

第20回NMR討論会 講演要旨集

1981年11月9日(月)・10日(火)・11日(水)

薬学会館ホール

共 催

日本化学会・日本分析化学会・日本薬学会
日本生化学会・日本農芸化学会・日本生物物理学会

プログラム

9:00~11:00

1. NH_3 , BF_3 分子の核磁気緩和 — 三スピン系
(京大教養, ブリティッシュコロンビア大) ○山内 淳, C. A. McDowell..... 1
2. 塊状ポリエステル¹³C核磁気緩和と分子運動性
(京大化研) ○北丸竜三, 堀井文敬, 平井諒子, 村山浩一, (京大工) 鈴木俊光..... 5
3. ³⁵Cl NMRの線幅からみたクラウン - KCl 錯体におけるクロライドイオンの挙動
(分子研, 都立大*, 名工大**) ○菅原 正, 湯田坂雅子*, 横山幸弘**, 藤山常毅, 岩村 秀..... 9
4. シリカゲルに固定した有機基のCMR挙動
(東大生研) ○篠田純雄, 斉藤泰和..... 13
5. 液晶を利用したNMR法による溶液状態での分子構造の決定. $(\text{CH}_3)_2\text{SnCl}_2$ に対する塩基添加の効果
(阪大薬) ○藤原英明, 佐々木喜男..... 17
6. シクロヘキサンの ring inversion の高圧高分解能NMRによる研究
(イリノイ大, 阪大教養*) D.L. Hasha, ○江口太郎*, J. Jonas..... 21
7. ¹³C 固体高分解能NMRとプロトン T_1 測定による β -キノール・メタノール包接化合物の動的構造の研究
(京大理) ○松井 茂, 寺尾武彦, 雑賀亜帆..... 25

11:15~12:00 (特別講演. I.)

8. The Current Status of High Resolution NMR in Solids
(MIT) J. S. Waugh 29

13:15~15:15

9. 架橋したシリコーン・ゴムの Magic Angle Spinning—BB Decoupling 法による ¹³C および ²⁹Si NMR
(東北大非水研) ○篠野昌弘, 野津庸則..... 30
10. ¹³C CP-MAS NMRによる耐炎化アクリル繊維の構造解析
(東レリサーチセンター, 東レ*) ○横田克行, 塩谷 泉, 森田健一*..... 34
11. ¹³C CP/MAS NMR. 溶液中でのコンホメーションの reference としての固体 ¹³C 化学シフト
(国立がんセンター) 斉藤 肇, ○多部田涼子..... 38
12. ポリペプチドのCP-MAS ¹³C NMRによるコンホメーションの研究
(徳大工短大, 徳大薬, 徳大工, 国立がんセンター) ○多木敏彦, 山下伸典, 柴田 堂, 佐藤三雄, 山下卓哉, 多部田涼子, 斎藤 肇..... 42

講演時間

特別講演：30分（+討論15分）

一般講演：10分（+討論7分）

総合討論（講演番号を太字で示す）における各演者の持時間は平均して17分です。

13. Shielding Anisotropy of ^{13}C in Poly(ethyleneterephthalate) : A Determination by Off-magnetic Angle Spinning
(Iowa State Univ., Eastman Kodak Co.) ○ T. Taki, P. Murphy, B. C. Gerstein, P. Henrichs, D. Massa 46
14. Hydrogen in $\text{YH}_{1.92}$: Studies by High Resolution Solid State NMR
(Iowa State Univ.) ○ T. Taki, R. Taylor, B. C. Gerstein 50
15. バナジウム水素化物の β 相における水素の挙動(2)—水素濃度変化による水素の挙動の変化 (化技研) ○ 林 繁信, 早水紀久子, 山本 修 54
- 15 : 30~18 : 00 (総合討論. I. NMRの測定技術)**
16. Recent Advances in FT-NMR Sensitivity Enhancement Techniques
(Univ. Wisconsin) T. C. Farrar 58
17. Analysis of Broad-band Decoupling Methods
(MIT) ○ J. S. Waugh (JEOL) M. Ohuchi, K. Higuchi, K. Goto, H. C. Charles 59
18. Adiabatic Half Passage 法によるメタノールの $T_{1\rho}$ と化学交換
(阪工試) 福見俊夫 60
19. 各種パルス系列の応用(III) —Double Quantum Transfer の応用—
(日本電子) ○ 大内宗城, 松下和弘, 細野政美, 栗原範明 64
20. CP/MAS の新しい応用
(日本電子) ○ 藤戸輝昭, 出口健三, 大内宗城, 今成 司, M. J. Albright 68
21. 多重パルス法およびMAS法を併用した ^1H 固体高分解能NMR
(ブルカー・GmbH, 日本ブルカー*) H. Post, ○ 戸井田良晴*, E. Baltholdi* 72
22. 固体高分解能J-分解NMR
(京大理) ○ 寺尾武彦, 三浦 等, 雑賀亜幌 73
23. 高温・高圧 C-^{13} NMR装置の試作
(北大工, 日進ソフト*) ○ 下川繁三, 山田英二, 神田勇一*, 相馬純吉 77

9:00~11:00

24. Spectral analysis of ^{13}C and ^{15}N polypeptide spectra using INEPT and correlated 2D NMR methods
(Varian Assoc.) G. Gray..... 81
25. 二次元NMRのポリペプチドへの適用
(阪大蛋白研, 東大理*) ○小林祐次, 樋口直樹, 京極好正, 永山昭*..... 82
26. ヘム蛋白質のヘム近傍の微細構造とモデル化合物によるシミュレーション—NMRによる研究—
(京大工) ○森島 績, 根矢三郎, 城 宣嗣, 舟橋 孝..... 86
27. チトクロム C-552 のヘム周辺の構造の研究
(日女大理工, 三菱生命研, 東大理) ○高橋征三, 本波康由, 宮沢辰雄..... 90
28. アスパラギン酸トランスアミナーゼと基質リガンド相互作用
(熊大医) ○森野能昌, 棚瀬純男, 山崎政城, 長島不二男..... 94
29. ピルビン酸キナーゼの活性点におけるヒスチジン残基の役割
(鳥取大医) ○飯塚舜介, (Inst. Cancer Res.) A. S. Mildvan..... 98
30. Dihydrofolate Reductase の活性に及ぼす Cl イオンの束縛効果に関する ^{35}Cl NMR
(東薬大・NIH) S. Subramanian, ○神藤平三郎, B. T. Kaufman..... 102

11:15~12:00 (特別講演. II.)

31

31. Recent Developments in Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Techniques and Applications
(ETH) R. R. Ernst..... 105

13:15~14:00 (特別講演. III.)

32

32. NMR Studies of Macromolecular Dynamics
(Stanford) Oleg Jardetzky..... 106

14:00~15:45 (総合討論. II. NMRによる生体系研究法)

33. スピン拡散下でのたて緩和時間—ラジオ波照射の影響
(京大理) 赤坂一之..... 107
34. 核酸構造における局所コンホメーションの間の相互依存性—ランタニドプローブ法による定量解析—
(東大理) ○横山茂之, 山本百合子, 稲垣冬彦, 宮沢辰雄..... 111

講演時間

特別講演：30分（+討論15分）

一般講演：10分（+討論7分）

総合討論（講演番号を太字で示す）における各演者の持時間は平均して17分です。

35. ヘム酵素西洋わさびペルオキシダーゼの構造ならびに活性に及ぼす無機金属イオンの結合の効果
—ランタニドイオンNMRプローブ法の適用—
(京大工) ○城 宣嗣, 森島 績……………115
36. 2次元差スペクトルNMR
(東大理, 阪大蛋白研*) ○永山国昭, 小林祐次*, 京極好正*……………119
37. ヘム蛋白質およびモデルポルフィリン錯体の高圧NMR
(京大工) ○森島 績, 永峯千里, 原 光信, (神戸大理) 山田博昭……………123
38. 同位体ラベルによる蛋白質の構造研究—¹³C NMRによる *Streptomyces Subtilisin Inhibitor* (SSI) の溶液中での動的構造
(味の素中研) ○辻 尚志, (都立大理) 甲斐荘正恒……………127

15:50~17:15

39. ²H核四重極エコーNMR. ポリエン抗生物質-コレステロール複合体の性質
(国立がんセンター, 東大薬) ○斉藤 肇, 多部田涼子, 秋山敏行, 三川 潮……………131
40. ¹H緩和からみた酵素タンパクの凍結乾燥変性防御物質の作用機作
(北大低温研) 花房尚史……………135
41. 広幅パルスNMR凍結曲線法による生体高分子の水和特性
(味の素中研) ○鈴木栄一郎, 永嶋伸也……………139
42. ゲル状態でのレシチン二重膜の³¹P-NMR—極性基の運動性とクロスポーラリゼーションの効率
(阪大蛋白研) ○阿久津秀雄, 京極好正……………143
43. ¹⁴N, ¹³C NMRによるリン脂質膜の分子運動と分子間相互作用
(九大薬) ○古賀けい子, 高野律子, 金沢洋子……………147

17:20~18:00 (特別講演, IV.)

44. NMRと30年
(千葉大理) 藤原鎮男……………151

18:30 (懇親会)

9:00~9:35

45. NMRパラメータを用いる¹Hスペクトル・データベース
(化技研) ○山本 修, 柳沢 勝.....157
46. ¹H NMRスペクトル検索システムの検討(5) 大量データベースの内容とその利用
(三菱レイヨン, 出光興産中研, 国立衛試, 第一製薬, チッソ石化, 豊田中研, 三菱油化中研) ○片桐 禪,
津村 修, 叶多謙蔵, 四居靖彦, 大草忠雄, 長沢一彦, 酒井稔夫.....161

9:40~12:00 (総合討論. III. NMRによる intact 生体系の研究)

47. 植物葉における炭酸同化過程の¹³C-NMR
(国立公害研) ○三森文行, 伊藤 治.....165
48. NMRの免疫領域への応用(I) — n. m. r. からどのような情報が得られるのだろうか —
(熊大医, 国立熊本病院*) 山崎政城, 石松隆志, 莊明 勝*, 森野能昌, 神原 武.....169
49. NMRの臨床診断への応用—一人尿のNMR—
(徳大教養, 予衛研*, 日本電子**) ○吉川研一, 逢坂 昭*, 松下和弘**.....173
50. ¹H-NMR法による脳組織の病態の研究
(京府医大) ○吉崎和男, 成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, (生理研) 亘 弘.....177
51. 筋細胞内pHとその緩衝能の¹Hおよび³¹P NMR法による測定
(京府医大) 吉崎和男, ○瀬尾芳輝, 森本武利.....181
52. 広径試料管を用いての生体組織の磷化合物の観察
(生理研) ○亘 弘, 志賀 潔 (大阪医大) 村上政隆, 今井雄介, (名大医) 富田忠雄, (大分医大) 山田
和広, 米谷快男児, (京府医大) 吉崎和男, 瀬尾芳輝.....185
53. モルモット心臓の³¹P-NMR—灌流方法とNMR条件の検討—
(新潟大医) 今井昭一, 仲沢幹雄 (山形大医) 片野由美 (日本電子) ○松下和弘, 大内宗城, 梅田雅宏.....189
54. NMRトモグラフィ. II. 人体での試み
(電総研) ○亀井裕孟, 片山義朗.....193

13:00~14:45

55. ¹³C NMRによる混合系の定性定量分析
(化技研) ○早水紀久子, 山本 修.....196
56. 橋頭位に窒素原子を持つ二環式化合物の¹³Cおよび¹⁵N NMRスペクトル
(東大教養, Portsmouth Polytechnic) ○竹内敬人, T. A. Crabb.....200
57. Co(acac)₃, Al(acac)₃の⁵⁹Co, ²⁷Alランタニドシフトにおけるコンタクト項の分離
(茨城大理) ○平山昌甫, 川又好倫, 北見訓子.....203
58. クロルチオフェンから生成するカチオンのNMRスペクトル
(名工大) ○横山幸弘, 山下行秀, 高橋憲助, (山形大工) 曾根 澄.....207

講演時間

特別講演：30分（+討論15分）

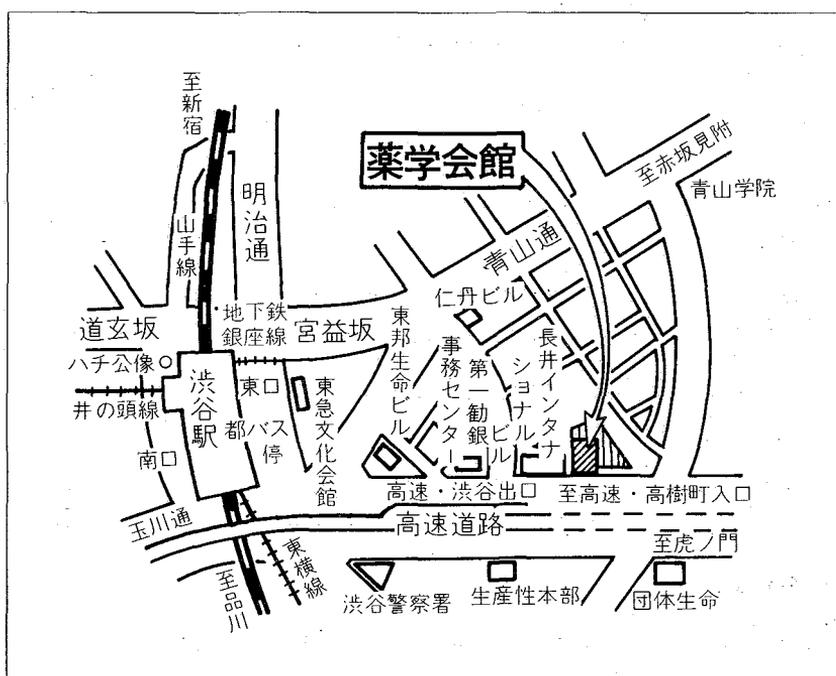
一般講演：10分（+討論7分）

総合討論（講演番号を太字で示す）における各演者の持時間は平均して17分です。

59. $(\text{CH}_3\text{O})_4\text{Si}$ の NMR シフトへの溶媒効果
 (阪大薬) ○山里洋吉, 藤原英明, 佐々木喜男.....211
60. 置換アシル尿素の NH プロトン水素結合に及ぼす水分子の影響
 (国際基督教大) ○吉田信行, 梅本公子, 高橋 詢, (電通大) 仁木国雄, 中川直哉, (青山学院大理工)
 遠藤 忠, 宮澤和裕.....215
- 14:50~16:50**
61. Intramolecular effects on nuclear magnetic shielding
 (Univ. Sheffield) W. T. Raynes219
62. 直鎖状共役系化合物の電子構造と ^{13}C -NMR 化学シフト
 (東工大) ○山延 健, 桜井 実, 安藤 勲, 中條利一郎.....220
63. アゾベンゼンおよびベンゾ[*c*]シンノリンの ^{13}C - ^{15}N スピン結合定数の相対符号の決定と INDO-MO 計算
 (京大薬, 京都薬大*) ○黒田義弘, 藤原靖弘*.....224
64. 核スピン結合定数における σ 電子と π 電子の寄与
 (北見工大) ○福井洋之, 三浦宏一, 辻 壮夫.....228
65. ピペリジン四級塩における ^1H スピン-格子緩和時間(III)
 (神戸女薬大) ○杉浦真喜子, 高尾楠雄, (神戸大教養) 上地真一.....232
66. ヘモシアニンモデル錯体 (銅(I)錯体) の NMR による研究
 (近畿大理工) ○北川 進, 宗像 恵, 米沢正泰.....236
67. 炭酸イオン存在下におけるポリ L-リジンの ^1H -および ^{13}C -NMR
 (阪大蛋白研) ○垣内欣二, 阿久津秀雄.....240
- 17:00~17:45 (特別講演. V.)**
68. ^2Hmr —Some Applications in Biosynthetic and Mechanistic Studies
 (Univ. Western Ontario) J. B. Stothers.....244
- 17:50~19:00**
69. キチン, キトサンゲルのコンホメーション. 溶液, ゲル, 固体の ^{13}C NMR スペクトル
 (国立がんセンター, 鳥取大農*) ○齊藤 肇, 多部田涼子, 平野茂博*.....245
70. NMR 緩和試薬の応用によるペプチド抗生物質シオマイシン-A の ^{13}C 化学シフトの帰属
 (塩野義研, 日本電子*) ○高山陽子, 松下和弘*, 通 和夫, 十倉一也, 岡部 啓.....249
71. ムギネ酸類における金属錯体の構造について
 (サントリー生物有機科学研) ○岩下 孝, 直木秀夫, 吉岡日女子, 野本享資, (大阪薬大) 三野芳紀.....253
72. プレオマイシン-鉄錯体の NMR による研究
 (京大工) ○森島 績, (微化研) 滝田智久, 梅沢浜夫.....257

薬学会館への交通案内

- 徒歩——国電渋谷駅東口より高樹町方面へ高速道路(3号線)沿いに徒歩10分, 左側.
- 都バス——国電渋谷駅東口より「学③日赤医療センター行」バスで一つめ, 青山学院高等部前下車, 左側.
- くるま——高速道路(3号線)高樹町出口より800m先, 右側, 渋谷出口より30m先, 左側. (駐車料金, 150円/30分)



連絡先

○薬学会館：東京都渋谷区渋谷2-12-15

(電話) 03-406-3321

(9:00~17:00の間, 学会参加者に連絡できます)

○東京大学理学部化学教室：東京都文京区本郷7-3-1

(電話) 03-812-2111 内線4350 荒田洋治 (討論会世話人)

第 1 日

11月9日(月)

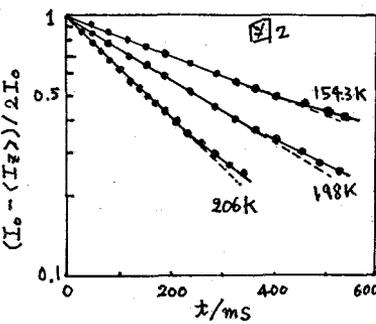
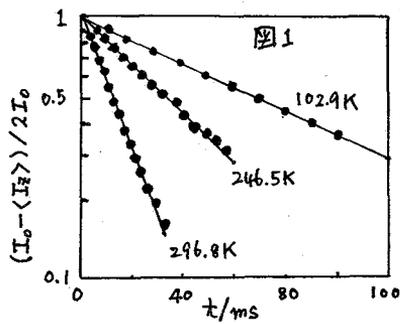
京大・教養 アリテシプロンピア大 O山内 淳 C.A.McDowell

はじめに NH₃·BF₃分子はNH₃分子とBF₃分子との間で生成される化合物である。結合は電子供与性の窒素原子と電子受容性のボロン原子の間で形成し、室温では比較的安定な白色結晶である。この化合物に関しては以前から多方面で研究されている。NMRの測定はCW法で行われ、そのNH₃-及びBF₃-グループの分子運動の知見が得られている。分子構造と分子運動の単純さのためスピン間の相互作用を調べる上で好都合と考え、スピン格子緩和時間の測定を行った。予見されたように、二種の異種スピン系で取り扱うには不十分であることが判明し、そのズレを三スピンを取り込んだ形の速度方程式を考慮することによって説明した。

実験 試料は二種の方法で合成し、実験値の比較確認を行った。NH₃ガスとBF₃ガスの直接的気体反応による方法と、NH₃ガスとBF₃ジエチルエーテルによる気体液体反応による方法である。後者の合成法が部分過熱を防ぐことができるので有利であるが、NMR測定結果に意味のある差異は認められなかった。NMR測定は¹Hと¹⁹F核について行った。CW法では16~17MHzで300~4.2Kまで測定し、計算機により二次モーメントの計算を行った。パルス法では29MHzで180°-t-90°パルスによりスピン格子緩和時間T₂の測定を行った。縦磁化R(t)=[I₀-I_z(t)]/2I₀は本質的にはnon-exponential decayを示したが、ある温度領域では十分exponential decayで近似することができ、そうでない場合でも、相当の値のところまでの縦磁化の回復をexponential decayで近似することができた。後の解析でも使用するようになり、ここではT₂は上のような意味でのinitial decay constantとして求めた。

二次モーメントの温度変化 線型から求めた二次モーメントとVan Vleckの式による計算とを比較することにより、過去のデータと合せて分子運動に関し次のような知見が得られた。BF₃グループのC₃回転運動は200K以下で制限されている。一方NH₃グループのC₃回転運動は77Kにおいても制限されておらず、二次モーメントの値は77Kから4.2Kに渡って徐々に増加するが、rigid latticeの値には到着しない。このことは4.2Kにおいても何らかのNH₃グループの700トン運動(例えば量子トンネル効果等)が存在している可能性を示す。これに呼応して、¹⁹Fの4.2Kでの値も、あらゆる原子のrigid lattice近似から計算した値よりも僅かに小さい。なお二次モーメントの運動に伴う転移から、BF₃分子回転の活性化エネルギーは21KJmol⁻¹と求められた。

スピン格子緩和時間の温度変化 ¹HのR(t)は指数関数でよく近似できるが、ある温度領域では、長いtに対して僅かにズレがみられた。このnon-exponential緩和はcross-correlationやcross-relaxationによるものと考えられる。この傾向は¹⁹FのR(t)において顕著であった。その様子を図1, 2に示す。図3と4に示す¹⁹Fと¹Hの緩和時間の温度変化で見ると、中間温度領域でnon-exponential緩和がみられ、スピン緩和が有効に効かない領域にあっている。しかしそのズレが起るのは相当量R(t)



が回復 ($R(t) < 0.5$) 後であるので, initial decay constantをとって T_1 とし, その温度変化を示したのが図3 (^{19}F), 図4 (^1H) である。 ^{19}F の緩和時間は

312.5 Kで深い極小(14.0 ms)を示し, 約170 Kで幅広い極大値の後低温側で再び短くなった。一方 ^1H の緩和時間は ^{19}F の高温側極小に呼応して, 250 Kで極小値を示し, 180 Kで幅広い極大値を示した後低温側で再び短くなった。しかし ^{19}F , ^1H 共低温側の測定温度範囲(85 Kまで)には T_1 の極小値を観測することができなかつた。その領域では $\log T_1$ は直線的に減少し, その勾配は ^{19}F , ^1H で殆んど等しいことから, 同じ活性化エネルギーをもち, 同一の運動に関連した緩和機構に支配されていると考えられる。二次モーメントの解析から判断して, 高温側では BF_3 ケル-7°の, 又低温側では NH_3 ケル-7°の C_3 回転運動が緩和に支配的であるといえよう。[1] 2個の同種スピン間相互作用 C_3 回転をする同種スピン間相互作用による緩和時間 T_1 は次式であたえられる。

$$\frac{1}{T_1} = C \left[\frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} + \frac{4\tau}{1 + 4\omega^2 \tau^2} \right], \quad C = \frac{9}{20} \frac{\gamma_I^4 \hbar^2}{r_{II}^6} \quad (1)$$

ω : 共鳴周波数, τ : 運動の相関時間, γ_I : 核Iの磁気回転比, r_{II} : 同種核I, I間距離。

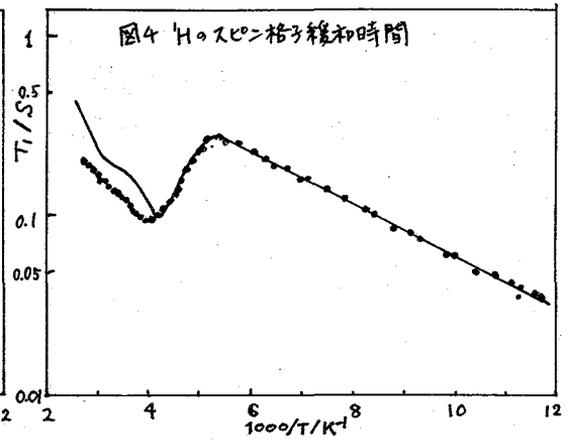
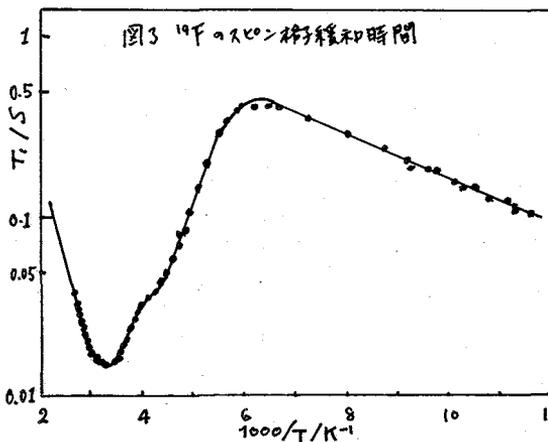
[2] 2個の異種スピン間相互作用 2種のスピンIとSの時間依存性は,

$$\left. \begin{aligned} d\langle I_z \rangle / dt &= -\beta_{II} (\langle I_z \rangle - I_0) - \beta_{IS} (\langle S_z \rangle - S_0) \\ d\langle S_z \rangle / dt &= -\beta_{SI} (\langle I_z \rangle - I_0) - \beta_{SS} (\langle S_z \rangle - S_0) \end{aligned} \right\} \Rightarrow \begin{cases} \langle I_z \rangle - I_0 = A_1 e^{\lambda_+ t} + A_2 e^{\lambda_- t} \\ \langle S_z \rangle - S_0 = B_1 e^{\lambda_+ t} + B_2 e^{\lambda_- t} \end{cases} \quad (2)$$

であたえられる。ここに $\lambda_{\pm} = \frac{1}{2} \{ -(\beta_{II} + \beta_{SS}) \pm [(\beta_{II} + \beta_{SS})^2 - 4\beta_{II}\beta_{SS} + 4\beta_{IS}\beta_{SI}]^{1/2} \}$, 係数 A_1, A_2, B_1, B_2 は $\lambda_{\pm}, \beta_{II}$ 等であらわされる。(2)式の時間依存性 $\ln [I_0 - \langle I_z \rangle / 2I_0]$ は一般には, linearでないが, β_{II} (又は β_{SS}) が他に比し大きい時には linear に近似できる。また $t=0$ での勾配を求めると $-\beta_{II}$ に等しく, ここで求めた initial 緩和時間 T_1 と, $\beta_{II} = 1/T_1$ であらわされる。[1] 及び [2] の寄与 (^{19}F - ^{19}F 及び ^{19}F - ^1H) で ^{19}F の極小を説明しようとしたところ, $T_{1, \text{min}} = 12.8 \text{ ms}$ の理論値を得, 実験値と満足すべき一致が得られたが, 温度変化の挙動に不一致点がみられた。特に極小値の低温側でのズレが大きい, これは ^{19}F - ^1H のスピン間相互作用によると考えた。異種スピン間による周波数依存性は $t / [1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2]$ の項をもち, ^1H と ^{19}F の場合 $\omega_I \sim \omega_S$ でこの効果が大きいと推察される。[3] 3個の異種スピン間相互作用 三種の異種スピンI, S, Jの時間依存性は

$$\begin{aligned} d\langle I_z \rangle / dt &= -\beta_{II} (\langle I_z \rangle - I_0) - \beta_{IS} (\langle S_z \rangle - S_0) - \beta_{IJ} (\langle J_z \rangle - J_0) \\ d\langle S_z \rangle / dt &= -\beta_{SI} (\langle I_z \rangle - I_0) - \beta_{SS} (\langle S_z \rangle - S_0) - \beta_{SJ} (\langle J_z \rangle - J_0) \\ d\langle J_z \rangle / dt &= -\beta_{JI} (\langle I_z \rangle - I_0) - \beta_{JS} (\langle S_z \rangle - S_0) - \beta_{JJ} (\langle J_z \rangle - J_0) \end{aligned} \quad (3)$$

β_{II} 等の係数は Abragam の教科書にある二スピン系の場合を拡張すれば求まる。この方程式の解は $\langle I_z \rangle - I_0 = \sum_{i=1}^3 A_i e^{\lambda_i t}$ の形で求められるが, 解析的に表現するこ



とはできない。ここで具体的な分子運動を考慮し、 β を評価し、二スピン系の方程式に近似することを試みた。そして $1/T_1 = \beta I I$ の関係を使用した。ここで指摘してあきたいことは、(3)式を二スピン系に reduce しても、その係数 β (diagonal part) には三スピンの効果が含まれていることである。たとえば β_{II} , β_{IS} は次の通りである。

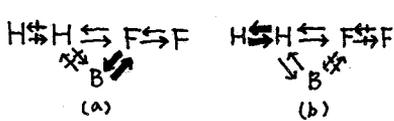
$$\beta_{II}^i = \frac{3}{2} \gamma_I^4 k^2 I(I+1) \sum_j \{ J_{ij}^{(1)}(\omega_I) + J_{ij}^{(2)}(2\omega_I) \} + \gamma_I^2 \gamma_S^2 k^2 S(S+1) \sum_k \left\{ \frac{1}{12} J_{ik}^{(0)}(\omega_I - \omega_S) + \frac{3}{2} J_{ik}^{(1)}(\omega_I) + \frac{3}{4} J_{ik}^{(2)}(\omega_I + \omega_S) \right\} + \gamma_I^2 \gamma_J^2 k^2 J(J+1) \sum_k \left\{ \frac{1}{12} J_{ik}^{(0)}(\omega_I - \omega_J) + \frac{3}{2} J_{ik}^{(1)}(\omega_I) + \frac{3}{4} J_{ik}^{(2)}(\omega_I + \omega_J) \right\} \quad (4)$$

$$\beta_{IS}^i = \gamma_I^2 \gamma_S^2 k^2 I(I+1) \sum_k \left\{ -\frac{1}{12} J_{ik}^{(0)}(\omega_I - \omega_S) + \frac{3}{4} J_{ik}^{(2)}(\omega_I + \omega_S) \right\} \quad (5)$$

X線解析された $\text{NH}_3\text{-BF}_3$ 分子の原子座標を使用し、また NH_3^- , BF_3^- グルーブの C_3 回転運動に対するスペクトル密度 J^0, J^1, J^2 及び $^1\text{H}, ^{19}\text{F}, ^{11}\text{B}$ の核スピンの定数を考慮して、係数 β の評価を行った。(ただし第4番目のスピン ^{14}N は考慮していない。) 高温側 NH_3 回転は充分速く、 $\tau_H \omega \ll 1$ であるので $\beta_{BH} \sim \beta_{BH} \sim 0$ である。

$\beta_{HH} = 0.2602 \times 10^9 g_2(\omega_H, \omega_F, \tau_F)$, $\beta_{HF} = 0.2602 \times 10^9 g_3(\omega_H, \omega_F, \tau_F)$, $\beta_{FH} = \beta_{HF}$, $\beta_{FF} = 1.4480 \times 10^9 g_1(\omega_F, \tau_F) + 2.8173 \times 10^9 g_2(\omega_F, \omega_B, \tau_F) + 0.2602 \times 10^9 g_2(\omega_F, \omega_H, \tau_F)$, $\beta_{FB} = 0.5635 \times 10^9 g_3(\omega_F, \omega_B, \tau_F)$, $\beta_{BF} = 15 \times \beta_{FB}$, $\beta_{BB} = 1.6904 \times 10^9 g_2(\omega_B, \omega_F, \tau_F)$ 。ここに $g_1(\omega, \tau) = \tau / (1 + \omega^2 \tau^2) + 4\tau / (1 + 4\omega^2 \tau^2)$, $g_2(\omega_1, \omega_2, \tau) = \tau / [1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 \tau^2] + 3\tau / [1 + \omega_1^2 \tau^2] + 6\tau / [1 + (\omega_1 + \omega_2)^2 \tau^2]$, $g_3(\omega_1, \omega_2, \tau) = -\tau / [1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 \tau^2] + 6\tau / [1 + (\omega_1 + \omega_2)^2 \tau^2]$ である。 $\beta_{HH}, \beta_{HF}, \beta_{FH}$ を無視して二スピン系の方程式にもどすと、 ^{19}F の T_1 は $^{19}\text{F}-^{19}\text{F}$, $^{19}\text{F}-^{11}\text{B}$, $^{19}\text{F}-^1\text{H}$ の結合を含んだ係数 β_{FF} の逆数であたえられる。理論的には $T_{1, \min} = 12.0 \text{ ms}$ がえられた。三つの相互作用の大きさは実測値と一致するように決定され、表1に示してある。また緩和時間の温度依存性から、係数の大きさ(双極子結合の大きさ)は小さいが、 β_{FF} 中 $g_2(\omega_F, \omega_H, \tau_F)$ が essential であることがわかった。高温側の ^1H の緩和時間に関しては、 β_{HH} と β_{HF} を含めねばならない。 $(\beta_{HB}$ は $\tau_H \omega \ll 1$ より無視できる。) さらに β_{BF} は大きい係数であるが、 ^1H の核スピンからみると二次的効果しかないのとおりあえず無視し、 β_{FF}, β_{FH} は考慮することになれば二スピン系になる。この近似のもとでは ^1H の T_1 は β_{HH} と関係づけられる。 ^{19}F のデータからえられたパラメータを使用して β_{HH}^{-1} をプロットすると 80.4 ms で極小値を示した。低温側からの寄与も考慮して、 $T_{1, \min}$ が 90 ms になるように決定された $^1\text{H}-^{19}\text{F}$ の結合の大きさ(表1)を使用して図4に理論曲線

(実線)を描いた。定性的には満足できる結果であるが、やや不一致である。 T_{min} は4.2 ($T=238K$)にあらわれたが、実測値は4.0 ($250K$)であった。また高温側でのズレも著しい。これらの事は β_{BF} を無視したためと考えられる。 β_{HB} や β_{BH} は殆んど零であるが、 β_{BF} の大きい項を通して、二次的にではあるが 1H の緩和に関わってくるものと考えられる。そのような意味では、三スピンを含んだ3個の微分方程式を解く必要があることを示唆している。いずれにしても高温側の ^{19}F と 1H の緩和時間は三スピンの相互作用の効果がはつきりと表われていることは確かである。低温側 この領域では BF_3 回転は制限されており、 NH_3 運動が緩和に支配的になる。係数 β を評価すると、 $\beta_{BB}=0.1630 \times 10^9 g_2(\omega_B, \omega_H, T_H)$, $\beta_{HB}=0.0326 \times 10^9 g_3(\omega_H, \omega_B, T_H)$, $\beta_{BH}=15 \times \beta_{HB}$, $\beta_{HF}=0.2602 \times 10^9 g_3(\omega_H, \omega_F, T_H)$, $\beta_{FH}=\beta_{HF}$, $\beta_{FF}=0.2602 \times 10^9 g_2(\omega_F, \omega_H, T_H)$, $\beta_{HH}=10.4696 \times 10^9 g_1(\omega_H, T_H) + 0.2602 \times 10^9 g_2(\omega_H, \omega_F, T_H) + 0.1630 \times 10^9 g_2(\omega_H, \omega_B, T_H)$ 。また $T_F \omega \gg 1$ より $\beta_{FB} \sim \beta_{BF} \sim 0$ 。この場合 β_{HH} が圧倒的に大きく、 $1/\tau_1 = \beta_{HH}$ が近似よく成り立ち、single-exponential decayが予測されるが、これは観測事実と一致する。 NH_3 回転運動が完全に $T_H \omega \sim 1$ の領域には入らないので、 ^{19}F と 1H 共極小値が観測できていない。そのため厳密にパラメーターを求めることはせず、 1H に対しては $C_2 g_1(\omega_H, T_H)$, ^{19}F に対しては $C_3 g_2(\omega_F, \omega_H, T_H)$ の形で実験値と対させた。(表1) 1H に対しては満足させる理論との一致がみられるが、 ^{19}F に対しては大きくズレている。 β_{HH} を除くすべての係数が同程度であることから、三スピンを含んだ方程式を解く必要がある場合もあるように思われる。即ち ^{19}F と 1H のcross-relaxationだけでなく、 $B-H$ の β_{BH} 項を考慮する必要がある。以上スピンの相互作用を模式的に描くと、左図の様になる。



(a)が高温領域(BF_3 回転が支配的), (b)が低温領域(NH_3 回転が支配的)のスピン間結合を示す。 \rightarrow は強い結合, \rightarrow は緩和に関わらない結合を示している。

(a)では ^{19}F が、又(b)では 1H が三スピン系にあたり、ここでのべた近似法から、 $^{19}F-^{19}F$, $^{19}F-B$, $^{19}F-H$ (^{19}F の場合)の結合の大きさが、又 $H-H$, $H-^{19}F$, $H-B$ (1H の場合)の結合の大きさが原理的に決定できる。さらに(a)での 1H , (b)での ^{19}F の場合は、二次的効果 β_{FB} があるいは β_{HB} を含む三スピン系で、より良い解析のためには三スピンを含む三速度方程式を解くことにより、えられる。換言すれば、それぞれの運動が緩和に支配的である核種に対しては、この近似法が有効であるが、それ以外の核種に対しては、explicit solutionを必要とする。それは当然のことながら、係数の相対的な大きさと分子運動の相関時間に依存して決ってくる。従来発表されている緩和時間のデータにもオマセ目3スピンの効果があらわれていいると思われるものもあり、今の様な考え方で解析を行えば、理論とまったく一致した結果、情報が入れるものと思われる。

表1	高温領域 BF_3 回転	低温領域 NH_3 回転	高温領域
T_i 極小値	^{19}F 4.0 (12.0)	—	$\beta_{FF} = C_1 g_1(\omega_F, T_F) + (2g_2(\omega_F, \omega_B, T_F) + C_3 g_2(\omega_F, \omega_H, T_F))$
	1H 90.0 (80.4)	—	$\beta_{HH} = C_3 g_2(\omega_H, \omega_F, T_F)$
E_a/kT_{mol} 活性化エネルギー	25.02	3.91	
τ_0/s 相関時間	3.169×10^{-19}	3.702×10^{-12}	
C_1/S^{-2} $^{19}F-^{19}F$	$1.244 \times 10^9 (1.4480 \times 10^9)$	$^1H-^1H$ $10.693 \times 10^9 (10.4696 \times 10^9)$	低温領域 $\beta_{FF} = C_3 g_2(\omega_F, \omega_H, T_H)$
C_2/S^{-2} $^{19}F-B$	$2.420 \times 10^9 (2.8173 \times 10^9)$	^1H-B — (0.1630×10^9)	$\beta_{HH} = C_1 g_1(\omega_H, T_H) + C_3 g_2(\omega_H, \omega_B, T_H) + C_3 g_2(\omega_H, \omega_F, T_H)$
C_3/S^{-2} $^{19}F-H$	$0.222 \times 10^9 (0.2602 \times 10^9)$	$^1H-^{19}F$ — (0.2602×10^9)	
	$^1H-^{19}F$ $0.202 \times 10^9 (0.2602 \times 10^9)$	$^{19}F-H$ $1.732 \times 10^9 (0.2602 \times 10^9)$	

(京都大学化学研究所) 北丸竜三, 堀井文敬, 平井諒子,
村山浩一, (京大工) 鈴木俊光

1. 緒言

高分解能NMRによる高分子のchain dynamicsに関する研究は主に溶液にて行なわれてきた。しかし固体におけるchain dynamicsを知るには最終的には固体状態で研究する必要がある。最近, 固体に対しても新しい高分解能NMR法が開発されているが塊状固体でもT_g以上であれば通常の¹³C NMR装置でもシャープなシグナルが得られ, 磁気緩和挙動を通じてchain dynamicsに関する情報が得られる。本研究は構造の多様な一連のポリエステル類についてT_g以上の広い温度域で¹³C NMR測定を行ない, シグナルおよびT₁をchain dynamicsと関連させて検討したものである。

2. 実験

試料 CH₂含量の異なるテレフタル酸ポリエステル [-CO--CO-O-(CH₂)_m-O]_l; m=2,3,4,6,10; l: 重合度, および脂肪族ポリエステルとしてポリエチレンサクチネートを用いた。テレフタル酸系ポリエステルはCH₂含有数mにて区別しC_mTと略記し, 後者はPESと略記する。これらポリマーの精製物を真空下で融体からそれぞれ融点より20~30℃低い温度で24時間等温結晶化させて試料とした。

NMR測定 ¹³C NMRをJNM-FX100により, 25.1MHzで¹Hノイズデカップリング下で行なった。スペクトルはflip angle π/4のパルス幅, くり返し時間2.5sで多数回積算して得た。T₁は180°-τ-90°パルス系列で測定した。

3. 実験結果

3.1. シグナル出現温度 図1にC₃Tの各温度におけるスペクトルを示す。90℃付近ではアロードであるが, 100℃でテレフタル酸残基(C-3)のシグナルが出現し始める。エチレン残基のCH₂基(C-4, C-5)のシグナルはより高温115℃で出現する。

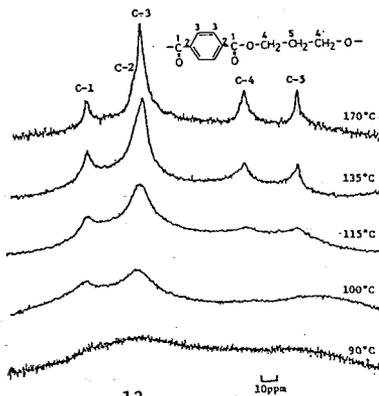


Fig.1 ¹³C NMR spectra of C₃T

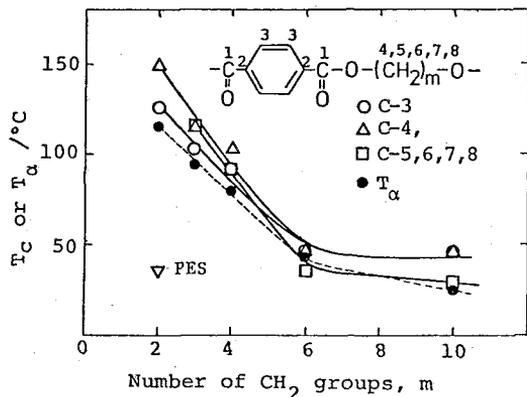


Fig.2 T_c or T_α vs number of CH₂ groups

¹³C Magnetic Relaxation and Chain Dynamics of Bulk Polyesters

R. Kitamaru, F. Horii, A. Hirai, K. Murayama (Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611), and T. Suzuki (Faculty of Engineering, Kyoto University, Kyoto 606)

図2にはHの結合している各炭素のシグナル出現温度 T_c を m に対し示す。 $m \leq 4$ ではC-4の T_c はC-3より常に高いが、両者は $m=6$ ではほぼ等しくなる。C-5, C-6, C-7, C-8の T_c は $m \geq 4$ でC-3, C-4のそれより低くなる(もちろん $m=2$ ではC-5, C-6...は無く; $m=3, 4$ ではC-5があり, C-6, C-7...は無い)。図中には周波数100Hzで測定した誘電緩和の α 吸収ピーク温度 T_α も示してあるが、 T_α とシグナル出現温度にはよい対応関係が見られる。

3.2. スピン-格子緩和時間 T_1 の温度依存性 各炭素の運動性を検討するために T_1 とシグナル出現温度 T_c から融解状態にいたる広い温度域で測定した。例として図3および図4にC6TとPESに対する T_1 を測定温度の逆数 $1/T$ (絶対温度表示)に対してプロットした。たゞ軸 nT_1 は T_1 に結合水素数 n を乗じたものである。図に見られるように各炭素は異なった $nT_1 - 1/T$ 関係を示し、それぞれ特有の運動様式をもつことがわかる。先ずC6Tでは、グリコール残基の中央のCH₂基(C-5, C-6)の nT_1 の極小は70°C付近にあり、C-3とC-4ではそれぞれ88°C, 97°C付近にある。170°C以上でC-3とC-4の値は接近するが融点をこえる高温になってもC-5, C-6の値とは一致しない。一方、PESに対しては2種のCH₂基間で全温度域で有意な差はあるが nT_1 の最小値は共に61°C付近でC6Tで見られるような炭素種による顕著な差は見られない。

4. 結果の解析および考察

4.1. ガラス-ゴム転移に伴う分子鎖の運動性 シグナル出現温度 T_c は各ポリエステルに対する広幅¹H-NMRで認められた狭幅成分の出現温度および図2に示した T_α とよく一致する。これら温度はガラス→ゴム転移に基づくものとみなされているため、シグナル出現過程は¹³C-NMRで観測されるガラス→ゴム転移であるとしてよい。したがって T_c あるいは $nT_1 - 1/T$ 関係によりこの転移過程を含む広い温度域で個々の炭素が如何様な運動性を示すかがわかる。

先ず脂肪族ポリエステルPESについて、 T_c あるいは nT_1 の温度依存性に2種のCH₂基間で目立った差はなく、また高温域での $\log nT_1 - 1/T$ プロットから求められる

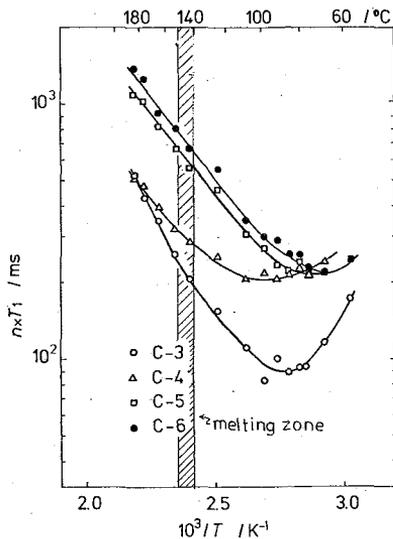


Fig.3 nT_1 vs $1/T$ for C₆T

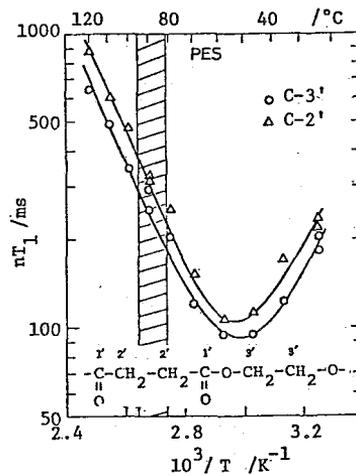


Fig.4 nT_1 vs $1/T$ for PES

活性化エネルギーは共にほぼ 39 kJ mol^{-1} である。したがってこのポリマーではガラス転移、融解を含む全温度域で分子鎖を構成する各部分はほぼ同様な chain motion を示すものと結論できる。これに反してテレフタル酸系ポリエステルの主鎖の構成要素は(C-3の属する)テレフタル酸残基, グリコール残基の末端の CH_2 基(C-4, 末端 CH_2 基と略称), およびグリコール残基中央部の CH_2 基(C-5, C-6, C-7, C-8; 中央 CH_2 基と略称)に大別され, それぞれ特有の運動性を示す。このうち, テレフタル酸残基および末端 CH_2 基は nT_1 の極小温度が最も高く, T_c も高いから運動性が最も小さいと考えられる。これに対し, 中央 CH_2 基の nT_1 極小温度は炭素数 m と共に低下し, $m \leq 3$ では運動性に乏しいが, $m \geq 4$ では最も大きな運動性をもつことになる。このことはテレフタル酸残基を含む $-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\langle \text{---} \rangle-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$ はカルボニル基とベンゼン環が共役二重結合状態にあると共に C-O結合も二重結合性をもつため全体がほぼ平板状で, そのため高まのため中央 CH_2 基より運動性が著しく制限されると考えるとよく理解できる。末端 CH_2 基の運動性がテレフタル酸残基の運動性と同程度か, $m \leq 3$ の場合にはむしろそれ以下であるのは, テレフタル酸残基と独立した独自の分子内回転が許されないためであろう。特に興味深いのは中央 CH_2 基で $m \leq 3$ では nT_1 極小温度も T_c も高く運動性は乏しいが $m \geq 4$ 以上になると最も大きな運動性をもつようになることである。これは CH_2 連鎖が4個以上連なると始めに例えればいわゆる 3-bond motion のようなテレフタル酸残基と独立な chain motions が可能になることを示すものである。

4.2. $nT_1 - 1/T$ 関係と分子鎖運動性 C, H系の ^{13}C NMRにおける nT_1 は,

$$\frac{1}{nT_1} = \frac{\gamma_C^2 \gamma_H^2 \hbar^2}{16 \gamma^6} [J_0(\omega_H - \omega_C) + 18J_1(\omega_C) + 9J_2(\omega_H + \omega_C)] \quad (1)$$

である。 γ_C, γ_H は ^{13}C および ^1H の磁気回転比, \hbar はPlanck定数/ 2π , γ はC-H間バクトル \mathbf{r} の大きさ, $J_m(\omega)$ はスペクトル密度で, \mathbf{r} の配向関数の自己相関関数のフーリエ変換で $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ の共鳴周波数 ω_C, ω_H の関数となる。 \mathbf{r} が等方的にランダム変動すれば J_m は1個の相関時間 T_c によつて式(2)のように決まり, 式(1)のように nT_1 は T_c の関数となる。

$$J_m(\omega) = K_m \frac{2T_c}{1 + \omega^2 T_c^2}, \quad K_0 = 4/5, \quad K_1 = 3/5, \quad K_2 = 8/5 \quad (2)$$

$$\frac{1}{nT_1} = \frac{\gamma_C^2 \gamma_H^2 \hbar^2}{10 \gamma^6} \left[\frac{3T_c}{1 + T_c^2 \omega_H^2} + \frac{6T_c}{1 + T_c^2 (\omega_H + \omega_C)^2} + \frac{T_c}{1 + T_c^2 (\omega_H - \omega_C)^2} \right] \quad (3)$$

nT_1 は $T_c \approx \omega_H^{-1}$ にて最小値を示す T_c の単一な関数となり, T_c は温度上昇と共に単調に短くなる筈であるから, nT_1 と $1/T$ 関係は $\omega_H = 100 \text{ MHz}$ の場合, 炭素種にかかわらず $T_c \approx 10^{-8}$ に対応する温度で最小値約 $40 \text{ m}\mu\text{s}$ を示す1本の曲線になる筈

である。事實は nT_1 の最小値は予想よりはるかに大きく各炭素種により異なる。この理論からの背違の原因として先ず考えられるのは T_c の分布である。例として $\log \Sigma^2$ 分布; 箱型分布を検討した。 T_c の分布を広くすると nT_1 最小値は増大するが, $100 \text{ m}\mu\text{s}$ 以上の実験値を説明するためには非現実的なほど広い分布を仮定しなければならず, またこの場合 nT_1 対 T_c 平均値関係曲線に著しい平坦化が見られた。したがって

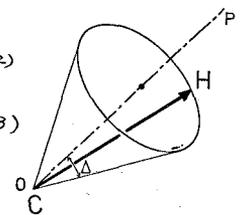


Fig.5 Stochastic rotation of a C-H vector for Woessner's model.

