄(II)状態にあるγ-Fe蛋白質の構造と機能を追究する上で、非常に有用なプローブとなる事がわかった。

[謝辞] ¹³C, 及び ⁵⁷Fe を濃縮したアルキルイソニトリルの合成に協力していただいた京都大学 化学研究所 植村 崇氏に深く感謝します。

[文献]

- 1) 森島, 林 *日化春季年会* (1978)
- 2) Kiyoshi Nagai *J. Mol. Biol.*, **111** 41 (1977)
- 3) Richard, B. Moon et al. *Biochemistry* **16** 221 (1977)
- 4) I. Morishima, T. Inubushi. *J. Am. Chem. Soc.*, **100** 3568 (1978)

Table I
Position of R¹³C Signals for Mb, Hb and Model complexes