理論よりの背違を τ_1 の分布のみを求めることは不可であると結論する。

11 の変動として等方的なランダム運動ではなく、現実の分子鎖の運動により即応した様式を考える必要がある。ここでは Woessner および Howarth の運動モデルを考えよう。これらモデルは図5で示したように 11 がある軸のまわりに角度 Δ を一定にしてランダムに回転するか、あるいは Δ を変えて librate し、回転軸 OP が等方的なランダム変動をするものである。すると、 $J_m(\omega)$ はランダム回転の場合、

$$J_m(\omega) = K_m \left[A \frac{2\tau_1}{1+\omega^2\tau_1^2} + B \frac{2\tau_2}{1+\omega^2\tau_2^2} + C \frac{2\tau_3}{1+\omega^2\tau_3^2} \right] \quad (4)$$

$$\tau_2^{-1} = \tau_1^{-1} + \tau_3^{-1}, \quad \tau_3^{-1} = \tau_1^{-1} + 4\tau_2^{-1}; \quad A = (3\cos^2\Delta - 1)^2/4,$$

$B = (3/4)\sin^2 2\Delta$, $C = (3/4)\sin^4 \Delta$; τ_1 は回転軸の等方的運動を、 τ_2 はランダム回転と規定する相関時間である。また Δ も変化する libration の場合、 Δ の最大値を X とすれば、

$$J_m(\omega) = K_m \left[A' \frac{2\tau_1}{1+\omega^2\tau_1^2} + (1-A') \frac{2\tau_3}{1+\omega^2\tau_3^2} \right] \quad (5)$$

$\tau_3^{-1} = \tau_1^{-1} + \tau_4^{-1}$; $A' = (\cos X - \cos^3 X)^2/4(1-\cos X)^2$; τ_4 は libration を規定する相関時間。

となり、いずれの場合も nT_1 は 2 個の相関時間の関数となる。これらモデルはパラメータ数が多く、実験データと対比に際して融通性がやや大きいと思われるが、 τ_2 または τ_4 は温度に対して不敏感で τ_1 より一般にはるかに短いと思われること、 nT_1 対温度関係で 1 回だけしか最小値を示す点のことなどの実験結果を参照すれば、合理的な式中のパラメータをほぼ決めることができた。図6に

libration の場合の 1 例と示す。理論曲線は $\tau_4 = 9 \times 10^{-10}$ s 一定とし; X は C-3, C-4, C-5, C-6 炭素に対してそれぞれ $X = 42, 57, 58, 58^\circ$; τ_1 と温度との換算は $\tau_1 = \tau_{10} \exp(\Delta E/T)$ なる関係が成立したからそれぞれの炭素に対して $\Delta E = 20.3, 15.6, 16.5, 19.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ なる値を用いた。見られるように理論と実験データの一致は極めて良い。

この例のように Woessner, Howarth らの 2 個の相関時間で 11 の変動を記述する 2 τ モデル理論は各種炭素に対する nT_1 vs. $1/T$ 関係をよく説明することができる。しかしこの方法で得た τ_1 値とその温度変化、炭素種間での差異などに基づいて各炭素の運動モードを考察すると上の理論計算で得たパラメータ ($\tau_1, \tau_2, \tau_4, \Delta, X$ など) が正確に chain dynamics と対応しているかどうかは多少の不安がある。最も現実的なモデルとしては 11 はある軸のまわりにランダム回転するが、その回転軸もまた等方的なランダム変動をするある軸のまわりに librate するようになる τ モデルであろう。

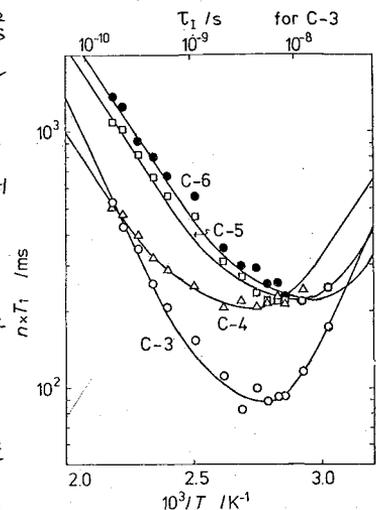


Fig.6 nT_1 vs $1/T$ for C.T. Solid lines are theoretical ones calculated by Howarth's model.

3

^{35}Cl NMRの線幅からみたクラウン-KCl錯体におけるクロ
ライドイオンの挙動
(分子研, 都立大*, 名工大**)の菅原 正, 湯田坂雅子*, 横山幸弘**
藤山常毅, 岩村 秀

I. はじめに

^{35}Cl のように核四極子を有する核種の線幅は, 四極子緩和時間で支配され, 分子の回転の相関時間 τ_c と測定周波数との積が1より十分小さい場合には, 四極子結合定数の2乗と τ_c との積に比例する。 $\Delta\nu_{1/2} \propto (e^2qQ)^2 \cdot \tau_c$ ここで, Einstein-Stokesの式 $\tau_c = 4\pi a^3 \eta / 3kT$ を用い, 半値幅を溶液の粘度で割り, 粘度補正半値幅 $\Delta\nu_{1/2}^0 = \Delta\nu_{1/2} / \eta / \eta_0$ ($\eta_0 = 1 \text{ cP}$) を定義すると, 半値幅の τ_c 依存性が除去され $\Delta\nu_{1/2}^0$ は, 核の周囲の電場勾配 q を反映する量と見做することができる。溶液中の塩素イオンの ^{35}Cl の半値幅の濃度依存性は, 対イオンの性質により異なり, 以下のよう要約される。1) アルカリ金属の塩化物の水溶液においては, ^{35}Cl の線幅は広い濃度範囲(3 mmole ~ 10 mole/l)に亘り, 一定(10 Hz前後)に保たれる。このことは, 塩素イオンの最近接の水分子が対称的に溶媒和されている¹⁾(free ion or solvent separated ion pair), 電場勾配 q が十分小さいことを示唆している。2) 対イオンがテトラアルキルアンモニウムのように疎水性を有すると, 水溶液中の線幅は著しい濃度依存性を示す。これは, 疎水性陽イオンの周囲に形成される配向した水分子の層に Cl^- がとび込み(contact ion pair), これら水分子のつくる電場により Cl^- の核の周囲に電場勾配 q が生じる為と理解される。この際 free イオンとイオン対間の交換は十分に速く, 平均化したスペクトルを与える。¹⁾

以上の知見をもとに, 今回クラウンエーテルにとり込まれた K^+ を対イオンとする Cl^- の水溶液, 有機溶媒中での挙動に注目した。クラウン-KCl錯体は, 細胞膜を介する透過性のモデルとして, 又相間移動触媒や有機溶媒中で大きな反応性を示すハロゲン化剤として種々の研究が行われており, Cl^- の挙動に關し, 微視的見地からの知見を得ることは, 甚だ重要であると考えられる。

II. 実験

^{35}Cl NMRの測定条件は前回報告の通りである。²⁾ 18-クラウン-6-KCl錯体は以下のように調整した。塩にカリウム(1.11g, 14.9 mmole)と, 18-クラウン-6(3.94g, 14.9 mmole)をメタノール60 mlに懸濁させ, 2時間煮沸還流すると均一な溶液が得られる。室温でメタノールを減圧下留去するとメタノールを1分子取り込んだ錯体³⁾が得られる。錯体の均一性は, 粉末X線回折法により確認した。この錯体をクロロホルムに溶解し, 減圧下溶媒を留去した後, 減圧下80~110°Cで乾燥するとメタノールを含まない18-クラウン-6-KCl錯体が得られる。有機

Behaviour of Chloride Ion in Crown Ether-KCl Complexes in Solution Studied by ^{35}Cl NMR Line-Width (Inst. for Molecular Science, Tokyo Metropolitan Univ., Nagoya Inst. of Technology) Tadashi SUGAWARA, Masako YUDASAKA, Yukihiro YOKOYAMA, Tsunetake FUJIIYAMA, and Hiizu IWAMURA

すがわらただし・ゆださかまさこ・よこやまゆきひろ・ふじやまつねたけ・いわむらひいず

溶解中での測定に際しては、予め溶液を調整した後、モレキュラーシーブ(4A又は3A)を入れ、一定放置したものを用了。

III. 結果及び考察

III-1. 18-クラウン-6 水溶液に KCl を添加した時の ^{35}Cl の線幅の濃度依存性

K^+ イオンは、18-クラウン-6 に選択的に取り込まれることはよく知られている。18-クラウン-6 の水溶液 (0.808 mole/kg) に KCl を $0 \sim 1.5 \text{ mole/kg}$ 添加した時の ^{35}Cl の半値幅を測定した。線幅は KCl の濃度と共に増大し、 0.75 mole/kg で極大となり、それ以降徐々に減少する。(図1参照) 極大となる濃度はクラウンと KCl の当量点 0.808 mole/kg に近い。又、クラウンの濃度 0.445 mole/kg の溶液についても同様に 0.445 mole/kg に極大をもつ上に凸の曲線が得られた。(図2参照) このことは、 K^+ がクラウンに取り込まれたことにより疎水性を持ち線幅が濃度依存性を示したことを意味している。 KCl の低濃度領域では、 K^+ はほぼ定量的にクラウンに取り込まれており、 Cl^- は free イオンとクラウン- K^+ のイオン対の平衡にある。従って、観測される平均化された線幅は、 KCl の濃度の増加に伴い広がる。当量点を過ぎると KCl が過剰になる為、free の Cl^- が必然的に増し、線幅は減少する。

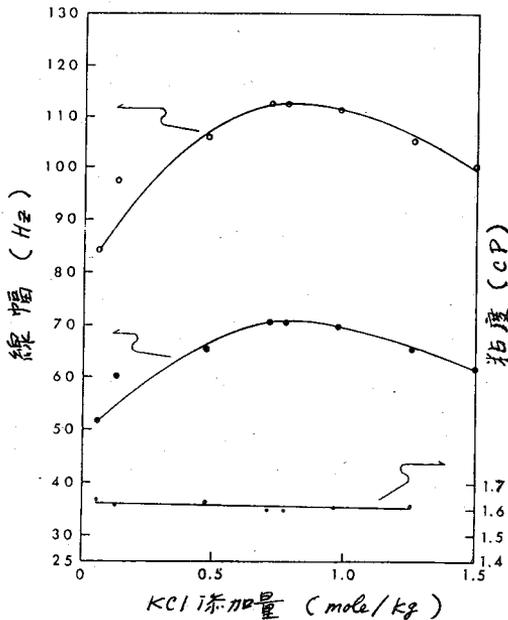


図1: KCl の添加に伴う ^{35}Cl の線幅の変化 (クラウン 0.808 mole/kg)
 ○ 実測線幅 ● 粘度補正線幅
 • 粘度実測値

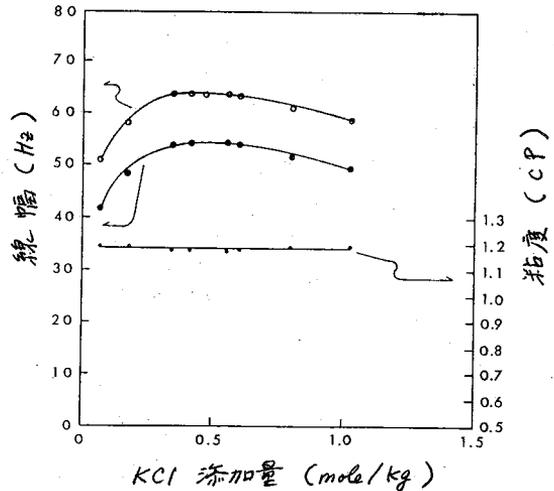
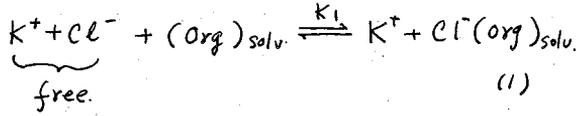


図2: KCl の添加に伴う ^{35}Cl の線幅の変化 (クラウン 0.445 mole/kg)
 図中の記号は左に同じ

III-2. ポリエチレングリコール水溶液に KCl を添加した時の ^{35}Cl の線幅

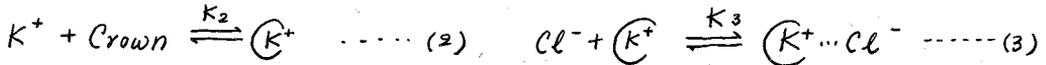
同様のプロットをポリエチレングリコール (PEG 平均分子量 200) の水溶液 (1 mole/kg) について行なったところ図3に示すように、 KCl の濃度依存性は認められないことがわかった。PEG はクラウンと異なり、 K^+ を取り込む作用を持たない。従ってクラウンにおける濃度依存性が K^+ を取り込んだクラウンに特有であることが実証された。尚、 ^{35}Cl の線幅は 40 Hz と水溶液中の値 (10 Hz)

より広い。このことは、PEGの周囲に配向した水の殻があり、 Cl^- が一定の確率でその中にとび込んで線幅を広げていることを示唆している。しかし、この平衡定数は、小さい為、($K_1 < 0.1$) 顕著な濃度依存性を示さない。



III-3. 線幅の濃度依存性に対する半定量的取扱い

18-クラウン-6-KCl水溶液における ^{35}Cl の濃度依存性に対し半定量的な解析を試みた。クラウン存在下のKClの錯平衡は次のように表わされる。(2)式の K_2 については $\log K_2 = 2.02$ と求められている。実測線幅は、(3)式より free と pair の荷重平均として



$$\Delta\nu_{1/2}^{obs} = \frac{\Delta\nu_{1/2}^p [C^+ \dots Cl^-] + \Delta\nu_{1/2}^f [Cl^-]}{[C^+ \dots Cl^-] + [Cl^-]} = \frac{\Delta\nu_{1/2}^p - \Delta\nu_{1/2}^f}{1 + f/p} + \Delta\nu_{1/2}^f \quad \dots \quad (4)$$

(4)式で表わされる。曲線の型は K_3 のみで決まり $\Delta\nu_{1/2}^p - \Delta\nu_{1/2}^f$ は縦軸の尺度のみに関係しているため、 K_3 及び $\Delta\nu_{1/2}^p$ をそれぞれ独立に決定することができる。図4、図5にKClの添加量に伴う ^{35}Cl の線幅の変化に関して

K_3 を0.01~100に固定した時の理論曲線と実測値を示した。図4では実測値に若干バラツキがあるが、 $\log K_3 = 0.3 \pm 0.5$ とした時に実測の曲線がほぼ良好に再現される。又、free及び

pair 固有の線幅としてクラウン

濃度 0.808 mole/kg の時 $\Delta\nu_{1/2}^f = 50.0$ Hz, $\Delta\nu_{1/2}^p = 93 \pm 15$ Hz ; 0.445 mole/kg の時 $\Delta\nu_{1/2}^f = 35.6$ Hz, $\Delta\nu_{1/2}^p = 88 \pm 23$ Hz と示まった。以上水溶液中のクラウン-KCl錯体における Cl^- の挙動に関して新しい知見が得られた。

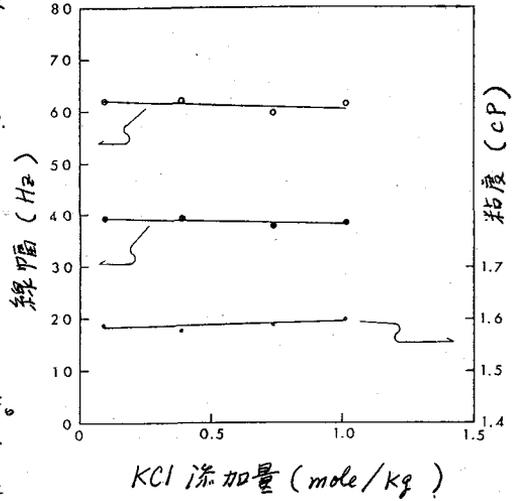


図3: KClの添加に伴う ^{35}Cl の線幅の変化(記号は図1に同じ)

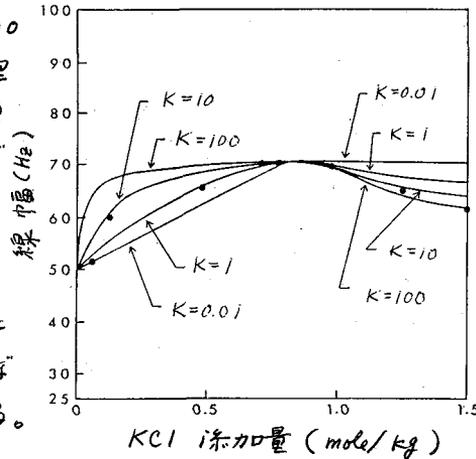


図4: ^{35}Cl 線幅変化の理論曲線 (クラウン 0.808 mole/kg)

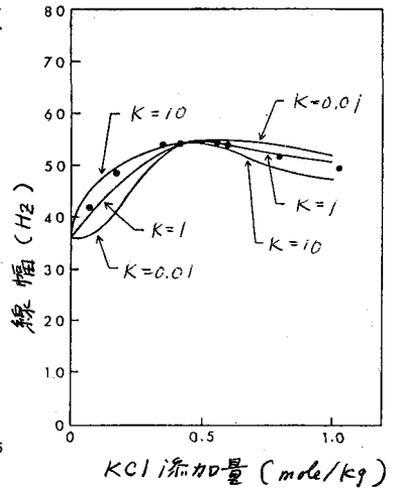


図5: ^{35}Cl 線幅変化の理論曲線(クラウン 0.445 mole/kg)

III-4. 有機溶媒中におけるクラウン-KCl錯体の ^{35}Cl の線幅

クラウン化合物の大きな特徴の一つは、無機塩と錯体をつくり、塩を有機溶媒に可溶にすることにある。有機溶媒中での Cl^- はfreeで存在し、しかも強い溶媒和をうけていないと考えられ(naked anion)高い反応性を示すことが知られている。このような Cl^- をスペクトル的に実証する目的で、有機溶媒中でクラウン-KCl錯体の ^{35}Cl NMRを測定した。有機溶媒中で水溶液と同様のプロットを行なうことは、溶解度の点で困難である為、クラウン-KCl錯体を単離し、種々の溶媒に溶解して、その線幅及び濃度依存性を検討した。表1に示すように、一般に ^{35}Cl の線幅はかなり狭い。特にアセトニトリル中では10 Hz前後で僅かに濃度依存性を示し、 Cl^- が殆んどfreeの状態で存在していることを示唆している。線幅は、ジクロロメタン中でも非常に狭く、クロロホルム中でやや増大する。一方メタノール、エタノール中では、例外的に広い線幅を示す。これらの溶媒中で溶解度が特に小さくなるとは考えにくく、むしろfreeの Cl^- イオンが、アルコールの水酸基と相互作用し、 Cl^- 周囲の対称性がNMRの時間尺度からみて、くずれていると考えるのが妥当であろう。このことは、メタノールを1分子含む錯体が、各溶媒中で1.2~6倍広いこと、又、ジクロロメタン中に0.17当量のトリクロロ酢酸を添加すると線幅が22 Hzから250 Hzにも増加することより裏付けられた。後者は Cl^- と酸性プロトンとの間に、更に強い相互作用があることを示すものである。以上により有機溶媒中での Cl^- の挙動が明らかになると共に、溶媒和の詳細についても知見が得られた。

表1: 18-クラウン-6-KCl 錯体の有機溶媒中での ^{35}Cl の線幅

溶媒	誘電率/ Fm^{-1}	濃度/ mole l^{-1}	$\Delta\nu_{1/2}/\text{Hz}$	η/cP	$\Delta\nu_{1/2}/\text{Hz}$	δ/ppm
アセトニトリル	36	0.0108	9	0.419	22	37
		0.0215	12	0.419	29	37
		0.0335	13	0.419	31	36
		0.0430	17	0.419	41	36
メタノール	32.6	0.0254	88	0.620	142	-34
		0.0507	97	0.651	149	-34
		0.0676	99	0.660	150	-33
		0.1015	104	0.688	151	-33
エタノール	24.3	0.0563	196	1.225	160	-13
		0.2029	116	0.744	156	-32
ジクロロメタン	7.8	0.0382	11	0.499	22	4
		0.0563	12	0.508	24	6
クロロホルム	4.8	0.0464	62	0.639	97	6

a) 誤差 < 10% b) KCl水溶液の ^{35}Cl の化学シフトを基準 誤差 ± 1 ppm

参考文献

- 1) M. Yudasaka, T. Sugawara, H. Iwamura, and T. Fujiyama, Bull. Chem. Soc. Jpn., **54**, 3273 (1981), and references therein, 2) 第19回 NMR 討論会予稿集

(東大生研) ○ 篠田純雄・斎藤泰和

1. はじめに

シリカゲルなどの金属酸化物表面に化学結合させた固定化有機官能基は、微量金属の予備濃縮・分離,¹⁾ 錯体触媒の固定,²⁾ 液体クロマトグラフ用固定相³⁾ として有用であるが、分光学的にはこれまで比較的限られた知見(光音響法,⁴⁾ ESRスピラベル法⁵⁾)しか得られていない。適当な溶媒に懸濁させることにより、シリカゲルに固定したアミノ基のCMRが良好な分解能で観測できることから、^{6,7)} ここでは水溶液中アミノ化シリカゲルとプロトン(HCl), およびPt(II)イオン(K_2PtCl_6)との相互作用を検討した。

2. 実験

既報の方法⁶⁾により、シリカゲル(100~200メッシュ, $S_{BET} = 148 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)を $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OEt})_3$ および $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OMe})_3$ で化学修飾し、それぞれ $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}-(\text{シリカ})$ (N-シリカ, $S_{BET} = 35 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}-(\text{シリカ})$ (N,N-シリカ, $S_{BET} = 19 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)を調製した。固定化有機基量は、元素分析値より 2.8 mmol g^{-1} (N-シリカ)および 2.0 mmol g^{-1} (N,N-シリカ)である。

CMRスペクトルはJEOL FX60またはFX60Q FT-NMR分光器(周波数15 MHz)で測定した。内部ロックおよび化学シフトの基準をとるため、同軸細管中に封入したジオキサン重水溶液(20 vol%)を用い、 $\delta(\text{TMS}) = \delta(\text{ジオキサン}) - 67.4 \text{ ppm}$ の換算を行なった。

アミノ化シリカゲル(0.5 g)は、測定前にNMRサンプル管(10 mmφ)中で水溶液(1 cm³)に懸濁・沈降させ、生成するゲル層(厚さ約1.5 cm)をテフロン栓で固定した。T₁は反転回復法により、NOEはゲート付きデカップリング法により(待ち時間10T₁以上)求めた。

3. 結果および議論

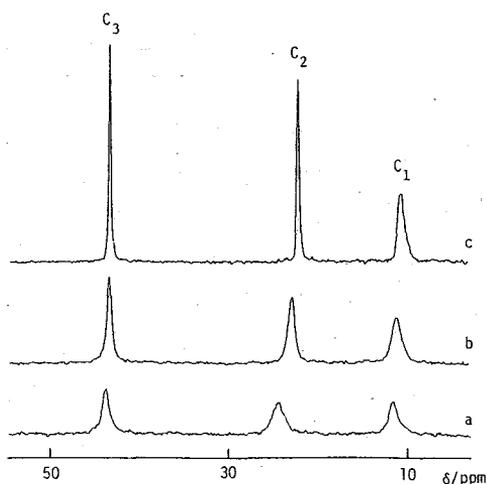


図1. $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}\equiv$ 基修飾シリカゲルのCMRスペクトル, およびそのHCl添加効果(15 MHz, 29°C, H₂O溶媒, 12800回転数). [HCl]/[L]: 0(a), 0.6(b), 1.0(c) 線幅 C₁: 18(a), 16(b), 14(c) (Hz) C₂: 24(a), 13(b), 5(c) C₃: 13(a), 9(b), 4(c)

CMR Studies of Organofunctional Groups Fixed on Silica Gel
(Univ. Tokyo) S. Shirouda and Y. Saito

3.1 プロトン和の効果

図1にN-シリカのCMRスペクトル(H₂O溶媒)および、HCl添加にともなうスペクトルの変化を示す。HCl添加量を増すとともに三つのピークは単調に高磁場シフトし、[HCl]/[L]比が1で飽和した。アミノ基のβ位炭素でプロトン和シフト量が大きいのは一級アミンの特徴であり(表1)、スペクトルとしてはプロトン和種と非プロトン和種の平均が観測されている。

N,N-シリカについても、すべての炭素で単調な高磁場シフトが観測された(図2)。アミノ基では含まれた二つの炭素のプロトン和シフト量が相対的に大きい点は、遊離ジアミンと同様である(表1)。図2において、[HCl]/[L]=2でシフトが飽和したことから、シリカゲル上に存在するすべてのジアミノ基がプロトン和可能であり、一部のジアミノ基のプロトン和が困難とされるエチレンジアミン修飾×タクリル酸グリシジル-ジメタクリル酸エチレンコポリマーの場合(ただし化学滴定による)⁹⁾と対照的である。

表2にN-シリカのT₁とNOEの値を示す。80%プロトン和の状態でのT₁(s; 29°C)は0.30(C₁), 0.45(C₂), 0.48(C₃)と求められた。表2の値を用いて算出したモル分率平均0.31(C₁), 0.48(C₂), 0.50(C₃)とよく一致する。温度を上げるとT₁が減少したので、固定化アミノ基の内部運動に関する(実効的または平均的)相関時間(τ_c)は、T₁極小点の高温側にある。⁹⁾従って、プロトン和により内部運動性は高まるといえる。この理解は、HCl添加にともなう線幅減少の事実(図1)とも調和する。NOEの値が理論的的最大値(2.987)よりもやや小

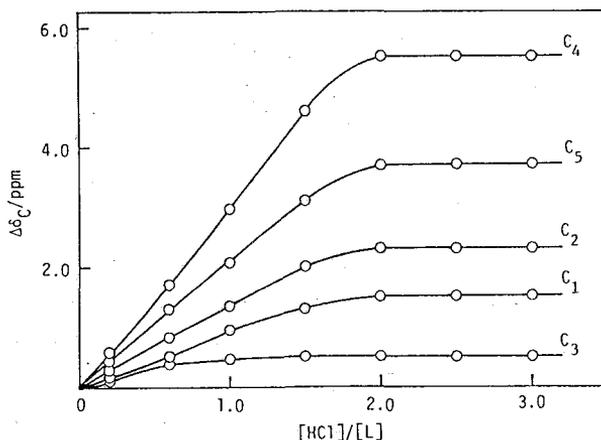


図2. シリカゲルに固定したNH₂CH₂CH₂NH-CH₂CH₂CH₂Si≡三基の¹³Cケミカルシフトに対するHCl添加効果(ただし、高磁場シフトを正とする)。

表1. シリカゲル固定化アミノ基および有機アミンの¹³Cケミカルシフト^aとプロトン和シフト^b

group or molecule	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
NH ₂ CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Si≡	11.5 (-1.1)	24.8 (-2.8)	43.7 (-0.8)		
NH ₂ CH ₅ CH ₂ CH ₂ NHCH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Si≡	11.7 (-1.5)	23.0 (-2.3)	52.0 (-0.5)	51.0 (-5.5)	40.4 (-3.7)
NH ₂ CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₃ ^c	12.17 (-0.43)	26.90 (-5.36)	44.24 (-1.75)		
NH ₂ CH ₄ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ ^c	14.75 (-0.47)	21.06 (-0.75)	36.18 (-6.23)	42.06 (-1.47)	
NH ₂ CH ₃ CH ₂ CH ₂ NHCH ₃ ^c	36.86 (-2.11)	55.11 (-8.33)	41.94 (-5.16)		
NH ₂ CH ₄ CH ₂ CH ₂ NHCH ₂ CH ₃ ^c	15.56 (-3.36)	44.44 (+0.28)	52.37 (-7.20)	41.70 (-4.66)	

^a TMS基準 ppm単位. ^b 括弧内. ^c 文献(13).

表2. シリカゲルに固定した $NH_2CH_2CH_2CH_2Si$ 三基の T_1 と NOE^a

sample	temp/°C ^b	T_1/s			NOE		
		C_1	C_2	C_3	C_1	C_2	C_3
no addends	29	0.21	0.35	0.36	2.4	2.4	2.4
	51	0.32	0.49	0.62			
protonated ^c	29	0.35	0.53	0.55	2.5	2.5	2.5
	51	0.68	1.05	1.17			

^a 15 MHz, H₂O 溶媒, 誤差 2-10%. ^b ± 1°C. ^c [HCl]/[L] = 1.

さいのは, 室温付近の高分子溶液について指摘されたように,¹⁰⁾ 固定化のため再配向速度が遅く, 極度尖鋭化条件 ($\omega_0 T_c \ll 1$) を満足していないことが一因であろう。プロトン相にもなる T_1 の増加は N, N -シリカでも観測された(表3)。なお, 均一溶液中 n -ブチルアミンの T_1 は, プロトン相により減少する(例えば $T_1/s : C_\alpha$ 13.4 → 0.97, C_β 13.4 → 1.50, C_γ 15.0 → 2.13, C_δ 12.1 → 3.46)。¹¹⁾ アンモニウムイオンと対アニオン・溶媒殻との相互作用により overall の再配向が遅くなるためとされた。

固定化アミノ基の内部運動は, プロトン相されていない状態の方がむしろ束縛が大きい。これは, 固定化のためにアミノ基間, あるいはアミノ基とヒラノール水酸基との間に強固な水素結合が形成されるためであろう。実際, 最近光音響スペクトルを用いて, シリカゲルに固定されたアミノプロピル基とピクラミドプロピル基の間に官能基どうしの相互作用のあることが示されている。⁴⁾ アミノ化シリカゲルを液体クロマトグラフ固定相として用いる場合, 溶媒の極性や溶質の酸性により, この水素結合の様相は変化するのであろう(固定化アミノ基の CMR 吸収の線幅は, 懸濁溶媒の種類に顕著に依存し, 水 < η < クロロホルム < \ll ベンゼンの順であった⁶⁾)。クロマトグラフの分離機構を分子論的に考察する上で, 表面有機基の CMR によるキャラクタリゼーションは, 有用な手がかりを与えるものと期待される。

3.2 Pt(II) との相互作用

N, N -シリカを K_2PtCl_4 水溶液と接触させたところ, 新たに δ 46.7, 55.0 ppm に幅広いピークが生じた(図3)。エチレンジアミン類縁配位子をもつ $Pt(II)$ 錯体の CMR 定数¹²⁾ との比較により, これらのピークはそれぞれ C_5 および $C_3 \cdot C_4$ の重畳と帰属できる。遊離配位子のピークは $[Pt]/[L] \propto 0.5$ で消失したので, 表

表3. シリカゲルに固定した $NH_2CH_2CH_2NHCH_2CH_2CH_2Si$ 三基の T_1^a

sample	T_1/s				
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
no addends ^b	0.10 (2.6)	0.14 (2.7)	0.20 (2.7) ^c	0.14 (2.7) ^c	0.37 (2.8)
diprotonated ^d	0.25	0.28	0.57	0.51	1.08

^a 15 MHz, H₂O 溶媒, 29 ± 1°C, 誤差 2-10%. ^b 括弧内 NOE .

^c ピーク重畳のため C_3 と C_4 の平均値. ^d [HCl]/[L] = 2.

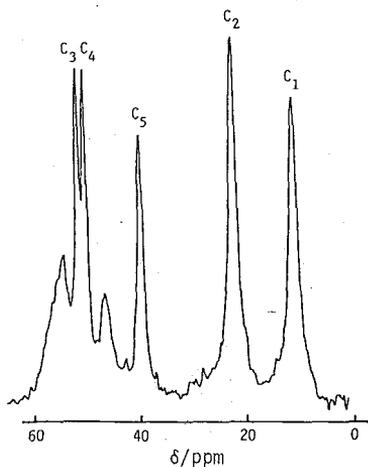


図3. K_2PtCl_4 を添加した $NH_2CH_2CH_2NHCH_2CH_2CH_2Si_3$ 基修飾シリカゲルの CMR スペクトル (15 MHz, 60°C, H_2O 溶媒, 25000 回積算, $[Pt]/[L] = 0.2$)

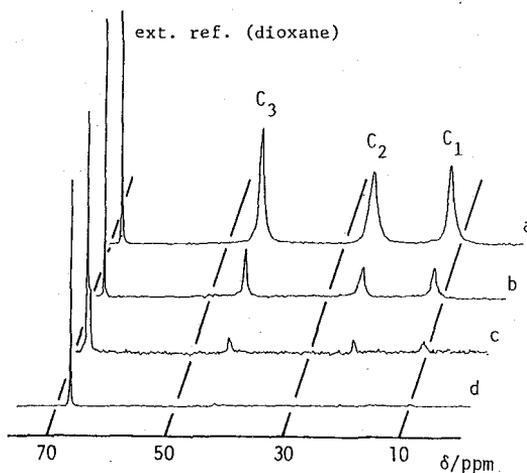


図4. $NH_2CH_2CH_2CH_2Si_3$ 基修飾シリカゲルの CMR スペクトルに対する K_2PtCl_4 添加効果 (15 MHz, 29°C, H_2O 溶媒, 積算回数 40000 (a, c), 30000 (b), 70000 (d), $[Pt]/[L]: 0$ (a), 0.1 (b), 0.2 (c), 0.3 (d))

面には主として $[Pt(N,N)_2]^{2+}$ 型の錯体が生成している。なお、配位子交換の徴候は 80°C でも認められなかった。N-シリカの場合、 $[Pt]/[L]$ 比の増加とともに遊離配位子ピークの強度が単調に減少し、一方 $Pt(II)$ 配位種にあたるピークは検出されなかった (図4)。遊離配位子ピークは $[Pt]/[L] \approx 0.3$ で検出困難となったので、表面には $Pt:N = 1:3$ のほかに $1:4$ の組成をもつ錯体が混在しているものと推定される。これらの錯体は表面と3あるいは4点で結合しているため運動性が強く束縛され、線幅が広くなっているであろう。

このように、表面アミノ基が直接して存在するという状況は、 K_2PtCl_4 水溶液と接触させたときの CMR スペクトルの変化にも反映している。特に、金属配位種が直接観測される場合には、錯体融媒固定化の状況把握に有力な知見を与えるものと期待される。

文献

- (1) D.E. Leyden, G.H. Luttrell, *Anal. Chem.*, **47**, 1612 (1975).
- (2) F.R. Hartley, P.N. Vezev, *Advan. Organomet. Chem.*, **15**, 189 (1977).
- (3) K.K. Unger, "Porous Silica", Elsevier, New York (1979), Chap. 3.
- (4) R.S. Davidson, W.J. Lough, S.A. Matlin, C.L. Morrison, *J.C.S. Chem. Comm.*, 517 (1981).
- (5) L.D. Hall, J.C. Waterton, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3697 (1979).
- (6) K. Tanaka, S. Shinoda, Y. Saito, *Chem. Lett.*, 179 (1979).
- (7) K. Tanaka, S. Shinoda, N. Takai, H. Takahashi, Y. Saito, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 1242 (1980).
- (8) Z. Radová, E. Kalalová, J. Kalal, Yu. N. Kukushkin, S.A. Simanova, L.V. Kononov, V.N. Pak, *Angew. Macromol. Chem.*, **81**, 55 (1979).
- (9) J.R. Lyerla, Jr., G.C. Levy, "Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy", Vol. 1, Wiley, New York (1974), Chap. 3.
- (10) J. Schaefer, reference (9), Chap. 4.
- (11) G.C. Levy, *J.C.S. Chem. Comm.*, 768 (1972).
- (12) L.E. Erickson, J.E. Sarneski, C.N. Reilley, *Inorg. Chem.*, **14**, 3007 (1975).
- (13) J.E. Sarneski, H.L. Surprenant, F.K. Molen, C.N. Reilley, *Anal. Chem.*, **47**, 2116 (1975).

序. 我々は前回および前々回の討論会で液晶中のNMRを利用した分子構造の研究について発表した。¹⁾ 今回は、ジメチルスズジクロライド Me_2SnCl_2 について¹H NMRの他¹³C NMRも利用して溶液状態での分子構造の検討を行なった。

実験. 液晶にはZLI 1167(メルク製)を用いた。この溶媒は磁場に垂直方向に配向するため、従来のNMR測定装置で試料回転が可能であり、配向した溶質のスペクトルの分解能を上げることができる。実際には $\sim 5\text{Hz}$ の半値幅が見られた。市販の液晶には木によると思われる信号が観察されたので、市販品を 10^{-5}torr で真空蒸留した後用いた。 Me_2SnCl_2 は市販品を屏華精製した。全2の試薬はデシケーター中に保存した。¹Hおよび¹³C NMRの測定は日立R-900M FT-NMR装置により行なったが、一部のCW測定ではR-22 NMR装置を利用した。いずれもプローブ温度は 34.1°C である。液晶自身のブロードな信号がベースラインのうねりとして現われるので「ベースライン補正」を適宜利用した。スペクトル解析には、LAOCN3および4Aを一部修正したプログラム¹⁾を用いた。LAOCN4Aの場合、異核種は大きなシフト差で表現されることになっているが、配向スペクトルの場合はスペクトル幅が非常に広いので、そのシフト差に非常に大きな値を入力する必要がある。これは計算スペクトルをプロットする上でも不都合があるので、LAOCN3と同様、データ入力の初めに異核種の指定ができるよう変更した。

結果と考察.

Me_2SnCl_2 の¹Hスペクトル

配向した Me_2SnCl_2 のスペクトルは A_3A_3' 系となる。この系ではメチル基間の直接および間接結合定数 $D(\text{H}, \text{H}')$ 、 $J(\text{H}, \text{H}')$ 、メチル基内の直接結合定数 $D(\text{H}, \text{H})$ 、および、メチル基のシフトがパラメーターとなり、既にハミルトニカンの正確な解により34本の信号が出現可能であることが知られている。実際には、図1のスペクトルから30本の信号が観察できた。スペクトル解析では $D(\text{H}, \text{H}')$ が 100Hz に近いことから、 0.5Hz 程度の $J(\text{H}, \text{H}')$ は0と近似した。予備計算より図1の1のピークは $\pm \frac{3}{2}D(\text{H}, \text{H}')$ に、2のピークは $\pm \frac{9}{2}D(\text{H}, \text{H}')$ に、また、3のピークは $\pm |3D(\text{H}, \text{H}) + \frac{9}{2}D(\text{H}, \text{H}')|$ に相当することがわかるので、これらより2つのD値をかなり正確に求めることができる。ここでは常法通り、全2のピークについてシミュレーションを行なった。計算スペクトルは2つのDの符号を同時に反転しても不変であるので、ここでは両者が異符号であることが確定するのみである。

希釈法による $J(\text{Sn}, \text{H})$ の決定

図1の¹Hスペクトルでは、¹¹⁹Snと¹¹⁷Snのサテライトが各メインピークを中心とする二重線として現われ、その間隔は $|2D(\text{Sn}, \text{H}) + J(\text{Sn}, \text{H})|$ に相当する。したがって、

$J(Sn, H)$ を正確に評価できれば、 $D(Sn, H)$ を求めることができる。このためには、幾々が前回、初めて報告した希釈法¹⁾を利用した。希釈剤には CCl_4 を用いた。

Me_2SnCl_2 の ^{13}C スペクトル

この場合、スペクトルは A_3A_2X 系となる。実測スペクトル(図2)では SN 比が小さいため全てのピークを観察することはできないが、シミュレーションにより $D(C, H)$ と $D(C, H')$ を決定することができる。予備計算により、図2の計算スペクトルは、 $R = J(C, H) + 2D(C, H)$ とすると、1のピークは $\pm\{\frac{1}{2}R + D(C, H')\}$ に、2のピークは $\pm\{\frac{1}{2}R + 3D(C, H')\}$ に、3は $\pm\{R + 2D(C, H')\}$ に、4は $\pm\{\frac{3}{2}R + D(C, H')\}$ に、5は $\pm\{\frac{3}{2}R + 3D(C, H')\}$ に相当することが分かる。無毒性溶液の測定から、 $J(C, H)$ には溶媒依存性は見られず、 $J(C, H')$ は殆んど D であった。したがって、これらの値を用いてシミュレーションを行なった。

1H スペクトルの ^{13}C サテライト

上述の 1H と ^{13}C スペクトルより $D(Sn, C)$ と $D(C, C')$ を除く全ての D 値が得られるが、 1H と ^{13}C スペクトル測定の時間的相違などのため両者から得た D 値が全く同一条件下の値かどうか問題が残る。このため、ここでは 1H スペクトルの ^{13}C サテライトを観察して両者の対応を付けた。 ^{13}C サテライトも A_3A_2X 系であるが、この場合は、「有効化学シフト」の考えから分かるように、サテライトは単純にメインピークの各々が

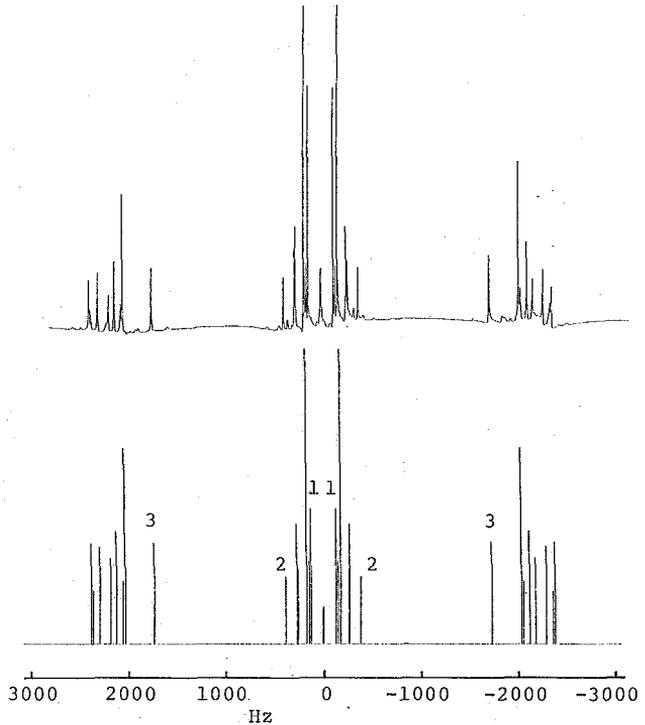


Fig. 1. 1H NMR Spectra of Me_2SnCl_2 (0.5M) in ZLI 1167.

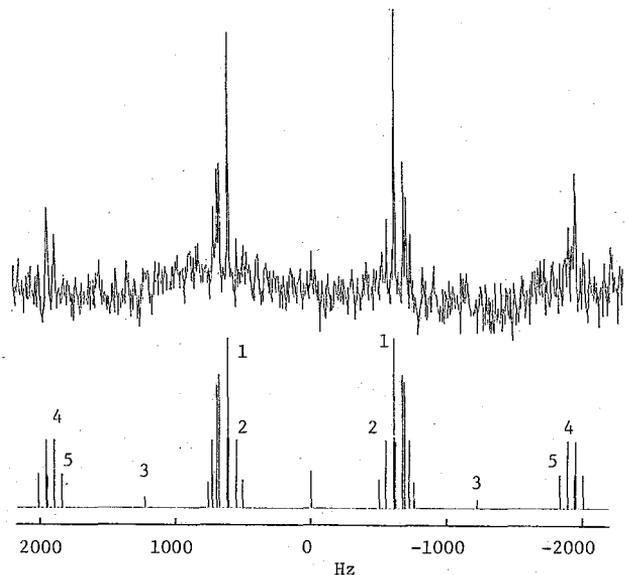


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of Me_2SnCl_2 (0.5 M) in ZLI 1167. 99906 scans accumulated.

二重線に分裂した形とはならない。長時間積分した¹Hスペクトルでは、¹³Cサテライトの一部が観察できるので、上の¹Hと¹³Cスペクトル解析により得たパラメータを利用して¹³Cサテライトの解析を行なった。この結果ではD(C,H')の計算誤差が非常に大きかったが、これは計算に用いたサテライトピーク(15本)がD(C,H)により支配的に決められるピークであったためと考えられる。したがってD(C,H')は¹³Cスペクトルから得たD(C,H)/D(C,H')の比を利用して求めた。

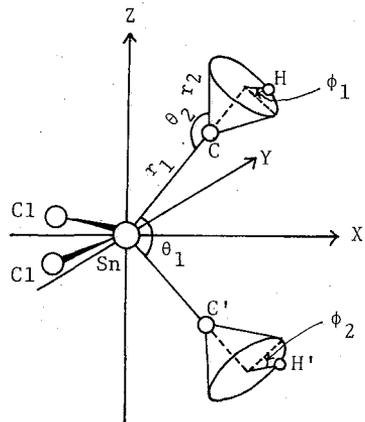


Fig. 3. Geometry of Me₂SnCl₂.

DおよびJの符号について

¹Hスペクトルでは、D(H,H)とD(H,H')の符号

を反転しても同じ計算スペクトルとなるので、両者が異符号であることが分かるのみであった。¹³CスペクトルでもD(C,H)とD(C,H')が異符号であることが分かるのみであるが、この場合はJ(C,H)が関与するので、符号を入れ替えると絶対値も異なった値となる。以下に示すように、D(C,H)/D(H,H)およびD(Sn,H)/D(H,H)はSnCH₃の部分構造にのみ依存するので、これらの比が実際の分子の形から予想される値に近いことが必要であり、これを利用すれば全てのDの符号は一義的に決定される。その際J(C,H)とJ(Sn,H)を負とするとき上述の比が良い値とはならず、これらのJが正であることを確認させた。最終的に得られたDとJを表1に掲げる。

Dと分子構造の関係

前回と前々回に報告したC_{2v}対称のMe₂SnCl₂およびMe₃SnClでは、独立な配向パラメータは一つであったが、今回のMe₂SnCl₂自身の構造は四面体型であるのでC_{2v}対称となり配向パラメータは二つが独立変数となる。この場合、Dは一般には、下式を利用して計算することができ

$$D(A,B) = -\frac{h}{4\pi^2} \gamma_A \gamma_B \left\langle \frac{S_{AB}}{r_{AB}^3} \right\rangle, \quad S_{AB} = \sum_{PQ} \cos \theta_P^{AB} \cos \theta_Q^{AB} \cdot S_{PQ} \quad \text{for } P, Q = X, Y, Z \quad (1)$$

および $S_{XX} + S_{YY} + S_{ZZ} = 0, S_{XY} = 0, S_{XZ} = 0, \text{ and } S_{YZ} = 0.$

その結果D(C,H)/D(H,H)とD(Sn,H)/D(H,H)はMe₂SnCl₂およびMe₃SnClと全く同様に、

$$\frac{D(C,H)}{D(H,H)} = 16 \frac{\gamma_C}{\gamma_H} \sin^2 \frac{3\alpha}{2} (2 \sin^2 \frac{\alpha}{2} - 1), \quad \text{for } \cos^2 \theta_2 = 1 - \frac{4}{3} \sin^2 \frac{\alpha}{2} \quad (2)$$

$$\frac{D(Sn,H)}{D(H,H)} = -\frac{\gamma_{Sn}}{\gamma_H} \left(\frac{r_{HH}}{r_{SnH}} \right)^3 \left\{ 2 - 3 \left(\frac{r_{CH}}{r_{SnH}} \right)^2 \sin^2 \theta_2 \right\} \quad (3)$$

と表すことができる。(2)式より、 θ_2 が得られる。これと電子線回折による値 $r_{SnCl} = 2.109 \text{ \AA}$ を利用すると(3)式は r_{CH} のみに依存するので r_{CH} が決められる。

$D(H,H')/D(H,H)$ は Me_2SnCl_2 および Me_3SnCl の場合と同じ式で表すことはできないので、 θ_1 を決めるためには、2つの配向パラメーターを含む式を解く必要がある。この際(1)式の()内の値を2つのメチル基の自由回転に関する統計平均値として求めることが必要となり、それには数値積分を利用した。 θ_1 を種々の値に仮定して $D(H,H)$ と $D(H,H')$ に関する(1)式相当の式から S_{xx} と S_{zz} を求め、これらに対する $D(C,H')$ を計算した。この計算値が実測の $D(C,H')$ に最も良く一致するような θ_1 を選んだ。

以上のようにして得た Me_2SnCl_2 の構造パラメーターを表2に示す。 r_2, θ_2 は気体電子線回折の値と良く一致している。 θ_1 の値は気体状よりも液晶中の方がかなり大きい。ここには考慮に入れられない振動の補正項は、 $D(C,H)$ には無視し得ないかも知れないが、それは θ_2 に関係するのみである。したがって、液晶自身の塩基性のために液晶中では θ_1 が広がっていると考えるのが妥当であろう。既に報告したように、¹⁾ ZLI 1167 は通常ここで用いたような目的によく使われる液晶の中では塩基性が強いので、それが原因と予想できる。液晶溶媒に強い塩基を混合した場合も同様の効果により、 θ_1 が広がると予想できる。これについては現在詳しく検討中である。

配向パラメーターについて

$Me_2SnCl_2, Me_3SnCl, Me_3SnCl$ の ZLI 1167 中での配向パラメーターは表3に示す通りである。3者とも $Sn-Cl$ 軸が光軸に垂直な方向を向き易いことがわかる。我々は前々回の討論会で Me_3SnCl に少量のピリジンを添加した場合、 Me_3SnCl の信号だけが異常にスペクトル幅が小さくなることを報告した。この現象は、 Me_3SnCl -ピリジン錯体が全体として細長い形をしており、光軸に平行に配向しているとすると、free の Me_3SnCl と錯形成した Me_3SnCl では配向パラメーターの符号が逆となり、それらの統計平均値としての全体の配向パラメーターが非常に小さくなったためと考えられる。今回の Me_2SnCl_2 の場合は DMSO, HMPA を添加してもそのような現象は見られなかった。例えば溶液中でトランスの1:2錯体を考えれば $Sn-Cl$ 結合は free と同様に光軸に垂直方向を向くはずであり、上の考えと矛盾しない。

Table 2. Structure of Me_2SnCl_2 .

Medium	r_1	r_2	θ_1	θ_2
ZLI 1167	2.109 ^b	1.120	123.0	108.42
Gas ^a	2.109	1.112	110.1	108.0

^a From ref. 2. ^b Assumed.

Table 3. Order parameter of Me_nSnCl_{4-n} .

Solute	Concentration	S_{xx}	S_{yy}	S_{zz}^a
Me_3SnCl_3	0.08 M			0.0837
Me_2SnCl_2	0.5 M	0.0747	-0.1456	0.0709
Me_3SnCl	0.13 M			-0.0488 ^b

^a $S_{zz} = S_{c3v}$ in Me_3SnCl_3 and Me_3SnCl .

^b in Nematic Phase IV.

References

1. H. Fujiwara and Y. Sasaki, J. Magn. Resonan., **41**, 171 (1980) and J. C. S. Chem. Comm., **1981**, 35.
2. H. Fujii and M. Kimura, Bull. Chem. Soc. Japan, **44**, 2643 (1971).

6

シクロヘキサンの ring inversion の 高圧高分解能 NMR による研究

(イリノイ大, 阪大教養*) D.L. Hasha, O. Eguchi*, J. Jonas

序論 シクロヘキサンの ring inversion の温度・圧力依存性に関する研究のうち、圧力依存性に関する実験は、1件しか報告されていない。それも、圧力範囲は2 kbar までである(溶媒は多成分, $T=217\text{K}$)。¹⁾ これまでのところ、ring inversion の低エネルギー経路は half-chair が遷移状態 (twist-boat, boat も少く混じる) になることがわがっている。また、最近、isomerization reaction に対する stochastic model^{2,3)} を使って反応座標への溶媒効果、衝突効果(分子間相互作用の寄与)

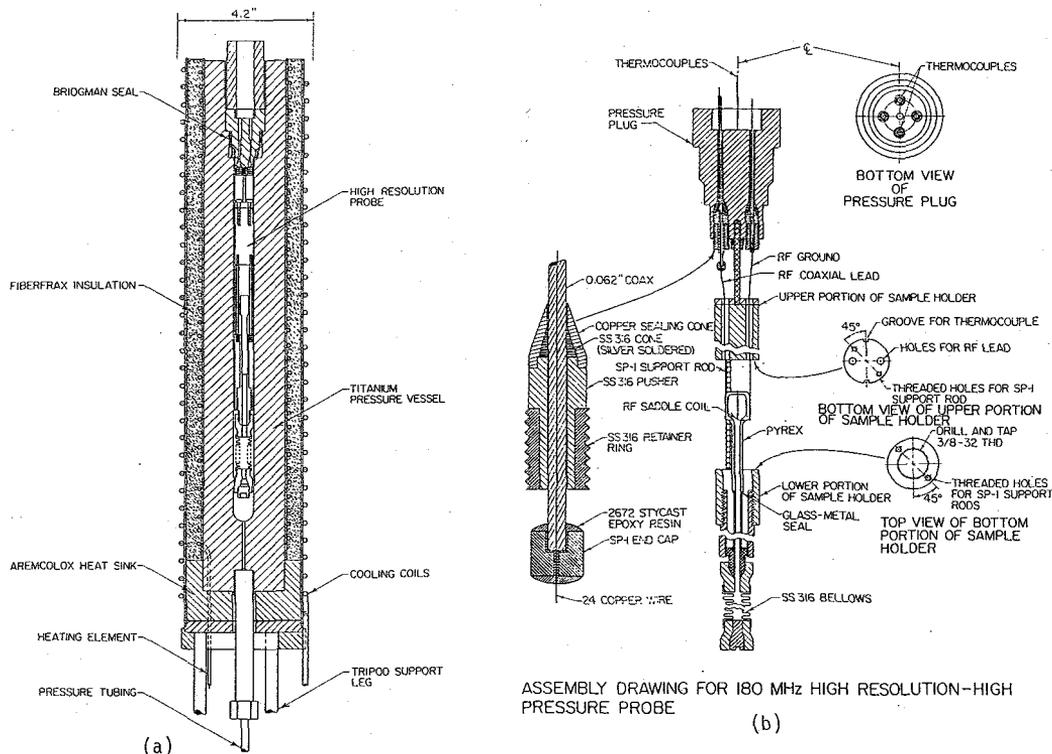


Fig. 1. Schematic drawings for the high-resolution and high-pressure NMR probe

も議論されている。本研究の第1の目的は、種々の溶媒中のシクロヘキサンにおける isomerization rate の温度変化と圧力変化の両方を測定することである。第2は stochastic model を用いての実験データの解析である。

実験 図1に、超重導磁石 (Oxford社製, 作業径12 cm) 用の高圧高分解能 NMR プロブを示す。 ^1H の共振周波数は180 MHz である。分解能は sample spinning なしでのエタールエーテルの線幅で1 Hz である。圧力媒体 (CS_2 を使用) は外部圧力システムに連結してあって、測定中常に圧力をモニターできる。図1(a)に示

したチタン合金製圧力容器は5 kbarまで使用できる（内径を少し小さくすると9 kbarまで使用可能）。sample cell (6mm中)にはステンレス製のベロー（図1(b)）が取り付けられており、CS₂とsampleは完全に分離されている。このプローブはガス圧の場合にも使用でき、COガスを圧力媒体にした¹³C-NMRの研究も行った。⁵⁾ 温度制御は、室温以下のばあいメタノール循環クライオスタットを使った。最低温度は-70°Cである。室温以上では、圧力容器外側に巻いた同軸加熱コイルで200°Cまで加熱できる。試料は5 mol % シクロヘキサンのCS₂, メチルシクロヘキサン-D₁₄, アセトン-D₆の3種類である。本実験の温度範囲は210-250 K, 圧力範囲はCS₂とC₆D₁₁CD₃溶液のとき4.7 kbar, アセトン-D₆溶液のとき3.25 kbarまでである。

結果 図2に、3種類の溶媒中での線形の圧力変化の典型例を示す。圧力が增大するとchair-chairの運動が加速される様子が明瞭に示されている。シクロヘキサンは12個のスピンをもつA₆B₆の複雑なシステムであるが、2本の吸収線の会合温度(T_{COA})よりも上の温度領域のスペクトル(速い交換)はABシステムとして近似できる。T_{COA}以下の温度では各吸収線はスピンスピン相互作用により拡がり(遅い

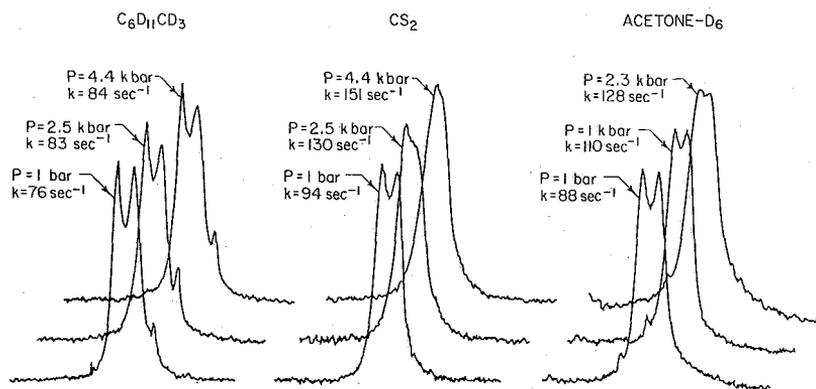


Fig. 2. ¹H FT-spectra of cyclohexane in different solvents(T=218 K)

交換), 厳密な解析は困難になる。この場合は、交換なしのときの線幅をパラメータとし、T_{COA}以上のときのデータと連続的なつながりをもつようなABシステムとして解析した。こうして得たring inversionの速度定数の温度依存性の結果を図3に、圧力依存性の結果を図4に示す。

考察 古典的な遷移状態理論(TST)によれば, isomerization rateは

$$k_{TST} = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (1)$$

で表わされる。stochastic model^{2,3)}は溶媒効果, 衝突による効果などをとり込み,

$$k_{OBS} = k k_{TST} \quad (2)$$

の形で, 透過係数kが導入される。TSTのばあいk=1である。式(1),(2)から活性化エネルギー($\Delta E_{OBS}^\ddagger = \Delta E_{TST}^\ddagger + \Delta E_{COLL}^\ddagger$), 活性化体積($\Delta V_{OBS}^\ddagger = \Delta V_{TST}^\ddagger + \Delta V_{COLL}^\ddagger$)

は下のようによわされる (COLLは衝突の寄与を示す)。

$$RT^2 \left(\frac{\partial \ln k_{OBS}}{\partial T} \right)_P = \Delta E_{OBS}^\ddagger, \quad RT^2 \left(\frac{\partial \ln k}{\partial T} \right)_P = \Delta E_{COLL}^\ddagger \quad (3)$$

$$-RT \left(\frac{\partial \ln k_{OBS}}{\partial P} \right)_T = \Delta V_{OBS}^\ddagger, \quad -RT \left(\frac{\partial \ln k}{\partial P} \right)_T = \Delta V_{COLL}^\ddagger \quad (4)$$

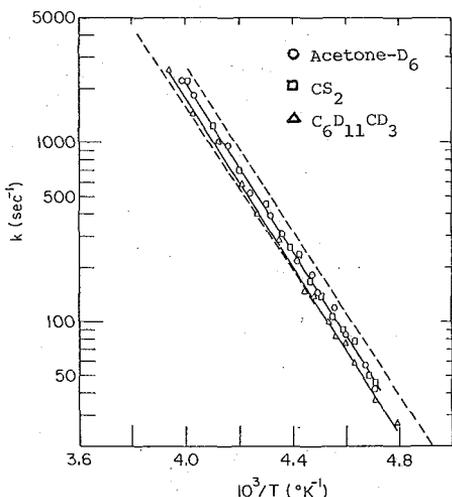


Fig. 3. Temperature dependence of k

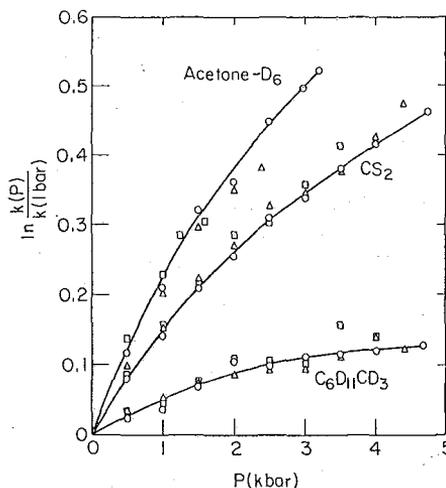


Fig. 4. Pressure dependence of k

Montgomery らは *n*-butane のトランス↔ゴーシユの変換速度について stochastic model を適用し, ΔE_{COLL}^\ddagger は ΔE_{TST}^\ddagger に比べて小さくなるが, ΔV_{COLL}^\ddagger のほうは ΔV_{TST}^\ddagger よりも 1 桁ほど大きく, かつ圧力依存性が強いことを推論している²⁾

温度変化の結果 (図3) から, 活性化エンタルピー, 活性化エントロピーには溶媒による違いは見られる, $\Delta H^\ddagger = 10.0 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta S^\ddagger = -2.7 \pm 1.0 \text{ e.u.}$ となる。一方,

Table 1. Activation volumes for conformational isomerization of cyclohexane

Solution	Temperature (K)	P_{MAX} (bar)	$\Delta V^{a\dagger}$ (cm^3/mol)	$\Delta V_{OBS}^{o\ddagger b}$ (cm^3/mol)	$\Delta V_{COLL}^{o\ddagger c}$ (cm^3/mol)
40% CYH, 30% TMS 15% CD_2Cl_2 , 15% $\text{C}_6\text{D}_{11}\text{CD}_3^d$	217	2000	-1.9 ± 0.5	---	---
5% CYH, $\text{C}_6\text{D}_{11}\text{CD}_3$	225	4700	-0.5 ± 0.2	-1.3	0.2
	218	4400	-0.5 ± 0.2	-1.0	0.5
	213	4000	-0.6 ± 0.2	-1.0	0.5
5% CYH, CS_2	225	4700	-1.8 ± 0.3	-3.1	-1.6
	218	4400	-1.9 ± 0.3	-3.4	-1.9
	213	3500	-2.1 ± 0.3	-3.2	-1.7
5% CYH, Acetone- d_6	225	3250	-3.0 ± 0.5	-4.8	-3.3
	218	2350	-2.9 ± 0.5	-4.0	-2.5
	213	1600	-3.3 ± 0.5	-4.9	-3.4

^a Linear least squares fit of data which assumes the volume of activation to be independent of pressure.

^b Obtained from the initial slopes of the data in Fig. 4.

^c $\Delta V_{COLL}^\ddagger = \Delta V_{OBS}^\ddagger - \Delta V_{TST}^\ddagger$; $\Delta V_{TST}^\ddagger = -1.5 \text{ cm}^3/\text{mol}$.

^d Solution composition in percent by volume. H. D. Lüdemann et al.

圧力変化の結果 (図4) には, 溶媒による大きな違いが見られる。このデータは下の展開式 (5) で再現できる。

$$\ln k(P) = A_0 + A_1 P + A_2 P^2 + A_3 P^3 \quad (5)$$

式(4), (5) から活性化体積を求めると, Table 1 と図5 に示すようになる。アセトン D_6 中がもっとも強い圧力依存性を示している。 ΔV_{TST}^\ddagger は遷移状態分子と chair 型分子のモル体積の差で, 圧力には依存しない。したがって, ΔV_{OBS}^\ddagger の圧力依存性は ΔV_{COLL}^\ddagger の寄与によるものと考えられる。half-chair 型の遷移状態分子はシクロヘキセンに

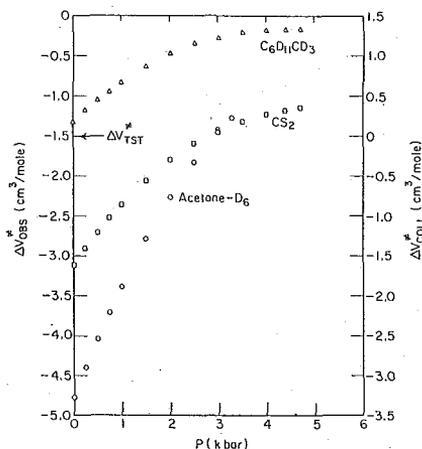


Fig. 5. Pressure effects on the volumes of activation ($T=225$ K)

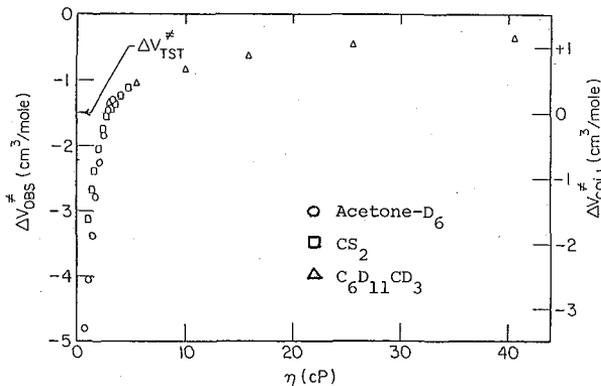


Fig. 6. Correlation between the shear viscosity and the volumes of activation

似た構造をもつ。シクロヘキセンとシクロヘキサンのモル体積の差に, 二重結合による寄与などを補正すると, $\Delta V_{TST}^\ddagger = -1.5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ と見積られる。 ΔV_{TST}^\ddagger の値と ΔV_{COLL}^\ddagger の圧力依存性のプロットを図5に示す。

ΔV_{COLL}^\ddagger は式(4)からわかるように透過係数 k に依存している。この k は溶媒分子の衝突周波数の関数になると考えられる。²⁾ この衝突の因子は, ずれの粘度に依存する。そこで3種類の純溶媒について, ずれの粘度の温度, 圧力変化をNMRと同じ条件で測定した。 ΔV_{COLL}^\ddagger をずれの粘度に対してプロットしたものが図6である。3種類の溶液について ΔV_{COLL}^\ddagger の値が単一の曲線でよく表わされる。

ΔV_{TST}^\ddagger の見積りには $\pm 1 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ 程度の不確かさがあると思われるが, いずれにせよ図5, 6に示された ΔV_{COLL}^\ddagger の圧力依存性の定性的な結論には変化がない。シクロヘキサンの isomerization rate の障壁の高さ ($\sim \Delta E^\ddagger$) は, 溶媒の種類に左右されないが, 活性化体積 (ΔV^\ddagger) は溶媒によって異なり, 分子間相互作用を強く反映しているものと考えられる。

References

- 1) H.D. Lüdemann, R. Rauchschalbe, and E. Lang, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **16**, 331 (1977)
- 2) J.A. Montgomery, Jr., D. Chandler, and B.J. Berne, *J. Chem. Phys.*, **70**, 4056 (1979)
- 3) J.L. Skinner and P.G. Wolynes, *J. Chem. Phys.*, **72**, 4913 (1980)
- 4) J. Jonas, D.L. Hasha, W.J. Lamb, G.A. Hoffman, and T. Eguchi, *J. Magn. Reson.*, **42**, 169 (1981)
- 5) B.T. Heaton, J. Jonas, T. Eguchi, and G.A. Hoffman, *J.C.S. Chem. Comm.*, **1981**, 331

京大・理 〇松井 茂, 寺尾武彦, 雑賀聖規

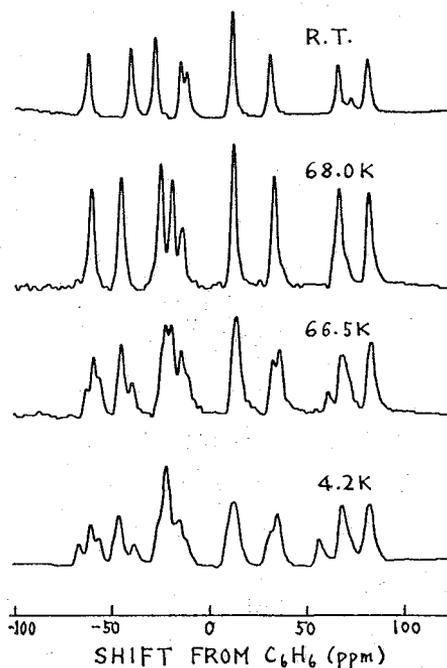
< 序 >

β -キノール・メタノール包接化合物の cavity 中に trap されたメタノール分子がどのような運動状態にあるか。あるいは極低温においてはどのように配向するかは興味深い問題である。しかし、それらの詳細に関しては不明瞭な点が多い。我々はすでに、単結晶において室温で ^{13}C 高分解能スペクトルを測定した結果を報告し⁽¹⁾ メタノール分子が結晶 C 軸に関して軸対称に再配向運動を行っているとい^(2,3)う。従来見い出されていながら、新しい分子運動形態の存在を明らかにしてきたが、今回、更に詳しい知見を得る目的で ^{13}C 高分解能スペクトルを 363K ~ 4.2K の温度範囲にわたって測定するとともに、 ^1H のスピン格子緩和時間の温度変化測定 (298K ~ 14.3K) を行ったのでその結果を報告する。

< 実験 >

全ての測定は、自作の装置により約 1.4T の静磁場のもとで行った。proton-enhanced NMR の実際に関しては以前と同様である⁽¹⁾。単結晶は酸素分子 (低温ではスペクトルの broadening の原因となる) を除くために、真空ライン中で作成した。またメタノール分子の吸収線と隣立させようために、約 20% ^{13}C CH_3OH enrich した単結晶も作成した。guest methanol に関しては、種々の温度で角度変化させて ^{13}C のスペクトルを測定した。host quinol に関しては、室温^(1,2) と 77K で角度変化測定を行った。 T_1 測定は、 CH_3OH の包接された粉末試料ばかりではなく CD_3OH (D 置換率 > 99%) が包接されたものに対しても行った。これらの試料も脱水したメタノール又は真空昇華したピドロキノンを用いて真空ライン中で作成した。 T_1 測定には、パルス系列 $90^\circ \times \text{comb.} - \tau - 90^\circ \times - 90^\circ$ による saturation recovery 法

Fig.1 Temperature dependence of ^{13}C high-resolution spectrum of the β -quinol-methanol clathrate.



The phase transition occurs between 68.0K and 66.5K.

A Study of Dynamic Structure of β -Quinol-Methanol Clathrate by ^{13}C High-Resolution Solid-State NMR and Proton T_1 Measurement

Department of Chemistry, Kyoto University

〇S.Matsui, T.Terao, and A.Saika

を用いた。温度変化は加圧による N_2 gas flow 方式及び減圧による He gas flow 方式の cryostat と同様に 行った。

< 結果と議論 >

^{13}C 高分解能スペクトルの温度変化

図1に室温, 68K, 66.5K, 4.2K で測定した ^{13}C のスペクトルを示す。室温のスペクトルに比べて68Kのスペクトルは line の位置の変化はみられるが、どちらも line の数は10本である。室温^(1,2)及び77Kで各 line について角度変化測定を行い、化学シフトテンソルを決定した結果 host quinol に関しては、わずかに異方性が增大するだけで主値, 主軸方向ともほとんど温度変化はみられなかった。しかしながら約67Kの転移直下, 66.5Kになると、たとえ host quinol の左端の line は3本に分裂しており、4.2Kでは更にその分裂幅が増大がみられている。また trap された guest methanol に関しては363K~4.2Kの温度範囲にわたって角度変化測定を行い、その結果転移直上では guest methanol の line は1本であり、そのテンソルは結晶 C 軸に関して軸対称で、異方性 $\Delta\sigma$ は図2に示すように温度を下げるにつれて連続的に増大していくことがわかった。しかし、転移直下の温度では、図3に示すように、転移直下不連続的に1本の line (M) が3本 (M_1, M_2, M_3) に分裂し、更に少しづつ温度変化していきことがわかった。そこで、これら各 line について68K, 65K, 40K, 20K, 4.2Kの各温度で角度変化測定を行い、各 line の化学シフトテンソルの主値及び主軸方向を決定した。表1に各温度で得られた主値を示す。実験誤差(約 ± 1.5 ppm)以内で、

Fig.2 Temperature dependence of ^{13}C chemical shift anisotropy and isotropic mean shift of the trapped methanol molecules.

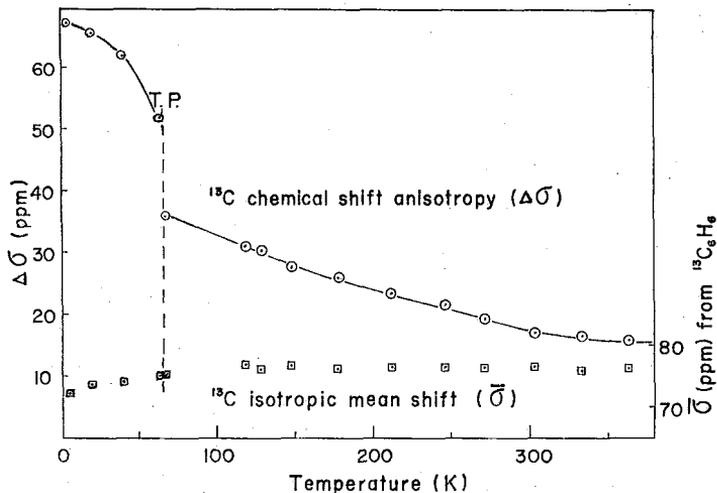
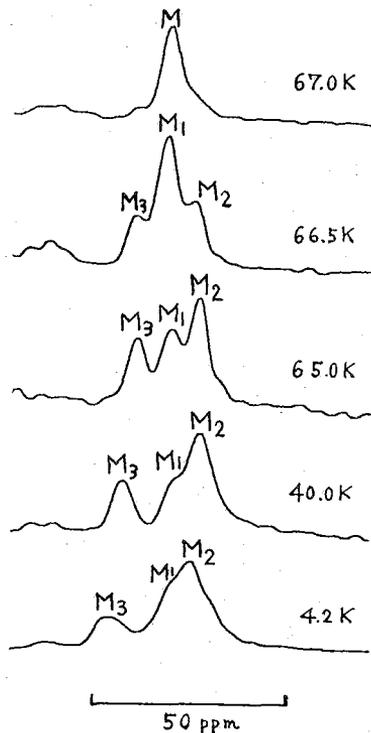


Fig.3 Temperature dependence of ^{13}C high-resolution spectrum of the trapped methanol molecules.



The phase transition occurs between 67.0K and 66.5K.

ほぼ、 M_1, M_2, M_3 の各

主値は一致している。

また、図2にその異方性及び等方平均値の温度変化を示す。(主軸方向に関しては講演で述べた) これらの結果から、guest methanolは転移域以上では、

結晶C軸である3回軸

のまわりに、ある角度

θ をかして再配向して

おり(図4参照) その角度 θ は温度降下につれて減少していること、また転移域以下では、guest methanolは図4の6つのsiteのいずれかに配向していることがわかる。しかし転移域直下の温度付近では、依然として異方性 ΔO が4.2Kの値に比べて約77%に減少していることから、各平衡位置で、相当激しく熱振動しているものと思われる。先に述べた host quinolのlineの分裂も、この guest methanolの配向の結果、転移域以下では結晶の対称性が低下し、lineの数が増大したものと考えることにより、説明される。

1H の T_1 の温度変化

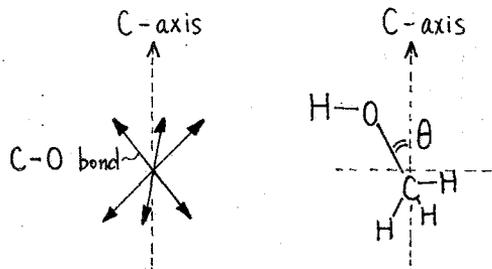
図5に測定結果を示す。 CH_3OH guestの場合も CD_3OH guestの場合も T_1 の温度依存性はよく似ており、転移域では T_1 の値が不連続的に変化している。高温側⁽⁴⁾及び低温側の T_1 minimumは CH_3OH guestに関する市村ら⁽⁴⁾と Ripmaester et al⁽⁵⁾の測定結果(各2.10MHz, 9.2MHz)と consistentであり、高温側の T_1 minimumは guest methanol分子全体の結晶C軸に関する反転によるもので、低温側のそれは、guest methanolのメチル基のトンネル回転によるものと思われる。しかしながら我々の測定(60MHz)では、77Kと転移域との間に新たな T_1 の温度変化が見い出された。我々はこれを、 ^{13}C 高分解能スペクトルの測定により見い出され、結晶C軸のまわりの guest methanol分子の再配向によるものと考え、転移域以上では、guest methanolが図4に示すような再配向を行っていると仮定して T_1 の解析を行った。図5中の実線は、結晶C軸が guest methanolの C-O-H面に平行であると仮定して T_1 値を理論計算⁽⁶⁾ CH_3OH guestと CD_3OH guestの両方の実測値に同時に

Table 1 Principal values of ^{13}C chemical shift tensor for the trapped methanol molecules at various temperatures.

	68K	65K	40K	20K	4.2K
M	$\begin{bmatrix} 62 \\ 62 \\ 100 \end{bmatrix}$	$M_1 \begin{bmatrix} 56 \\ 60 \\ 108 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 51 \\ 57 \\ 116 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 49 \\ 54 \\ 118 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 46 \\ 53 \\ 118 \end{bmatrix}$
		$M_2 \begin{bmatrix} 54 \\ 59 \\ 110 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 51 \\ 56 \\ 115 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 50 \\ 55 \\ 115 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 48 \\ 54 \\ 115 \end{bmatrix}$
		$M_3 \begin{bmatrix} 55 \\ 59 \\ 111 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 52 \\ 56 \\ 116 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 49 \\ 55 \\ 118 \end{bmatrix}$	$\begin{bmatrix} 45 \\ 53 \\ 119 \end{bmatrix}$

Shifts are in ppm, relative to $^{13}C_6H_6$.

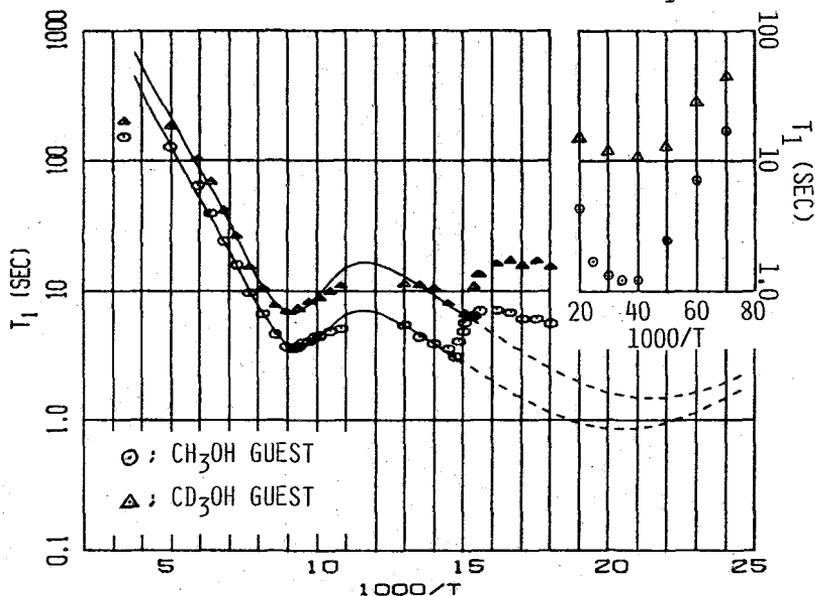
Fig.4 Reorientation model of the trapped methanol molecules.



The trapped methanol molecules reorient among the six sites, each related by the C_{3i} symmetry operation.

fit 2 本の曲線
 である。(破線
 は、仮に転移
 が起こらなかつた
 場合の、
 C 軸まわりの
 軸対称の再配
 向による T_1 の
 仮想的な温度
 変化を示している)
 この解析により
 guest methanol
 のメチル基炭素
 は、cavity の中
 心から C 軸方向
 に 0.28 \AA 、C-O

Fig.5 Temperature dependence of proton T_1



結合軸方向に 0.22 \AA だけ、はずれた位置にあることが結論された。また、反転に関しては、その活性化エネルギー $\Delta E = 2.4 \text{ kcal/mol}$ 、相関時間 ($T \rightarrow \infty$) $\tau_0 = 4.5 \times 10^{-14} \text{ sec}$ ($\text{CH}_3\text{OH guest}$) ; $5.5 \times 10^{-14} \text{ sec}$ ($\text{CD}_3\text{OH guest}$)、3 回軸まわりの再配向に関しては、 $\Delta E = 0.7 \text{ kcal/mol}$ 、 $\tau_0 = 3.7 \times 10^{-12} \text{ sec}$ ($\text{CH}_3\text{OH guest}$) ; $2.7 \times 10^{-12} \text{ sec}$ ($\text{CD}_3\text{OH guest}$) の値を得た。Massalska-Arodz (7) によれば、guest methanol の OH 基の C-O 結合軸まわりの回転運動に対する活性化エネルギーとして $\Delta E = 0.62 \text{ kcal/mol}$ が与えられているが、OH 基の C-O 結合軸まわりの回転は起っていない (5) ので、これは 3 回軸まわりの分子全体の再配向によるものと考えらるべきであろう。

References

- (1) 松井茂, 前田史郎, 寺尾武彦; 第16回NMR討論会講演要旨集 P156 (1977).
- (2) T.Terao, S.Matsui, and A.Saika, Chem.Phys.Letters 64, 582 (1979).
- (3) 松井茂, 雑賀重規, 寺尾武彦; 分子構造総合討論会要旨集; 2B19, 298 (1978).
- (4) 市村清, 曾田元, 千原秀昭; 日本化学会講演要旨集(春); 4W18, 601 (1978).
- (5) J.A.Ripmeester, R.E.Hawkins, and D.W.Davidson, J.Chem.Phys. 71, 1889 (1979).
- (6) G.Soda and H.Chihara, private communication.
- (7) M.Massalska-Arodz, Acta.Phys.Polon. Sect.A52, 555 (1977).

The Current Status of High Resolution NMR in Solids

John S. Waugh

Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, Massachusetts 02139

Numerous techniques developed during the past decade have opened a large number of new applications for NMR in solids, all resulting from coherent averaging procedures for enhancing both resolution and sensitivity. One set of applications stems from the possibility of measuring accurately the anisotropic parts of the various nuclear spin interactions. Another set of techniques, involving cross-polarization and magic angle spinning, creates a very useful routine spectroscopy comparable in breadth of application to conventional high resolution technique in liquids. Recent experiments will be described including (a) partial determination of nucleic acid structure using oriented samples, (b) studies of the anisotropy of the electron-coupled spin spin interaction and (c) a family of procedures for studying rather slow molecular motion in solids.

1. 目的

我々は Bruker CXP-300 型高分解能 NMR 装置を用いて、固体試料の種々の核種の NMR を測定している。この報告では架橋したシリコーン・ゴムと未架橋シリコーン・ゴム（ワックステータ）の ^{13}C および ^{29}Si NMR のケミカル・シフトと T₁ 値を比較し、架橋の効果をはっきりとすることを目的とした研究結果を報告する。

2. 方法

表 1 本研究に用いた試料

試料番号	組成式 (Me: -CH ₃ , Vi: -CH=CH ₂ , Ph: -C ₆ H ₅)	
本研究に用いた試料は表 1 に示す SE-1	$(\text{Me}_2\text{SiO})_2(\text{MeViSiO})_m$	$m = 0.15\%$
SE-2	$(\text{Me}_2\text{SiO})_2(\text{MeViSiO})_m$	$m = 0.5\%$
-1 ~ SE-5 の各未架橋及び架橋シリコーン・ゴムである、SE-3	$(\text{Me}_2\text{SiO})_2(\text{MeViSiO})_m$	$m = 3.0\%$
SE-4	$(\text{Me}_2\text{SiO})_2(\text{MeViSiO})_m(\text{Ph}_2\text{SiO})_n$	$m = 0.15\%, n = 3.0\%$
SE-5	$(\text{CF}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{MeSiO}(\text{MeViSiO})_m$	$m = 0.15\%$

信越化学工業株式会社により供給された試料である。未架橋ゴムはワックステータで有機溶媒に可溶である。架橋ゴムは不溶である。

2.2 測定方法

Bruker CXP-300 に Z3Z PE/MAS プローブをセットし、重水素化 PMMA スピナー中に挿入した試料を 1000 ~ 3400 Hz の速度で高速回転しつつ BB-デカップリング法で ^{13}C NMR, ^{29}Si NMR を測定した。 ^{13}C NMR は 75.460 MHz で測定し、 ^{29}Si は 59.613 MHz で測定された。この Z3Z PE/MAS プローブは本来 ^{13}C NMR 用であるが 57 ~ 85 MHz の帯域の核種測定が可能である。 ^{13}C NMR のケミカルシフトは TMS の ^{13}C シグナルを基準とし、 ^{29}Si NMR のケミカルシフトは TMS の ^{29}Si シグナルを基準として求められた。なお Magic Angle (54° 44') の角度調節にはグリニオのカルボニル基の ^{13}C シグナルを用い、そのシグナルのサイド・バンドによってスピナーの回転速度を求めた。1000 Hz 以上の回転速度においてはゴムの各シグナルの形状は実質的には回転速度によらずほぼ一定であり、サイド・バンドも認め難い。

^{13}C および ^{29}Si の NMR 計測にあたり、トランスミッター出力をオシログラフ上で 300 V に調節し、それぞれ 90° パルスを決めた。BB-デカップリングには 4 db で 4 フット程度を用い、±15 ppm 帯域をデカップリングしている。

^{13}C and ^{29}Si NMR Observations of Cross-linked Silicone Rubbers by Magic Angle Spinning-BB Decoupling Method

Chemical Research Institute of Non-aqueous Solutions, Tohoku University

○ Masahiro Hatano and Tsunenori Nozawa

スピナーの回転から 雑音レベルであるから始めチェックし、十分に安定な計測が行なわれしことを確認した。試料の充填方法により回転むらが生ずりことがある。 T_1 の測定には標準的 180° - τ - 90° パルス法を用い、ケミカル・シフト計測時のパルス間隔には T_1 の時間の 5.5 ~ 6.5 倍の時間を用いた。

3. 結果と考察

Fig. 1 ~ 8 に結果の一部を提示した。() 以示したものが未架橋ゴムである。

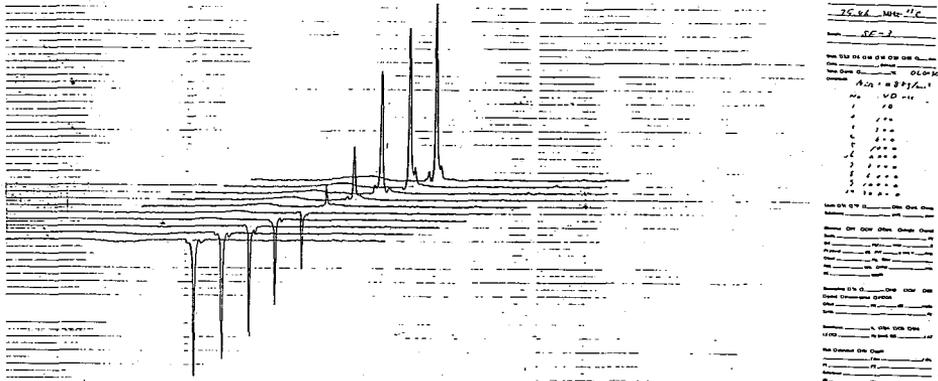


Fig. 1. 架橋 SE-3 の ^{13}C NMR

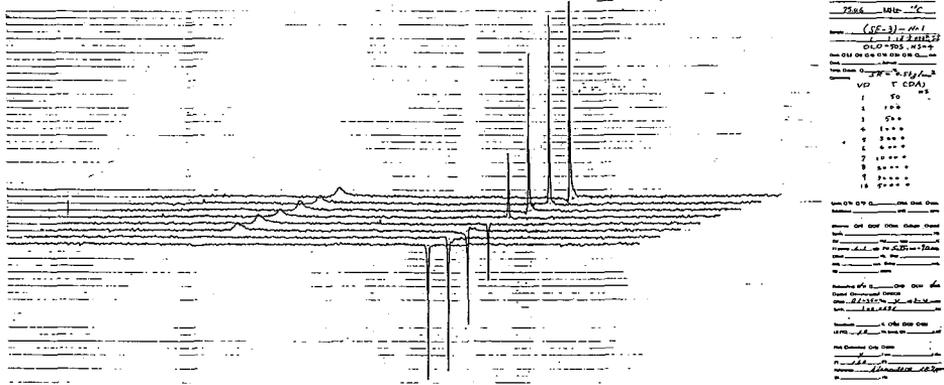


Fig. 2. 未架橋 SE-3 の ^{13}C NMR

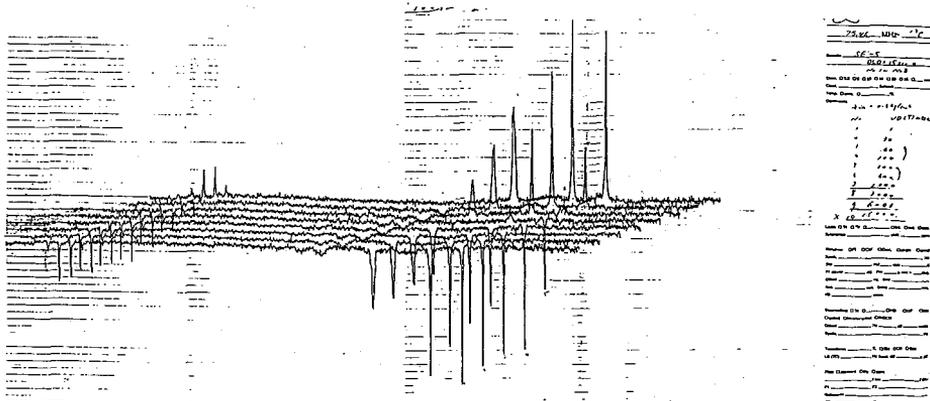


Fig. 3. 架橋 SE-5 の ^{13}C NMR

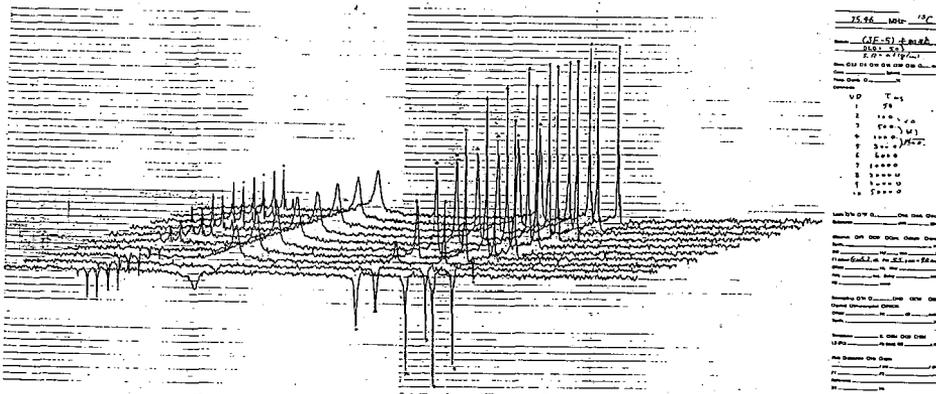


Fig. 7. 未架橋 SE-5 の ^{13}C NMR

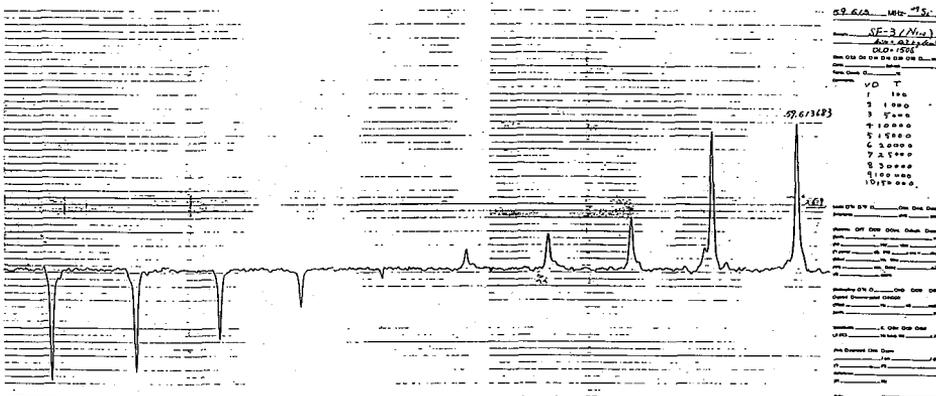


Fig. 5. 架橋 SE-3 の ^{29}Si NMR

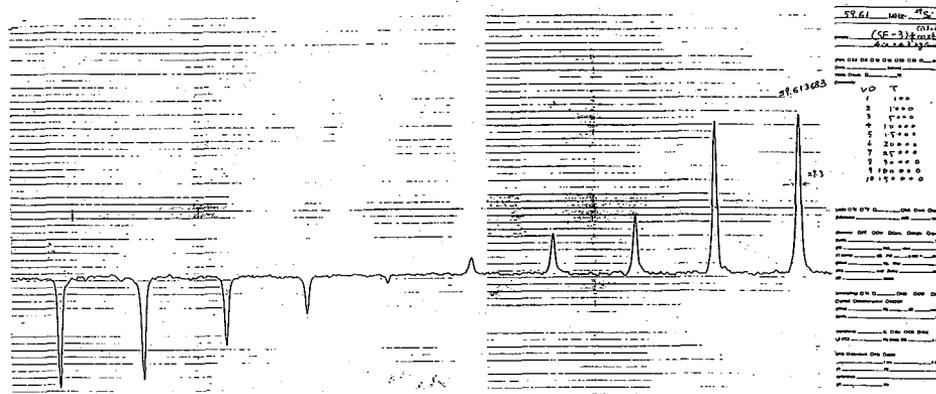
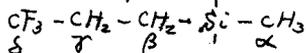


Fig. 6. 未架橋 SE-3 の ^{29}Si NMR

表 2 各試料の ^{13}C NMR の T_1 (s)

	SE-1	SE-3	SE-5			
			α^*	β	γ	δ
架橋ゴム	3.30~3.64	3.55	1.02	0.407	0.500	2.16
未架橋ゴム	3.28~3.33	3.09	1.17	0.521	0.656	2.79

* α, β, γ 等は下記のカに帰属した。



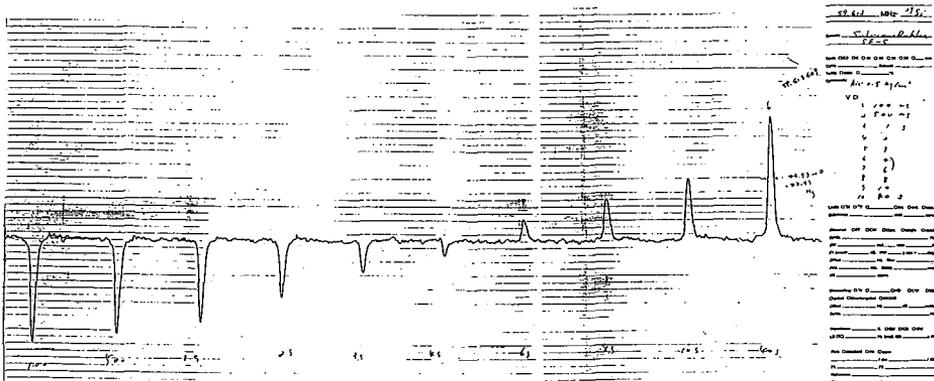


Fig. 7. 架橋 SE-5 の ^{29}Si NMR

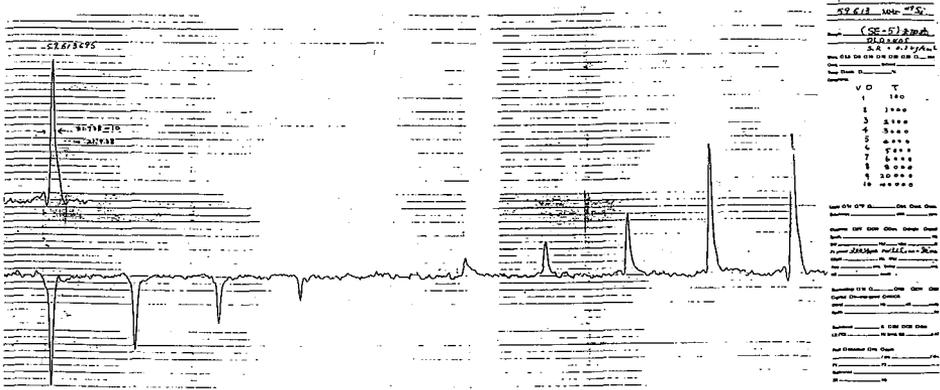


Fig. 8. 未架橋 SE-5 の ^{29}Si NMR

表3 各試料の ^{29}Si NMR

		SE-1	SE-2	SE-3	SE-4	SE-5
架橋 ゾル	δ (ppm) ^a	0	0	0	0	0.20
	T_1 (s)	33.1	34.2	38.5	32.1	7.26
	Γ (Hz) ^b	21.7~38.8	21.7~41.3	16.9~42.5	~32	~34
未架橋 ゾル	δ (ppm)	0	0	0	0	2.44
	T_1 (s)	30.0	29.5	30.1	29.2	7.20
	Γ (Hz)	19.3	19.3	19.3	21.7	21.9

a. δ 値は SE-1 を基準として表示した。

b. 半価幅。

本方法の分析法としての応用, 架橋による構造変化の解析結果を報告する。

Ref.

- 1) G. Engelhardt, H. Jancke, E. Lippmaa, and A. Samoson, J. Organometallic Chem., 210, 295~301 (1981).
- 2) A-R. Grimmer, R. Peter, E. Fechner, and G. Molgedey, Chem. Phys. Lett., 77, 331~335 (1981).

(東レリサーチセンター, 東レ*)の横田克行, 塩谷泉, 森田健一*

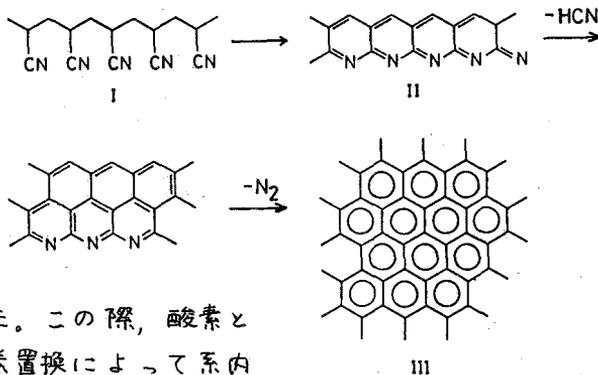
1. はじめに

アクリル繊維から炭素繊維への変換の化学は, (1)ポリアクリロニトリル(PAN, I)の縮合ヘテロ環構造(II)への安定化(耐炭化)およびグラファイト様構造(III)へ的高温縮合(炭化)の2つの反応からなる。¹⁾ ①の反応は通常空気の雰囲気で行なわれる(酸化的耐炭化)が, 炭素繊維製造の収率に関係するため, 機構について多くの研究がある。しかし, (1)赤外スペクトル等の従来の手法に限界があること(2)副反応を伴なうことから研究が妨げられている。森田らは, 後者を克服するためイオウ原子による単純な耐炭化反応系を使い, ヘテロ原子の導入により縮合ヘテロ環形成反応開始の活性化ができる機構を提案している。¹⁾ 一方, ^{13}C CP-MAS NMRは, 耐炭化繊維のような溶媒に不溶な固体試料につき有効な構造情報を与える可能性がある。

そこで本研究では, ^{13}C CP-MAS NMRおよびイオウ(分子)による単純な耐炭化反応系を使って構造解析を試みた。ここでは, CP-MASスペクトルの帰属を議論し, 空気およびイオウによる耐炭化繊維のスペクトルの比較, 元素分析, FT-IRなどのサポートによって耐炭化の化学についても言及する。

2. 実験方法

アクリル繊維としてPANまたは共重合PAN(PAN 99%以上)を用いた。空気雰囲気での耐炭化は電気炉中で行なった。イオウ(分子)による耐炭化は, フラスコ中でイオウを加熱しイオウのガスと共重合PANの反応で行なった。この際, 酸素との反応を極力減らすため, 減圧, 窒素置換によって系内を窒素雰囲気としてから反応を行なった。(閉鎖系, 方法B) 反応の進行に伴って試料は白色から茶褐色を経て緑黒色となる。反応後, 繊維を洗浄, 減圧乾燥してから凍結粉砕してCP-MAS NMR測定などに用いた。試料は吸湿性であり, 加水分解によってアンモニアを発生するので, 空气中に放置し反応を完結させた。上述とは別に, 開放系で窒素気流中, イオウの液相中での耐炭化反応も行なった。(方法A)



^{13}C CP-MAS NMRは, JEOL FX-100スペクトロメータに

¹³C CP-MAS NMR Analysis of Stabilized Acrylic Fibers

(Toray Research Center, Toray*) oK. Yokota, I. Sionoya, K. Morita*

CP-MASユニットを付属させて測定した。プロトンデカップルパワ-は12μとし、通常、 $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ のコンタクト時間は1ms、パルスくり返し45で700回の積算でスペクトルを得た。MAS回転数は約3kHzである。したがって、これによるサイドバンドの位置は主ピークから120ppmの所であり、スペクトル解釈の妨げとならない。プロトン非結合炭素のみを残す測定は、 $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ コンタクト後にdelay時間を挿入するパルス・シーケンス²⁾によった。 ^{13}C シフトは外部 Me_4Si 基準で表わした。

3. 結果と考察

3.1 耐炭化繊維のCP-MAS NMR

空気雰囲気中で耐炭化した繊維のCP-MASスペクトルを図1B, 1Cに示す。MASによって等方平均 ^{13}C シフトが観測されるので、原料PAN(メチン27.0ppm, メチレン32.6ppm, ニトリル120ppm)以外の吸収が出現していることは明らかである。吸収の位置から、低磁場側吸収は二重結合およびカルボニル炭素、高磁場側吸収は飽和炭素由来と推定される。反応時間の増加とともに(C→B)低磁場側吸収が増すことは、閉環および/または脱水素反応の進行と対応する。 ^{13}C 線幅は、例えば図1B, 1Cの高磁場側吸収(図2のピークaに対応)に対してそれぞれ、300Hz, 240Hzであり、ガラスポリマについての報告50-100Hz³⁾に比べてもかなり大きい。図2から $^{13}\text{C}-\text{F}_2$ が長いピークc, eと短いピークaで線幅が同じかむしろ前者の方が大きいこと、図1C→1Bで線幅が増すことおよび推定される反応などから、おそらく生成した構造の一致でないことに基づく ^{13}C シフトの重ね合わせの寄与が大であろう。

イオウによる耐炭化繊維を空気によるものと比較すると(図1Aと1B), (1)CP-MASスペクトルは両者で類似しているがイオウによる方が単純で分離がよい。(単純な反応を示唆)(2)イオウによる耐炭化でのみ~68ppmの弱い吸収が出現する。(3)空気による場合に178ppmのシグナルが顕著に見られる。などが指摘できる。したがって、イオウによる耐炭化繊維は、スペクトル帰属がし易いことおよび空気による耐炭化繊維との比較ができる点からモデル系として優れている。

なお、コンタクト時間を変えて測定すると、吸収強度はピークa, b, dでは1ms程度で、ピークc, eでは1-3ms程度

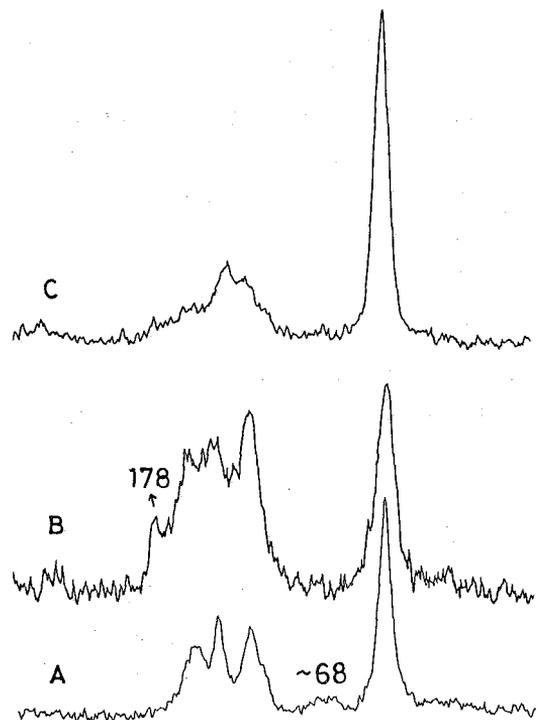


図1. 耐炭化アクリル繊維の ^{13}C CP-MAS NMR (A)液体イオウ中耐炭化した繊維(230°, 10hr) (B)空気中耐炭化した繊維(240°, 5.2hr) (C)Bと同一(240°, 1.5hr)

で最大となるが、これを変えたための新しいシグナルが出現することはない。

3.2 スペクトル帰属および構造解析

A. イオウによる耐炭化繊維

図2Aに再びイオウによる耐炭化繊維のCP-MASスペクトルを示す。図2B, 2Cは ^{13}C , ^1H コンタクト後に40または100 μs のdelayを挿入して得たスペクトルである。 ^{13}C T_2 の短いプロトン結合炭素を消去し、 T_2 の長いプロトン非結合炭素を残して観測できるので、ピークa, b, dはプロトン結合炭素、ピークc, eの主な寄与はプロトン非結合炭素と言える。この結果は、前述のコンタクト時間を変えた測定結果とよく対応する。上述に加えて、モデル物質の ^{13}C シフトとの比較および後に示す森田らの提案する反応機構¹⁾などから帰属は表1のように決められる。このうちピークbはイオウによる耐炭化で特徴的シグナルであり、帰属が解析のポイントである。表1の根拠は、化学シフトが隣接するカルボニルの影響でかなり

低磁場側に変位することである。これはまた、加水分解によるアンモニアの発生はVIのようなエナミン構造からVIIのようなケトンが生成しうることによっても支持される。これをさらに確実にするため、重水による加水分解で水素を重水素置換し帰属を行なうことを検討している。また、カルボニルは後述するようにCP-MAS NMR, FT-IR⁶⁾からアクリドン(VIII)タイプのもののシグナルは出現しないが元素分析⁷⁾、反応機構などからはVIIのようなケトンの存在が示唆される。シチジンC-2カルボニルのシフト(157.0 ppm)⁵⁾との比較から暫定的にピークeに含まれると推定した。

上述帰属に基づき、耐炭化繊維の平均的構造単位がどのようなものであるかを考察してみる。

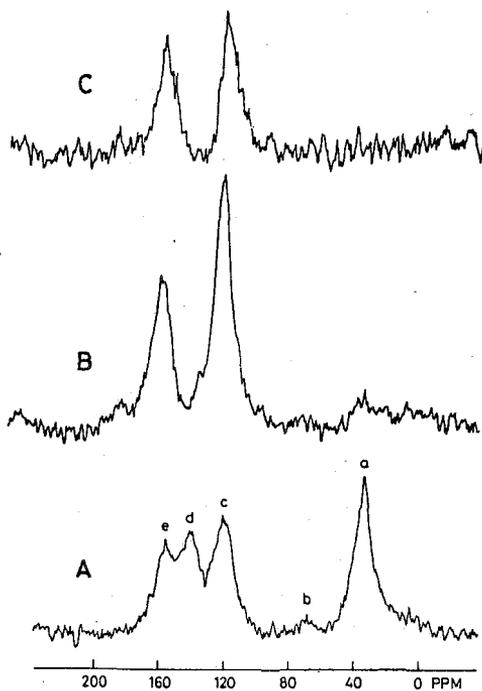
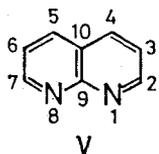
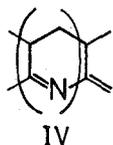


図2 イオウ気体による耐炭化繊維の ^{13}C CP-MAS NMR (A)完全デカップリング (B)デター取得前に40 μs のdelayを入れたデカップリング(1300回積算) (C) Bと同-(100 μs delay, 2400回積算)

表1 イオウによる耐炭化アクリル繊維の ^{13}C CP-MASスペクトルの帰属

^{13}C シフト	帰属	比較のためのモデル物質の ^{13}C シフト ^a
33	水素化ナフチリジン環 ^b C-3メチン, C-4メチン 飽和環炭素	
~68	カルボニル隣接リメチン	54.9 (オクタヒドロ-1(2H)-ナフリンC9)
120	ナフチリジン環 ^c C-3 4級炭素	123.2 (1,8-ナフチリジン ^d C-10)
139	ナフチリジン環 C-4メチン	139.3 (1,8-ナフチリジンC-4)
155	ナフチリジン環 C-2 4級炭素 水素化ナフチリジン環 C-2 4級炭素	153.4 (1,8-ナフチリジンC-9)

a 文献5)参照 b 構造IV c 構造II d 化合物V (文献4)参照



まず、FT-IR⁶⁾でニトリル基の吸収(2240cm⁻¹)がほとんど残存せず、二重結合の強い吸収(1610cm⁻¹)があることは、閉環反応がほぼ完結していることを示す。また、VIIの構造に対して、 $m=2$, $n=3$ とすると元素組成はC₂₁H₁₄N₆SOとなり表2の元素分析結果と⁷⁾きわめてよく一致する。さらに、CP-MASスペクトルの強度比を求めると、1msのコンタクトの条件で表3のようになり、ピークbを除いて理論計算比との対応がかなりよい。以上から、平均的構造単位としてVIIを支持する複数の実験的根拠が得られたと言えよう。これ

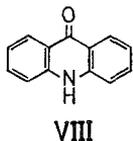
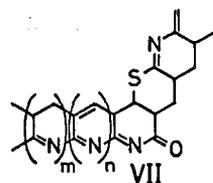
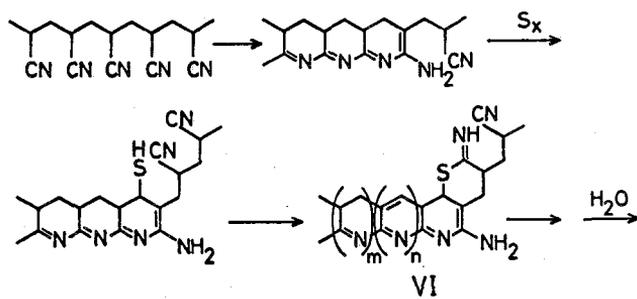


表2 耐炭化繊維の元素組成(モル比)

耐炭化条件	C	H	N	S	O
イオウ, 230°, 10hr	20.6	14.1	6.0	1.03	1.16
空気, 240°, 5.2hr	21.0	9.52	6.29	—	4.04

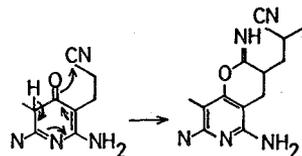
表3 ¹³C CP-MASスペクトル強度比

	a	b	(c+d+e)
実測比	7	0.4	12.5
計算比	7	1	13

をさらに確実なものとするためには、耐炭化条件を変えた試料の解析、CP-MASスペクトル強度比の詳細な検討、イオウの化学結合の解明が役立つと思われる。

B. 空気による耐炭化繊維

特徴的な点は、178 ppmの吸収が比較的強く出現することおよび~68 ppmの吸収がないことである。前者については、9(10H)-アクリドン(VIII)のカルボニル⁸⁾¹³Cシフトが176.8 ppmであること飽和炭素隣りのカルボニル(1721cm⁻¹), 不飽和炭素隣りのカルボニル(1660cm⁻¹)のIR吸収がある⁶⁾ことエナミン構造のアリル位に酸素が導入されやすいことなどからアクリドンタイプのカルボニルと推定される。元素分析もこれを支持する。後者については、森田らの提案した反応機構(上)で縮合ヘテロ環形成反応開始の活性点にピリジン環が形成されることによく対応している。すなわち、この場合カルボニル隣りメチンが生成しないわけである。



[謝辞] CP-MAS NMRを測定していただいた日本電子、藤戸氏、出口氏、日本ブルカー 戸井田氏、有益なご助言と議論をしていただいた国立がんセンター 齊藤博士、一部試料を調製していただいた東し平松氏および発表前のFT-IR等データを教えていただいた弊社石谷室長、嶋田氏、高萩氏にそれぞれ感謝いたします。

- 1) K. Morita, H. Miyachi and T. Hiramatsu, Carbon, 19, 11 (1981).
- 2) S. J. Opella and M. H. Frey, J. Am. Chem. Soc., 101, 5854 (1979).
- 3) J. Schaefer, E. O. Stejskal and R. Buchdahl, Macromolecules, 10, 384 (1977).
- 4) P. van de Weijer, D. M. W. van de Ham and D. van de Meer, Org. Magn. Resonance, 9, 281 (1977).
- 5) "Sadtler Standard Carbon-13 NMR" Vol. 1-50 (1980) Sadtler Res. Lab.; J. B. Stothers, "Carbon-13 NMR Spectroscopy" (1972) Academic Press.
- 6) 嶋田, 石谷, 私信(1981).
- 7) 高萩, 石谷, 私信(1981).
- 8) A. Ahond, C. Poupat and P. Potier, Tetrahedron, 34, 2385 (1978).

1. はじめに

^{13}C 化学シフトは、本質的にはコンホメーションに関する情報を含んでいるはずであるが、多くの場合C-C結合回りの速い内部回転によって、コンホメーションに対する鋭敏さが失われてしまうと考えられる。それゆえ、いま問題としていふ糸の ^{13}C NMRシフトの変化が、どの程度コンホメーションに関する情報とよんでいられるかと十分認識していないと、あやふさな結論に導くおそれがある。この問題の解決の一つの方法は、溶液中でコンホメーションが固定する条件（たとえばポリブチドの場合、溶液組成、PH、イオン強度などのパラメーターとかえる）でスペクトルを測定し、その他の条件で得たスペクトルと比較することである。ただしこの場合は、外部パラメーターによるコンホメーション効果以外の要因、たとえば溶液効果を含んでいるし、また上述した特定のコンホメーションの life time に関する問題も含む。それゆえ、より信頼性が高くまた一般性のある方法は、X線回折その他の手段でコンホメーションが明らかにされている試料について、固体高分解スペクトルを測定して、溶液データと比較することである。われわれは、この目的のために多糖やポリブチドの ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを測定しているが、ここでは前者に重点を置いて報告することにする。

2. 実験方法

^{13}C CP/MAS NMR スペクトルは、Bruker CXP-300 スペクトロメーターを用い、75.46 MHz で測定した。試料は約300mg と、重水素化 MMA から工作した Andrew-Beams 型ローターにつめ、3~4 kHz のマジックアングルスピンニングを行なった。化学シフトは、あらかじめ Calibration を行った TMS の ^{13}C シグナルを基準にした。Contact 時間 は 1 秒、くり返し時間 は 2 秒で測定を行なった。

3. 実験結果と考察

A. アミロースおよびシクロアミロース (α -(1 \rightarrow 4)-グルカン)¹⁾

アミロースの固体構造で最も典型的なタイプは、ゆるやかなヘリックス構造をとり V 型である。湿度その他の条件で固体はその他の多形をとることが知られているが、問題は水溶液中での構造がヘリックスあるいはランダムコイルと測定手段によって著しく異なっていることである。特に水溶液中での ^{13}C NMR スペクトルは、重合度によって全く変化せず、ランダムコイル様の挙動を示す。図1に示す ^{13}C CP/

^{13}C CP/MAS NMR. Solid-state ^{13}C chemical shift as a reference of conformation in solution state.

(Biophys. Div., Natl Cancer Centr. Res. Inst.) H. Saito and R. Tabeta

MAS NMR スペクトルは、これに反して重合度によってスペクトルパターンが変化することがわかる。特に、DP 25, 100 のアミロース試料と比較すると、前者の C-1 ピークが 3 ppm 後者にくらべて高磁場側にシフトしており、又 C-4 ピークの強度が 50% に減少している。このピーク強度のロスは、C-1 ピークの場合と同様高磁場側にシフトし、大きな C-2,3,5 ピークにうつすものと考えられる。表 1 にまとめようように、中性水溶液におけるアミロースの C-1, C-4 ピーク位置と、DP 25 の高磁場に移行したアミロースのピーク位置が一致しており、DP 100 のアミロースとは明確な差異がみられる。この差、それぞれ約 5 ppm は、固体中における両者のコンホメーションの差異に由来していることはいうまでもない。

さらに、n-ブタールで処理した V アミロースはより結晶性が高く、主鎖の色スペクトル線幅が、粉末試料に較べて大巾に減少しているのは興味深い。粉末試料においても、分子鎖の結合位置におけるコンホメーションは、結晶性試料とは異なる変化しないことは、以前に (1→3)-β-D-グルカン の ¹³C CP/MAS NMR の知見から指摘したところであるが、マクロにはアモルファスであるような試料のコンホメーションが議論できる意味で CP/MAS 法の特徴がみられると言えよう。ただし、個々の分子鎖のコンホメーションの乱れは、スペクトル線の広がりとして検出されることも指摘して置こう。

図 2 に示すシクロアミロースは、環状構造をとるために、グルコシド結合回りの回転異性による構造のゆらぎは、線状のアミロースにくらべて著しく抑えられると考えられる。実際に図 2 のシフトデータも水溶液中での高分解能 NMR データと比較した場合、両者内のデータは線状のアミロースにくらべて無視できるほど近い。明らかに、線状のアミロースの固体と液体とのシフト (C-1, C-4) の違いは、後者の場合連いグルコシド結合回りの回転異性体の存在によって、NMR 時間尺度でよう

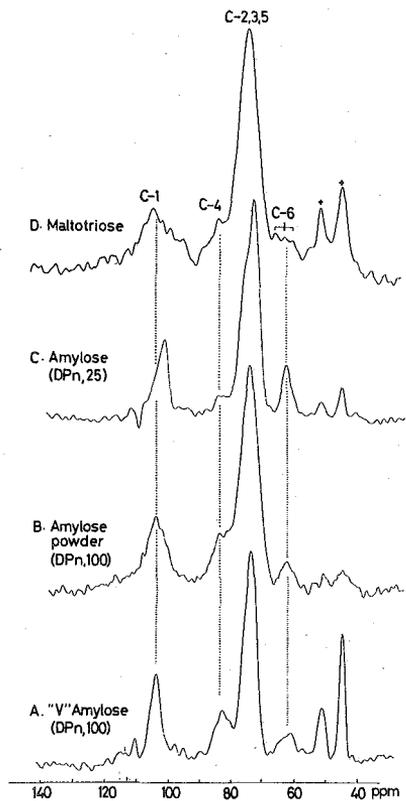


Fig. 1. ¹³C CP/MAS NMR spectra of linear (1→4)-α-D-glucans

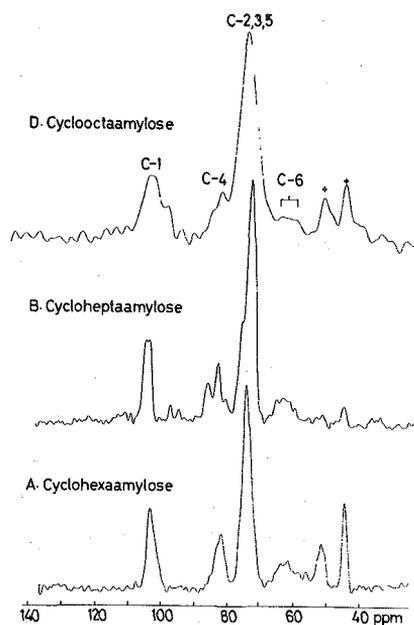


Fig. 2. ¹³C CP/MAS NMR spectra of cyclic (1→4)-α-D-glucans.

Table 1. Comparison of ^{13}C chemical shifts of (1 \rightarrow 4)- α -D-glucans in solid state with those in aqueous solution (pH 7)(ppm from TMS; \pm 0.5 ppm for solid samples)†**

	Linear glucans						Cyclic glucans					
	Amylose(DP 100)		Amylose(DP 25)		Maltotriose		Cyclohexa-amylose		Cyclohepta-amylose		Cycloocta-amylose	
	solid	soln.	solid	soln.	solid	soln.	solid	soln.	solid	soln.	solid	soln.
C-1	102.6	100.3	99.5	100.3	102.9	99.8	101.5	102.5	102.8	102.5	101.2	102.4
C-4	82.4	77.9	82.9 ^{††} ~78 *	77.9	82.8	77.0	81.2	81.9	82.0	81.8	82.2	81.2
C-3		74.2		74.2		73.4		74.0		73.8		73.6
C-2	73.2	72.4	72.1	72.4	73.7	72.9	72.5	72.7	72.5	72.7	72.9	73.0
C-5		72.0		72.0		71.8		72.4		72.5		72.5
C-6	62.4	61.4	61.8	61.4	59.5	60.5	60.5	61.2	58.8	61.0	58.6	61.0
					62.1		63.4		64.4		62.3	
					65.2							

† Assignment of peaks based on refs. 11 and 13. †† Peak-intensity decreased to ~50%.
 * Displaced peak at the shoulder of C-2,3,5 signal. ** The slight difference of the ^{13}C chemical shifts observed in aqueous solution with those from ref. 11 is due to the magnetic susceptibility effect in the iron magnet system.

ンダムコイルとしての挙動をすることである。上ごのべた DP 25 のアミロースの固体状態でのコンホメーション挙動も、C-1, C-4 のシフト値からみてランダムコイルと考へるのが妥当である。

よく知られているように、Site A, B の化学シフトを δ_A, δ_B とすると、 $1/\tau \gg \frac{\pi}{\sqrt{2}}(\delta_A - \delta_B)$ ならば平均のシグナルを観測する。 δ_A としては固体のヘリックスのシフト値、 δ_B としては固体における最大乱雑角シフト値がまいるので溶液データを用いると、水溶液中におけるヘリックス構造の寿命は少なくとも 10^{-2} 秒よりは短いことがわかる。このような水溶液中での連いグルコシド結合回りの固相異性の存在は、アミロースのみならず β -(1 \rightarrow 3)グルカンやキチンオリゴマーにもみられ、Calibration としての固体データの重要性が明らかである。

B. (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン^{2,3)}

高分子量の (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンは、ゲル生成能をもち、ゲルネットワークを生成する分子鎖コンホメーションは一重ヘリックスであることと、 ^{13}C CP/MAS、高分解能 NMR で検証してきた。ここで問題にふるのは、スフレードライ法でアルカリ溶液から中拍してから乾燥した粉末が native 状態と反映しているかどうか、いかんかは多形が存在するかどうかである。

図3に比較するように、固相培養液から直接得た天然型の (1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン(カードラン)と、再生型のカードランの CP/MAS NMR スペクトルを比較すると、C-1, C-3 ピーク位置が全く変化せず、両者のコンホメーションの差は見い出されなかった。

もう一つの興味は、ゲル化過程で大きなコンホメーション変化が起り得るかどうかが、特に Marchessault らが主張する三重鎖ヘリックスが

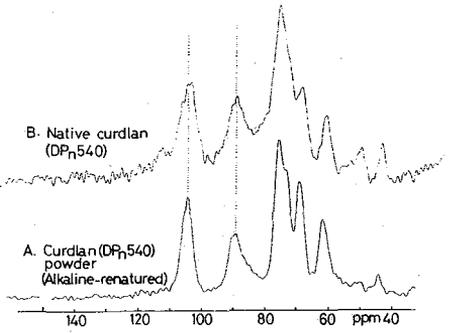


Fig. 3. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of native and regenerated (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan (curdlan)

Table 2
Conformation-dependent ^{13}C chemical shifts of some polysaccharides (ppm)

Linkage	Conformation (solid state)	Difference of chemical shifts at the glucosidic linkages*		
		C-1	C-3	C-4
Amylose (1-4)- α -D-glucan	V-form	2.3		4.5
Curdlan (1-3)- β -D-glucan	7/1 helix	1.0	4.2	
Chitin ⁴⁾ (1-4)- β -D-2-acetamido-2-deoxy-glucan	α -form (extended)	2.3		4.1

* with respect to those observed in solution states.

石も子ユニホーマーとして生成してきかどうかである。われわれは、ゲルを120°Cで加熱した後、凍結乾燥を行ってCP/MASスペクトルを測定したが、スペクトルピークの幅がいろいろ変わったが、三重ヘリックス生成にもとづくスペクトルピークのシフト、ピーク位置はいろいろ変わった。さらに、DMSOから作った繊維材料を加熱しても同じ傾向であった。また、高結晶(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカンモデルとしてパラミロングラニューールについても、そのような変化はみられない。

C. ポリペプチド

ポリペプチドは一般に α -ヘリックス、 β -構造などのコンホメーションが溶液においても存在することが知られている。上記の多糖とは異なり、特定のコンホメーションのとり得る寿命はNMRの時間尺度よりは長く、溶液においてもNMRスペクトルの測定が可能である。しかし、固体 ^{13}C CP/MAS NMR測定の重要性は、やはりこれらの構造のゆらぎがどの程度シフト値に影響を及ぼすかのデータを提供することである。データの詳細は多木らの予稿集を参照されたい。

4. 結論

固体 ^{13}C CP/MAS NMRデータは、固体と溶液との孔友コンホメーションに差異がみられるかに関する情報を与える。二、三の多糖についてのデータは、表2を参照されたい。

1) H. Saitô and R. Tabeta, Chem. Lett., 1981, 713.

2) H. Saitô, in "Solution Properties of Polysaccharides", D. A. Brant ed., ACS Symposium Series No. 150, pp. 125-147, 1981

3) H. Saitô, R. Tabeta and T. Harada, Chem. Lett., 1981, 571

4) 齋藤, 多田, 平野, 第20回NMR討論会講演要録, 1981.

Tokushima University & National Cancer Center Research Institute

T.Taki, S.Yamashita, A.Shibata, M.Satoh, T.YAMashita, R.Tabeta and H.Saito

Iowa State Univ. Tokushima Univ. & Kodak P.D.Murphy, T.TAKI, B.C.Gerstein,P.M. Henrichs and D.J.Massa

The use of shielding anisotropies^{1,2,3} to characterize NMR spectra of nuclei in molecules can be a sensitive tool for probing details of molecular structure.

Unfortunately, nature is usually not this kind for most molecules that contain magnetically inequivalent NMR species. Overlapping shielding anisotropies can destroy the obvious resolution of NMR spectra that contain many shielding tensors. Little useful information is available from such an NMR spectrum. Magic-angle-spinning (MAS)^{1,2} can remove the anisotropies, yielding a relatively high-resolution NMR spectrum in which the locations and relative areas of the resolved absorptions are obtained. In such an experiment the anisotropic shielding components are lost.

Three methods have been proposed for high-resolution NMR in solids without the loss of tensor information: (1) synchronized-pulse techniques,⁵ (2) slow-speed magic angle spinning (SSMAS),⁶⁻⁸ and (3) off-magic angle spinning (OMAS).⁶ Taylor et al,⁹ in a recent treatment of OMAS, have shown that it can be a simple and direct means for determining anisotropic values of overlapping shielding tensors in favorable cases, i.e., those for which one can judiciously choose a rotational angle such that nonoverlapping, but scaled, tensors are generated for the species of interest.

Their calculations have shown that in the rapid-rotation limit, i.e.,

$$\omega_r \gg \omega_0 |\sigma_i - \bar{\sigma}|,$$

where ω_r is the rotational frequency, ω_0 is the Larmor frequency, σ_i is one of the three tensor components chosen such that $|\sigma_i - \bar{\sigma}|$ is maximum, and $\bar{\sigma}$ is the isotropic value of the three tensor components, the observed tensor components, σ_i' , are scaled with respect to their isotropic values by a constant C which depends on the orientation of the rotational axis with respect to the static magnetic field. The actual tensor components, σ_i , can be calculated from the OMAS scaled components, σ_i' , by the following relation:

$$\sigma_i = (\sigma_i' - \bar{\sigma}) / C + \bar{\sigma}, \quad C = (3 \cos^2 \theta - 1) / 2$$

where θ is the angle between the rotational axis and the static magnetic field.

The present work was primarily undertaken to investigate the use of OMAS to study anisotropic shielding of carbon in poly(ethylene terephthalate) (PET). The structural formula of the PET repeating unit is shown in Fig.1.

OMAS is used to generate tensor information for offset from the magic angle. The value of the tensor components, thus determined, are refined by nonlinear least-square analysis of the static powder spectrum. The results of the two methods are compared and some of the possible limitations of this technique are discussed. Finally, the

observed shielding tensors in PET, compared with previously reported shielding tensors of similar kinds, are interpreted and discussed.

Experimental section

The sample of PET was a commercial sample which had been melt polymerized to an inherent viscosity of 0.63 g/dL. Differential scanning calorimetry indicated that it was 58% crystalline. The weight-average molecular weight was greater than 40,000, based on the inherent viscosity.

The resonances of ^{13}C and ^1H occur at 14.09 and 56.02 MHz, respectively, in our laboratory field of 1.31 T. The design of the cross-polarization (CP) spectrometer and the MAS probe have been described in detail elsewhere.^{10,11} A phase-alternated CP pulse sequence, which minimizes some base line and rf ringdown artifacts, was used. For static powder pattern measurements, 0.7 g of sample and rf fields of $H_{11}=10$ and $H_{1S}=40$ G were used. For MAS and OMAS experiments, 0.3 g of sample and rf fields of $H_{11}=8$ and $H_{1S}=32$ G were used.

In all experiments, a CP contact time t_{CP} of 1msec, a slow clock period of 3 sec, and 10,000 coherent signal averages were used. The receiver band width was 10 kHz, and the spectrometer offset was 2 kHz above the isotropic line of the carboxylic carbons. The magic angle was carefully adjusted for minimum line width on a sample of calcium formate. Rotor speeds were measured at 2.6 kHz. Chemical shifts were measured with respect to an external reference of tetramethylsilane. Negative shifts are downfield from the reference and indicate decreased shielding.

Results and Discussions

The chemical shift tensor is a second-rank tensor which requires six quantities for complete characterization.¹ Normally, these tensors are diagonalized by a transformation to the principal axis frame, and one reports the three principal values ν_{11} , ν_{22} , ν_{33} in this diagonalized frame and the three angles which specify the orientation of the chemical shift principal axes with respect to the molecular or crystallographic frame of reference. The three principal components of the diagonalized shielding tensor are directly measurable from powder-pattern NMR spectra, provided the problem of overlapping powder patterns can be appropriately handled.

The static powder spectrum and MAS spectrum of PET are shown in Fig.1, and appropriate NMR spectral information is tabulated in Table 1. The MAS spectrum clearly shows the existence of four different ^{13}C species (labelled A-D). The locations of the NMR shifts and relative areas are consistent with the assignment of species A (-164 ppm) to carboxylcarbons and species D (-62 ppm) to methylene carbons. Both species B and C have shifts indicative of aromatic carbons, and we tentatively assign the downfield species B (-134 ppm) to the substituted aromatic carbons and the upfield species C (-131 ppm) to remaining aromatic carbons.

From the static powder spectrum, one can clearly see the methylene tensor. The

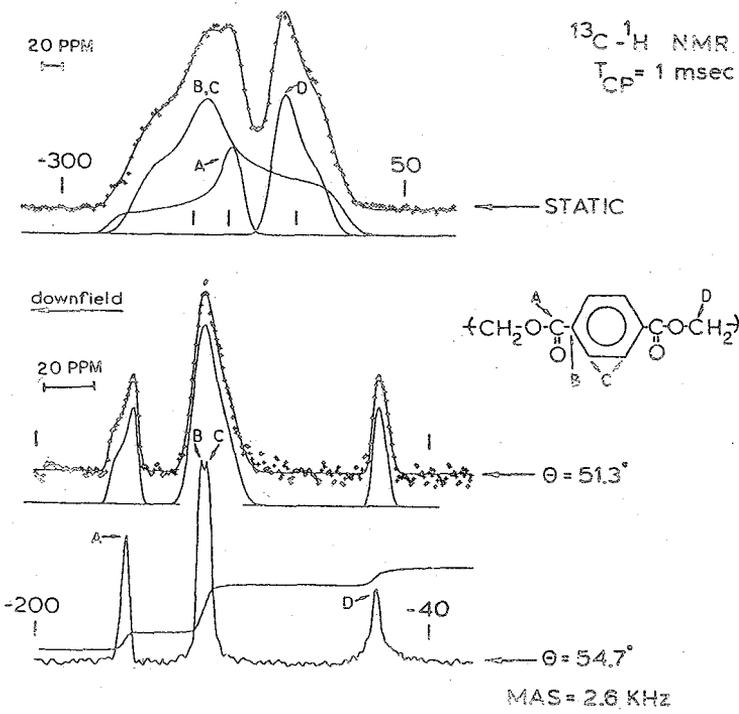


Fig.1
The static, MAS
and OMAS ^{13}C
NMR spectra of
PET.

Table I. ^{13}C NMR Spectral Parameters for PET

^{13}C Type	shielding ^a symmetry	$\sigma_{11}/\sigma_{\parallel}$ ^b ± 3 ppm	$\sigma_{22}/\sigma_{\perp}$ ^b ± 3 ppm	σ_{33} ^b ± 3 ppm	$\bar{\sigma}$ ^c ± 3 ppm	$\Delta\sigma$ ^c ± 5 ppm	% area Static ± 3 %	$\bar{\sigma}_{\text{MAS}}$ ± 2 ppm	% area MAS ± 3 %
A	AS	-250	-122	-	-165	-128	19	-164	21
B,C	NS	-226	-153	-15	-131	175	59	$\frac{-134}{-131}$	57
D	AS	-28	-80	-	-63	52	22	-62	22

a AS = axially symmetric; NS = nonaxially symmetric.

b Tensor components determined by least-squares analysis; shifts in ppm, w.r.t., TMS.

c These generalized parameters are calculated.

carboxyl and aromatic tensors strongly overlap. To separate the methylene and carboxyl tensors for measurement of their components, OMAS experiments were performed at angle $\theta = 51.3$ with respect to the static field. The NMR spectra at this orientation is shown in Fig. 1, and appropriate spectral information is tabulated in Table II.

In summary, OMAS appears to be a rapid and accurate method for the measurements of carboxyl and methylene tensors in a system such as PET. AS was pointed out earlier by Stejskal et al.⁶⁾ OMAS is not particularly useful for measuring very similar tensors that are separated by small isotropic differences, such as aromatic tensors. For such

measurements, other techniques, such as the SSMS used by Waugh et al.⁸⁾ are probably more useful. The observed axially symmetric shielding of the carboxylic tensors of PET at room temperature appears to result from molecular motion.

Table II. OMAS ¹³C NMR Spectral Parameters for PET

θ ± 0.1	¹³ C type	a shielding symmetry	b,c $\bar{\sigma}$ ± 3 ppm	c $\Delta\sigma'$ ± 5 ppm	c S ± 0.2	d FWBF ± 1 ppm	% area $\pm 3\%$	calculated ^e $\Delta\sigma$ ± 10 ppm
51.3	A	AS	-163	-11	1.0	3	20	-127
	B,C	NS	-129	15	0.8	9	64	174
	D	AS	-61	5	1.0	4	16	58

a-c Same as for Table I.

d Full width at half maximum of Gaussian broadening function.

$$e \quad C = (3 \cos^2 \theta - 1)/2$$

$$\Delta\sigma_{AS} = \Delta\sigma'_{AS}/C; \quad \Delta\sigma_{NS} = \Delta\sigma'_{NS}/C$$

References

- 1M.Mehring, "NMR Basic Principles and Progress: High Resolution NMR Spectroscopy in Solids", Vol 11; Springer New York, 1976.
- 2U.Haeberlen, "Advances in Magnetic Resonance: High Resolution NMR in Solids, Selective Averaging", Academic Press, New York, 1976
- 3 N.Bloembergen and J.A.Rowland, Acta Metall. 1,731, 1953.
- 4E.R.Andrew, Progress in NMR Spectroscopy, 8,1 1971.
- 5E.Lippmaa, M.Alla and T.Tuheim, Proceedings of Congress Ampere, p.113,1977.
- 6O.Stejskal, J.Schaefer and R.A.McKay, J.Magn. Reson. 25,569 1977.
- 7M.Maricq and J.S.Waugh, Chem. Phys. Lett. 47,327,1977
- 8J.S.Waugh, M.Maricq and R.J.Cantor, J.Mag.Reson. 29, 183 ,1978.
- 9R.E.Taylor, R.G.Pembleton, L.M.Ryan and B.C.Geratein J.chem. Phys. 71,4541,1979.

Iowa State Univ. & Tokushima Univ. R.E.Taylor, T.TAKI, B.C.Gerstein

1. Introduction

Analysis of the rigid-lattice second moment of the proton magnetic resonance is a useful method for obtaining structural information in metal hydrogen systems. In a metal-hydrogen system where both species of nuclei are spin 1/2, e.g., $\text{YH}_{1.92}$, the Hamiltonian for the protons may be written as

$$\mathcal{H} = -\gamma_I \hbar H_0 \sum_j I_z^j + \mathcal{H}_d^H + \mathcal{H}_d^{IS} \quad (1)$$

The first term represents the Zeeman energy of the spin system. \mathcal{H}_d^H represents the homonuclear dipolar interactions while \mathcal{H}_d^{IS} represents the heteronuclear dipolar interactions. If the heteronuclear term is large due to a large value of or the metal atoms being closer to the protons than are other protons, then the total value of the second moments might not be sensitive to changes in models for proton site occupancy. For this reason, the separation of homonuclear and heteronuclear broadening in solid state NMR spectra has been of recent interest.

The location of hydrogen in yttrium dihydride has been studied^{2,3} through analysis of second moments. These studies have ignored contribution to the second moment associated with inhomogeneous broadening, e.g., shielding anisotropy and heteronuclear dipolar. This work reports the use of homonuclear decoupling experiments to investigate the magnitudes of inhomogeneous broadening associated with shielding anisotropy and heteronuclear dipolar interactions. In addition, the combined experiment^{4,5} using multiple-pulse homonuclear decoupling and magic angle spinning has been used to measure the proton Knight shift.

2. Experimental

The characterization fo the yttrium metal as well as the method of preparation for $\text{YH}_{1.92}$ have been previously reported by Anderson et al.³ The bulk sample were ground to 80 mesh powder for the NMR measurements.

The ^1H NMR absorption spectra were obtained using a multiple-pulse spectrometer,⁶ except for the incorporation of a microprocessor based pulse programmer,⁷ and the probe⁸ for combined homonuclear decoupling and magic angle spinning have also been reported. The MREV-8 pulse sequence⁹ was used for the homonuclear decoupling experiments.

3. Results and discussion

Free induction decay were obtained at temperatures of 298 and 86 K. The full widths at half-height ($2\delta f$) of the Fourier transforms were 34.2 and 41.6 kHz, respectively. A previous wide-line ^1H NMR study¹⁰ has shown that the onset of motional narrowing occurs around room temperature. Satisfactory fits of the spectra were obtained using the Harper-Barnes line shape,¹¹ which has the analytical form

$$g(x) = A \exp(-b|x|^n),$$

where $X = \nu - \nu_0$. Since a determination of n readily given the second moment, this allows a judgement of goodness of fit, by passing the usual difficulty of establishing the proper baseline for the measurement of second moments. At room temperature, the exponent n was 2.1. However, at 86K, well within the rigid lattice regime, the best fit was given by $n=2.8$ (Fig.1) Increases in n , leading to a more rectangular shape than a Gaussian, at lower temperatures have been observed in other metallic hydrides.^{1,2} The second moment obtained from the fit of the Harper-Banes line shape to the Fourier transform of the 86K was $11.17(\pm 0.56)G^2$. This may be compared to the value of $10.68(\pm 0.26)G^2$ (Ref.2) measured by direct numerical integration of cw derivative recording^{2,3} obtained in the range 160-200K.

Under conditions of homonuclear decoupling, linear interactions of irradiated spin system (e.g., Knight shift and chemical shielding, heteronuclear coupling) are scaled by a factor which depends upon the pulse sequence used.⁹ Correcting for scaling, the homonuclear decoupling experiments using the MREV-8 sequence with a cycle time $t_c (=12\tau) = 27.6\mu\text{sec}$ gave symmetric line shapes with $2\delta f \sim 2.9\text{kHz}$ at both room temperature and 86 K. Fitting the data at 86K with the Harper-Banes line shape (Fig.2) gave a second moment of $0.16G^2$, which is smaller than the standard deviation in second moment reported by Anderson et al.^{2,3} The combined homonuclear decoupling (MREV-8 $t_c = 36\mu\text{sec}$) and magic angle spinning ($\omega_r \sim 2.9\text{kHz}$) experiments at room temperature gave a proton Knight shift of $K_H = -5.9(\pm 1.6)\text{ppm}$ ($\nu = +5.9\text{ppm}$) with respect to H_2O . The linewidth was $2\delta f \sim 525\text{Hz}$. A phase-altered MREV-8 sequence¹³ ($P_x - M_y$), which removes and inhomogeneous magnetic broadening, gave a linewidth of $2\delta f \sim 415\text{Hz}$ at 86K.

The measurement of the second moment under the homonuclear dipolar decoupling experiments allows the determination of the contribution from the shielding anisotropy, heteronuclear dipolar broadening, and other interactions such as scalar spin-spin coupling. For $\text{YH}_{1.92}$, the correction to experimental second moment from other mechanism of line broadening is within the observed standard deviation. At 56MHz, the ratio of the second moment under the homonuclear decoupling experiment to the

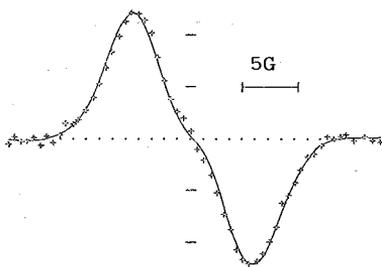


Fig.1. Derivative ^1H absorption spectrum for $\text{YH}_{1.92}$ at 86K is given by the crosses. The solid line represents a fit of the Harper-Banes line shape.

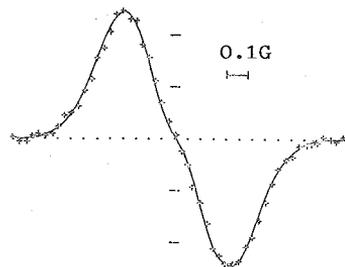


Fig.2 Derivative ^1H absorption spectrum for $\text{YH}_{1.92}$ at 86K is given by crosses. The solid line represents a Harper-Banes line shape.

second moment obtained from the Fourier transform of the freeinduction decay (FID) is $M_2(\text{MREV-8})/M_2(\text{FID})=1.5\%$. When the second moments are measured at lower fields, the correction may even be smaller if there is any field dependence.

Anderson et al.^{2,3} have reported the distribution of hydrogen atoms on the octahedral and tetrahedral interstitial sites of the fcc CaF_2 structure of YH_2 . If the protons reside at the centers of the tetrahedral and octahedral sites which have cubic symmetry, there should be no shielding anisotropy. The homonuclear decoupling experiment gives a symmetric line shape of $2\delta f=2.9\text{kHz}$. The phase-altered sequence which suppresses homonuclear dipolar interactions as well as interactions proportional to I_z , such as heteronuclear dipolar broadening, significantly narrows the line to 0.4kHz . The inability of the multiple-pulse sequences to completely narrow the line can be understood in terms of the correlation time obtained from the change in line-width at the onset of thermal line narrowing. Anderson¹⁰ has found a correlation time of $10\mu\text{sec}$ at room temperature. This correlation time is of the same order of magnitude as the multiple-pulse cycle times presently achievable and limits the ability of the multiple-pulse sequence to narrow.

The measurements of the Knight shift in metal-hydrogen systems contributes to the understanding of the electronic structure. By homonuclear decoupling and magic angle spinning, a Knight shift of $-5.9(+1.6)$ ppm was obtained (Fig.3). No corrections for bulk susceptibility were made. (Yttrium metal¹⁴ at 292K has a magnetic susceptibility of $+2.15 \times 10^{-6}$ cgs.) Using the $T_{1e}T=285.7\text{secK}$ value from Anderson et al.³, the Korringa relation,¹⁵ which applies only to S contact hyperfine interaction and to effectively free-electron metals, can be tested. This relation is, in a generalized form

$$K^2 T_{1e} T = (\hbar/4\pi k_B) (\chi_e/\chi_I)^2 f,$$

where f is an enhancement factor which corrects for electron-electron correlation effects. The intrinsic Knight shift relative to bare protons is given by

$$K_H = K_H(\text{obs}) - 25.6 \text{ (in ppm)},$$

where the molecular shielding constant of proton in water¹⁶ is taken to be 25.6 ppm. Using the intrinsic Knight shift for $\text{YH}_{1.92}$ and the $T_{1e}T$ value reported by Anderson

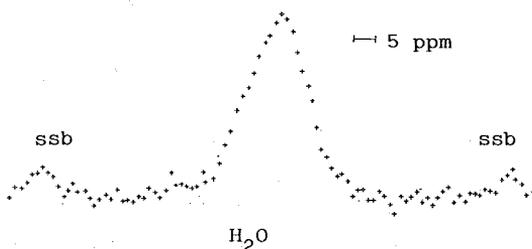


Fig.3. ^1H absorption spectrum under a combined homonuclear decoupling and magic angle spinning experiment for $\text{YH}_{1.92}$ at room temperature.

et al.³, a value of $f=1.07$ was obtained. This value indicates a suitable description by the free-electron model of the electronic structure in the vicinity of the interstitial hydrogen atoms.

Multiple-pulse techniques have been used to separate homonuclear and heteronuclear dipolar contribution to the second moment of $\text{YH}_{1.92}$ (Table I). These measurements have shown that Anderson et al.^{2,3} were justified in their assumption of a negligible contribution to the ^1H second moment from ^{89}Y - ^1H dipolar interactions. The measurements of the ^1H Knight shift indicates the electronic structure in the vicinity of the interstitial hydrogen atoms can be suitably described by a free-electron model.

Table I. ^1H second moments of $\text{YH}_{1.92}$. FT-Fourier Transform; CW-continuous wave.

Second moment (G^2)	Experiment	Temperature (K)	
11.17 (± 0.56)	FT NMR	86	
10.68 (± 0.26)	CW NMR	160-200	From Refs.2&3
0.16	Multiple-pulse FT NMR	86	

One difficulty in most proton Knight shift measurements for metal-hydrogen systems is the effect of relatively large bulk magnetic susceptibility. The use of powdered specimens prevents a correction of demagnetizing fields due to bulk susceptibility from being applied. However, the small magnetic susceptibility of ^{89}Y metal has allowed the measurement of relatively accurate proton Knight shift in a randomly oriented powder sample of $\text{YH}_{1.92}$ by using combined multiple-pulse techniques AND magic angle spinning.

REFERENCES

- 1 C.S.Yannoni and R.A.Wind, *J.Magn.Reson.* **38**,493 (1980)
- 2 D.L.Anderson, R.G.Banes, D.T.Peterson and D.R.Torgeson (unpublished)
- 3 D.L.Anderson, R.G.Banes, T.Y.Hwang, D.T.Peterson and D.R.Torgeson (unpublished)
- 4 B.C.Gerstein, R.G.Pembleton, R.C.Wilson and L.M.Ryan, *J.chem.Phys.* **66**,361 (1977)
- 5 L.M.Ryan, R.E.Taylor, A.J.Paff and B.C.Gerstein, *J.chem.Phys.* **72**,508 (1980)
- 6 B.C.Gerstein, C.Chow, R.G.Pembleton and R.C.Wilson, *J.phys.Chem.* **81**,565 (1977)
- 7 D.J.Adduci and B.C.Gerstein, *Rev.Sci.Instrum.* **50**,1403 (1979)
- 8 R.G.Pembleton, L.M.Ryan and B.C.Gerstein, *Rev.Sci.Instrum.* **48**,1286 (1977)
- 9 P.Mansfield, *J.Phys.* **C4**,1444(1977); W.-K.Rhim, D.D.Elleman, and R.W.Vaughan, *J.chem.Phys.* **59**,3740 (1973); **58**,1772 (1972)
- 10 D.L.Anderson, M.S.thesis (Iowa State University, Ames, Iowa, 1979) (unpublished)
- 11 W.C.Harper and R.G.Barnes *J.Magn.Reson.* **21**,507 (1976)
- 12 R.G.Barnes, (private communication)
- 13 K.F.Lau, R.W.Vaughan and C.B.Satterthwaite, *Phys.Rev.* **b15**,2449 (1977)
- 14 Handbook of Chemistry and Physics, 52nd ed., edited by R.C.Weast (The Chemical Rubber)
- 15 J.Korringa, *Physica* **16**,601 (1950) 16 R.V.Reid, *Phys.Rev* **A11**403 (1975)

金属水素化物は、水素を多量に吸蔵し、水素の貯蔵・輸送手段として注目されているが、水素の挙動においては不明な点が多い。Va族金属の水素化物において、水素が規則構造をとることが報告されている。

前回の報告¹⁾において我々は、VH_{0.59}のβ₁、β₂相における水素の挙動を¹H NMRを用いて調べ報告した。VH_{0.59}においては二種類の水素が存在し、水素の規則構造との関連が示された。

VH_{0.59}のバナジウム原子はbcc格子を作っているが、同じbccの相でも水素濃度が高くなってVHに近くなると水素の規則-不規則構造の相変化が不明確になり、構造や拡散などについて不明な点が多い。今回の報告においては、VH_{0.90}中の水素の挙動について¹H NMRを用いて調べた結果を示し、VH_{0.59}の結果と比較して水素濃度に対する依存性について議論する。

<実験> i) 試料: バナジウム金属の水素化・脱水素化をくり返して活性化したあと水素を導入し、50°C, 1 atmに保って合成した。合成したVH_{0.90}はヘリウム気流下で200メッシュに粉碎し、パイレックスガラスのアンフルに真空封入した。粉末X線回折パターンを測定したところ、バナジウム原子はbcc格子を作っていて格子定数は $a_0 = 3.04 \text{ \AA}$, $c_0 = 3.41 \text{ \AA}$ であった。

ii) NMR測定: 装置は、Bruker CXP-100, NMR Specialities PS-60RW(T_1 測定のみ)を用い、FTスペクトル、 T_2 , T_1 の測定を行なった。測定周波数は55 MHzとした。

<結果及び考察> i) FTスペクトル: Fig.1 にソリッドエコー法によるFTスペクトルを示した。120~180 Kのスペクトルは、線幅の異なる2つの吸収線が重なっている。温度の上昇と共に狭幅成分の

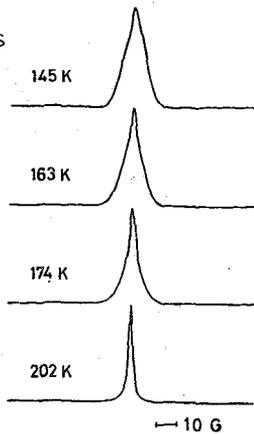


Fig.1. ソリッドエコー法によるVH_{0.90}の¹H FTスペクトル。(τ = 10 μs)

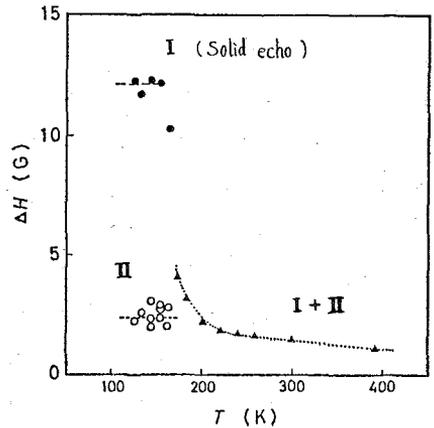


Fig.2. VH_{0.90}の¹Hスペクトルの半値幅の温度変化。

割合が徐々に増加し、180 K 以上では広幅成分の motional narrowing が起こり、全く 1 本の吸収線に見える。free induction decay (FID) curve やスピンエコーを用いて得られたスペクトルも同じような傾向を示した。

スペクトル上の二成分比は、励起パルスとシグナルの取込開始までの時間 t_d の関数になっており、本来の成分比 M_{II}^0/M_I^0 は $t_d=0$ の時に得られる。

$$\frac{M_{II}(t_d)}{M_I(t_d)} = \frac{M_{II}^0}{M_I^0} \exp \left\{ - \left(\frac{1}{T_{2I}'} - \frac{1}{T_{2II}'} \right) t_d \right\} \quad (1)$$

T_{2i}' は FT スペクトルを得る方法によって異なった値をとる。 $t_d \rightarrow 0$ に外挿して成分比を概算することができるが、その結果を Fig. 4 に Δ で示した。²⁾ 傾きはほぼ 2 kcal/mol の直線上に乗っている。成分 I が広幅成分、成分 II が狭幅成分に対応している。

Fig. 2 に線幅の温度変化を示した。成分 I は 155 K 以下で rigid lattice による線幅 12 G (VH_{0.59} では 13 G) を示し、160~220 K において motional narrowing が起こる。一方、成分 II はすでに narrowing しており 2.3 G の幅になっている。180 K 以上では二成分の重なった線幅を図に示したが、内部磁場に起因する線幅を持っている。

VH_{0.90} は VH_{0.59} より水素濃度が高く、プロトン間の双極子相互作用が大きいにもかかわらず、線幅は VH_{0.90} の方が各成分とも 1 G 程小さい。これは磁化率の違いによるものと考えられる。

ii) スピン-スピン緩和時間 T_2 : スピン-スピン緩和曲線を 140~400 K において測定したところ、Fig. 3 に示すよう

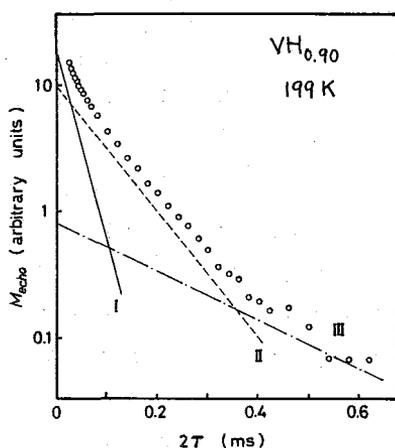


Fig. 3. Hahn のスピンエコー法による VH_{0.90} (199 K) のスピン-スピン緩和曲線。

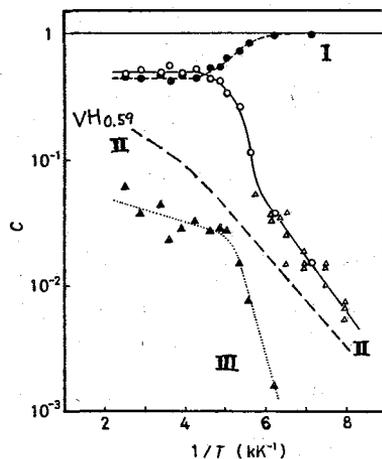


Fig. 4. VH_{0.90} 中の各成分水素の存在比。

に単一の指数関数的減衰を示さなかった。Hahn 及び Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) の方法で測定した緩和曲線を (2) 及び (3) 式を用いて最小二乗法で各成分に分離した。

$$M(2\tau) = \sum_i M_i^0 \exp \left\{ - \frac{2\tau}{T_{2i}} - \frac{1}{12} \gamma^2 G_i^2 D_i (2\tau)^3 \right\} \quad (\text{Hahn}) \quad (2)$$

$$M(t) = \sum_i M_i^0 \exp \left\{ - \left(\frac{1}{T_{2i}} + \frac{1}{12} \gamma^2 G_i^2 D_i (2\tau)^2 \right) t \right\} \quad (\text{CPMG}) \quad (3)$$

G_i は空間的な磁場勾配、 D_i は拡散係数であり、低温においては拡散の効果は無視できる。VH_{0.90} 中の水素は 3 成分から成っており、FT スペクトルの結果との対応から、 T_2 の短い方から成分 I, II, III とした。各成分の割合の温度変化を Fig. 4 に示した。VH_{0.59} の場合に比べかなり複雑な様相を呈している。120~170 K では成分 II が徐々に増加するが、170~210 K において成分 II が急激に増加し、その成分 I が

減少している。210 K 以上では各成分比はほぼ一定になる。210 K 付近で何らかの相変化があるのかもしれない。成分 III は存在比が小さく、VH_{0.59} においては確認されなかった。VH_{0.59} において成分 III は存在比がさらに小さくなっていると思われる。

VH_{0.59} では成分 II と I の比がアレニウスの関係を 120 ~ 400 K において満足し、そのエネルギー差は約 1.9 kcal/mol であった。

VH_{0.90} においても 120 ~ 170 K においてほぼアレニウスの関係を示し、エネルギー差は約 2.0 kcal/mol である。成分 I, II が VH_{0.90} と VH_{0.59} とで対応しているように思われる。但し、VH_{0.90} の方が VH_{0.59} より成分 II の割合が大きい。VH_{0.90} の 170 K 以上における複雑な挙動は VH_{0.59} では観測されなかった。

Fig. 5 に VH_{0.90} 中の各成分の T_2 を示した。各成分の T_2 が平行して温度変化しており、 T_2 の逆転のような現象は起こっていない。成分 I, II の T_2 は VH_{0.59} の成分 I, II の T_2 とそれぞれほぼ似たような値を示している。

iii) スピン-格子緩和時間 T_1 : ¹H のスピン-格子緩和曲線を 77 ~ 420 K において測定した。Fig. 6 に 183 K における緩和曲線を示したが、前節で述べてきたように多成分が重なっているため単一の指数関数的減衰を示さない。また、各成分の T_2 の値が異なるため、見かけの成分比は (4) 式で示すように変化し、緩和曲線は Fig. 6 に示すように t_d に依存する。この t_d 依存性から T_2 の長さ T_1 の長さの対応を知ることができる。Fig. 6 のような場合、 T_2 の短い方の成分が T_1 の長い方の成分に対応している。 t_d 依存性は全温度領域にわたって Fig. 6 と同じ傾向を示している。今、存在比の低い成分 III を無視して考えると、成分 I の T_1 が成分 II の T_1 より長いことになり、VH_{0.59} で

見られたような T_1 の逆転は見られない。

緩和曲線は (4) 式で示すような形となる。但し、 $a_I + a_{II} = 1$,

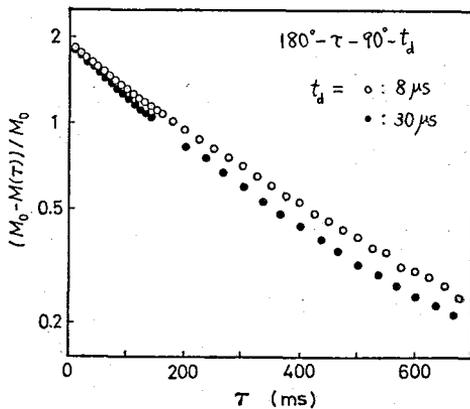


Fig. 6. VH_{0.90} の 183 K における ¹H のスピン-格子緩和曲線 (CXP-100).

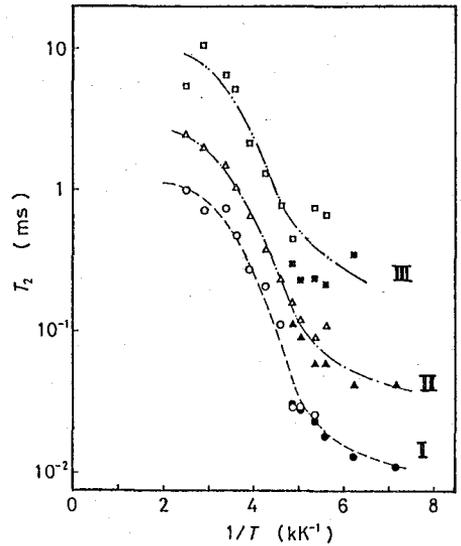


Fig. 5. VH_{0.90} 中の各成分水素の T_2 .

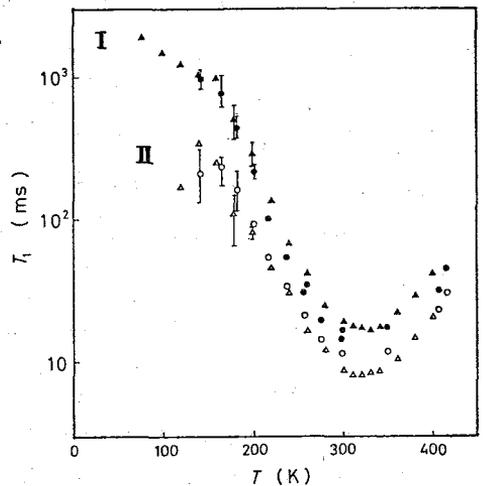


Fig. 7. VH_{0.90} 中の成分 I, II の T_1 . (○: CXP-100, △: PS-60 RW)

$a_{II}/a_I = M_{II}(t_d)/M_I(t_d)$ である。

$$\frac{M_0 - M(\tau)}{M_0} = 2 \sum_{i=I}^{II} a_i \exp\left(-\frac{\tau}{T_{ii}}\right) \quad (4)$$

パラメータが4つ ($a_I, a_{II}, T_{II}, T_{II}$) あり、2成分の T_i の違いがそれほど大きくないため、このまま2成分に分離するのは不可能である。そこで T_{2i} の値を用いて(1)式から a_i を見積もり、 T_{ii} の2つのパラメータについて最小二乗法を行なった。結果を Fig. 7 に示した。各成分の T_i は拡散による緩和を示す温度変化をし、 T_i の最小値は成分 I で 17 ms (330 K)、成分 II で 8 ms (310 K) である。(VH0.59 では成分 I: 12 ms, 成分 II: 19 ms (350 K) である。) VH0.90 の方が VH0.59 より低い温度で T_i が最小値をとる。

伝導電子との相互作用による緩和の寄与は低温領域の T_i の値から求められる。VH0.90 では $K = T_{ie} \cdot T = 150 \text{ sec} \cdot \text{K}$ であり、VH0.59 の 110 sec·K より大きな値を示す。成分 I と II でナイトシフトに差が見られないことから、 K の値は2成分において等しいと考えられる。

水素が O_{Z^-} サイトに均一に分布していると仮定して T_i の値から BPP 式を用いて平均跳躍時間 τ_j を求めると Fig. 8 と 9 に示すようになる。アレニウスプロットの傾きから水素の自己拡散の活性化エネルギーは成分 I では 4 kcal/mol (180 ~ 420 K)、成分 II では 5 kcal/mol (>240 K) となり、成分 II では 240 K 以下において活性化エネルギーの値が小さくなる。240 K 以上では成分 I と II の拡散速度はほぼ同じだが、240 K 以下では成分 II の方が速くなる。

iv) VH0.90 における水素の規則構造及び VH0.59 との比較: 金属格子は bct 相の一相のみであり、水素の各成分は違うサイトに分布していると考えられる。VH0.90 の成分 I, II はそれぞれ VH0.59 の成分 I, II と対応している。VH0.59 では成分 I は O_{Z1^-} 、成分 II は O_{Z2^-} サイトに分布している。VH0.90 についても同様に考えられる。成分 I 及び高温領域の成分 II は、VH0.90 中の方が拡散が速いが、成分 II の低温領域では VH0.59 中の方が速く拡散する。成分 III は水素濃度の高い VH0.90 でのみ観測され、拡散が非常に速いと思われる。α相との類推から T-サイト上の水素と思われる。

1) 林, 早水, 山本, 第12回中化連秋季大会 (1981) 名古屋.

2) 林, 早水, 山本, 日本化学会第43春季年会 (1981) 東京.

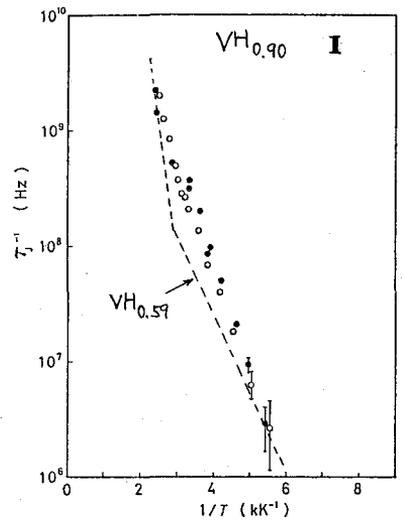


Fig. 8. VH0.90 中の成分 I の mean jump freq. (●: CXP, ○: PS).

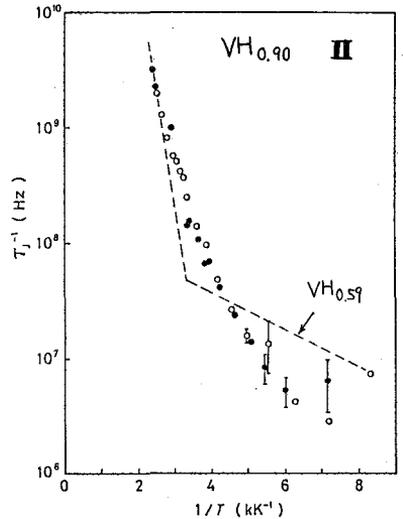


Fig. 9. VH0.90 中の成分 II の mean jump freq. (●: CXP, ○: PS).

Recent Advances in FT-NMR Sensitivity Enhancement Techniques

Thomas C. Farrar

Department of Chemistry, University of Wisconsin
Madison, Wisconsin 53706

Abstract not available at time of printing

J. S. Waugh

Department of Chemistry

Massachusetts Institute of Technology

Cambridge, Massachusetts 02139

and

M. Ohuchi, K. Higuchi, K. Goto, H. C. Charles

JEOL Ltd.

Abstract

The theoretical analysis of heteronuclear spin decoupling is relatively straightforward if certain idealizations are made; it can be carried out either by average Hamiltonian theory or by exact numerical calculations. Such ideal calculations give useful insights into decoupling schemes which are currently used and suggest improved ones. Comparison of the results with experiment makes clear the role which experimental nonidealities play and how some of them may be circumvented.

(阪工試)

福見俊夫

分子の動的過程を調べる方法として定常的NMRスペクトルの *line shape* を解析する方法は広く用いられているが、この方法は磁場の不均一からくる不確定さを本質的に含んでいる。これを解決する方法としてはスピン・エコー法¹⁾がよく知られているが、他に負の Overhauser 効果と関連して縦緩和を見る²⁾こともしばしば用いられている。これに対して回転系における緩和時間 $T_{1\rho}$ の測定は固体中における遅い分子運動を見ることに用いられてきたが、液体中の化学交換を測定する方法としても有効である³⁾。しかし残念ながらこれまでの解析は断熱的な緩和に限られている。しかしながらメタノールのような系では陽子交換の速度がメチル基と水酸基の化学シフトの差と同程度に $T_{1\rho}$ の時、非断熱的な緩和が優勢になることが知られている。本研究においては $T_{1\rho}$ の解析を非断熱的な緩和を含むような系に拡張することを試みる。

実験は100MHzで行い、adiabatic rapid passageを共鳴点で止めることによりrfの存在下で横磁化のdecayを観測した⁴⁾。代表的な実験例を図(1)に示す。

以下化学交換を含むような系での $T_{1\rho}$ を表す式を導出する。スピン結合定数 A で結合している二種のスピン I と S を考え、主ハミルトニアン \mathcal{H}_0 及び擾動項 \mathcal{H}_1 を次のようにとる。

$$\mathcal{H}_0 = \omega_I I_z + \omega_S S_z + \omega_1 (I_x \cos \omega t + I_y \sin \omega t) \quad (1)$$

$$\mathcal{H}_1 = A(t) I \cdot S$$

ここで $\omega_I I_z + \omega_S S_z$ はゼーマン項、 ω_1 はrf場の大きさでスピン I にのみ作用するものとする。スピン結合 $A(t)$ は化学交換によりランダムに変化していると考え、最初に全スピン系を記述する密度行列 ρ に対する運動方程式から出発する。

$$\frac{d\rho}{dt} = -i [\mathcal{H}_0(t) + \mathcal{H}_1(t), \rho] \quad (2)$$

ユニタリ変換 $\exp(i\mathcal{H}_0 t)$ によって相互作用表示に移れば

$$\frac{d\rho^*}{dt} = -i [\mathcal{H}_1^*(t), \rho^*] \quad (3)$$

を得る。ここで

$$\begin{aligned} \rho^* &= e^{i\mathcal{H}_0 t} \rho e^{-i\mathcal{H}_0 t} \\ \mathcal{H}_1^* &= e^{i\mathcal{H}_0 t} \mathcal{H}_1 e^{-i\mathcal{H}_0 t} \end{aligned} \quad (4)$$

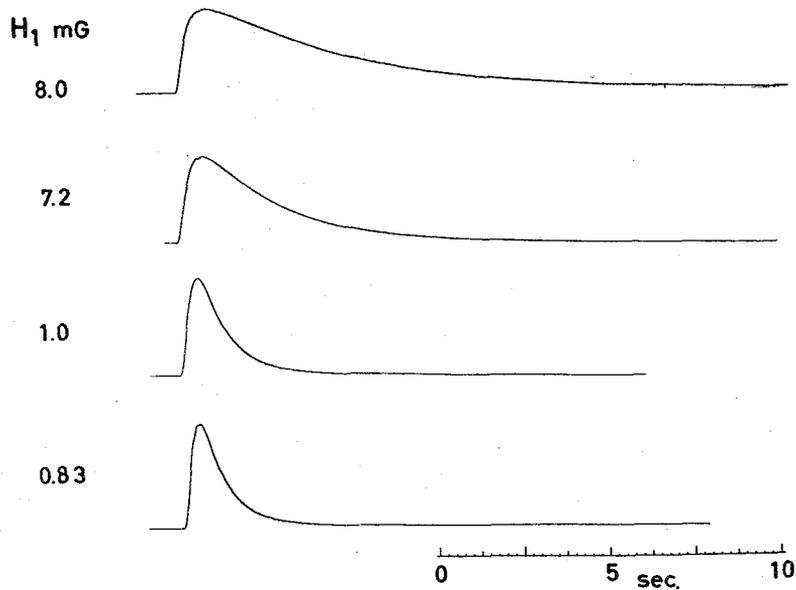


Fig.(1) The decays of the transverse magnetization of methyl protons under the rf fields indicated in the figure.

である。(4)式で逐次近似を2次までとれば

$$\frac{da^*}{dt} = -\int dt' \langle [\mathcal{X}_I^*(t), [\mathcal{X}_I^*(t-t'), a^*(t)]] \rangle \quad (5)$$

を得る。ここで $\langle \cdot \rangle$ はランダム変数 $A(t)$ に対する集団平均をとることを示す。(5)式において a^* はラジオ波の効果の主ハミルトニアンに入れてしまったために2重回転系におけるスピンの運動を記述する密度行列である。そこで次の変換を行って一重回転系における密度行列 \tilde{a} を導入する。

$$\tilde{a} = e^{-i\omega_1 I_x t} a^* e^{i\omega_1 I_x t} \quad (6)$$

\tilde{a} に対する運動方程式は次のように

$$\frac{d\tilde{a}}{dt} = -i[\omega_1 I_x, \tilde{a}] - \frac{1}{2} \int dt' \langle [\mathcal{X}_I^*(t), [R^{-1}(t-t') \mathcal{X}_I^*(t-t') R(t-t'), \tilde{a}]] \rangle \quad (7)$$

を得る。ここで $R(t) = e^{i\omega_1 I_x t}$ である。従って巨視的磁化 $\langle I \rangle = \text{Tr} \tilde{a} I$ に対する運動方程式は次のようになる。

$$\frac{d\langle I \rangle}{dt} = \text{Tr} \langle I \rangle \times H_{\text{eff}} - \frac{1}{2} \int dt' \langle [\tilde{H}_I(t-t'), [H_I(t), \tilde{a}]] \rangle \quad (8)$$

ここで

$$\tilde{H}_I(t-t') = R^{-1}(t-t') H_I(t-t') R(t-t')$$

$$\begin{aligned}
&= e^{-i\omega_I I_x \tau} H_1^*(t-\tau) e^{i\omega_I I_x \tau} \\
&= \frac{1}{2} A(t-\tau) I_x \beta_- e^{i(\omega_I - \omega_S)(t-\tau)} \\
&\quad + I_x \beta_+ e^{-i(\omega_I - \omega_S)(t-\tau)} - \frac{1}{2} I_x \beta_+ e^{-i(\omega_I - \omega_S)(t-\tau)} \\
&\quad + h.c.
\end{aligned} \tag{9}$$

$$I_x = I_y \mp i I_z$$

$$\beta_{\pm} = \beta_y \mp i \beta_z$$

であり、h.c. は Hermitian conjugate を意味する。(8)式の形を得るために交換子を計算すると

$$\begin{aligned}
[\tilde{H}_1(t), I_x] &= i A(t) I_y \beta_z \\
&\quad + \frac{1}{2} A(t) I_x \beta_- e^{i(\omega_I - \omega_S)t} - I_x \beta_+ e^{-i(\omega_I - \omega_S)t} \\
[\tilde{H}_1(t), I_y] &= -i A(t) I_x \beta_z \\
&\quad + \frac{1}{2} A(t) I_x \beta_- e^{i(\omega_I - \omega_S)t} - I_x \beta_+ e^{-i(\omega_I - \omega_S)t}
\end{aligned} \tag{10}$$

$$[\tilde{H}_1(t), I_z] = -\frac{1}{2} A(t) I_x \beta_- e^{i(\omega_I - \omega_S)t} + \frac{1}{2} A(t) I_x \beta_+ e^{-i(\omega_I - \omega_S)t}$$

2重交換子も同様に計算することができ、式が長くなりすぎるので、項のみを explicit に書き下し他は省略する。

$$\begin{aligned}
&[R^\dagger(\tau) \tilde{H}_1(t+\tau) R(\tau), [\tilde{H}_1(t'), I_x]] \\
&= \frac{1}{4} A(t+\tau) A(t) e^{-i(\omega_I - \omega_S)\tau} [I_x \beta_-, I_x \beta_+] + h.c. \\
&\quad + \frac{1}{2} A(t+\tau) A(t) e^{-i\omega_I \tau} [I_x \beta_z, I_y \beta_z] + h.c. \\
&\quad + \frac{1}{4} A(t+\tau) A(t) e^{-i(\omega_I + \omega_I - \omega_S)\tau} [I_x \beta_-, I_x \beta_+] + h.c. \\
&\quad + \frac{1}{4} A(t+\tau) A(t) e^{-i(\omega_I - \omega_I + \omega_S)\tau} [I_x \beta_+, I_x \beta_-] + h.c. \\
&\quad etc.
\end{aligned} \tag{11}$$

この中で $A(t+\tau)A(t)$ という形が出てくるので $A(t)$ をマルコフ過程であると仮定すると

$$\langle A(t+\tau)A(t) \rangle = |A|^2 e^{-\tau/\tau_c} \tag{12}$$

を得る。ここで τ_c は陽子交換反応の相関時間である。このようにしてスピンの I に対する運動方程式は次のようになる。

$$\frac{d\langle I \rangle}{dt} = \gamma \hbar \langle I \rangle \times H_{\text{eff}} - \frac{\langle I_x \rangle}{T_x} - \frac{\langle I_y \rangle}{T_y} - \frac{\langle I_z \rangle - \langle I_{z^0} \rangle}{T_z^{\text{II}}} - \frac{\langle \beta_z \rangle - \langle \beta_{z^0} \rangle}{T_z^{\text{SI}}} \tag{13}$$

ここで T_2 と書いたものが $T_{1\rho}$ に相当し explicit な形は次のようになる。

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{|A|^2}{b} \rho(\rho+1) \left\{ \frac{2\tau_c}{1+\omega_I^2\tau_c^2} + \frac{\tau_c}{1+(\omega_I-\omega_S+\omega_1)^2\tau_c^2} + \frac{\tau_c}{1+(\omega_I-\omega_S-\omega_1)^2\tau_c^2} \right\} \quad (14)$$

この式の中でオ1項が断熱的緩和に相当し、オ2項とオ3項が非断熱的緩和を表している。当然のことながら $T_{1\rho}$ は対強度に依存し、 $\omega_1=0$ の時、通常の緩和時間を表す式と一致する。

なお(13)式において T_2^{IS} は Overhauser enhancement factor を求める量であるが通常の条件と異なり、対強度に依存している形になっているのがやや面白いので書き下しておく。これは Solid State Effect¹⁾ の類似物と考えることもできる。

$$\frac{1}{T_2^{IS}} = \frac{|A|^2}{b} \rho(\rho+1) \left\{ \frac{2\tau_c}{1+(\omega_I-\omega_S)^2\tau_c^2} + \frac{\tau_c}{1+(\omega_I-\omega_S+\omega_1)^2\tau_c^2} + \frac{\tau_c}{1+(\omega_I-\omega_S-\omega_1)^2\tau_c^2} \right\} \quad (15)$$

討論会においては理論式と実験値との一致についてもう少し詳しく立ち入り、議論を可る予定である。

文 献

1. A. Abragam "The principle of nuclear magnetism" Clarendon (1961)
2. T. Fukumi, Y. Arata, and S. Fujiwara, J. Chem. Phys., 47 4198 (1968)
3. S. Meiboom, J. Chem. Phys., 34 375 (1961)
4. W.A. Anderson, in "NMR and EPR Spectroscopy" Pergamon (1960)

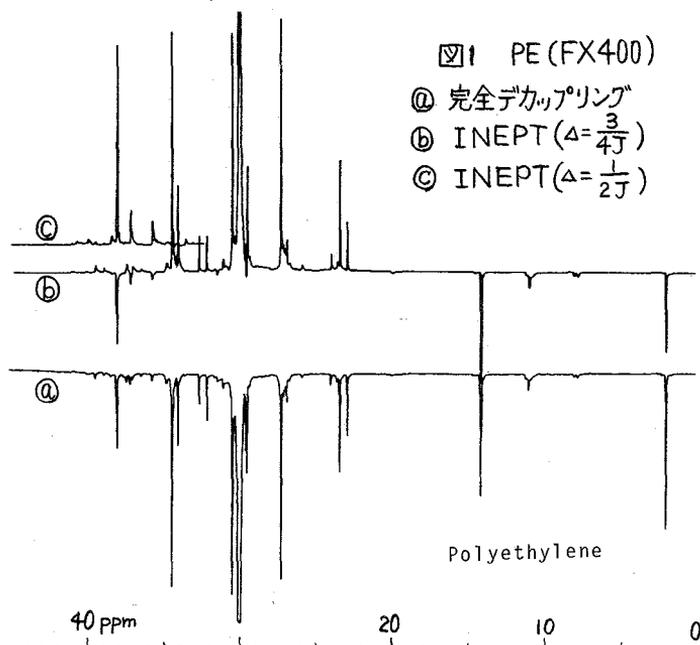
<はじめに>

種々のパルス系列のうち Double Quantum NMR の FTNMR への応用が報告されているが、このうちでも、INEPT 法、Double Quantum Coherence 法等は、すでに有機化合物の構造解析に応用されている。

自然存在比のまま ^{13}C NMR の測定を行なうと、 $J_{\text{C-C}}$ による ^{13}C サテライトシグナルは、主シグナルに重なったりして測定が、非常に困難であり、 $J_{\text{C-C}}$ 等は測定が不可能である。この Double Quantum Coherence 法は、主シグナルを消去し、 ^{13}C サテライトを測定することを目的としている。さらに、この Double Quantum Coherence 法を 2 次元 NMR に応用して、有機化合物の構造解析 (直接結合している炭素を知ることができる) が行なえる。

INEPT 法は、感度向上を目的とした測定と、原子団の区別を目的とした測定に応用されている。感度向上を目的とした測定法は、前回本討論会にて報告したように、 ^1N 等感度の低い核や核スピンの負の核、緩和時間の長い核に特に有用である。原子団の区別を目的とした測定法は、 ^{13}C 核等、スペクトルが複雑で、オフレゾナンスデカップリングで判断できない系に有用である。INEPT 法のスペクトルは、デカップリングしているため単一線となり、かつ ^1H の大きな分極を ^{13}C 核に移して観測するため、オフレゾナンスデカップリングより短時間に複雑な系の区別を正確に解析できる。(図1)

また、INEPT 法は、 ^{13}C 核とスピン相互作用を持っている ^1H 核の Spin Population を移すものであるから、 ^{13}C 核と結合している ^1H 核の緩和時間を測定することができる。今回は、INEPT 法を用いて ^{13}C 核に結合しているプロトンの緩和時間を間接的に測定する方法とその解析について報告する。



Application of Pulse Sequences — Double Quantum Transfer —
(JEOL, UNIV. HOKKAIDO*) Muneki Ohuchi, Kazuhiro Matsushita
Masami Hosono, Noriaki Kurihara, Kunio Hikichi*

<方法および原理>

INEPT法は、図2のようなパルス系列が使用される。デカップリングスペクトルを得るためには、通常(c)又は(d)のパルス系列を用いるが、 $\Delta = \frac{1}{4}J$ とすると

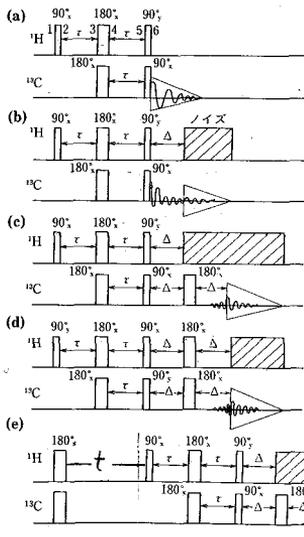


図2. いろいろな INEPT パルス系列

CH, CH_2, CH_3 が同位相で、 $\Delta = \frac{1}{2}J$ とすると CH_2, CH_3 は消し合って、 CH のみ現れ、 $\Delta = \frac{3}{4}J$ とすると、 CH, CH_3 が上向き(同位相)、 CH_2 が下向き(逆位相)で観測できる。さらに(e)のようなパルス系列を使用すると ^{13}C 核に直接結合しているプロトンの緩和時間が測定できる。まず、 1H 核に 180° パルスを加えると、 1H の磁化は、反転し、この磁化は、緩和時間 T_1 で回復する。t秒後、 1H の磁化を INEPT法で ^{13}C 核に磁化を移し観測する。

測定は、F×200 10mmφ C/H dual probe を使用した。

この T_1 (INEPT) は、dipole相互作用のみを考慮すると次のように解析できる。

1H の ^{13}C サテライトの緩和時間 T_1 (Sat)は、^注

$$\frac{1}{T_1}(\text{Sat}) = \frac{1}{T_1}(\text{HC}) + \frac{1}{T_1}(\text{HH}) \quad (1)$$

ここで、
$$\frac{1}{T_1}(\text{HC}) = \frac{1}{10} \cdot \frac{\hbar^2 \gamma_C^2 \gamma_H^2}{r_{CH}^6} \left\{ \frac{\tau_C}{1+(\omega_H - \omega_C)^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1+\omega_H^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1+(\omega_H + \omega_C)^2 \tau_C^2} \right\}$$

$$\frac{1}{T_1}(\text{HH}) = \sum \frac{3}{10} \cdot \frac{\hbar^2 \gamma_H^4}{r_{HH}^6} \left\{ \frac{\tau_C}{1+\omega_H^2 \tau_C^2} + \frac{4\tau_C}{1+4\omega_H^2 \tau_C^2} \right\}$$

である。 ^{13}C の緩和時間 T_1 (CH)は、

$$\frac{1}{T_1}(\text{CH}) = n \frac{\hbar^2 \gamma_C^2 \gamma_H^2}{10r_{CH}^6} \left\{ \frac{\tau_C}{1+(\omega_H - \omega_C)^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1+\omega_C^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1+(\omega_H + \omega_C)^2 \tau_C^2} \right\}$$

である。(n; プロトンの数)

液体の場合、 $\omega_H^2 \tau_C^2, \omega_C^2 \tau_C^2, (\omega_H - \omega_C)^2 \tau_C^2, (\omega_H + \omega_C)^2 \tau_C^2 \ll 1$ である。また、 ^{13}C 核には、n個のプロトンが結合しているが、 1H 核には1個の炭素しか結合していないため、

$$\frac{1}{T_1}(\text{CH}) \approx n \frac{1}{T_1}(\text{HC}) \quad \text{と考えられる。このため、(1)式は、}$$

$$\frac{1}{T_1}(\text{Sat}) \approx \frac{1}{n} \cdot T_1(\text{CH}) + \frac{1}{T_1}(\text{HH}) \quad (2)$$

となる。さらに $T_1(\text{Sat}) = T_1(\text{INEPT})$ のため、(2)式は、

$$\frac{1}{T_1}(\text{INEPT}) = \frac{1}{n} \cdot T_1(\text{CH}) + \frac{1}{T_1}(\text{HH}) \quad (3)$$

が得られる。このことは、 ^{13}C 核の緩和時間 T_1 (CH) および T_1 (INEPT)の二つが測定できれば、 1H の緩和時間が得られたことになる。

<結果>

^注 ^{13}C - 1H 間の結合を反映しているのは、 1H の ^{13}C サテライトであるため。

1-フェニルプロパノールについて、得られた結果を表1に示す。

T_1 (INEPT)の実測値と(3)式により求めた計算値を比較すると、それぞれ C1について1.9秒、2.0秒 C2について1.3秒、1.4秒、C3について2.2秒、2.0秒となり、実験誤差の範囲内で一致している。さらに、C1における、 1H の ^{13}C

		C 1	C 2	C 3	
$T_1(\text{CH})$	実測	3.43	2.27	4.20	$\phi-\overset{1}{\text{CH}}-\overset{2}{\text{CH}_2}-\overset{3}{\text{CH}_3}$ OH
$T_1(\text{HH})$	"	4.86	2.00	2.44	
$T_1(\text{INEPT})$	"	1.88	1.27	2.20	
$T_1(\text{INEPT})$	(3)式より計算値	2.01	1.39	2.05	
$T_1(\text{Sat})$	実測	2.10	—	—	単位 秒

表1

サテライトの $T_1(\text{Sat})$ と比較すると, $T_1(\text{INEPT})=1.9$, $T_1(\text{Sat})=2.1$ 秒 とほぼ一致している。図3にコレステロールの実測例を示す。(濃度 100mg/cc in CDCl_3)

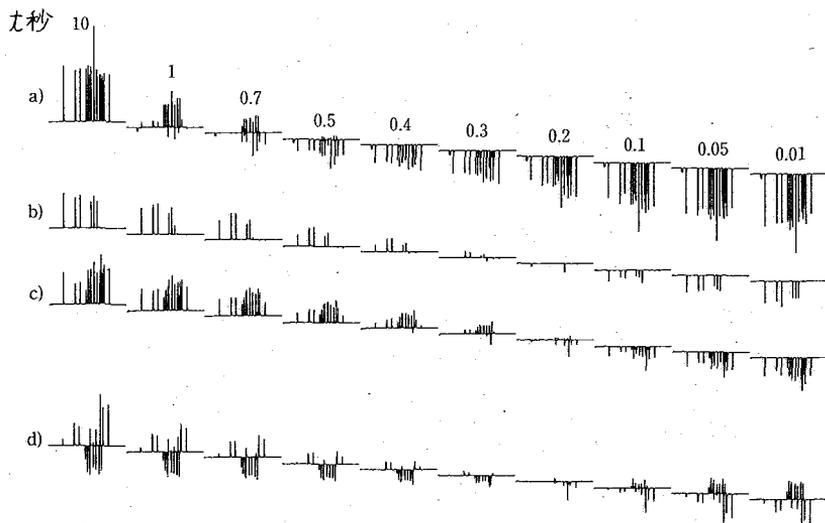


図3 コレステロールの間接的な¹Hの緩和スペクトル(¹³C INEPT)

(a)は、Inversion Recovery法,(b)(c)(d)は、INEPT法を使用し、それぞれ、 $\Delta = \frac{1}{2}J(\text{CHのみ})$, $\Delta = \frac{1}{4}J(\text{CH,CH}_2,\text{CH}_3)$, $\Delta = \frac{3}{4}J(\text{CH,CH}_3 \text{ 上向き, CH}_2 \text{ 下向き})$ で緩和時間を求めるスペクトルである。このスペクトルより、緩和時間 $T_1(\text{CH})$

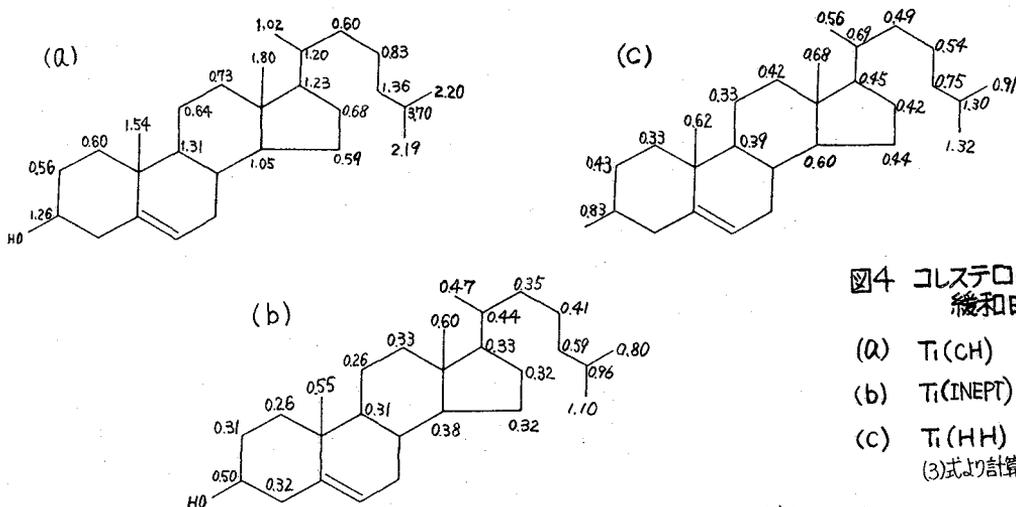


図4 コレステロールの緩和時間

- (a) $T_1(\text{CH})$ 実測
- (b) $T_1(\text{INEPT})$ "
- (c) $T_1(\text{HH})$
(3)式より計算値

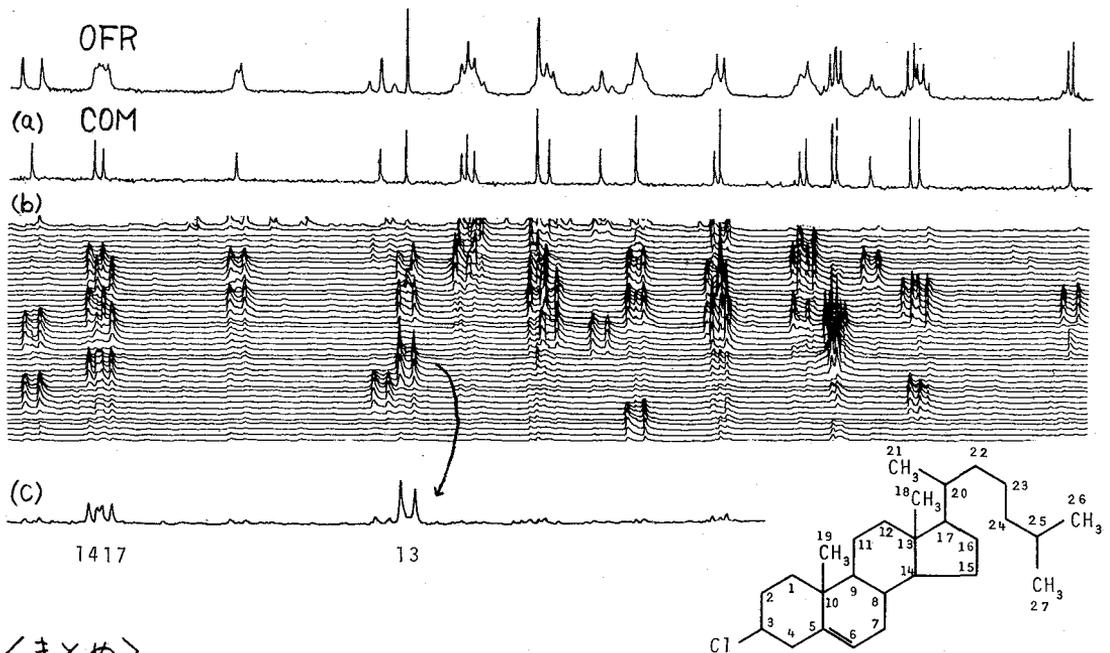
単位 秒

および、 T_1 (INEPT)が得られ、(b)(c)よりプロトンの個数もわかり、(3)式を使用することにより T_1 (HH)が求まる。コレステロールのように似かよった原子団を保有する化合物の ^1H スペクトルは、非常に複雑なため T_1 (HH)を測定することが不可能であるが、この方法を使用すれば間接的に T_1 (HH)を得ることができる。この実験結果を図4に示した。

< Double Quantum Coherence の2次元NMR >

Double Quantum Coherenceを2次元NMRに応用すれば、炭素間で結合相手がわかり、有機化合物の構造解析に使用できる。塩化コレステロールでこの一例を図5に示した。(a)は完全デカップリングスペクトルであり、(b)はこの方法の2次元スペクトルである。(c)は、このうち一つのみを取り出し、結合相手(J_{CC})をわかりやすくしたスペクトルである。

図5 Double Quantum Coherence の2次元NMR



<まとめ>

Double Quantum NMRは、種々の応用目的があるが、このINEPT法の T_1 は、 ^{13}C 核と直接結合した ^1H の緩和時間が測定できる。この値より、 ^1H のシグナルが複雑で分離できない系の ^1H の緩和時間が得られる。

<文献>

G. A. Morris	J. Am. Chem. Soc.	<u>101</u>	761 (1979)
G. A. Morris	J. Magn. Resonance	<u>41</u>	186 (1980)
A. Bax et al	J. Am. Chem. Soc.	<u>102</u>	4849 (1980)
A. Bax et al	J. Magn. Resonance	<u>43</u>	478 (1981)

(日本電子) 藤戸輝昭, 出口健三, 大内泉城
今成 司, M.J. Albricht

1. はじめに

近年 CP/MAS-NMR は、固体の物性研究に不可欠なものとなつてきており、多くの研究例が報告されている。我々もこれまで ^{13}C -CP/MAS法を用いて各種のサンプル系を測定してきたが、その際次のような問題に直面した。それは、① CP法ではシグナルが非常に出しにくい系があること、②緩和時間測定に際し、CP法ではプロトンの発熱による同調のずれ等の影響で測定値が不正確になりやすいこと、③得られた固体のスペクトルが、液体のスペクトルとの比較だけでは同定がむづかしいこと、などである。③に対しては緩和時間 (T_1, T_2) の差を利用してピークを分離する方法や、Magic Angle Decoupling による J-分解法が考案されている。今回、我々は上記①②の問題点を解決する方法として、pulse saturation Decoupling 法 (P.Sat. Dec. と略す) を用い、数種のサンプルで測定を試み、その物性について考察を行い、併せてこの方法の適用範囲についても検討した。

2. Pulse Saturation Decoupling 法とその応用

CP 法でシグナルが非常に出しにくいサンプルとしては、加硫ゴム類や、ポリフェニレンのような有機半導体がある。その原因としては、装置上の問題、即ちサンプルコイル中に高誘電体や半導体が入るため、予エンディングがずれ、CP のマッチング条件が変わることがあげられる。これは予エンディングを再調整することによって切りぬけることは出来る。しかしそれ以外にも CP 法での観測をむづかしくしている、サンプルの性質に起因する本質的な原因がある。即ち ^{13}C の T_{2CH} に比べ、 ^1H の T_{1H} が十分に長くないような系である。

① 分子運動が ω またはそれより速く、相関時間 τ_c が短いため、プロトンの T_{1H} が T_{2CH} に比べ十分長くない、 ^1H 核の分極が ^{13}C 核へトランスファされないうちに、 ^1H スピオンが decay してしまうような系。

② 常磁性物質や伝導電子等が含まれているため、それが ^1H の緩和に大きく寄与し、 $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ への Cross Polarization が起こりにくい。

③ 数 KHz もの高速回転を行っているため、 ^1H 系のエネルギーが回転運動をとおして、格子へにげてしまい、 ^1H の T_{1H} が短くなり、結果的に①と同じになってしまう系、等である。

これらの系に対しては、CP法をやめ、溶液で使われている完全デカップリング法を使

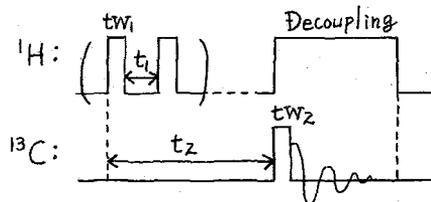


図1. P.Sat. Dec. 法のパルスシーケンス

New Application Techniques in CP/MAS-NMR

(JEOL) T. Fujito, K. Deguchi, M. Okuchi, M. Imanari and M.J. Albricht

うとしても、 ^1H デカップルパワーが大きいから、発熱等で不可能である。したがって、いわゆる Gated Decouple 法を用いるしかないが、その場合には NOE 効果がないため感度が 1/2 近くに低下するという欠点がある。これを解決するため、以前我々は、データサンプリング時のみ、ハイパワーデカップルし、その他の時間はローレベル Irradiation するという、いわゆる Bilevel Decoupling 法を試みた¹⁾。しかしこの方法では、固体サンプルに対しては、サンプルにより Saturation Power がかなり異なるため、必要最小限の Power level を設定することがあつた。この欠点を除くため、今回は Low level Irradiation の代わりに、 90° パルスをくり返してかけることにより ^1H スピンを Saturation させる方法を行った。図 1 にそのパルスシーケンスを示す。 t_{w1} はプロトンの 90° パルス、 t_{w2} はカーボンの 90° パルスにそれぞれ設定し、 t_1 はプロトンの T_1 より短かく、 T_2 よりも長い時間となるように選ぶ。この方法は CP 法に比べパワーレベル調整を必要とせず条件設定が容易である。この他に、 ^1H Irradiation (Saturation) 周波数幅がパルス変調によって拡がるという特徴がある。今回の測定では $t_{w1} = 5.0 \text{ msec}$, $t_{w2} = 6 \text{ msec}$, $t_1 = 10 \text{ msec}$ とした。ちなみにアダマンタンの ^1H の T_1 ($< T_2$) は室温では数 100 msec , T_2 は数 10 msec のオーダーである。この方法での感度の向上度を見たのが図 2 である。サンプルはアダマンタンで、いずれも 10 秒 \times 8 回積算を行った。アダマンタンのように ^{13}C の T_1 が短い (~ 3 秒) サンプル系では CP 法と P. Sat. Dec. 法とではほとんど感度に差が見られない。この方法を用いて CP 法でシグナルの出にくい各種の加硫ゴム A, B で ^{13}C -MAS 測定を行った。いずれもくりかえしは

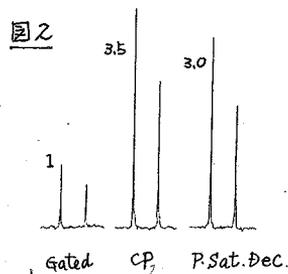


図 2. 3つの方法の感度比較

図 3. 加硫ゴム A の ^{13}C -MAS スペクトル

図 4. カarbon添加ゴム B の ^{13}C -MAS スペクトル

図 3

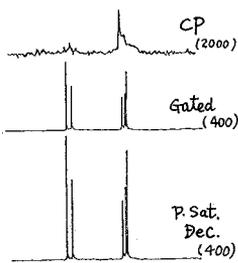
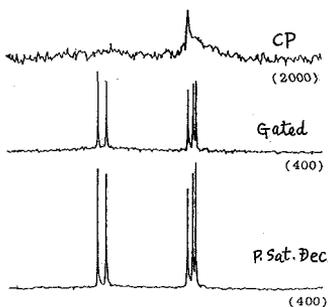


図 4



10 秒、観測周波数は 25 MHz である。サンプル A は天然ゴムを加硫したもの、B はこれにさらにカーボンブラックを添加したものである。単に加硫だけを行ったサンプル A では、CP 法と P. Sat. Dec. 法との強度差が非常に大きく、しかも CP 法で得られたスペクトルの線幅が広い。カーボンを添加したゴム B では CP 法と P. Sat. Dec. 法との強度差が A に比べ少なくなっており、しかも P. Sat. Dec. 法でのスペクトルも線幅が広くなっている。また Gated 法と P. Sat. Dec. 法とでピークの相対強度に変化は見られない。これまでプロトンのスピネエコー法による研究から、次のことが分っている²⁾。カーボンブラック系加硫ゴムは T_2 の短い (10 数 μsec) 準ガラス相と T_2 の長い (数 msec) 液状相からなり、 T_2 の短い成分は 10% 以下である。また ^1H の T_1

は数10mSecである。カーボングラック添加されていない加硫ゴムでは、 T_2 の短い成分は非常に少ない。これらのことから、図3,4の ^{13}C -MASスペクトルは次のように解釈される。加硫ゴムAは大部分が液状相から成るため、運動が激しくてCP法ではほとんど検出されない。またP.Sat.Dec法で得られるスペクトルも線幅がシャープである。一方カーボングラックを添加したサンプルBでは、CP法で検出される準ガラス相成分が増加して、P.Sat.Dec法でのものとの差が小さくなっている。また、カーボングラックを添加したため、それに含まれる電子スピンの緩和に寄与するため線幅が広くなるとともに、NOEによる増大も減少したと考えられる。以上のようによりこの方法を用いれば、ゴム中の各成分を分離して求めることが可能になる。

3. Pulse Saturation- T_1 法とその応用

この方法は単一パルスに対してだけでなく、複合パルスに対しても適用出来る。従来のCP法での T_1 測定では、matching条件の不安定さ及びTransient NOEによる T_1 値の誤差が大きい。

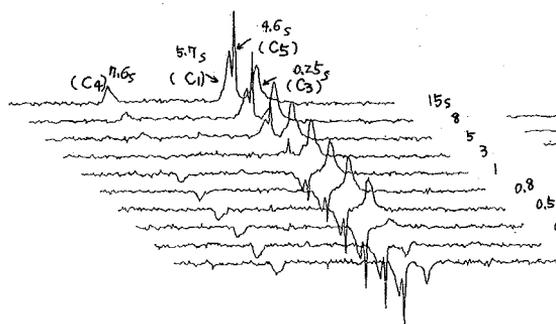
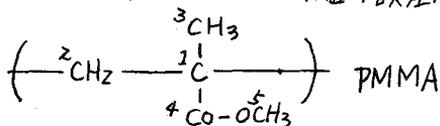


図6. ISO-PMMAのP.Sat- T_1 スペクトル

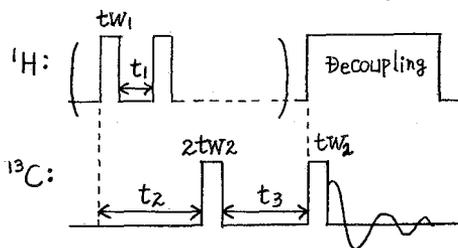


図5. P.Sat- T_1 法のパルスシーケンス

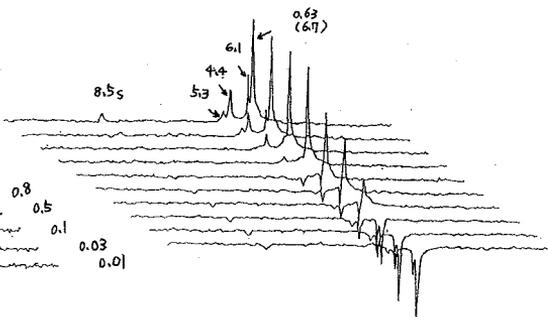


図7. SYN-PMMAのP.Sat- T_1 スペクトル

きいという問題だけでなく、CP法で検出出来ない系に対しても本法を用いれば対処出来る。図5にInversion Recovery法にpulse Saturationを適用したシーケンスを示す。 t_2 はくり返し時間で、測定は t_3 のパルスインタバルを変えて行う。このP.Sat- T_1 法を使用して、ISO及びSyn-PMMAの ^{13}C - T_1 を測定した結果を図6,7に示す。3位の $-\text{CH}_3$ をのぞけば、いずれもISOの方が T_1 値が長い。興味深いのは3位 $-\text{CH}_3$ の挙動である。ISOでは254msと非常に短いが、Synでは2本に分裂し、しかもその T_1 値は6.1秒及び0.63secと非常に差が大きい。念のためSyn-PMMAをCP法とP.Sat.Dec法とで測定し、比較してみたのが図8である。明らかに、CP法とP.Sat.Dec法とでは、 $-\text{OCH}_3$ 及び $-\text{CH}_3$ の強度比が異なり、P.Sat.Dec法(Gated法と強度比同じ)では、 $-\text{OCH}_3$ 及び T_1 の短い方の $-\text{CH}_3$ ピークの強度が増している。

さらに、このサンプルの ^{13}C - T_1 をCP法で測定³⁾したのが、図9である。 T_1 -セファロットカーブの傾きから、 $-\text{OCH}_3$ 及び $-\text{CH}_3$ では、 T_1 値の異なる種類の成分を分

図8. Syn-PMMAの¹³C-MASスペクトルの比較

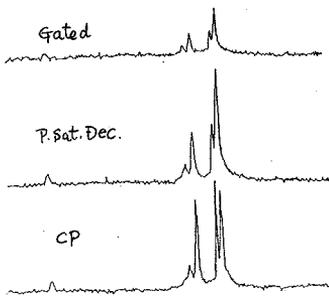
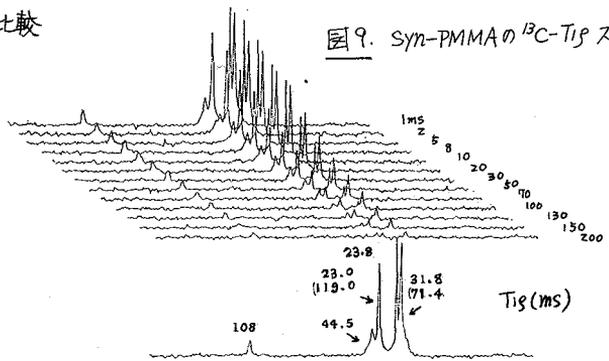


図9. Syn-PMMAの¹³C-TISスペクトル



離出来た。以上の結果及び Veeman³⁾及び Albright⁵⁾の測定結果から、2種の PMMA に対して次のことが云えるであろう。iso-PMMAの方が一般に iso-richで結晶性の高い(一成分のもの)のが得られやすく、これは rigidであるからT₁値は、比較的長い。一成分であるということは、CP法と P.Sat.Dec法とで得られたスペクトルの強度比にあまり差が見られないことからもうらづけられる。しかし-CH₃はω₀に近い非常に速い運動をしているためT₁が254msと短く、しかも iso tropic dispersionで広がっている。一方 Syn-PMMAでは、Syn-richで結晶化度の高いものが得られにくく、非晶質分がかなりの比率で含まれている。これは CP法と P.Sat.Dec法とで得られたスペクトルの強度比の差が大きいこと、及び(-OCH₃)-CH₃のT₁, T_{1ρ}がいずれも2種類あることから云えよう。Syn-PMMAの2種類の-CH₃のうち、一方は運動しにくい位置にあり、固定されやすいため低磁場側にピークを示し、T₁も61秒と長い。他方の-CH₃は比較的動きやすい位置にあり、isoに近い高磁場側にピークを示し、T₁も比較的短い。(0.63秒)しかし isoに較べると長い。このようにT₁測定から、PMMAでは Syn構造では isoに比べメチル基の速い運動が束縛されていることが分る。

以上のように、pulse Saturation Decoupling法を用いれば、CP法で検出されない成分が、従来の Gated法よりも感度良く、しかも簡単に測定出来るので、結晶質と非晶質のような2成分系の物性研究に非常に有効であると考えられる。

最後は、iso及び Syn-PMMAサンプルを提供して下さった東レリサーチセンター(滋賀)の嶋田一夫氏に感謝致します。

参考文献

- 1) 藤中, 寺尾; 第18回 NMR 討論会要旨集 p53 (1979)
- 2) 藤本, 西; 日本ゴム協会誌 45 465 (1970)
- 3) W.S. Veeman, E.M. Menger, W. Ritchy, E. de. Boer; *macromolecules* 12 924 (1979)
- 4) W.S. Veeman, E.M. Menger; 22nd ENC. preprint p77 (1981)
- 5) M.J. Albright, K.Goto, H.Hutchings, C. Anderson Evans; 22nd ENC preprint p332 (1981)

今日まで固体高分解能NMRスペクトルは主として¹³C, ¹⁵N, ²⁹SiなどのレアスピンのCPIMAS法の様にアバンダントな核スピンの相互作用を容易にデカップリングできる系, 又は無機化合物の²³Naや²⁰⁷Pbの様に他のアバンダントスピンのなくしかも測定する核スピンの相互作用(又は四重極相互作用)が小さく線中の小さい系に関して行われてきたが、¹H核などのアバンダントスピンの高分解能スペクトルの測定例は比較的限られている。これは¹H核の場合固体内で線中と比較した化学シフトの大きさが¹³Cや¹⁵Nなどの核と比べて格段に小さいこと、また観測すべき核の共鳴周波数とデカップリングすべき核の共鳴周波数が同じであるため、このため高分解能スペクトルを得るには多重パルス法を用いる必要があり、このパルスとして、¹H_i磁場が大きくかつ均一であること、各パルス中が正確に同一でありさらに各パルス間の位相が正確に90°ずつ異なること、デッドタイムが充分小さいことなどが同時に要求される。今回我々は超伝導マグネット、高時間分解能かつ高出力パルスNMRスペクトロメーターを用い、4パルスシーケンスまたはMREVシーケンスとマジックアングルスピニングを組合せいくつかの固体のプロトン高分解能スペクトラを得たのでこれを報告する。

実験は6mmφスピナーを用いるMAS用プロブヘッドを¹H 200 MHzにチューニングし、Qダンプして用い、トランスミッター出力は1KWで90°パルス中は約1μ秒、デッドタイムは約2μ秒であった。また回転速度は約6 KHzである。パルスシーケンスのサイクルタイムは4パルス、MREVに対しそれぞれ22μ秒及び44μ秒であった。(Fig.1)

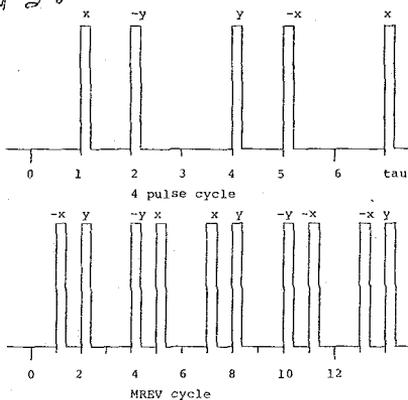


Fig. 1

図2(2)は球型にしたフェロセン単結晶の4パルスシーケンスによるスペクトルで磁気的非等価な二つのC₅H₅により二本線となっている。(1)図は多結晶のフェロセンのWHH/MASスペクトルで前者と比べ細いスペクトルが得られる。

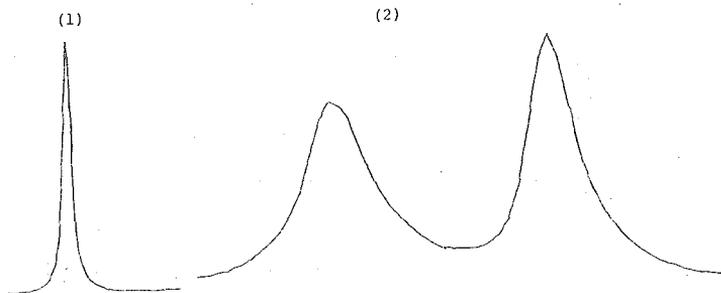


Fig.2 200MHz ¹H WHH/MAS (1), and WHH (2) Spectra of Ferrocene

えっち ぼすと、といた よしはる、いー ぼるとるてい

(京大理) O寺尾武彦・三浦 尊・雑賀亜幌

〈序〉 固体中の希薄スピンの高分解能 NMR¹⁾ スペクトルを得るための CP/MAS 法では, rare spin(S)-abundant spin(I)間の双極子相互作用を消去する heteronuclear decoupling が IS 間接スピンスピン相互作用をも同時に消し去ってしまうので, IS 間の結合定数を求めることができない。結合定数 J は化学シフトとともに, 分子内の電子状態を知る上での重要な parameter のひとつであり, 液体の高分解能 NMR では, 信号の帰属や配座解析にも利用されている。我々は, J によって分離した, 固体中の rare spin のスペクトルを得る方法を考案し, 2, 3 の試料にその方法を適用した。

〈理論〉 固体中の rare spin の高分解能スペクトルを得るために heteronuclear decoupling の使用が不可欠だと考えられているようだが, 同時に MAS を使用する場合はそうではない。実際, 我々は homonuclear decoupling (ここでは, inhomogeneous な相互作用を残したまま IS 間接スピンスピン相互作用 \mathcal{H}_{II} を消去する, magic-angle 照射²⁾ や multiple-pulse 法³⁾ などの手法を意味する) と MAS を併用することにより IS 間の双極子相互作用 \mathcal{H}_{IS} による線幅の広がりを除くことができることを見出した。 \mathcal{H}_{II} と \mathcal{H}_{IS} が結合した相互作用は homogeneous であるが, homonuclear decoupling が \mathcal{H}_{II} を抑えるので残った相互作用は inhomogeneous になる。残った inhomogeneous な相互作用 \mathcal{H}_{IS} による線幅は, spinning の周波数が dipolar width よりも小さくても MAS の使用によって消し去られる⁴⁾。他方, 間接スピンスピン相互作用は homonuclear decoupling に用いる方法に依存して若干縮小されるが, 消去されずに観測される。

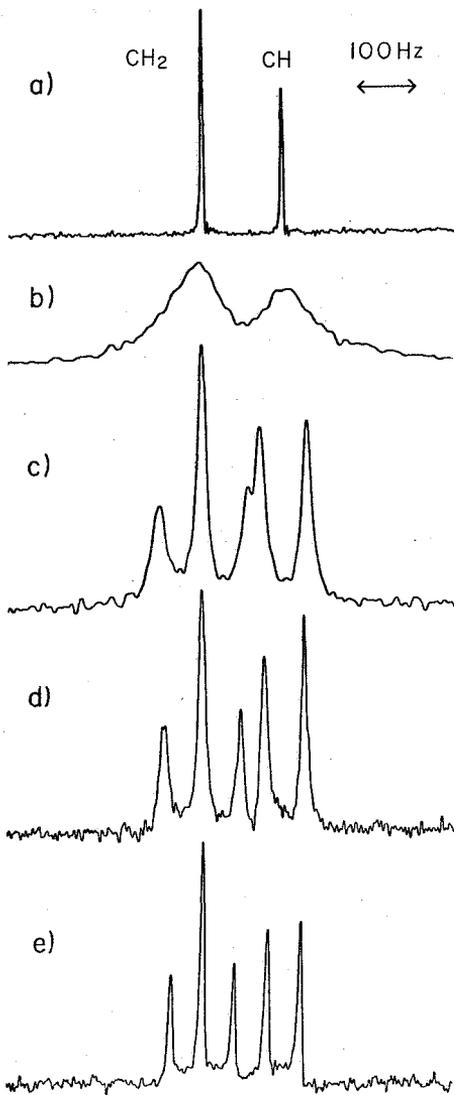
〈実験〉 実験は ^1H 周波数 60 MHz の自作の装置を用いて行なった。 ^1H に対する高周波磁場の強さは CP に対しては 15 G, homonuclear decoupling に対しては, magic-angle 照射の場合 23 G, multiple pulse の場合 24 G である。multiple pulse のパルス間隔では 3.7 μsec , 試料回転の速さは 2.2 kHz である。

〈結果〉 図 1 にアダマンタンにおいて様々な条件の下で得られた ^{13}C のスペクトルを示す。図 1 a のスペクトルは on-resonance decoupling のもとで観測されたものであり, したがって ^{13}C - ^1H 間の間接結合による微細構造は消去されている。図 1 b のスペクトルは decoupling をせずに測定したスペクトルであり, 液体の場合と対照的に微細構造は全く見られない。それは, ^1H スピンの flip-flop のために ^{13}C - ^1H 間の双極子相互作用が MAS によって完全に消去されなくなるばかりでなく, ^{13}C - ^1H 間の間接結合が消されてしまうからである。図 1 c, d, e のスペクトルは図 2

High Resolution J-Resolved NMR Spectra of Dilute Spins in Solids.

(Kyoto Univ.) T.Terao, H.Miura, A.Saika.

図1



試料回転を併用して得られた、アダムantanの¹³Cスペクトル

- a) on-resonance decoupling
- b) decoupling なし
- c) magic-angle decoupling
- d) MREV-8 pulse cycle decoupling
- e) 24 pulse cycle decoupling.

度では多数の side band に分裂して信号の大きさが極めて小さくなることによる。前者に対してはパルス間隔を更に短縮すること、あるいは multiple pulse 法に改良を加えることにより、後者に対しては図2に示したようにMASの回転に同期して sampling すること(今回は行っていない)によりIS間双極子相互作用の

に示すように homonuclear decoupling をMASと併用して得たスペクトルであり、予想される微細構造—メチレン及びメチン炭素に対してそれぞれAX₂, AX型の多重線—がはっきりと現われていて、この方法の有効性を示している。

c, d, e において用いられた homonuclear decoupling法はそれぞれ magic-angle 照射, MREV-8 pulse cycle³⁾, 24 pulse cycle⁵⁾である。これらの方法は、II間の双極子相互作用をそれぞれ0次, 1次, 3次まで取り除くことができ、したがって、この順に分解能が向上している。c, d, e において分裂の大きさが互いに異なるのは、方法によって scaling factorが異なるためである。この実験で得られたJの値は、メチレン及びメチン炭素に対してそれぞれ123±3 Hz, 134±3 Hzで、溶液中での値(それぞれ125.9 Hz, 131.2 Hz)に近い。

他の例を図3に示す。試料はβ-キロール-メタノール包接化合物であり、メタノールの¹³Cは約20%にエンリッチされている。aは通常のCP/MASスペクトルであり、吸収線は高磁場からそれぞれメチル, メチン(近接した2本), 4級炭素によるものである。bは24 pulse cycle decouplingのもとで観測されたスペクトルであり、メチル炭素は明確にAX₃型の多重線に分離している。4級炭素の信号も見られているが、メチン炭素の信号が消失している。その理由は、この場合においてはIS間の双極子相互作用が極めて大きいために homonuclear decoupling が困難になることと、2,3 kHzの回転速

大きい rigid lattice におけるメチン、メチレン炭素の信号も得られるようになると思われる。

複雑なスペクトルの場合には J で吸収線が分離すると特に固体では線幅が広いため、二次元 NMR の適用が望まれる。そのための pulse sequence の例を図 4 に示す。しかし、 J で分

離したスペクトルの大きな利用価値の一つは信号の帰属であるが、この目的だけのためには多大な時間を要する二次元 NMR を行なう必要はなく、特別の t_1 でスペクトルを測定すれば十分である。図 5 にカンファーに対する実験結果を示す。a は通常の CP/MAS スペクトルである。b は $t_1 \approx (2J)^{-1}$ で得たスペクトルでありこの t_1 では 4 級炭素のみの信号が選択的に観測される。4 級炭素の選択的観測法として考案された Opella による方法⁷⁾ ではメチル基の信号が混入してくるが、この方法では完全に取り除かれ、信号の帰属のみならず複雑なスペクトルの単純化に、より有効である。

$t_1 = J^{-1}$ では、4 級炭素、メチレン炭素の信号と、メチン炭素、メチル炭素の信号とが互いに逆符号で、かつ理想的にはいずれも full amplitude で観測されることが容易に示し得る。c は

$t_1 \approx J$ で得たスペクトルである。特に a で分離できていない炭素 6, 7 が c では見事に分離されている点に注目されたい。他の t_1 の値でスペクトルを得ることにより、メチン炭素とメチル炭素を区別することももちろん可能である。なお、この試料で

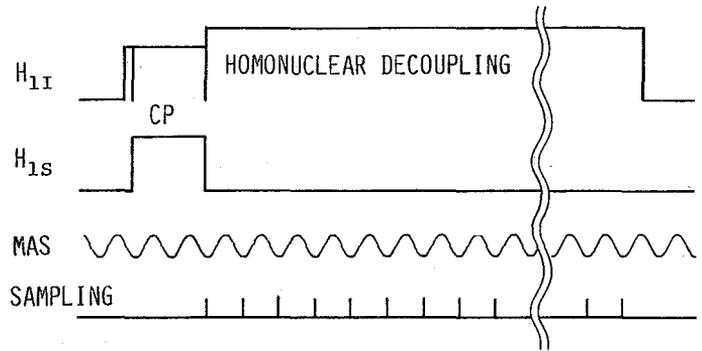


図 2. J 分離スペクトルを得るためのパルス系列

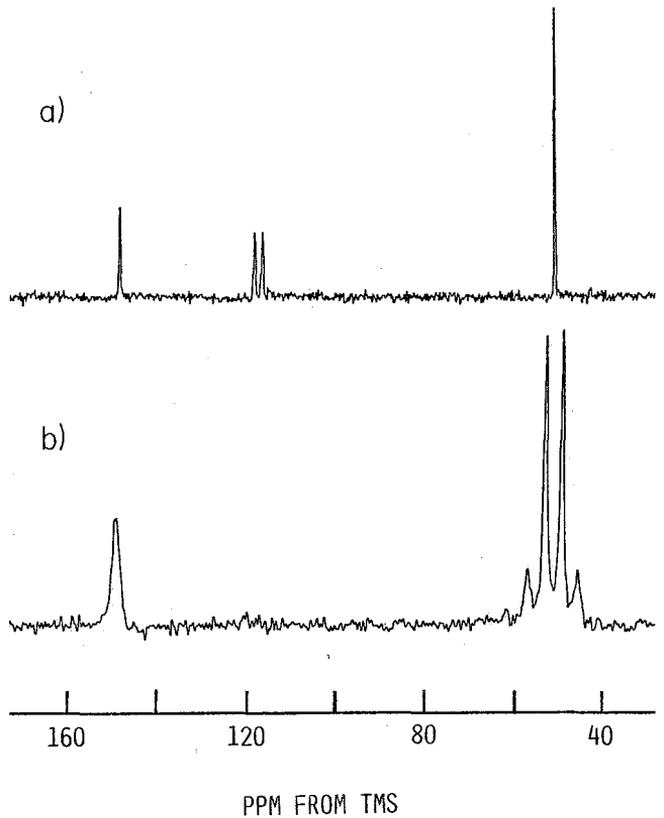


図 3. β キノン-メタノール包接化合物の ^{13}C スペクトル。a) は CP/MAS, b) は図 2 の方法による。

は、C-H間双極子相互作用が分子運動のため小さく、 $t_1 = 2\pi T$ の条件を満たすことは不必要である。一般の試料では図2の実験同様、今の段階では困難であるが、今後一層の改良を加えていく予定である。

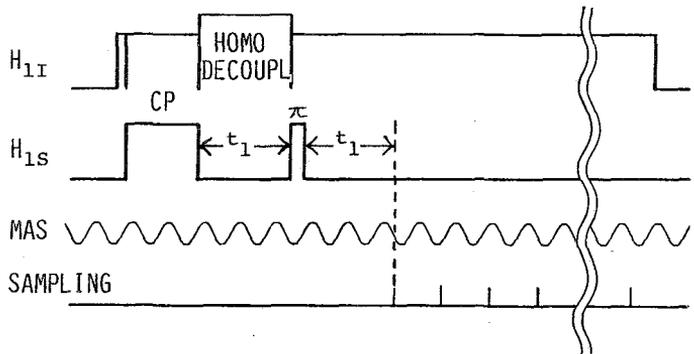
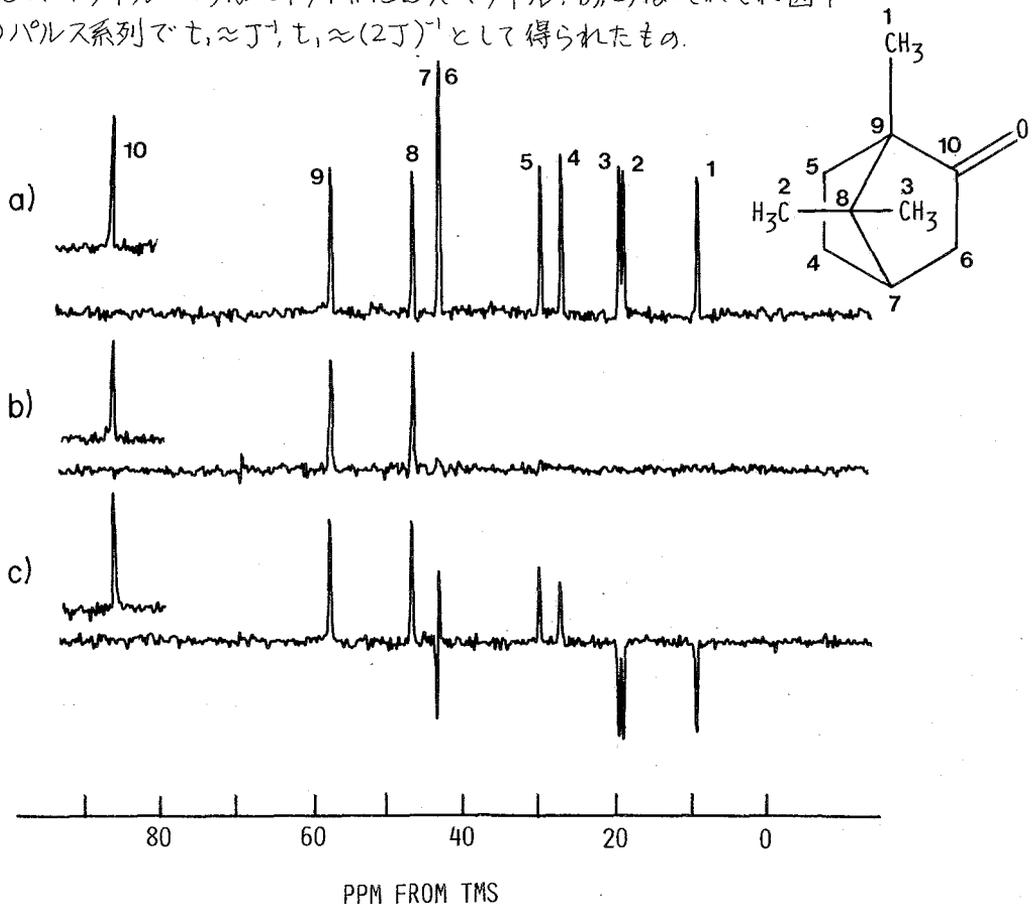


図4 二次元J分解NMR用パルス系列の一例

図5 カンファードにおける

^{13}C スペクトル a)はCP/MASSスペクトル、b),c)はそれぞれ図4のパルス系列で、 $t_1 \approx J^{-1}$, $t_2 \approx (2J)^{-1}$ として得られたもの。



- (文献) 1) 寺尾武彦, 藤戸輝昭 「化学と工業」 33, 531 (1980)
 2) M.Lee and W.I.Goldburg, Phys.Rev., A140, 1261 (1965).
 3) U.Haeberlen, High Resolution NMR in Solids, Selective Averaging (Academic, New York, 1976).
 4) M.M.Maricq and J.S.Waugh, J.Chem.Phys., 77, 3300 (1979).
 5) D.P.Burum and W.K.Rhim, J.Chem.Phys., 71, 944 (1979).
 6) W.P.Ave, E.Bartholdi, and R.R.Ernst, J.Chem.Phys., 64, 2229 (1976).
 7) S.T.Opella and M.H.Frey, J.Am.Chem.Soc., 101, 5854 (1979).

(北大工・日進ソフド)*下川 繁三, 山田 英二,

*神田 勇一, 相馬 純吉

〔序〕 高圧NMRは古くから物性研究の手段として用いられて来た¹⁾。液体分子を対称とする高分解能高圧NMRはこゝ10年来いくつかのグループによつて発展されて来た。これについてはガラスの耐圧セルを用いた先駆的研究で知られる山田らによつて本討論会でも報告されている²⁾。しかるに高温での高圧NMRは純液体の臨界状態近傍での輸送現象或は緩和の興味など多くの関心を集めながら、わづかに Jonas³⁾, Hanany⁴⁾ らのみによつてこゝ数年研究されて来たのみである。我々の興味の一つは有機物、高分子の高温における性質であり特に熱溶解性高分子液体の高温での液晶化、秩序形成と炭素化に至る過程をNMR分光法で調べることにある。すでに我々は高温・高分解能のNMRをシステム化し塩ビ(PVC)の熱分解過程を調べた⁵⁾。又昨年の討論会ではプロトンを観測する高温・高圧・高分解能NMR装置を試作し、550°C 250 barの温度と圧力のもとで合成高分子や天然高分子物質の熱分解反応過程に応用して見た⁶⁾。今回はC-13 NMRの高温・高圧化を試みPVCと他の合成高分子の熱分解に適用して見たので報告する。さらに一言言うと今迄ブラックボックスであつたオートクレーブにNMRの眼を奪へてみようとする意図もあり有機合成反応に応用を試みている⁷⁾。

〔装置〕 感度の低いC-13スペクトルを高温高圧のもとで得るために我々は従来用いて来た高温高分解能システムをさらに改良した。ホ1図に示す様に⁸⁾の外部ロックシステムを作り、38MHzのプロトンノイズデカップラーを加えた。特にワイドギャップ(磁極間隔6cm)の中心から25cm以上離れた場所でロック信号の強度(感度・分解能)が静磁場を長時間保存するのに十分である様にして作った。高圧プローブの材料はチタン合金(Ti-6Al-4V)を用いた。合金中に含まれる不純物の影響もあるが凡そ $5 \sim 8 \times 10^{-7}$ の分解能を得た。C-13用のプローブは前回のプロトン用とは全く異なつた観点から組上げた。

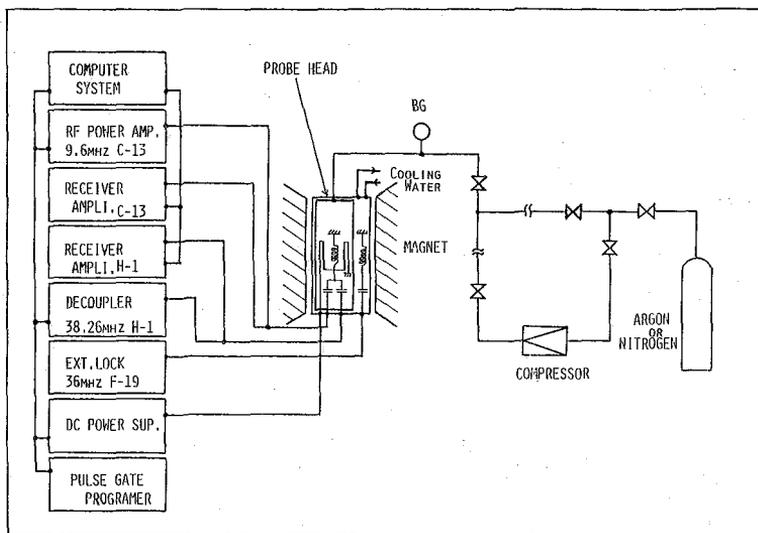


Fig.1 A block diagram of the high-temperature and high-pressure carbon-13 NMR system.

A C-13 NMR PROBE FOR HIGH -PRESSURE AND HIGH -TEMPERATURE EXPERIMENTS

BY

• SHIMOKAWA Shigezo, YAMADA Eiji, KANDA Yuichi* and SOHMA Junkichi
(Hokkaido Univ. Nishin Software*)

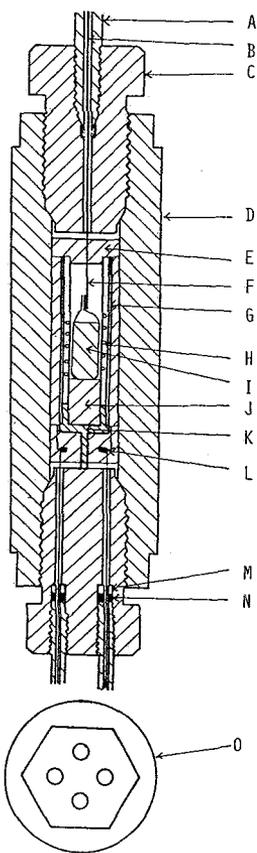


Fig. 2 The high pressure vessel.

高温にするためのヒーターは前回外熱式として耐圧プローブの外側から熱したが今回は内熱式とし耐圧プローブ内部にヒーターを組み込んだ。お2回に此のプローブを示す。RFリード線とヒーター線が下部より導入されている。此の耐圧容器はこれ自体2000bar以上にも用いられるが圧力ゲージとバルブの耐圧が250barのものを使用したのが今回は250bar迄の低い圧力で実験を行なった。耐圧プローブの外側はアルミ製の冷却器によって水冷されておりプローブの外側はほぼ室温に近い温度を示している。此のプローブの内径は直径20mmで、ヒーターは15%の石英管に0.35%の純ニッケルクロム線を交互巻きとして磁界の生ずるのを最小にした。共振コイルは10%φの耐熱ガラスに巻いた。試料セルは前回同時に上部端が毛细管にしたものを使用し直径8%φを用い通常1.2ccの内容積に試料を入れる。共振コイルは単一コイルの方式をとった。C-13の共振周波数は9.62MHz、対応するプロトンデカップラーの周波数は38.26MHzである。プローブの温度分布はあらかじめ測定した。測定温度の誤差は±5°Cである(450°C)。試料の加熱は直流安定化電源より供給しこれはトリガパルスによってRFパルスとヒーターが交互にゲートされる様になっている。(お3回図)。C-13スペクトルは通常100回の積算で得るが低感度の場合S/N比改善のため400~1000回の積算を行なった。積算中の磁場のドリフトは周波数で見ても±1Hz以内である。昇温等によってロック信号が変化する場合などは全く認められなかった。耐熱耐圧容器中に被測定試料(ポリマー)を入れた場合どうやって分解能を調整するかが一つの向題であった。常温で液体の場合はデカップラーをCWとしこれをパルス化して(変調)共振コイルに与え、互受信号を通してオシロスコープ上にプロトンのFIDとして描かせることが出来る。我々はこれをスイッチングで簡単に切変えて出来る様にした。試料が常温で固体の場合にはあらかじめ(耐圧プローブ投入前に)分解能を調整し、プローブ中の試料が高温で溶けた時に上述の方法で分解能をチェクすることにした。我々の経験によれば外部ロックの周波数(指示計)が同じである場合には分解能に大きな差(10%のオーダー)は少なく試料自身の線巾に由来する場合が多かつ

高温にするためのヒーターは前回外熱式として耐圧プローブの外側から熱したが今回は内熱式とし耐圧プローブ内部にヒーターを組み込んだ。お2回に此のプローブを示す。RFリード線とヒーター線が下部より導入されている。此の耐圧容器はこれ自体2000bar以上にも用いられるが圧力ゲージとバルブの耐圧が250barのものを使用したのが今回は250bar迄の低い圧力で実験を行なった。耐圧プローブの外側はアルミ製の冷却器によって水冷されておりプローブの外側はほぼ室温に近い温度を示している。此のプローブの内径は直径20mmで、ヒーターは15%の石英管に0.35%の純ニッケルクロム線を交互巻きとして磁界の生ずるのを最小にした。共振コイルは10%φの耐熱ガラスに巻いた。試料セルは前回同時に上部端が毛细管にしたものを使用し直径8%φを用い通常1.2ccの内容積に試料を入れる。共振コイルは単一コイルの方式をとった。C-13の共振周波数は9.62MHz、対応するプロトンデカップラーの周波数は38.26MHzである。プローブの温度分布はあらかじめ測定した。測定温度の誤差は±5°Cである(450°C)。試料の加熱は直流安定化電源より供給しこれはトリガパルスによってRFパルスとヒーターが交互にゲートされる様になっている。(お3回図)。

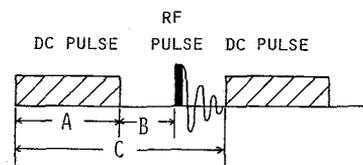


Fig. 3 Pulse sequence of rf and dc heater.

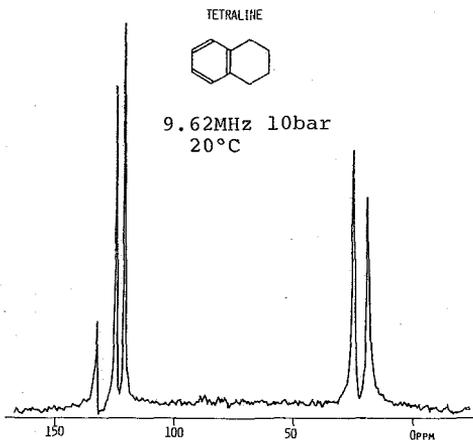


Fig. 4 C-13 spectrum of tetraline

た。第4回是我々の高温高压プローブ中で測定したテトラリンのC-13スペクトルである。(20°C, 10bar)分解能はスペクトルの半値中で10 Hz以内である。もともとポリマーはスペクトル線の重なりが多く、又高温ではラザカルの影響も受けるので線中は広く、本研究の目的には十分な分離したスペクトルが得られたと考えられる。このスペクトルから環の各炭素がよく分離して観測された。

〔実験結果〕

すでに報告した様に一般に有機物の炭化過程の追跡にはポリ塩化ビニル(PVC)の熱分解残渣(TD)を用いるのが最も適切である。その理由は熱分解PVCは脱HCl反応によつてすべてがポリエー型として高温で溶けることが知られてゐる。そして温度の上昇と共に環の縮合が進み、液晶の生成が認められる。プロトン高温・高压NMRでこの様子を見ると芳香環と脂肪族向5.5ppmのためスペクトルの線中に比べて分離が悪く(シフトが小さい)芳香環の多環化に関する情報は失われてしまつてゐる。第4回は同じ試料をC-13スペクトルで観測したものである。炭素の化学シフトはプロトンに比べて凡そ20倍以上であるから我々の観測磁場でも十分分離して見ることが出来る。あらかじめ脱HClしたTD-PVCはすでに373°Cで芳香環に二つのピークが出現した。低磁場側は1つの炭素で環の縮合が明白にシフトより認められた。520°C, 170 barにおいても芳香環の二つのシフトを示す信号は依然としてのごつてゐる。此のことは次の様に考えられる。即ちプロトンに比べてC-13の化学シフトは20倍大きいこと、又此の温度域ではプロトンの足めに比べて線中の広がり(ラザカル)が少なく見えるのは、C-13の存在比が1%(10⁻²)であるので、見かけのラザカル量が少な目に影響を与えてゐるのだから(例之は分子100%当り14しかラザカルの影響を受けないので)、此の点に関しては目下プロトンを含めて検討中である。以上のことから高温高压でのC-13スペクトルは有機物特に炭素化合物の熱分解プロセスの解析にはプロトンNMRよりも多くの情報が得られることが判明した。

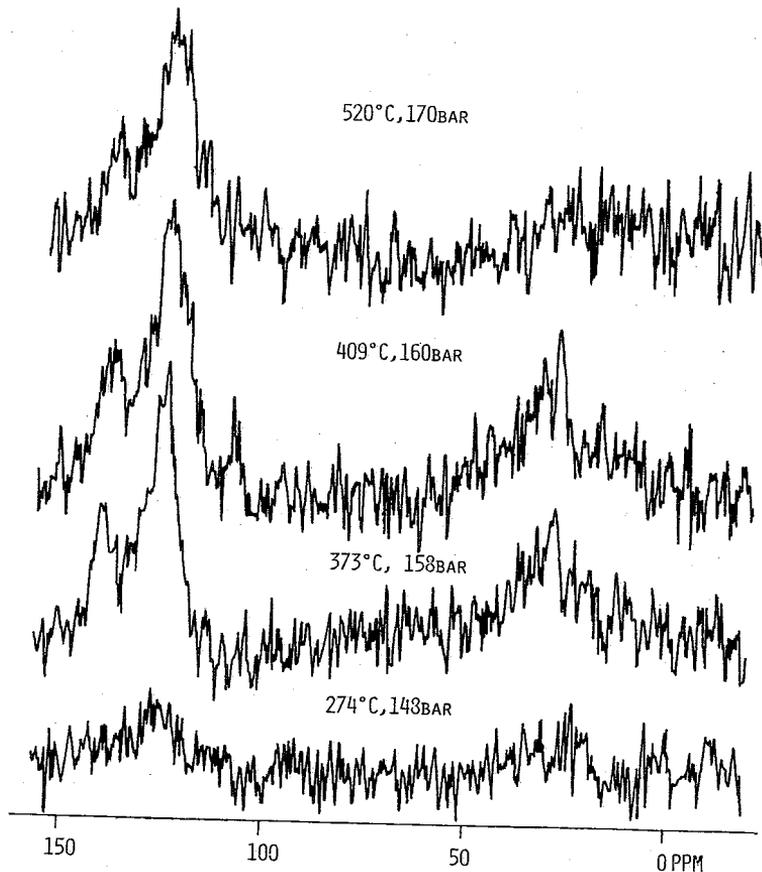


Fig. 5 C-13 spectra of TD-PVC at 9.6MHz

ね6図は直鎖状ポリエステルを同様に140bar
 449°Cで測定したC-13スペクトルを示す。
 ポリエステルは常温で固体でありC-13スペ
 クトルは観測されな。268°C(120bar)で
 軟化して来ていることが判る。310°C,130bar
 では低磁場側からカルボニル,芳香環,メチ
 レンの各炭素が出現した。373°C(130bar)で
 は各炭素のシグナルは極めて鋭い吸収を示し
 ている。このことはポリエステル分子が熱
 分解によつて比較的到低分子化(解重合)
 していることが判り且、此の温度での活発
 な分子運動を示している。449°C(140bar)
 ではメチレンに比べてカルボニルと芳香環
 の強度が減少している。これは昇温と共に
 重合が進行していることを示している。
 PVCの場合に比べてスペクトル線が狭い
 のはラジカルの影響が少ないためと考え
 られる。それ故此の温度域では液晶化は
 しない様に思はれる。

【結論】 高温・高圧C-13NMRを
 試作し二種のポリマーの熱分解過程を観
 測した。チタン合金の耐圧容器はC-13
 スペクトルを高温で得るのに良い道具で
 あることが判った。内部ヒーター方式に
 より耐圧セルの安全性は極めて良くなつ
 た。分解能は凡そ $5 \sim 10^7$ 程度であるが
 スペクトルの分離は良く、プロトンに比べ
 微細構造(ミット)に関する情報が多。ラ
 ジカルの影響はPVCではC-13核は
 プロトンに比べて少ないことが判った。
 NMRをオートクレーブとして用いると
 有機合成反応に広い応用が期待される。

References

- 1) G.B.Bedek "Magnetic Resonance at High Pressure" Interscience publishers 1963
- 2) H.Yamadaら 第16回NMR討論会 1977 京都
- 3) W.J.Lamb, J.Jonas J.Chem.Phys. 74 913 1981
- 4) U.El-Hanany, W.W.Warren, Jr. Phys.Rev.Lett. 34 1276 (1975)
- 5) S.Shimokawa E.Yamadaら 第18回NMR討論会 1979 大阪
- 6) S.Shimokawa E.Yamadaら 第19回NMR討論会 1980 札幌
- 7) S.Shimokawa E.Yamada 未発表

Abstract

An inert gas pressureized internally heated, high pressure and high temperature carbon-13 nmr probe for experiments in the temperature range 20 to 550°C and the pressure range 1 to 250 bar is described. The probe was applied to the study of the thermal degradation process of polymers(PVC and polyesters).

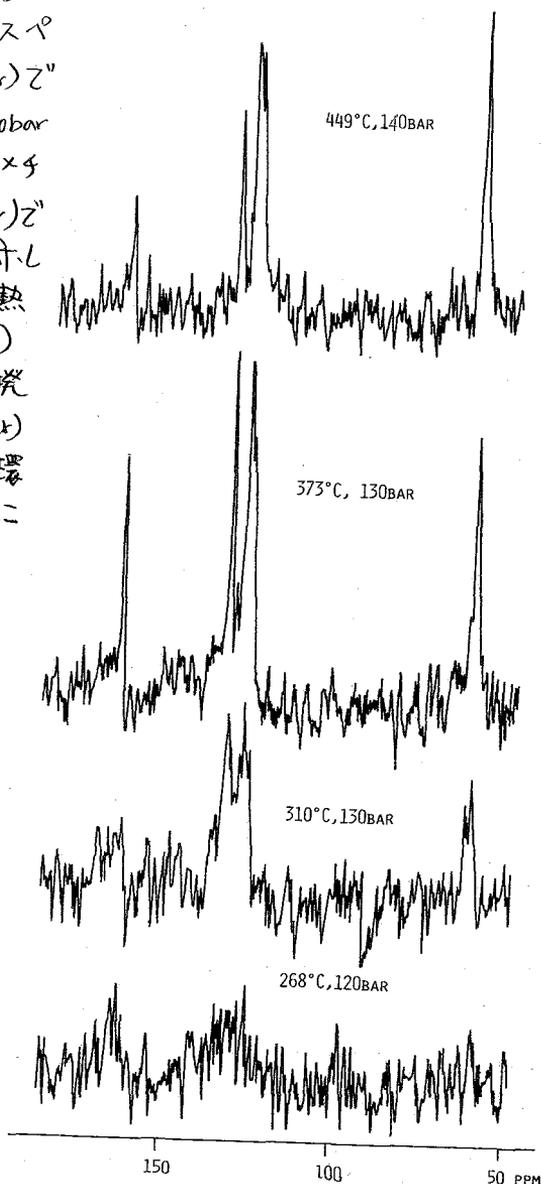
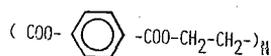


Fig.6 C-13 spectra of polyesters

第 2 日

11月10日(火)

SPECTRAL ANALYSIS OF ^{13}C AND ^{15}N POLYPEPTIDE SPECTRA
USING INEPT AND CORRELATED 2D NMR METHODS

George A. Gray

NMR Applications Laboratory
Varian Associates, D-298
611 Hansen Way, Palo Alto, CA 94303

Recently developed spin excitation methods such as INEPT¹ coupled with new higher sensitivity probes have significantly increased the power of the NMR method in the study of polypeptides for weak nuclei such as ^{13}C and ^{15}N . Whereas in the past large amounts of material and/or labeling were necessary to obtain sufficient sensitivity, it is now practical to consider ^{15}N analysis of 0.1 molar solutions using volumes on the order of 2 cc.

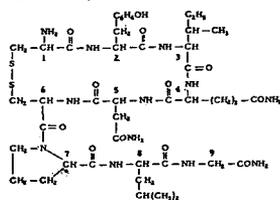
^{13}C and ^{15}N spectra of 0.2 molar CBZ-gly-pro-leu-ala-proline in $\text{dms}\text{-d}_6$ have been obtained at 50 and 20 MHz respectively. The prolines are demonstrated to have stable cis/trans isomerism in $\text{dms}\text{-d}_6$ through the observation of separate resonances both in the ^{15}N and ^{13}C spectra. Proline resonances were identified by comparing the NOE-enhanced and INEPT spectra.

The polypeptide was also examined using both homo and heteronuclear correlated 2D NMR with quadrature detection in both frequency dimensions, allowing more detailed interpretation of the proton spectrum in the former, and establishment of C-H bonds in the latter.

¹G.A. Morris and R. Freeman, J. of Amer. Chem. Society, 101, 760 (1979)

阪大蛋白研・東大理* 小林祐次・樋口直樹・京極好正・
永山国昭*

I.はじめに 二次元NMRは前回の本討論会において永山と山田により紹介されたが、我々が以前から行っているポリペプチドの研究に関して適用した例を二、三報告する。用いた手法は (1) $90^\circ-t_1-180^\circ-t_1$ -Sampling (t_2) といったパルス系列を用い、 t_1 を変化させてFIDをサンプリングすることにより、二つの時間成分 t_1 と t_2 に対応する二つの周波数成分としてケミカルシフトとスピンスピン結合の情報を取り出す2DJ分解法, (2) $90^\circ-t_1-90^\circ-t_1$ -Sampling (t_2) といったパルス系列を用い、スピンスピン結合している核間をケミカルシフト差として取り出す2D-SECSY法, (3) $90^\circ-t_1-90^\circ-t_m-90^\circ-t_1$ -Sampling (t_2) といったパルス系列で一定の待時間 t_m をおき、この間に双極子-双極子相互作用による交叉緩和を起こさせ、双極子結合している核間の相関をケミカルシフト差として取り出す2D-NOE法の三方法である。



II.実験 測定はすべてBruker WM-360wbを用い、Aspect 2000を用いて計算した。

図1 オキシジンの化学構造

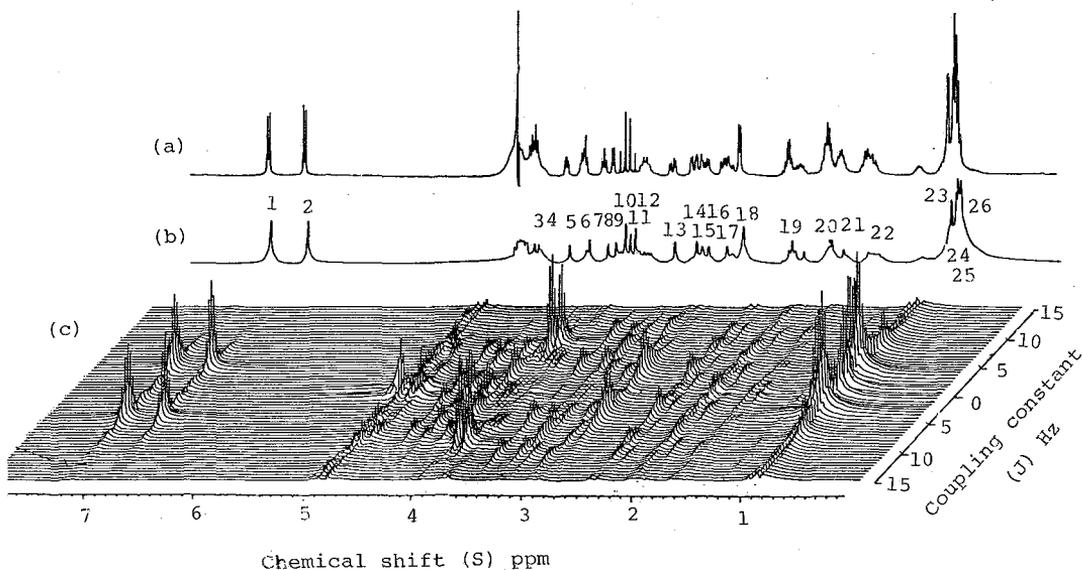


図2 オキシジンの2D J分解スペクトル
各ピークのケミカルシフト値と帰属は図3参照

Application of the Two-Dimensional NMR Techniques on Polypeptides
(Inst. for Protein Res, Osaka Univ Faculty of Science, Univ Tokyo)
Y. Kobayashi, N. Higuchi, Y. Kyogoku, K. Nagayama.

2DJ-分解スペクトル

図2のaはリナペプチドであるオキシトシン(組成は図1)のD₂O中での通常の1Dスペクトルを示す。これをスピンスピン結合軸(J軸)とケミカルシフト軸(S軸)に展開レスタックプロットしたのがcである。J軸に沿ってS軸にスペクトルを投影するとbが得られ、aに対してあたかもブロードバンドホモデカップリングを行ったようなスペクトルとなる。bの各ピークの位置でJ軸に沿ってcの断面を見たのが図3である。このように各ピークのカップリングの様子を重なりなしにより精度で取り出すことが出来る。(S軸 4000 Hz/8k ポイント, J軸に 30 Hz/64 ポイント 用いた。) 例えばaの0.9 ppm付近のピークは複雑で通常のカップリング法ではその様子を知らることは困難であるが、図3の22~25のように4種のメチル基のカップリングの様子がわかり、26はLeuのδメチル基であると簡単に帰属できた。(100)

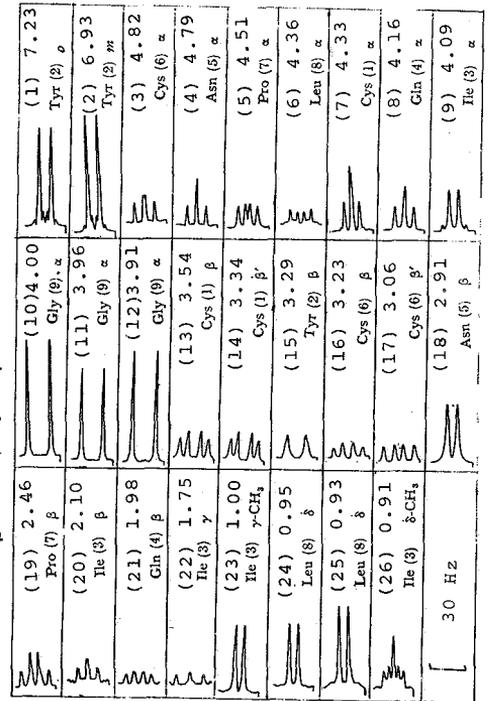


図3 オキシトシンの2DJ-スペクトルのJ軸に沿った断面。ピーク番号は図2を参照、ピークを中心のケミカルシフトをTMSからのppmで表わした。

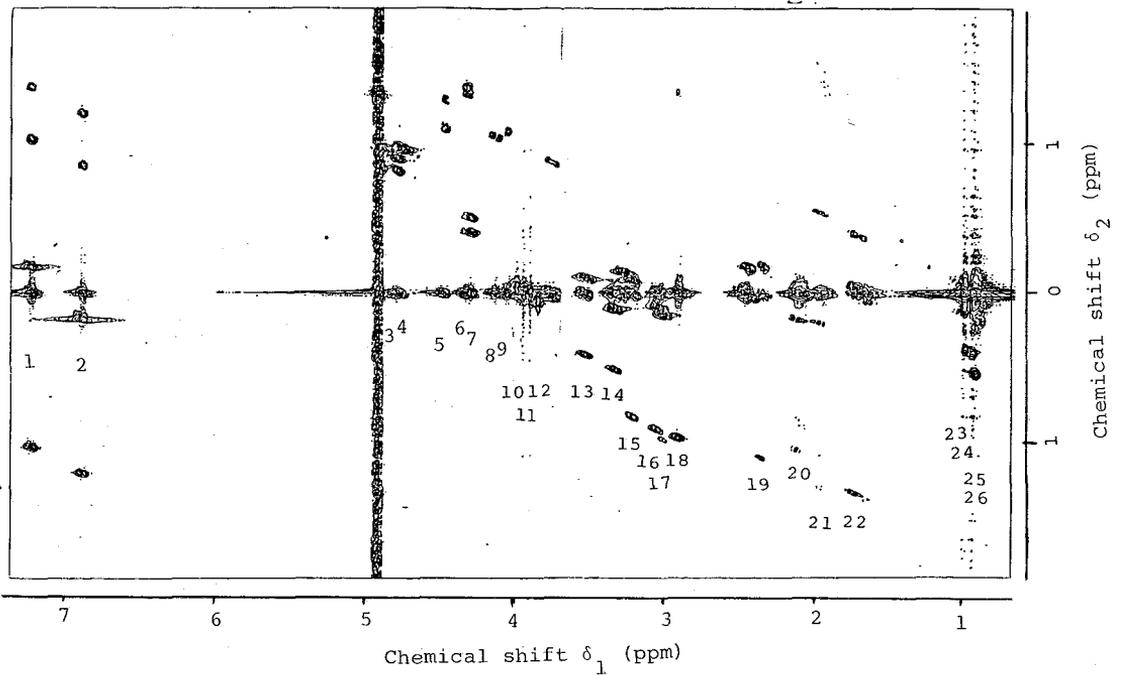


図4 オキシトシンの2D-SECSYスペクトル ピークの帰属は図3参照

2D-SECSYスペクトル

上の方法では、通常のデカップリング法では得られる、どのピークとどのピークがカップリングの関係にあるかの情報を失っている。これを補うために2D-SECSY法が適している。図4はオキシトシンのD₂O中でのスペクトルである。横軸は1Dスペクトルのケミカルシフトに対応し、縦軸 δ_2 はスピン結合を行う核の間のケミカルシフト差を示している。 $\delta_1 = 0$ 軸上のピークは1Dスペクトルを等高線表示したことになる。45°の対角線上をたどることにより、各ピークの相関を明らかに出来る。さらにケミカルシフト値が近くて1Dスペクトルでは分離できないピークも、例えば4.8 ppm付近のTyr, Asn, Cys 6のC α -Hのように δ_2 軸に展開することにより分離して見えるようになる。

2D-NOE スペクトル

図6はオクタペプチドのトリオスチンA(組成は図5)のDMSO-d₆中での2DNOEスペクトルを示す。 δ_1 は1Dスペクトルのケミカルシフトを、 δ_2 は双極子相互作用をもち核の間のケミカルシフト差を示している。図中に示すように、Ala-NHとAla- β CH₃の間、Cys- α CHとCys-NCH₃の間にNOEが観測される。ただ2DNOEの場合には、 t_m の選択は重要である。 t_m を短くすると、空間的に近い核間の相関が、又長くすると、遠い核間の相関が強調されて得られることになるが、分子量、粘度等にも依存する。異った t_m を用いて測定するとよいが、膨大な測定時間が必要となる。(種々の付加的なノイズの除去については本討論会の講演番号36 参照)

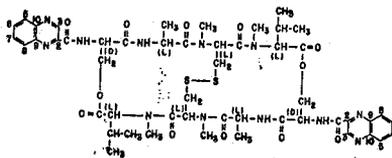


図5 トリオスチンAの化学構造

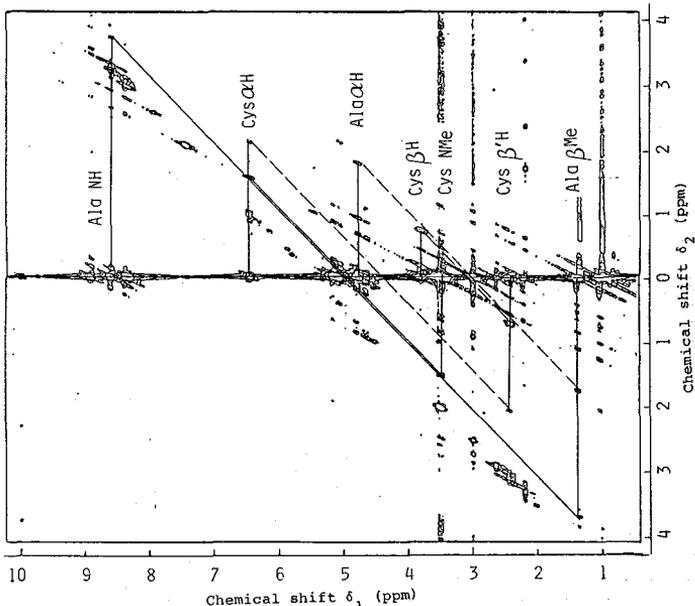


図6 トリオスチンAの2D-NOEスペクトル
 $\delta_2 = \frac{1}{2} \delta_1$ 上の一連のピークはr.fパルス不完全性によるノイズ。

分子量の大きいポリペプチドの例

分子量の大きい物に対する適用例として、 α -ブンガロトキシニン(MW. 7820)のD₂O中での場合を示す。(アミノ酸組成は表1)図7は芳香環に含まれるプロトンの現れる領域の2D Jスペクトルである。aはJ = 4.4 Hz, bはJ = 0軸に対するS軸にそった断面であり、cはS軸への投影である。すなわちカップリング定数(ΔJ)が8 Hz程度のダブルレットは、aに、シングレット、トリプレットはbに表われることになる。dは通常は1Dスペクトルである。

図8は2D-SECSYスペクトルである。上にも述べたように二次元にシグナルを展開することにより、ピークが分離がよくなる。2Dの結果と合わせると芳香環に含まれるプロトン帰属が可能になる。

Ala 5	Arg 3	Asn 2	Asp 2	Cys 10	Gln 1	Glu 4	Gly 4
His 2	Ile 2	Leu 2	Lys 6	Met 1	Phe 1	Pro 8	Ser 6
Thr 7	Trp 1	Tyr 2	Val 5				

表1 α-ブングロトキシンのアミノ酸組成

おわりに、

二次元NMRのポリペプチドへの適用例をいくつか示したが、低分子では2Dと、2D-SECSY法により、ピークの帰属及びカップリング定数を求めるのが非常に容易になること。高分子においては2D-SECSY法がスペクトルの分離を高めるために有効であることがわかった。2DNOE法は高分子において有効(T_1 が短く、 t_m を小さく出来る)であると考えられる。待時間 t_w のため必然的に弱くなる信号を取り扱うから、長い測定時間を必要とする欠点はあるが、それを凌駕して二次元NMR法はポリペプチドの構造研究に有効であると考えられる。

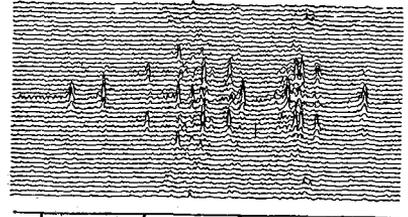
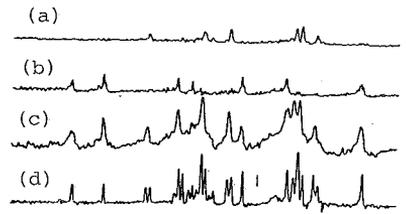


図7 α-ブングロトキシンの2D NMRスペクトル

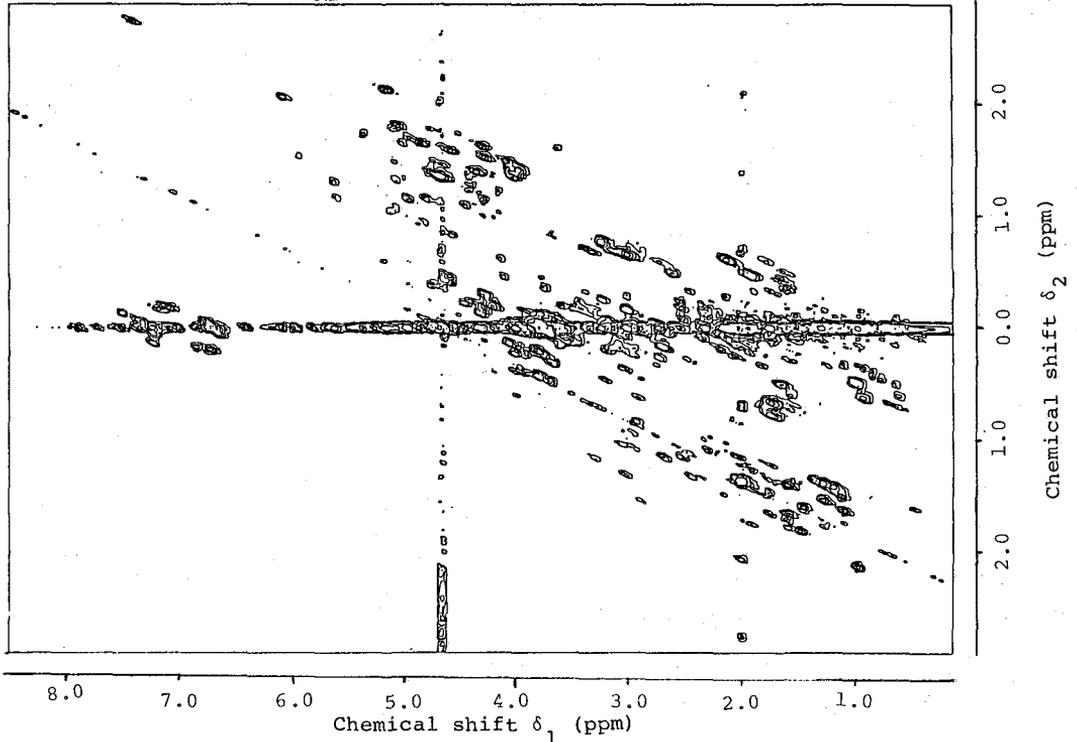


図8 α-ブングロトキシンのD₂O中における2D-SECSYスペクトル
ブングロトキシンの測定に協力し、種々議論していただいた阪大蛋白質研の中沢隆、藤原敏道両氏に感謝致します。

1. 序

ヘム蛋白質は生体内に広く分布し、酸素運搬、貯蔵、電子伝達、酵素添加、過酸化水素処理などを種多様の機能をもち、活性中心は図1に示すプロトポルフィリン鉄錯体である。従って、こゝろ一連のヘム蛋白質の構造と機能との接点を求めて、主としてNMR法を用いてヘム近傍の微細構造の解明に努めているが、こゝろには適当なモデル化合物によるNMRスペクトルの比較研究が不足である。本研究では、モデルとしてプロトポルフィリン-IX、4トクロムCより蛋白部分を一部残して切りとった α -ウンデカオキソプロパドを主として用い、適当なリガンドを配位させ、そのNMRスペクトル(常磁性スペクトル)をヘム蛋白質のそれと比較して、ヘム近傍の構造に関する知見を得ることを目的とした。

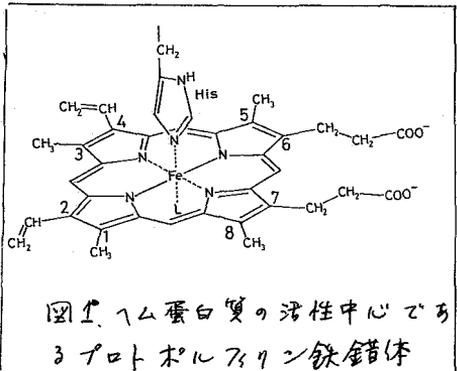


図1. ヘム蛋白質の活性中心であるプロトポルフィリン鉄錯体

ヘム蛋白質では一般にヒスチジン(His)のイミダゾールがヘム鉄にオキソ配位子として結合している(カタラーゼでは4オキソ, 4トクロムP-450ではニスチジン)が、これをモデルにするには、単にイミダゾールをプロトポルフィリンに配位させるだけでは、蛋白質に存在するHis-Fe結合の歪みを再現できない。本研究では、通常用いているイミダゾールの代わりに2-イソプロピルイミダゾールをオキソ配位として用いる歪みを導入した。また α -プロパドは図2に示すようにヘム蛋白質のヘム近傍の構造とくにHis-Fe結合の歪みを保つておくので、モデル化合物として適当であると考えられる。今回はこゝろのモデル化合物を用いて①鉄3価低スピン錯体モデルとしてニアン配位化合物(L=CN⁻)のヘム近傍メチル基シグナルの常磁性シフトのシミュレーションなるびにこゝろHisイミダゾールのNHプロトンシグナルの検出なるびに

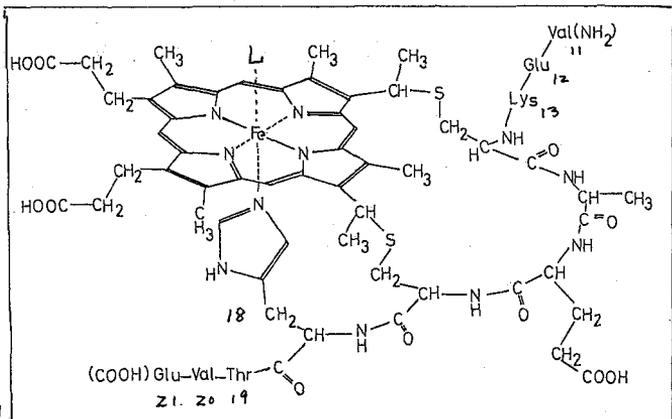


図2. α -ウンデカプロパド

ニ、三のヘム蛋白質の近位ヒスチジン (proximal His) のととの比較は、(2) 鉄3価高スピン体における同様の比較についてのものである。

2. 実験

ヘム-ウンデカメチルプロトヘムは Harbury and Loach の方法¹⁾に従って、2,4-トクロムシ (シブツ社) をイソジンで処理することによって得た。H NMR の測定は HR-220 / Nicolet TT-100 (220MHz) なるものは Nicolet NT-300 (300MHz) を用いた。軽水中での測定には後者をを用い Low-power presaturation 法 (Low-power mode で水シフトしたものを saturate させ、続いて high-power mode でシフトしたものを観測する) を採用した。

3. 結果および考察

(A) ヘムメチル常磁性シフトに及ぼす
ヘム鉄-イミダゾール結合の歪みの効果²⁾

図3は protohemin(imidazole)CN⁻ のヘムメチルプロトンスペクトルを示す。溶媒は DMSO-d₆、室温での測定結果である。用いた Im 誘導体は、図4に示す立体障害のない 1-Methyl Im (図3(a)) なるものは hindered imidazoles (図3(b)-(d)) で、[hemin]:[CN⁻]=1:1 の条件下で ミックス-テトラ配位錯体が生成した。立体障害の大きいイミダゾールが配位すると4つのヘムメチルシフトは2つのグループに合致してシフトし、かつ向うシフトは、bulky なイミダゾール誘導体ほど大きく、ヘム蛋白質でもみられるスペクトル

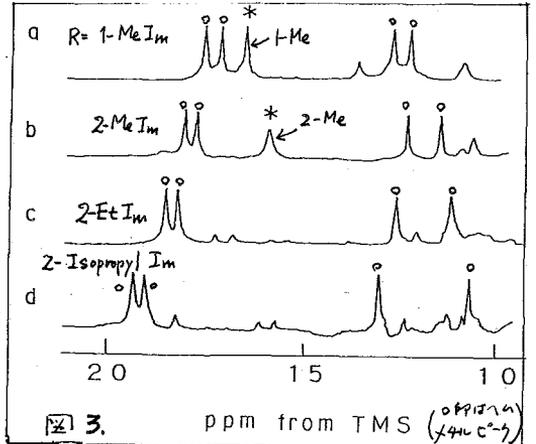


図3. ppm from TMS (0 ppm)

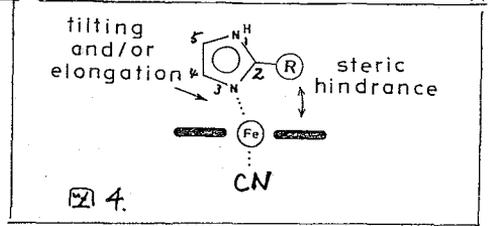
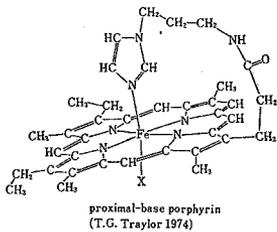


図4.

パターンを再現する傾向がみられる。表1に示される結果とヘム-11プロトヘム、ミオグロビン3価高スピン体なるものは Taylor モデルとの比較を示す。

Table 1: Heme Methyl Shifts of ProtohemeFe(III)(imidazole)CN⁻ in Dimethylsulfoxide

axial ligands	heme methyl shifts (ppm from DSS)				average	spread	reference
1-MeIm·CN ⁻	17.5	17.1	12.7	12.3	14.9	5.2	this work
2-MeIm·CN ⁻	18.1	17.8	12.4	11.5	15.1	6.5	this work
2-EtIm·CN ⁻	18.5	18.2	12.6	11.2	15.1	7.3	this work
2-iPrIm·CN ⁻	19.1	18.8	12.9	10.7	15.3	8.4	this work
11-peptide·CN ⁻	26.0	18.0	15.3	7.6	16.7	18.4	this work ^a
Taylor's compd. \downarrow	21.6	20.1	19.2	14.8	13.3	17.1	b
	10.8	8.0	7.5	4.5			
Taylor's compd. \downarrow	17.3	16.6	15.5	15.0	14.3	6.0	b
	14.3	12.5	12.2	11.3			
Mb ⁺ ·CN ⁻	26.9	18.2	13.2	— ^c	—	—	—



Taylor モデル化合物

a. In 0.1 M Tris buffer at pH 7.4 and 21°C.
 b. Imidazole chelated protohemin monocyanides. Mixtures of four diastereomeric isomers which exhibit eight heme methyl peaks in the NMR spectra.
 c. The peak is obscured by the globin resonances.

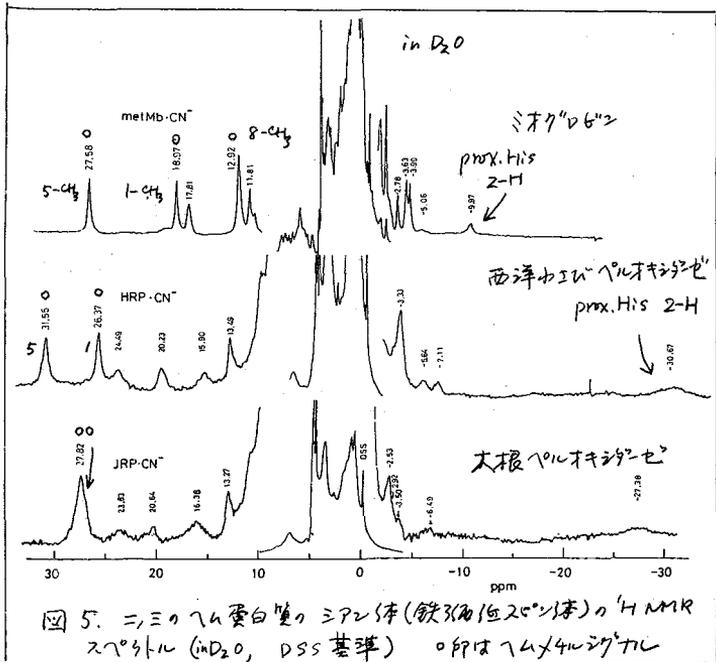


図5. ニ、三つの蛋白質のメチル基(鉄3価低スピン体)の¹H NMRスペクトル (in D₂O, DSS基準) ○印はメチルシグナル

塩基性の異なる種々のピリジン誘導体をオキ配位子として用いてもこのように傾向がみられなことから、4つのメチルピークの分離は図4に示す鉄-イミダゾール向結合の歪みに由来するものと考えられ、蛋白質において通常図3dのパターンがみられることから(図5, 6参照), 2-isopropyl imidazole が蛋白質における proximal His のモデルとして適当と思われる。表1に示すように Traylorモデルにおいてもメチルシグナルの分離は蛋白質の歪みの傾向を示すが、このモデルではメチル面に対するイミダゾールの配向も固定され、鉄-ヒスチジン結合の歪みの効果のみを考察できな。蛋白質において、4つのメチルピークの内低磁場側2本の分離が大きいものもある(Mb-CN⁻, heme-11 peptide-CN⁻など)、イミダゾールの配向効果に由来するものと思われる。これらのモデル研究を基にして、コウモリヘモグロビン-シアニド体のNMRスペクトルにおけるプロスタリックエフェクター-IHP添加効果を検討し、メチル基の微細構造変化も調べた。

(B) 近位ヒスチジン N₁-H プロトンシフトとメチル基構造

蛋白質の軽水中での測定から交換プロトン、特に proximal His の N₁-H シグナルを検出することが出来る。図6, 7はその結果の一部を示す。図6から明らかに、4トクロム C とそれから得られた heme-11 peptide とでは、メチルシグナルのパターンは異なるが prox. His N₁-H のシフト

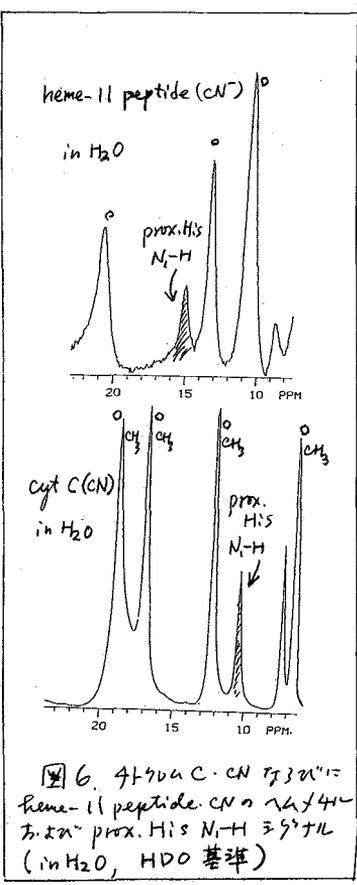


図6. 4トクロム C-CN 系では heme-11 peptide-CN のメチルシグナル prox. His N₁-H シフト (in H₂O, H₂O基準)

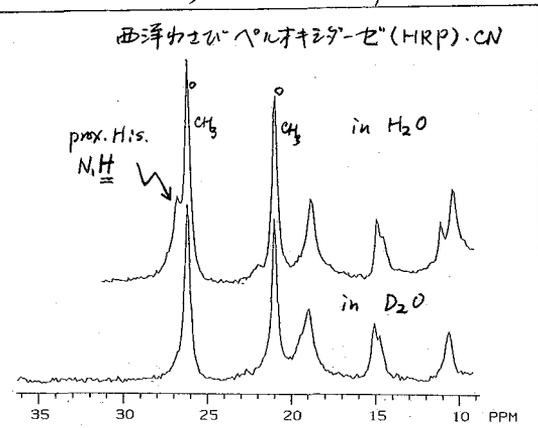


図7. HRP-CN の重水系では軽水の¹H NMRスペクトル (H₂O基準)

にかなりの差異が認められる。即ち近位ヒスチジン残基のγ-メチル基の配位に大きな変化が起るというこゝを示している。現在×4ルニフトヒプロキシヒスチジンニフトとの相関関係も追究しているが、Fe-Im間結合の歪みに加え、N-Hの近くのアミノ酸残基との水素結合の効果も考慮に入らねばならないであろう。図7では西洋わさびペルオキシニフトヒスチジンニフト(HRP(Fe²⁺·CN⁻))の近位ヒスチジンN-Hニフトが示されている。図6の場合に比べてミオグロビンニフト(Hb·CN⁻)のγ-メチル基(16ppm)と比較して異常に低磁場

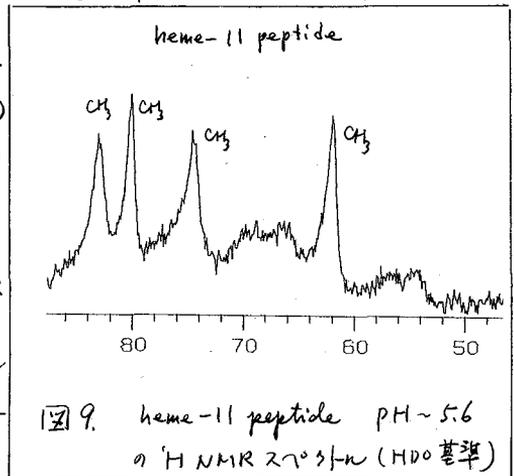
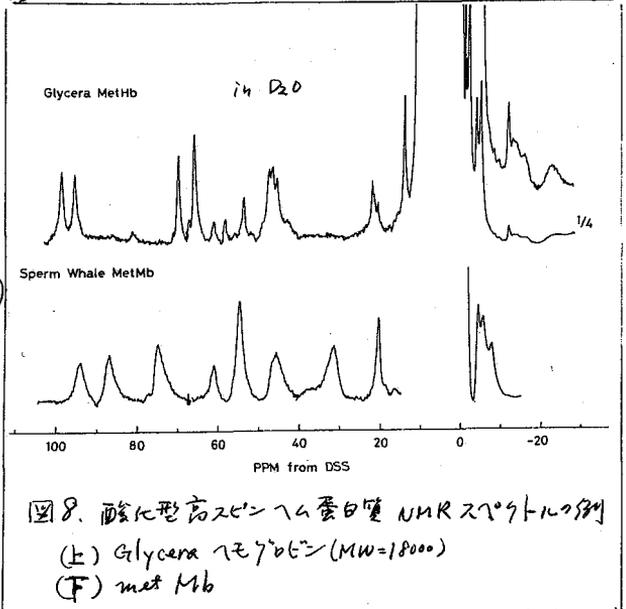
ニフトしている。これはモデルによるFe-Im結合の歪みについては説明できず、そのpK値が低いことから、上記のN-H...Bの水素結合の効果も考えねばならない。事実HRPではかなり強い水素結合がありうるとさし(Resonance Ramanなどの研究より)している。

(C) 酸化型高スピンγ-メチル蛋白質モデル

以上はγ-メチル蛋白質の酸化型(Fe³⁺)高スピン体(ニフト錯体)について検討してきたが、高スピン体については、これまでにほとんどモデル化が成功してはいない。hemin(DMSO)₂, hemin(H₂O)₂が報告されているが、γ-メチル蛋白質のγ-メチル基構造に最も類似しているhemin(Im)(H₂O)はまだ成功してはいない。従ってこのモデルに合成ホルスチジンを用いてOEP(Im)(alcohol)の生成を報告したが、³⁾今回heme-11 peptideを用いてそのモデル化を試みた。図9はpH 5.6での¹H NMRスペクトルを示す。pH 3近くでは全く異なる高スピン型パターンを示し、低スピン型と推定される。図8に見られるように高スピン型でもγ-メチル×4ルニフトヒスチジンのパターンは蛋白質によつて異なり、現在heminと hindered imidazoleを用いて低スピン型と同様、高スピン型モデルを検討している。

[文献]

- 1) H.A. Harbury and P.A. Loach, J. Biol. Chem., 12, 3640 (1966)
- 2) S. Neya and I. Morishima, submitted for publication
- 3) I. Morishima et al., J. Am. Chem. Soc., 102, 2429 (1980)



(日女大, 養化生科研, 東大) 高橋征三, 本波康由,
宮沢辰雄

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB 8 のチトクロムC-552はアミノ酸約130個, プロトハムIX 1個からなるハムタンパク質である。等電点が10.8で, 酸化還元電位は+0.232Vなので, チトクロムC-552の機能は恐らく高等動物のミトコンドリアから抽出されるチトクロムCと同じだろうと推察される。

本研究は¹H-NMRを用いて, ハムシグナルの帰属を行なうと共に, ハム周辺の構造を明らかにすることを目的に行った。従来, 共鳴ラマン散乱等の研究から, チトクロムC-552のオキ, オキ配位子はそれぞれヒスチジン, メチオニンであることが明らかにされているが, ¹H-NMRのスペクトルではメチオニンのスペクトル位置がミトコンドリアのそれと大いに異なる。従ってメチオニン周辺の構造に何か異常があるのではないかと予想されていた。

【実験】スペクトルは断わらない限り, 35°C pH 7.0で測定した。スペクトルの測定は8Kデータ長で4096回とり込み, ゼロフィリングした後16Kのデータ長でフーリエ変換した。

図1Aは典型的な還元型チトクロムC-552の270 MHz ¹H-NMRスペクトルで, Resolution enhancementには dispersion spectrum を4英シフトした data との差, つまり差スペクトルをとって図1Bを得た。化学シフトを読み取る時は図1B上で読み取れ, それが困難な時は図1Cを作った上で読んだ。図1Cは図1Bのスペクトルを2倍して図1Aに足したものである。図1Bではスペクトル強度の情報が全く失われるが, 図1Cのスペクトルは強度情報を保持した上で, 分解能が見かけ上向上したスペクトルが得られる英に意味がある。

ハムのメチル基及びメゾ基の帰属にはNOEを利用した。つまりメチル基のついでいる位置が非対称であることを利用し, メゾプロトンとの相対的位置の違いがNOEに反映されることを利用したものである。

ためはしせいぞう, ほんなみこうゆう, みやざわたつお

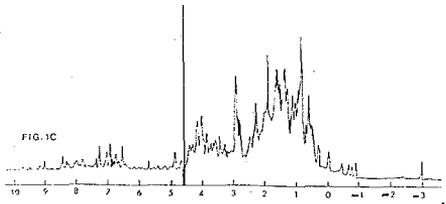
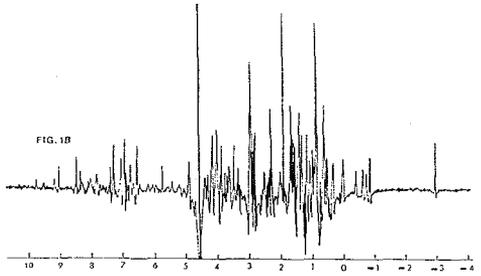
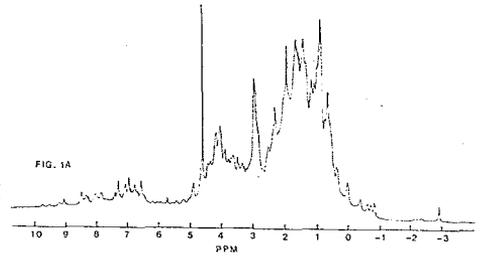


図1, 還元型チトクロムC-552の270 MHz ¹H-NMRスペクトル

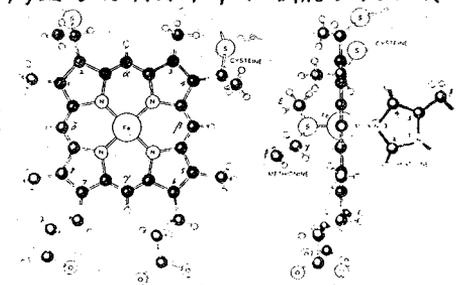


図2 ハムの構造

Δ の各残基の番号は図2に示した。NOEの大きさも直接測定するのは困難なので、本実験では差スペクトルをとって行ない、負のNOEが上向きになるように表示した。タンパク質ではスピン拡散の影響が大きく、普通の手法でNOEをとったのでは必ずしも直接双極子-双極子相互作用による影響を見ていることになる。従って今回は0.8秒ずつ on-resonance と off-resonance を交互にとりて差スペクトルをとった。

〔結果〕

図3Cに示したように、メゾプロトンに照射した場合に顕著なメチル基のシグナルが差スペクトルに表われない。従ってCのメゾプロトンが γ であると帰属される。図2からおぼろげに2本のメチル基がNOE差スペクトルに出ることが期待されるが、それは図3Dに対応し、このメゾプロトンが δ であると帰属される。チオエーテル結合を形成しているメチンプロトンまで含めると、 α および β 位のメゾプロトンは3本のNOEシグナルが期待されるが、図3A, Bで示したように実際に見えろ本数は3本以上である。そこで α と β を区別するためにメチンプロトンの2および4を照射した結果が図4である。この結果を図3の結果と照し合わせることでより一義的に各メチル基のシグナルを帰属することができた。つまり図4Bからメチル1が帰属できる。何故ならば図3Dのメチル基は1か4でなければならず、メチンプロトンの近傍にあるメチル基となるとメチル1でなければならぬことになる。従って照射したメチンプロトンは2でなければならぬから、メゾプロトン α とメチル基の2, 3が一義的に決定される。以下同様の論理をすべてのプロトンに帰属する。

メチル基の2と4を照射した結果を図5に示したが、明らかにこの結果は上に述べた帰属を満足する。

ミトコンドリアチトクロームCはメチオニンメチルシグナルの再帰場側にメチオニン γ

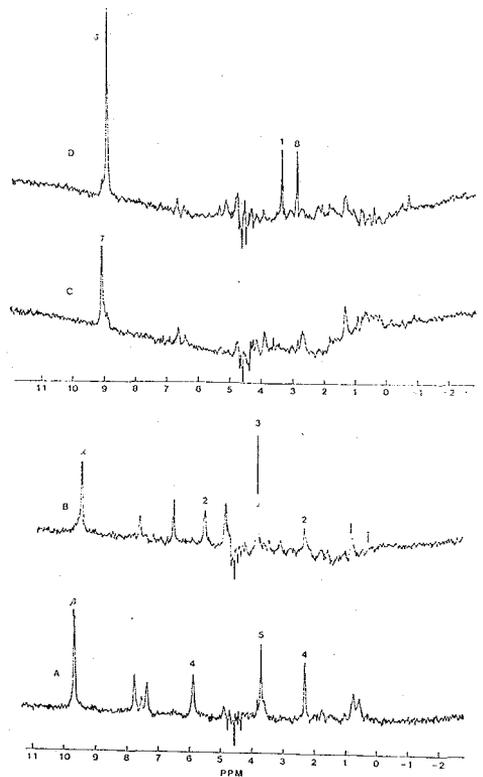


図3. チトクロムC-552のNOE差スペクトル。照射はそれぞれ $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ の各メゾプロトンである。

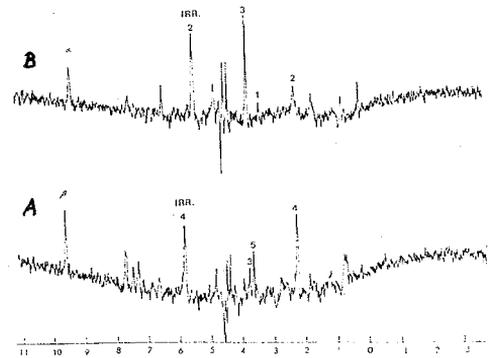


図4. チトクロムC-552のNOE差スペクトル。照射位置は2または4位のメチンプロトン。

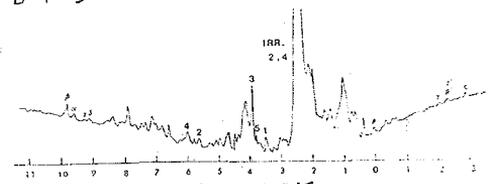


図5. チトクロムC-552のNOE差スペクトル。

プロトンのシグナルが出るのが普通であるが、チトクロム C-552 ではメチルシグナルより高磁場側にシグナルは見えない。-2 ~ -2.5 ppm に broad なシグナルが2本見えるが、感度を上げて行くと図6 のように一本のシグナルは低磁場側にシフトして行き、80°C では明瞭な3本のシグナルに分離する。シグナル感度を見よと各シグナルはそれぞれ一個のプロトンに対応している。60°C で約0.5% ferricytochrome C-552 を混ぜた状態でスペクトルをとると、低磁場側の2本の重なったシグナルが broadening して、実質上高磁場側のスペクトルだけが残る。従って早く消えたプロトンがメチオニンの2個のαプロトンで、残った一個のプロトンはメチオニンのβメチレンのプロトンコアであろうと考えられる。

図7の結果からβプロトンのもう一つのシグナルは0 ppm 付近のメチル基のシグナルの下に埋もれていると考えられる。-0.8 ppm 近傍のシグナルは感度を上昇すると約4.5 Hz の結合定数を持つ doublet になるので、多分メチオニンメチル基に接触して Valine のメチル基が存在することを示唆される。このシグナルはメチオニンのメチレンプロトンより先に ferricytochrome の存在で化学シフトが変化し、broadening を示す。

[考察]

図6に示したようにバリンのメチル基を照射するとメチオニンのメチル基、β位のメチル、メゾプロトンのγ、δがNOEを示す。この結果はバリンのメチル基がこれらの残基の近傍にあることを示す。

メチオニンのメチル基は図7から明らかなようにメゾプロトンαとβの中間に位置する。

メチオニンのメチレン基はNOEの結果を総合した結果メゾプロトンの近傍にある可能性が高い。またαプロトンは低磁場側に見えるβプロトンの近くにあることが、図6の結果から示唆される。

チトクロム C-552 には3個のヒステジンがあることが明らかにされているが、芳香族領域で正常に酸・塩基解離を示すのは一つし

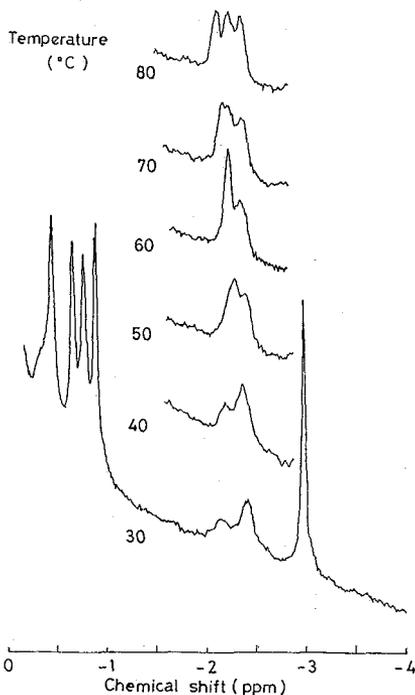


図6 チトクロム C-552 のメチオニンシグナル領域の温度変化

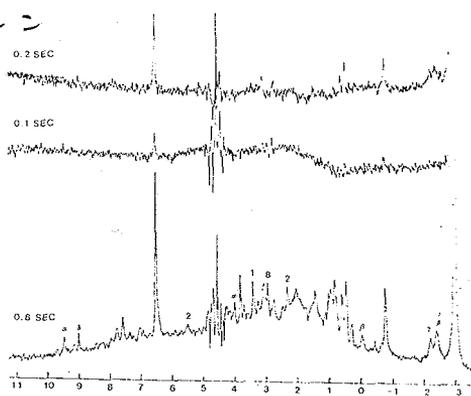


図7. チトクロム C-552のNOE差スペクトル照射はメチオニンのメチル基αプロトンである。

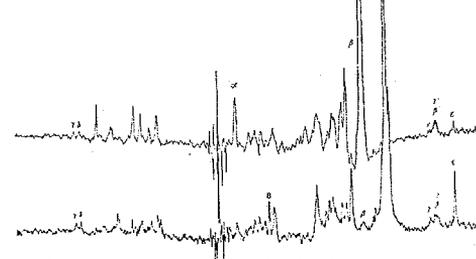


図8 チトクロム C-552のNOE差スペクトル照射はValのメチル基(?)、βプロトン(メチオニン)について行ったもの。

かたは、このヒスチジンの pK_a は 7.44 ± 0.02 で、 $pK_a = 5.8 \pm 0.2$ のカルボキシル基の解離の影響を受けず。またヒスチジンの解離の影響はメゾプロトン γ に若干見られるが、メチオニンのメチル基への影響は僅かである。しかるにバリンのメチル基は大きく影響を受け、メチオニンの β プロトンも明らかに影響を受ける。その結果を総合するとこのヒスチジンは明らかに *distal* 側に存在し、 δ の γ 位近傍に存在すると考えられるが合理的である。このヒスチジンは δ 近傍に存在するにもかかわらず、 δ の環境電荷の影響は少ない。従ってこのヒスチジンは δ 面から約 50° の位置にあると考えられる。

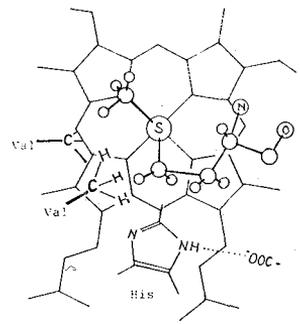


図9 チトクロムc-552のH-NMRの結果から予想される構造

以上の結果を総合して図9のようなモデルを考えた。このモデルによると 107°F での折りたまり方は他のチトクロムcと大中に異なることになり、これを明らかにするのは今後の問題である。何れにしてもその配位子のメチオニンの構造が従来解明されたいずれチトクロムcとも異なっているらしいという興味深い結果を得た。

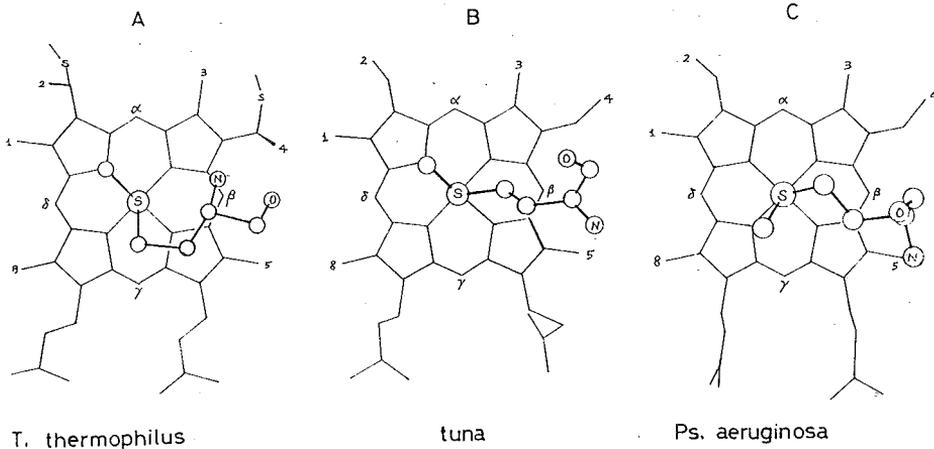
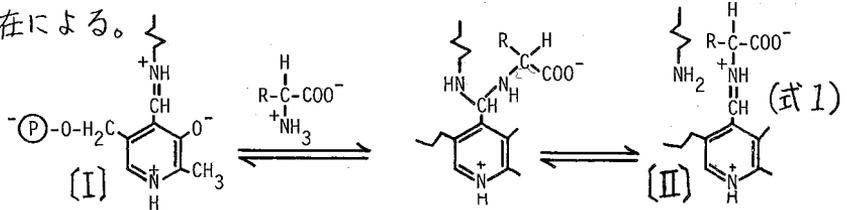


図10 メチオニン配位子の構造

(熊大医) 森野能昌, 桐瀬純男, 山崎政城, 長島不二夫

ブタ心筋アスパラギン酸トランスアミナーゼ・アインザイム (cytosol局在:cAAT; ミトコンドリア局在:mAAT) はともに, 同一サブユニット (cAAT=412残基¹⁾, mAAT=401残基²⁾)よりなる2量体として存在し, 分子量は約9万である。補酵素ピリドキサルリウロン酸は, cAATではLys-258, mAATではLys-250のε-アミノ基とaldimine結合を形成する。一般に, ピリドキサル酵素による酵素触媒の高能率性は, このinternalaldimine結合の高い反応性にもとずくと考えられる。つまり, すべてのピリドキサル酵素で, 基質アミノ酸とのイミノ基転移(式1)が極めて容易に起るのは, このaldimine結合の存在による。



本研究では, この補酵素aldimineプロトンを¹H-NMRスペクトル上同定するためイミノ複合体形成リガンドを用いた。また酵素タンパク側に影響を与えることが少ないこれらリガンドに比し, 活性域内側鎖にかなり影響を及ぼすことが予想されるジカルボン酸性イミノ複合体形成リガンドとの相互作用の結果現われるスペクトルの変化をも併せて観察した。

〔方法〕cAAT, mAATは, とともにブタ心筋から精製した³⁾。200MHz ¹H-NMRの測定には, FT-NMR装置JNM FX-200型(日本電子)を用いた。スペクトルは通常5KHz幅, 8Kポイント, 60°パルス, 繰り返し1sec, 500~2000scanによって得た。酵素濃度はモノマー(分子量4.5万)として約1mM, 全量0.5ml, 5mmφ試料管(Wilmad)を用い28°Cで測定した。pHはpHメーターの読みそのままを記載した。化学シフトは, 外部規準DSSを0ppmとした。

〔結果と考察〕 1. His領域のスペクトル

① アインザイム間の比較: cAATは8His/モノマー, mAATは10His/モノマーをもつ。28°Cでの¹H-NMRスペクトル上7.6ppm-9.0ppmの領域でcAATで6ピーク, mAATで7ピークが認められる。このうちcAATでは4ピーク, mAATでは6ピークがpH滴定される(図1, 図2)。昇温によりこれらのシグナルはより明確となり28°CでのpH滴定データとの対応から, pKが正常イミダゾールのそれ(~7)に近いシグナルは大きな温度依存性を示し, pKが異常(~9または~4)のシグナルは温度によってそのchemical shift位置をほとんど変えない(図3, 4, 5, 6)ことがわかる。

¹H-NMR Study of Aspartate Aminotransferase — Interaction with Ligands
(Dep. of Biochemistry, Kumamoto Univ. Medical School, Y. Morino, S. Tanase, M. Yamasaki, F. Nagashima)

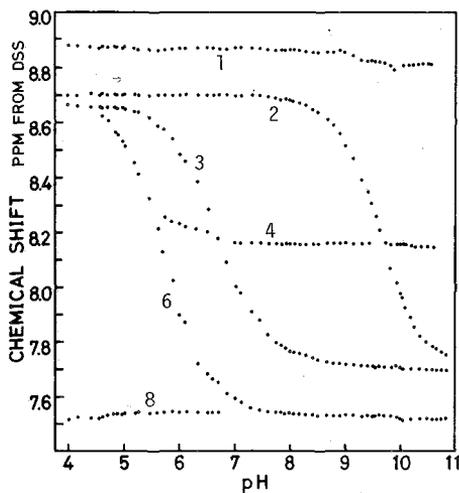


図1. cAAT α 型(ピリドキサル型)His領域シグナルの chemical shift に対する pH の影響 (28°C)
pH 滴定データは従来報告したが⁴⁾、今回更に詳細に実験した結果である。

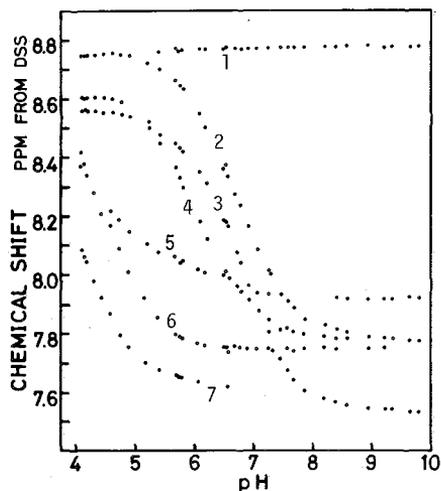


図2. mAAT(ピリドキサル型)His領域シグナルの chemical shift に対する pH の影響 (28°C)
pH 滴定データは従来報告したが⁴⁾、今回更に詳細に実験した結果である。

両アイソサイム間で共通するものは両者のピーク1, および, cAAT のピーク3 と mAAT のピーク2 (あるいは3) のみである。

⑥. cAAT におけるピーク1の性質:

cAATには α , β , γ の3型があり, α 型がもっとも高活性(比活性 \sim 250), γ 型がもっとも低活性(比活性10 \sim 40), β 型がその中間である。この差異は, 補酵素ピリドキサルリン酸の結合様式が, α 型では aldimine 結合(式2), γ 型では substituted aldimine 結合(式3), であることによると考えられている⁵⁾。

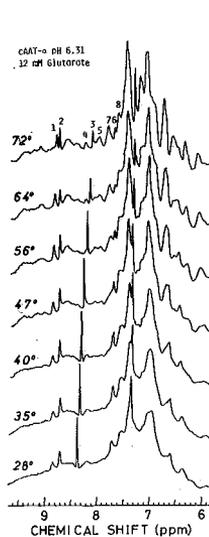
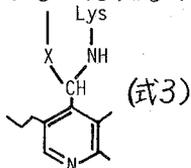
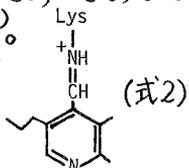


図3. cAAT α 型(ピリドキサル型)芳香環領域¹H-NMR スペクトルの温度による変化

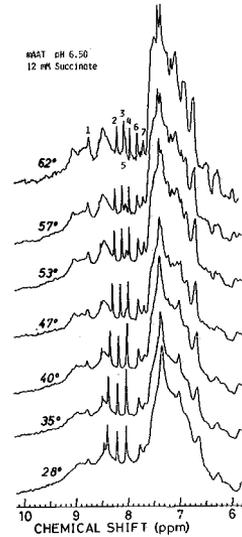


図4. mAAT(ピリドキサル型)芳香環領域¹H-NMR スペクトルの温度による変化

α 型と γ 型のヒスタジソン領域のスペクトルを比較すると, γ 型の方がピーク1の強度がやや小さく, chemical shift も約0.03ppm程度高磁場シフトしていることがわかる(図7)。65°Cで観察したスペクトルでは両者の差異が明確になっている(図8)。

このことからピーク1は aldimine 結合由来のプロトンを含む可能性が極めて大きい。

2. aldimine プロトンの同定: AATの aldimine 結合を変化させる種々の基質, 試薬が知られている(図9)。1.⑥で想定したごとく, ピーク1が aldimine プロトンを含むならば, 本プロトンによるシグナルは上記(図9)の処理で消失するはずである。

⑦. アミノオキシ酢酸との反応: イミノ複合体を形成する代表的なアミノオキシ酢酸は, AAT両アイソサイムともにモノマー当り1分子が強固に結合し, internal

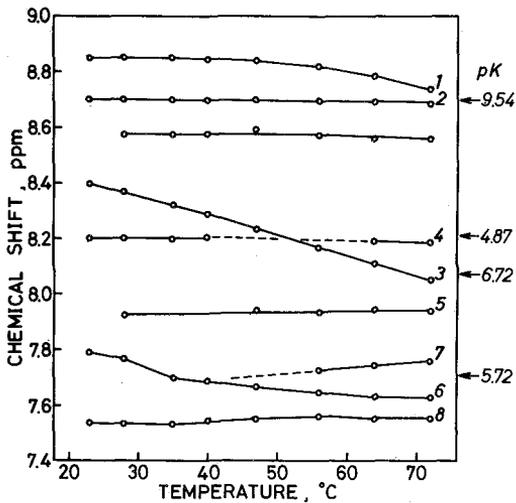


図5. cAAT α 型 (pH6.31) His領域シグナル位置の温度依存性。
Numberingは図3に準ずる。

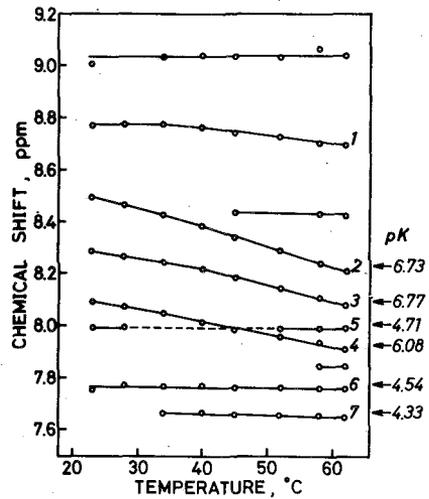


図6. mAAT (pH6.50) His領域シグナル位置の温度依存性。
Numberingは図4に準ずる。

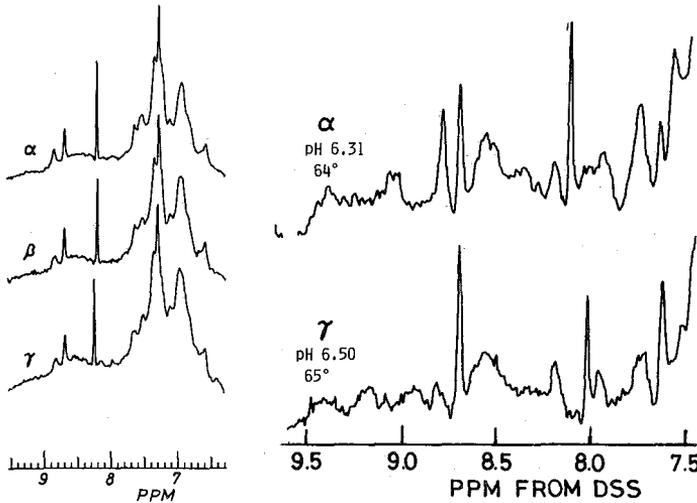


図7. cAAT, α , β , γ 各型の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (convolution difference)

図8. cAAT, α 型, γ 型の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (convolution difference)の比較

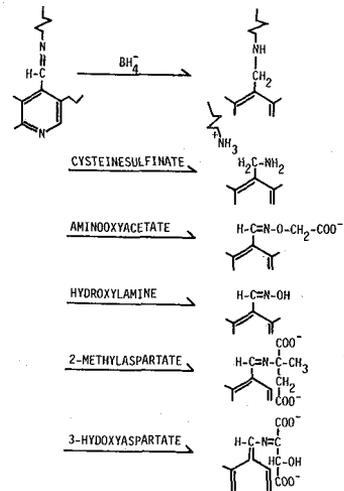


図9. Internal aldimineと反応する試薬

aldimine (式I, (I))は, external aldimine (式I, (II))に変換する。この化学変化とともに cAAT の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上 8.87 ppm のシグナル (20~30 Hz) が消失し, 新たに 8.36 ppm にシグナル (15~20 Hz) を生成する (図10)。本変化は pH 4.9~8.6 の範囲内で同様に認められることから, internal aldimine, external aldimine とともに, この pH 範囲で chemical shift 位置を変えないことがわかる。しかも, external aldimine に変換後も, 8.83~8.84 ppm にほぼ one proton と考えられるシグナルが残る。これは pH 滴定されず, His-C2 プロトンか, NH プロトンかは不明であるが, とにかく, 本来のピーク 1 は, わづかに chemical shift を異にする 2 種のプロトンから成る複合シグナルであることがわかる。

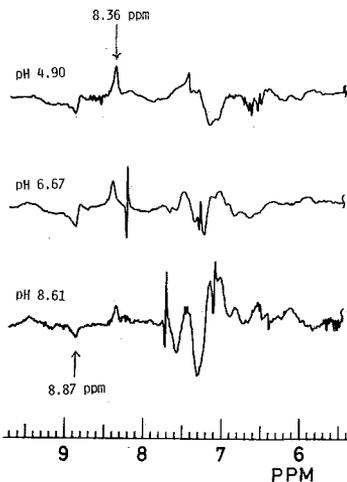


図10. cAAT α 型(ピロドキサル型)のアミノキシ酢酸とのイミノ複合体と遊離酵素の差 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(芳香環領域)

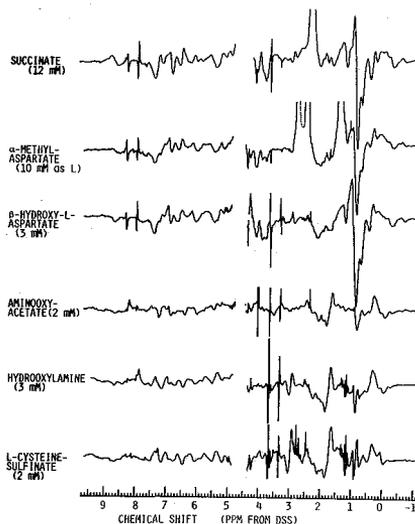


図11. mAAT(ピロドキサル型)の種々リガンドとの複合体と遊離酵素の差 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。

④、アミノオキシ酢酸以外のリガンドとの相互作用の結果観察される差スペクトル(データ省略)からも8.87~8.88 ppmに *internal aldimine* に由来するプロトンがあることがわかる。

3. 基質リガンドとの相互作用: 芳香環領域, メチレン, メチル領域における変化が著明である(図11)。これらの変化の程度と, リガンドの種類の間には相関がある。すなわち, [a]ジカルボン酸リガンド(グルタル酸, コハク酸); [b]ジカルボン酸性イミノ複合体形成リガンド(α -メチルアスパラギン酸, β -ヒドロキシアスパラギン酸); [c]イミノ複合体形成あるいは *aldimine* 結合のみを変化させるリガンド(システインスルフィン酸, NH_2OH , アミノオキシ酢酸など)でのスペクトルの変化を比較すると, 変化の大きさは, 概ね, [a], [b] > [c] である。これら差スペクトルは [c] に属するリガンドでは, 主として補酵素ピリジン環の微細な回旋が及ぼす活性域内側鎖の存在状態の変化(たとえば Lys-258 のコンホメーション変化など)を, [b] に属するリガンドでは, これに更に α 位, ω 位カルボキシル基の結合によ, てもたらされるコンホメーションの変化を反映する。以上の変化を, アイソザイム間で比較するとともに, 現時点での両アイソザイムの結晶のX線解析^{6,7)} から得られた情報との対応について考察する。

[文献]

- 1) Ovchinnikov, Y.A., Egorov, C.A., Aldanova, N.A., Feigina, M.Y., Lipkin, V.M., Abdulaev, N.G., Grishin, E.V., Kiselev, A.P., Modyanov, N.N., Braunstein, A.E., Polyakov, D.L., & Nosikov, V.V. (1973) FEBS Lett. 29, 31-33
- 2) Kagamiyama, H., Sakakibara, R., Tanase, S., Wada, H., & Morino, Y. (1977) J. Biochem. 82, 291-294; *idem* (1980) J. Biol. Chem. 255, 6153-6159
- 3) Morino, Y., Tanase, S., Watanabe, T., Kagamiyama, H., & Wada, H. (1977) J. Biochem. 82, 847-852
- 4) Yamasaki, M., Higaki, T., Akasaka, K., Morino, Y., & Miyazawa, T. (1977) 16th NMR Symposium, Abstract Book 49-52; Yamasaki, M., Higaki, T., Morino, Y., & Miyazawa, T. (1978) 8th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Abstract p.20.
- 5) see Braunstein, A.E. (1973) in The Enzymes (Boyer, P.D. Ed) 9, 379-481
- 6) Arnone, A., Rogers, P.H., Schmidt, J., Han, C.-N., Harris, C.M., & Metzler, D.E. (1977) J. Mol. Biol. 112, 509-513
- 7) Ford, G.C., Eichele, G., & Jansonius, J.N. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 77, 2559-2563.

(鳥取大・医)

○飯塚 舜介

(Inst. Cancer Res.)

A. S. Mildvan

ウサギ筋肉ピルビン酸キナーゼは、等しい4つのサブユニットからなり ($M_r = 237,000$)、式(1)の反応を触媒する。2価の金属イオンが、サブユニット当り2



コ活性化に必要であり、そのうちの一つは、酵素に配位しオニ配位圏で、酵素-基質結合体の形成に寄与しており、また、もう一つは、ヌクレオチドのポリリン酸鎂に配位し、酵素には直接配位していないことが知られている。また、1価カチオンの結合部位もある。基質のリン-エノールピルビン酸の結合によって、酵素に結合する2価イオンは、結合が強くなり、同時に、酵素に結合した2価イオンと1価イオンの距離は、 8.2 \AA から、 3.3 \AA 減少して、 4.9 \AA になることも報告されており、活性中心における構造の変化がおこることを示している。金属イオンの位置や役割については、多くの報告があるが、活性中心におけるアミノ酸残基についての知見は乏しく、化学修飾によって、リジンとシステインがヌクレオチドの結合部位の近くにあり、ヒスタジンが、活性点にあることが知られている程度である。プロトン NMR は、酵素のヒスタジン残基の役割を研究する上で、直接的で、効果的な方法であるが、これまでは比較的小さな蛋白質 ($M_r \leq 68,000$) に限られていた。

既に報告したように、ピルビン酸キナーゼの 250 MHz の NMR により、サブユニット当り、6 ユのヒスタジンの C-2 プロトンのシグナルを観測し、pH 滴定によりヒスタジンの pK' 値を求めた (His-1, 6.7; His-2, 6.3; His-3, 6.2; His-4, 6.0; His-5, 5.9; His-6, 5.6)。リン-エノールピルビン酸の飽和量の存在では、His-3 の pK' 値が、0.4 単位減少するが、他のヒスタジンの pK' 値は、変化しなかった。リン-エノールピルビン酸の滴定による His-3 のシフトの測定から、リン-エノールピルビン酸の解離定数を求めたところ、 $74 \pm 7 \mu\text{M}$ を得た。これは、他の方法で求められた値とよく一致しており、活性中心へのリン-エノールピルビン酸の結合に対応するシフトであることを示している。1 価カチオン (K^+) と 2 価カチオン (Mg^{2+}) がリン-エノールピルビン酸による His-3 のシフトには必要であり、これら両方のイオンなしでは、シフトは観測されないうし、また、いずれか一方だけでは、小さなシフトしか見出されなかった。これらの結果からは、リン-エノールピルビン酸の結合による His-3 の pK' の減少は、金属イオン

Proton NMR Studies of the Roles of the Histidine Residues at the Active Site of Rabbit Muscle Pyruvate Kinase

(Tottori Univ. School of Med.) ◆ Shunsuke Meshitsuka and
(Inst. Cancer Res.) Albert S. Mildvan

と、His-3とのより強い相互作用により直接もたらされるものか、あるいは、リンエーテルピルビン酸の結合によって引き起こされたHis-3の周囲の構造変化によるものか、いずれかであると推論した[1]。

今回の報告では、2価カチオン結合部位におけるNi²⁺イオンの常磁性効果と、Cr^{III}ATPを用いて、ヌクレオチド結合部位におけるCr^{III}の常磁性効果を用いて、観測されたヒスチジンの金属イオンに対する位置を明かにし、さらに、ジエチルピロカーボネート(DEP)によるヒスチジンの選択的化学修飾のNMRによる観察と化学修飾した酵素を用いての、リン酸転移反応、及びエーテル化反応の測定を行い、基質の活性化におけるヒスチジン残基の役割を推察し、また、分子内NOEの測定により、ATPの結合部位におけるヒスチジンの存在を推定したので報告する。

方法

ウサギ筋肉ピルビン酸キナーゼは、市販(Boehringer製)のもので、SDSゲル電気泳動で単一バンドであった。乳酸脱水素酵素を用いた共役反応による評価で200から250 unit/mgの活性があった。250 MHz ¹H NMRスペクトルは、ピルビン酸キナーゼ0.6 - 1.0 mMの濃度で、25°C、pH^{*}6.0で測定した。装置は、Bruker WM.250で、16 bitのA/D変換器を用い、8Kデータ点に、1024回の積算を行った。ヒスチジン残基の核磁気緩和速度の測定は、180°-τ-90°パルスで行った。

結果と考察

(1) Ni²⁺とピルビン酸キナーゼの活性中心との相互作用

Ni²⁺が特異的に活性中心へ結合することを、Mnとの拮抗法を用いEPRで確認した。解離定数は、136 μM (Mn), 78 μM (Ni)であった。Fig. 1にNi²⁺の常磁性効果を示す。Ni²⁺だけでは、比較的小さな効果しか観測されないが、こ

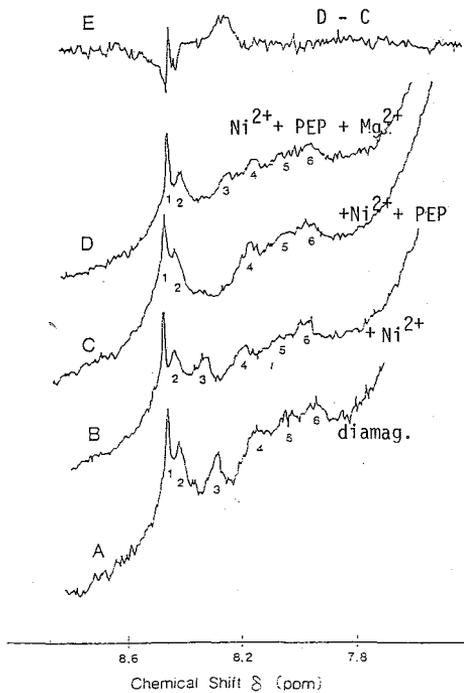


Fig.1. Paramagnetic Effects of NiCl₂ on the Histidine of Pyruvate Kinase.

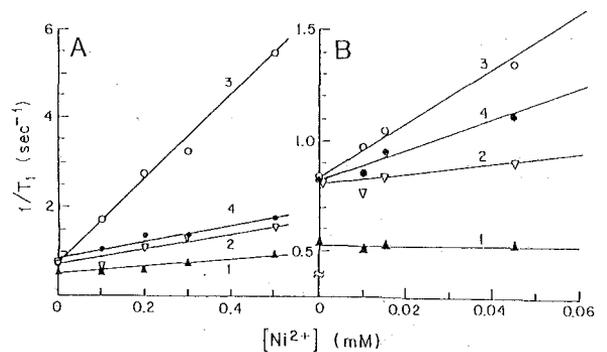


Fig.2. Paramagnetic Effect of Ni²⁺ on T₁ of Histidine C-2H of Pyruvate Kinase in the Absence (A) and Presence of PEP.

れに、PEPを加えると、His-3のC-2Hだけ幅広くなり観測されなくなる。これに、過剰量の Mg^{2+} を添加すると、再びHis-3が観測されるようになる。このことは2価イオンの結合部位の近くにHis-3があることを示すとともに、PEPによって、2価イオンの親和性が著しく増加することに対応している。 Ni^{2+} のC-2Hの T_1 に対する効果を、Fig.2に示す。His-3に対する効果が、特異的に大きいことがわかる。また、PEPの存在下での Ni^{2+} の効果をFig.3に示す。微量の Ni^{2+} でHis-3のC-2Hに大きな T_2 の変化があり、 Ni^{2+} との強い相互作用 おそらく、直接配位した構造が推察される。

(2) CrATPの活性中心のヒスチジンに対する効果とPEPによる置換。

CrATPはリン酸転移反応の基質であるが、これの添加によってHis-2とHis-3のC-2Hが幅広くなった(Fig.4)。そこに、PEPを加えると、再びHis-2とHis-3が観測された。このことは、これら2つの基質の結合部位が重なっていることを考えあわせると、より強く結合するPEPが、CrATPを追い出したことを示している。従って、His-3だけでなく、His-2も活性中心に位置することがわかった。上述のように、His-3は、2価イオンの結合部位に位置するので、His-2は、ヌクレオチド結合部位の近傍に存在すると思われる。

(3) DEPによるヒスチジンの置換的化學修飾と化學修飾したピルビン酸キナーゼによる酵素反応。

DEPによる滴定におけるNMRスペクトルの変化をFig.5に示す。1.05 mM (1.3当量)のDEPで、His-2のC-2Hは著しく強度が減少する。His-1は少し減るが、His-3は、変化しない。このことは、活性中心に存在するヒスチジンの化學修飾のうけ方に違いがあることを示している。そこで、この酵素が触媒する部分反応であるピルビン酸のエーテル化反応を試みた。化學修飾したピルビン酸キナーゼは全活性

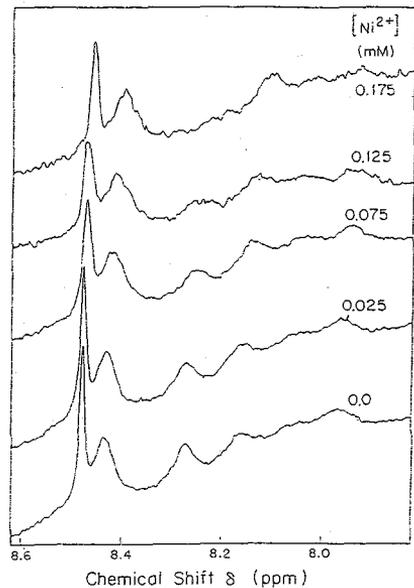


Fig.3. Titration Measuring the Paramagnetic Effects of $NiCl_2$ on His C-2H of Pyruvate Kinase-PEP Complex.

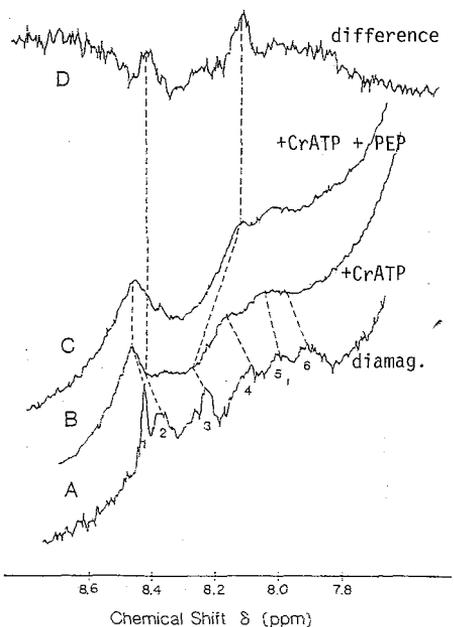


Fig.4. Paramagnetic Effect of CrATP on the linewidths of His C-2H of Pyruvate Kinase

は0.2%に低下していたが、無機リン酸活性化 エーテル化反応は59.3%活性が残っていた。しかし、ATP活性化エーテル化反応は0.9%しか活性がなかった。このことは、DEPで化学修飾した酵素も、基質のピルビン酸と、活性化に必要な2価イオン、1価イオン及び無機リン酸は結合出来るが、ATPは結合出来ないことを示している。化学修飾したピルビン酸キナーゼのNMRと関連づけると、化学修飾されやすいHis-2は、金属イオン、ピルビン酸、リン酸の結合部位ではないことがわかる。上述の常磁性効果の結果とよく一致しており、His-2は、ATPの結合部位のアデニンに近いところにあると考えられる。

(4) ピルビン酸キナーゼ-ATPの分子間NOE

His-2のC-2Hを前照射することによってATPのH2に分子間NOEが観測された(Fig. 6)。Fig. 7のNOEアクションスペクトルに示すように、特異的であった。この結果は、化学修飾の実験とよく一致しておりHis-2のC-2HはATPのアデニン基のH2の近くに存在することがわかった。

Referece

- [1] S. Meshitsuka, G. M. Smith and A. S. Mildvan, *J. Biol. Chem.* **256** 4460-4465 (1981).

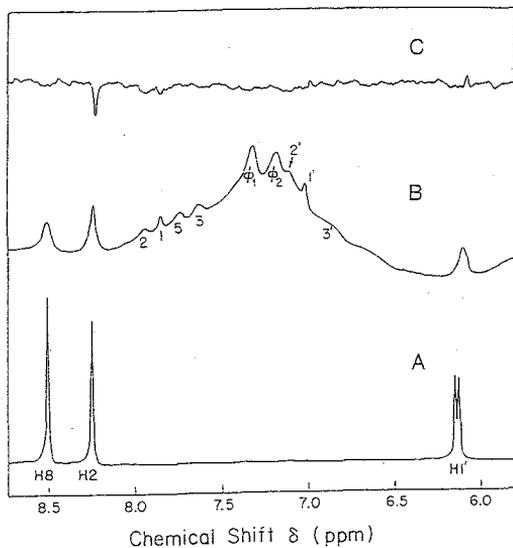


Fig. 6. ^1H NMR Spectra of (A) MgATP, (B) Pyruvate Kinase-Mg-ATP-Mg Complex, (C) NOE Difference Spectrum.

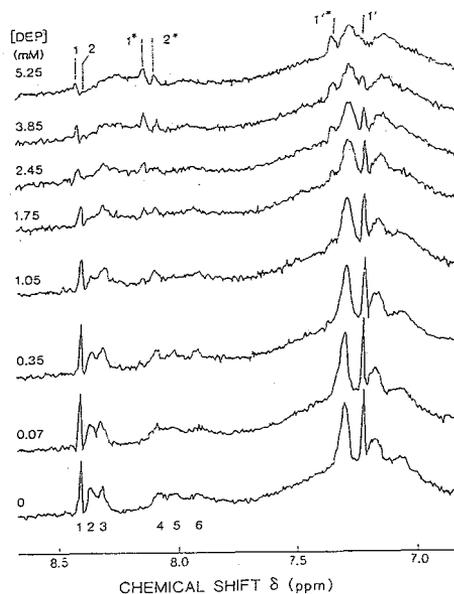


Fig. 5. Chemical Modification of Specific Histidines of Pyruvate Kinase by Diethylpyrocarbonate

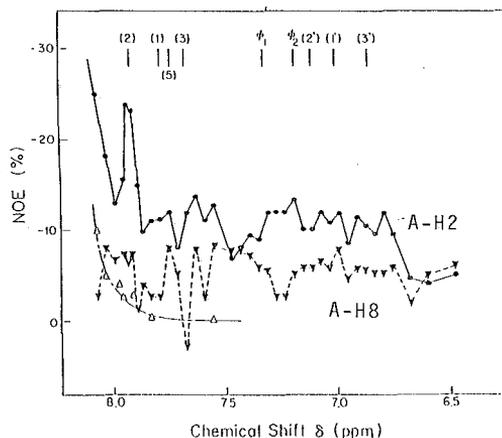
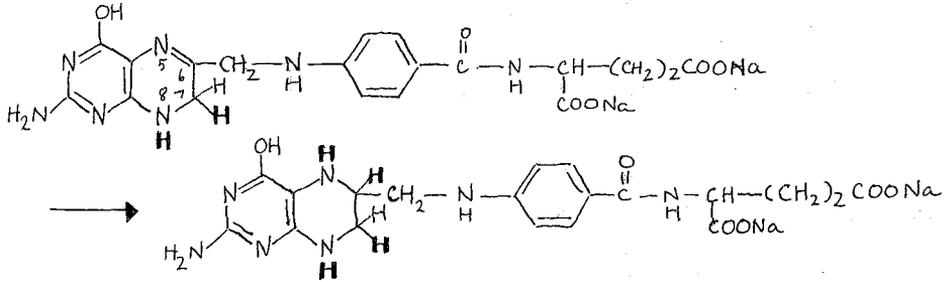


Fig. 7. Intermolecular NOE Action Spectra of Pyruvate Kinase-ATP Complex in the Aromatic Region

Dihydrofolate reductase は補酵素として NADPH を必要とし、次のように dihydrofolate を tetrahydrofolate に還元する酵素である。



Tetrahydrofolate はピドロキシメチルやメチルグループの中間担体として、さらにアミノ酸、プリンおよびピリミジンなどの代謝物から他へ、またこれらの間の相互変換に必須な仲介代謝物として役立っている。

種々の生体から得られた dihydrofolate reductase に関してその活性に及ぼす塩陰イオンの著しい効果は最近興味のある対象となっているが、ある reductase では塩によって活性が促進され、他のものでは阻害されるという矛盾した結果が得られている。このように塩による活性/阻害の現象が蛋白質の構造変化の結果なのかあるいは陰イオンと補酵素の間の相互協調を逆に排斥の結果によるものか、を知ることは重要な問題である。

[実験]

使用された Dihydrofolate reductase はにわりの肝臓から分離、精製した。塩として塩化ナトリウムを用い、塩素イオンの結合部位および Cl⁻ と補酵素や阻害剤、基質との相互作用を調べるために、³⁵Cl NMR (26.5 MHz) を測定し、その縦緩和時間 T₁ を求めた。酵素活性は 50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH=7.4、温度 28°C で行なった。³⁵Cl NMR の測定は同じ緩衝液を用い、NaCl の濃度 0.1 M、温度 10 ± 1°C で行なった。

³⁵Cl NMR Study of Effect of Cl⁻ Ion on the Activity of Dihydrofolate Reductase

(Tokyo college of pharmacy and NIH) S. Sabramanian, H. Shindo and B. T. Kaufman

[結果と考察]

Dihydrofolate reductase (100 μ M)/NaCl (0.1M) 溶液において ^{35}Cl 核の緩和速度 ($1/T_1$) を補酵素である NADP^+ の濃度の関数として Fig. 1 にプロットした。緩和速度は NADP^+ の濃度の増加とともに直線的に減少し、酵素と NADP が約 1 のモル比のときにプロットは折曲点を示し、そののち NADP^+ の濃度にはほぼ無関係に一定値となる。しかしこの値は酵素が存在しないとき、すなわち遊離の Cl^- の緩和速度に比べて尚かなり大きい。さらに基質のアナログである Methotrexate (MTX) を十分量添加しても緩和速度には何ら変化もみられない (Fig. 1 で四角印)。このような緩和時間の挙動は、 Cl^- イオンが一つの結合部位を NADP と競合していること、他方 MTX とは独立であることを意味している。酵素に対する NADP の結合は Cl^- よりもずっと強いので、 Cl^- は NADP によって置換され、遊離のイオンとなる。したがって結合部位が NADP によって占有されることで緩和速度の減少がみられる。 NADP^+ の濃度が $\sim 100\mu\text{M}$ 以上においてその時の緩和速度が free の Cl^- イオンのそれと比べてまだ大きいのは、 Cl^- イオンは酵素の表面に散在している塩基性アミノ残基からは陽イオンとの間の静電気相互作用のため束縛されおるためと考えられる。 NADP^+ の還元型である NADPH に対して Cl^- の緩和速度はまったく同じ挙動を示した (Fig. 1, 下図)。

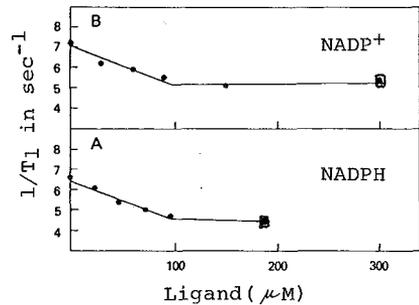


Fig. 1. Dihydrofolate reductase - NaCl の ^{35}Cl NMR 緩和速度 ($1/T_1$)。横軸は加えられた NADP^+ または NADPH の濃度。□ は Cl^- の過剰を添加した。

NAD と NADP とは同じ部位に結合すると考えられるが、Fig. 2 に示したようにこの場合緩和速度は NAD の濃度には無関係であることが分る。また基質のアナログである methotrexate (MTX) に対して NAD と同様である (Fig. 2 B で点線)。 NAD が NADP と異なった挙動を示すのは、一つには NAD は NADP の 2'-リン酸基を欠いておるために NAD ではこのリン酸陰イオンの反撥がないことによるのかと推測される。しかし NAD に MTX を加えるか、あるいはその逆に加えるとき、すなわち酵素- NADH - MTX の三次元複合体を形成すれば、 Cl^- イオンは結合部位から離れ、free のイオンとなる (Fig. 2 A の白丸, 2B の黒丸)。

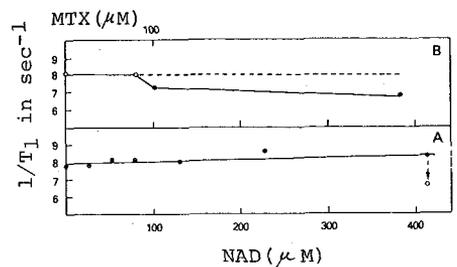


Fig. 2. Dihydrofolate reductase - NaCl の ^{35}Cl NMR 緩和速度 ($1/T_1$)。横軸は加えられた NADH または MTX の濃度を示す。● は NADH , ○ は MTX 。

この結果やX線解析の結果を考へ合せると^{2,3)} NADPとNADの結合モードは異なり、基質MTXが複合体、酵素-NADHに参加したとき、酵素の局所的な構造変化、あるいはNADの結合モードの再配向が生じ、その結果として Cl^- が遊離すると結論できる。

基質 dihydrofolate や阻害剤 Cibacron blue も試験したが、NADH や MTX と同様にそれ自身は Cl^- の結合速度には何ら影響を与えなかった。これは明らかに Cl^- の結合部位は基質の結合部位とは異なることを示す。

最後に、この reductase の活性の塩濃度依存性について Fig. 3 に示した。図から分かるように、NADPHを用いた場合に酵素反応は Cl^- イオンにより活性化され、塩濃度 0.2 ~ 0.6 M の範囲で最大となり、それ以上の濃度では阻害される。NADHを用いた場合にはその反応は阻害される(白丸)。酵素反応から得られた NADPH の Michaelis-Menten 定数 K_M は NaCl の濃度に着しく依存していることがわかった。すなわち、NaCl の濃度が零のとまに比べて、NADPH の K_M は $[NaCl] = 0.6 M$ において 15 倍に、他方 NADH の K_M は単に 2 倍に増加したにすぎない。

以上 ^{35}Cl NMR と酵素活性に関する結果から、次のことが結論される。NADPH を用いた場合、 Cl^- イオンにより活性が促進されたのは、 K_M の増加、すなわち生成物である酸化型 $NADP^+$ の結合部位からの遊離を促進した結果である。また NADH に対して Cl^- が阻害剤として作用したのは反応物としての基質 dihydrofolate が活性部位に入るチャンスは Cl^- イオンとの競争のために少なくなった結果であると考えられる。

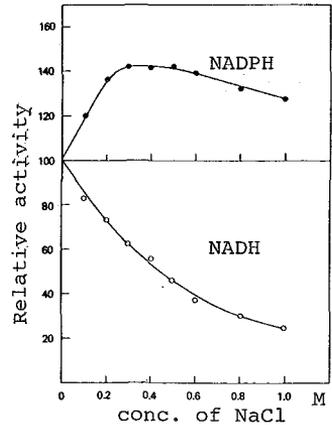


Fig. 3. 添加 NaCl の濃度の関数として得られた肝臓から得られた dihydrofolate reductase の還元反応の相対初期速度

[文献]

- 1) S. Subramanian, H. Shindo & B. T. Kaufman (1981) Biochemistry, 20, 3226
- 2) D. A. Matthews, R. A. Alden, J. T. Balin, D. J. Filman, S. T. Freer, R. Hamlin, W. G. J. Hol, R. L. Kislink, E. J. Pastore, L. T. Planke N-H. Xuong & J. Kraut (1978) J. Biol. Chem. 253, 6946.
- 3) D. A. Matthews, R. A. Alden, S. T. Freer, N-H. Xuong & J. Kraut (1979) J. Biol. Chem. 254, 4144.

RECENT DEVELOPMENTS IN TWO-DIMENSIONAL NMR SPECTROSCOPY.
TECHNIQUES AND APPLICATIONS.

R.R. Ernst

Laboratorium für Physikalische Chemie
Eidgenössische Technische Hochschule
8092 Zürich, Switzerland

A survey is presented over some recent developments in two-dimensional NMR spectroscopy. Two-dimensional exchange studies of small molecules will be discussed. The potential of 2D spectroscopy for the elucidation of the structure of biological macromolecules will be demonstrated. Techniques for the extension to three dimensions using the accordion concept are mentioned. It is shown that 2D spectroscopy is of practical use for the study of spin diffusion in solids.

ABSTRACT

FUJIWARA SYMPOSIUM

NMR Studies of Macromolecular Dynamics

Oleg Jardetzky

Stanford Magnetic Resonance Laboratory
Stanford University
Stanford California

Measurement of NMR relaxation parameters, ring rotation rates from chemical shift averaging and proton-deuterium exchange reveal a variety of internal motions in proteins. Recent advances in the theoretical interpretation of these findings will be discussed.

I. 序

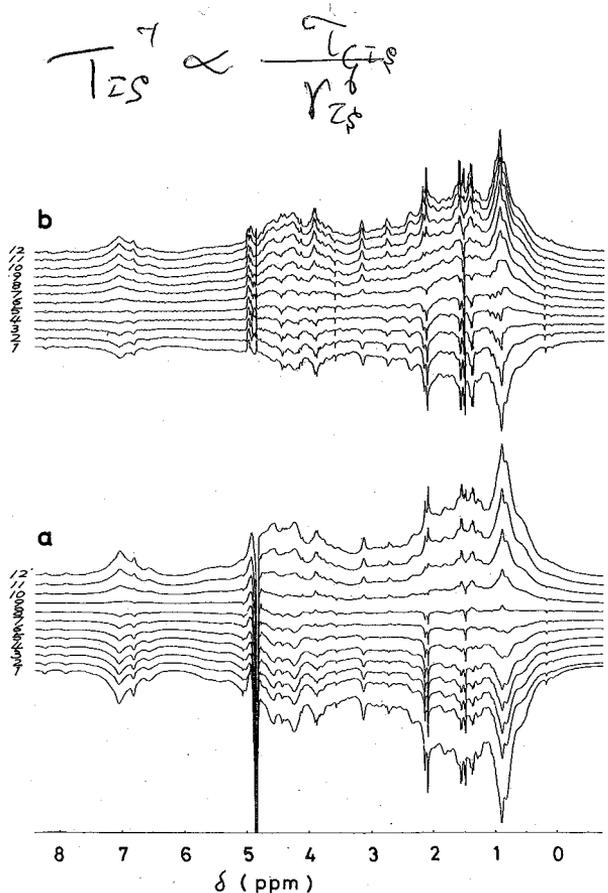
タンパク質, *Streptomyces subtilisin inhibitor* (SSI) (分子量 23,000) とお
いて, 70ドット右の緩和時間は, スロクトルの一部に選択的にラジオ波照射をおこ
とによって著しく短くなった。この現象は, 通常のスピン-格子緩和の他に, 交叉
緩和とスピン拡散の効果とをとり入れることにより説明することが出来る。

II 実験

70ドット右のたて緩和測定は 360 MHz で inversion-recovery FT 法により行
った。180°-τ-45°-acquisition-T のくり返しで, ラジオ波は π および
T の間同じ強さで加えた。ラジオ波は若葉 (Bruker 社製) の decoupling (f₂)
channel を用いて照射し, この強さ (H₂) は充分に attenuate した場合, 180°
パルス間隔を測定し, 実験の attenuation 値に換算することにより決定した。

精製した SSI 試料は 23 mg/ml の濃度のリン酸 buffer (pH 7.0, 0.1 M, D₂O)
に溶かして用いた。化学シフトは 2,5-ジメチル TSP により表示した。

Fig. 1. Inversion recovery ¹H FT spectra of SSI (23 mg/ml in deuterated 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0) taken at 360 MHz at 20 C. a) without f₂ irradiation b) with f₂ irradiation at δ = 4.82 at a power level of γH₂/2π = 24 Hz. The numbers on the left side of the spectra show the time intervals between the inversion and the sampling pulses (common for a and b): 1, 1 ms; 2, 50 ms; 3, 100 ms; 4, 150 ms; 5, 200 ms; 6, 300 ms; 7, 400 ms; 8, 500 ms; 9, 700 ms; 10, 1 s; 11, 1.5 s; 12, 3 s. The spectral gain in b is twice as much as that in a.



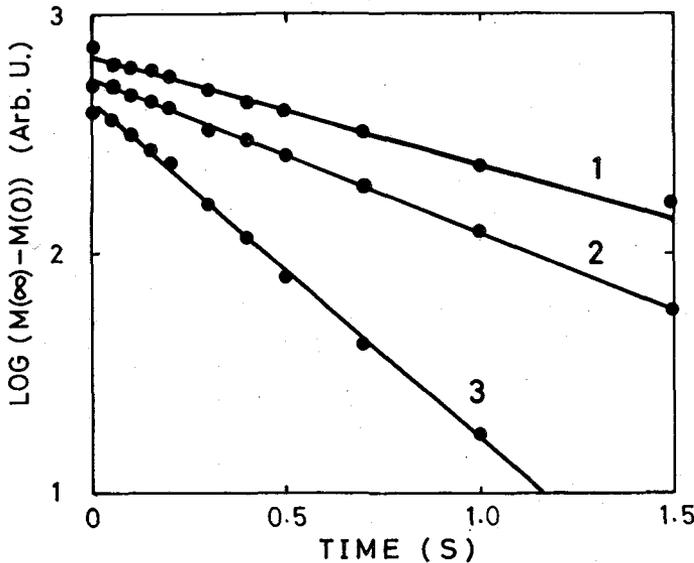
あかさか かずゆき

III. 結果

Fig. 1 は δ の位置 (二の場合は HD0 共振の位置) に ν_2 を加えた場合 (a) と、加えなかった場合 (b) の SSI の ν_2 の緩和測定の様子を示す。この図をよめれば、 ν_2 を加えた場合の緩和時間が著しく短くなることは一目瞭然である。即ち Fig. 1 (a) では緩和時間が通常の $T_1 \sim 900$ ms の回復して 113 の緩和し、(b) では緩和時間が共通の $T_1^* \sim 300$ ms で回復して 113。いずれの場合も、 ν_2 の照射による PB 共振を除いて、この緩和時間は共通位置に緩和しなす。この緩和時間は aromatic resonance のピーク ($\delta = 7.07$) にて行われた。

Fig. 2 は ν_2 の照射位置を変えて、その強さのみを変えて、SSI の緩和速度がどう変化するを示したものである。この緩和はよく単一指数関数的に進行し、緩和時間 T_1^* が求められた (Table I)。Table 1 に示した、長時間 ν_2 を照射した後の平衡緩和 I^∞ と、熱平衡緩和 I^∞ に示したものと一致している。 T_1^* の減少と I^∞ の減少は平衡に起因していることがわかる。

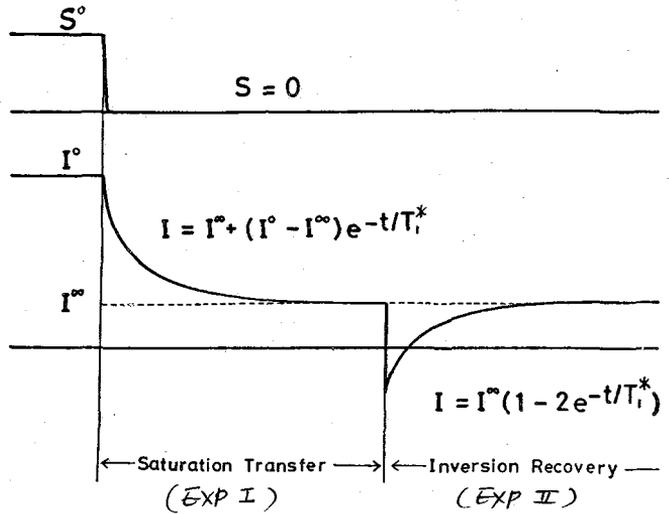
Fig. 2. Semilogarithmic plot of nonequilibrium magnetization of protons of SSI from experiments such as in Fig. 1. The intensity is measured at the peak of the aromatic resonance, $\delta = 7.07$. 1, without ν_2 irradiation. 2, with ν_2 irradiation at $\nu_{H_2}/2\pi = 8$ Hz. 3, with ν_2 irradiation at $\nu_{H_2}/2\pi = 24$ Hz. All the ν_2 's were applied at $\delta = 4.82$.



IV. 結果の解析
現象論的取扱

Fig. 3. Time dependence of magnetization in the saturation transfer experiment and in the inversion recovery experiment under saturating rf field.

今仮りに全スピンを、RF照射中で直接飽和されるスピノ群 (S) と それ以外のスピノ群 (I) とに分ける。右図に示すように S スピノ群は (ほとんど) 瞬時的に飽和するが、この飽和は交叉飽和により I スピノ群にも伝わる (EXP I) (Saturation Transfer)。平衡状態に達した後、Inversion Recovery パルスを加えてスピンの回復を測定する (EXP II)。この実験は Fig. 1b のスペクトルから Fig. 2 のプロットが得られ互い合っている。



この実験は Fig. 1b のスペクトルから Fig. 2 のプロットが得られ互い合っている。

I スピノ群の自己緩和をよび速度式は、スピン格子緩和速度 T_1^{-1} と、 S スピノ群との交叉緩和速度 T_{IS}^{-1} との両方に支配される。即ち、

$$dI/dt = -(I - I^\infty)/T_1 - I/T_{IS} \quad (1)$$

この式は化学交換による飽和緩和がある場合と本質的に同じである。(1)式を初期条件の下で解けば、Fig. 3 の中に記しているのとこの解が得られる。
よって

$$I^\infty = (T_1^*/T_1) I^0 \quad (2)$$

$$T_1^* = T_1 + T_{IS} \quad (3)$$

Inversion Recovery の時定数は Saturation Transfer の場合と同じく、 T_1^* で与えられる T_1 とは注意しよう。即ち、緩和速度は交叉緩和速度 (T_{IS}^{-1}) の分だけ、 T_1 (スピン格子緩和) より大きくなる。この単純な現象論的解析を Fig. 2 に適用すると Table 1 の結果が得られる。

即ち、飽和 RF 照射下および照射下にて T_1 を含む T_1^* を測定すれば (3)式から T_{IS} が決定される。さらに (2)式を適用すると I^∞/I^0 の比が得られる (これを "緩和度" と呼ぶ)。一方 I^∞/I^0 の実験値は直接の測定から得られる。表 1 に示すように両者の一致はよい。このことは (1)式は荒い近似ではあるが、溶液中のタンパク質 (SSF) のスピノ緩和を、少なくとも現象論的に記述するのに適当な表式であることを示している。

V. 考察

(1)式、パラメータ T_{IS} は一般理論的に導入されたものである。ここでより正確な緩和の表式 (I. Solomon, Phys. Rev., 1955, 99, 559-565) との対応関係の意味はよくいえば、その物理的意味を明かにした上で有用である。n個のプロトンは双極子相互作用で結ばれており、あるプロトンは飽和された場合の他のプロトンの磁化の振舞は、

$$dI_i/dt = -(\sum_{j \neq i} \rho_{ij})(I_i - I_i^0) - \sum_{j \neq i} \sigma_{ij}(I_j - I_j^0) + \sigma_{ki} I_i^0 \quad (4)$$

全プロトンの磁化 ($I = \sum_{i=1}^n I_i$) の振舞は (4)式を i について和をとると

$$dI/dt = -\sum_i (1/T_1)_i (I_i - I_i^0) + \sum_i \sigma_{ki} I_i^0 \quad (5)$$

$$\text{但し } (1/T_1)_i = \rho_{ii} + \sum_{j \neq i} (\rho_{ij} + \sigma_{ij})$$

$$\text{ここで } i \quad I_1 \approx I_2 \approx I_3 \approx \dots \approx I_n \approx I/n \quad (6)$$

が成り立つと、(5)式は (1)式に帰着するとかわかる。

$$\text{但し } 1/T_1 = (1/n) \sum_{i=1}^n (1/T_1)_i \quad (7)$$

$$1/T_{IS} = -(1/n) \sum_{i=1}^n \sigma_{ki} \quad (8)$$

(6)式はスピンの温度の成立ち、(7)式は各プロトンの T_1 の平均値、(8)式は飽和した他のプロトンと他のプロトンとの交叉緩和速度の平均を示している。(6)式の成立ちの度合はプロトン双極子同士の結合の強さに依り、その機構がスピンの緩和である。

パラメータ T_{IS} について

$$\sigma_{ki} = (1/10) (\gamma^4 h^2 / r_{ki}^6) \left[\frac{6\tau_c}{1 + (\omega_0 \tau_c)^2} - \tau_c \right] \quad (9)$$

σ_{ki} は geometrical factor (r_{ki}) と motional factor (τ_c) の両方に依存する。

$\tau_c > 1/\nu$ の場合には異なる球基団の proton pair が問題である。もし2つのP-1醇残基が空間的に離れており r_{ki} は大きく、 σ_{ki} は極端に小さく、 T_{IS} は長くなる。それ以外の場合は τ_c が小さいので、 T_{IS} は長くなる。

このように T_{IS} は $\tau_c > 1/\nu$ の gross conformation や運動状態に敏感なパラメータであり、 T_1, T_2 とは異なり、情報を与える。

TABLE 1. RESULTS OF ANALYSIS OF 1H RELAXATION DATA OF SSI TAKEN UNDER RF IRRADIATION

RF level ^a	Longitudinal ^b relax. time	Cross relax. time ^c	I^0/I^0	
$\nu H_2/2\pi$ (Hz)	T_1^* (s)	T_{IS} (s)	Calc. ^d	Obs. ^b
0	0.90 (= T_1)		1.0	1.0
8	0.69	3.0	0.77	0.75
24	0.30	0.45	0.33	0.36

a) rf applied at $\delta = 4.82$. b) Measured at $\delta = 7.07$. c) Calculated from Eq. 3. d) Calculated from Eq. 2.

(東大理)〇横山茂之, 山本百合子, 稀垣冬彦, 宮沢辰雄

《序》核酸の機能発現には、核酸の動的構造がきわめて重要である。すなわち、核酸は、一様な2重らせんではなく、いろいろな2次構造をつくり、おそらくより複雑なる3次構造も形成する。核酸の立体構造、特に主鎖のコンホメーションは、機能と関連して、残基ごとに異なっている場合もある〔tRNAのL字型の3次構造やDNA主鎖の塩基配列に依存したコンホメーションの多様性など〕。また、核酸はかなり速い内部運動の自由度をもち、種々のコンホメーションのあいだの平衡であることも考えられる。核酸の機能が発現していく過程において、核酸のコンホメーションは、変化していくと考えられている。このような、核酸の構造における動的側面をとらえるためには、核酸におけるflexibilityがどのようなものであるかを、理解することが必須である。従来、核酸を構成するヌクレオチド類について、NMRによる解析がなされ、個々の局所コンホメーション(単結合の内部回転、糖部分のパッキング)において、いくつかずつの異性体が存在することが示されてきた。もし、これらの局所コンホメーションが互いに独立な平衡にあるならば、ヌクレオチドそのものは、きわめてランダムなコンホメーション・アンサンブルであり、高分子核酸の動的構造は、残基間あるいはそれ以上の長距離相互作用によって規定されることになる。ところが、われわれの開発したランタニドプローブ法を用いることにより、ヌクレオチド類の局所コンホメーションの間の相互依存性を、定量的に解析できるようになった。このような、コンホメーションの短距離相互依存性の知見は、核酸のコンホメーションの多様性、あるいは、内部運動や、コンホメーション変化において、局所コンホメーションの変化がどのように周囲に影響するかなどの理解に重要な手がかりを与えるものといえる。

《ランタニドプローブ法》^(1,2) ヌクレオチド、ペプチドのように、分子内にリン酸基やカルボキシル基などの陰イオングループがあると、水溶液において、ランタニドイオンと弱く結合し、シグナルの周波数(ν)はシフトし、スピン格子緩和時間(T_1)は短くなる。

a. シフト比. 共鳴核*i*において、常磁性のPr(III), Eu(III)により誘起されたシフトは、反磁性のLa(III)を用いて、複合体形成によるシフトを補正する。基質とランタニドイオンとの1:1錯体における誘起シフトの比($\Delta\nu_i/\Delta\nu_j$)は、逐次希釈法により、基質の濃度が0になるように外そうして求める。それらの誘起シフトは、コンホマーについての加重平均値として実測されるもので、(1)式のように基質分子の構造と関係づけられる。

Interdependencies among Local Conformations in Nucleic Acids

— Quantitative Analyses by the Lanthanide Probe Method —

(Univ. Tokyo) S. Yokoyama, Y. Yamamoto, F. Inagaki, T. Miyazawa

$$\frac{\Delta\nu_i}{\Delta\nu_s} = \frac{\langle (3\cos^2\theta_i - 1)/r_i^3 \rangle}{\langle (3\cos^2\theta_s - 1)/r_s^3 \rangle} \quad (1)$$

r_i は共鳴核 i とランタニドイオンとの距離, θ_i は, 方位角である (図1参照)。 $\langle \rangle$ は, コンホマーについての加重平均値であることを表わす。

b. 緩和比。 Gd(III) によつて誘起される緩和速度 ($1/T_{1M}$) は, 共鳴核の相関時間がすべてに共通と考えられる場合, (2) 式のように表わすことができる。

$$\frac{(1/T_{1M})_i}{(1/T_{1M})_s} = \frac{\langle r_i^{-6} \rangle}{\langle r_s^{-6} \rangle} \quad (2)$$

《スピン結合定数》 スピン結合定数は, (3) 式のような Karplus 型の近似式で表わすことができる。

$${}^3J = \langle A\cos^2\phi + B\cos\phi + C \rangle \quad (3)$$

3J は, 3本の単結合をへだてた核スピン間のスピン結合定数, ϕ は, それらの単結合のつくる2面角を表わす。

《NOE》 NOEの測定は, gated decouplingにより行なう。 k 番目の測定において, あるスピンを照射した時の, スピン i の熱平衡値からの強度変化の割合,

$$F(i, k) = (I_i^{i,k} - I_0) / I_0 \quad (4)$$

を求める。 NOEである $F(i, k)$ は, N 個のスピン系の場合, (5) 式のように表わされる。このように $F(i, k)$ は, $\tau_c, R(i), \langle r_{ij}^{-6} \rangle$ が与えられれば, (5) 式を用いて漸化的に計算できる。

$$F(i, k) = -\frac{\gamma^4 \hbar^2 \tau_c}{2R(i)} \sum_{i \neq j}^N [\langle r_{ij}^{-6} \rangle F(j, k)] \quad (5)$$

$\langle r_{ij}^{-6} \rangle$: スピン i とスピン j との距離 r_{ij} を, 各コンホマーの座標から求め, r_{ij}^{-6} をコンホマーの存在率により加重平均した値。

τ_c : 双極子相互作用の相関時間。

$R(i)$: スピン i の縦緩和速度。以下の(6)式のように, このスピン系の中での双極子-双極子相互作用の項と, それ以外の機構による項 [$\rho^*(i)$] の和で表わされる。

$$R(i) = \gamma^4 \hbar^2 \tau_c \sum_{i \neq j}^N \langle r_{ij}^{-6} \rangle + \rho^*(i) \quad (6)$$

《解析方法》 マクレオチドのような flexible な分子においては, 図2のようにいくつかの flexible site をもつ。そこで, マクレオチド分子のコンホメーションを, 図3のような樹構造であらわす。つまり, 局所的多形をもつ部分をそれぞれ, ひとつのレベルとして枝わかれさせる。

コンピュータによるコンホメーション解析のアルゴリズムを図4に示す。まず, コンホメーション・モデルを設定し, structure parameter により各コンホマーのデカルト座標を計算する。そして, 局所的多形の population parameter から, 各コンホマーの fractional population を計算し, シフト比, 緩和比, スピン結合定数,

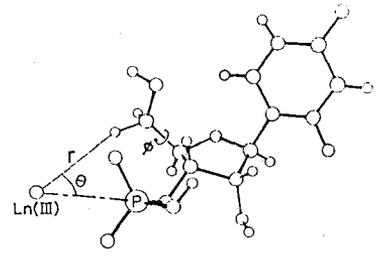


図1. U_p のランタニド錯体

NOEをシミュレートする。その計算値が、実測値とよい一致を示したところで最小2乗法により、パラメータの標準偏差を求める。コンホメーション・モデルをかえてみても、それ以上 agreement factor [R値] とパラメータの標準偏差が小さくならないところまできたら計算をおえる。以上の計算には、コンピュータプログラムCOFLEMを使用した。

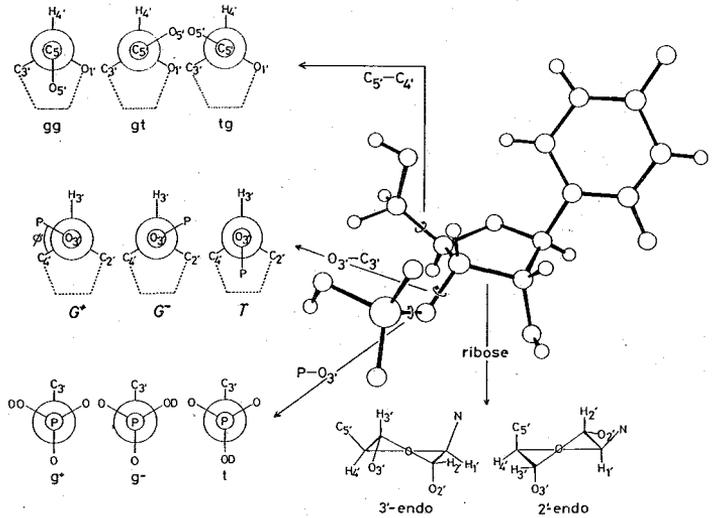


図2. U_p (ウリジン 3'-モノリン酸) の局所コンホメーション

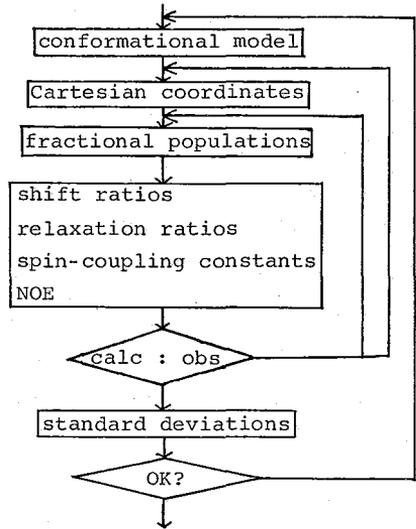
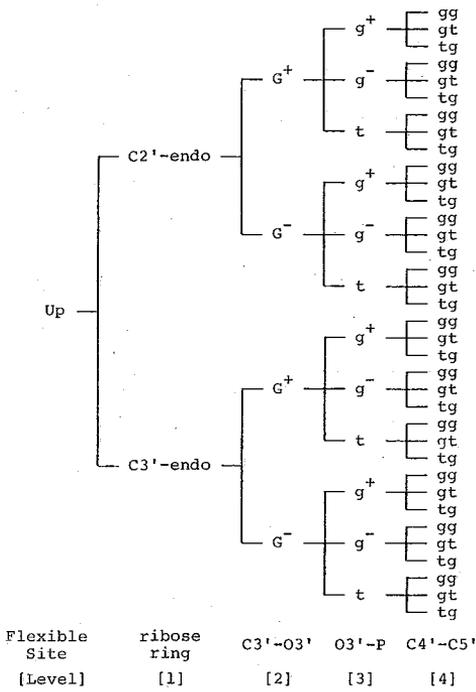


図4. ランダムプローブ法によるコンホメーション解析の概要

図3. 局所コンホメーションを組合せて U_p 全体のコンホメーションを表わすためのコンホメーション樹。

《RNAとDNAの差異》 私たちは、リボヌクレオチドとして U_p 、デオキシリボヌクレオチドとして dTp をえらび、2'-水酸基の有無が、ヌクレオチドのコンホメーションに与える影響を調べた。 U_p についてのコンホメーション樹構造は、図5のようになった。図6は、 U_p と dTp について、糖部分のパッカーリングと、 $C3'-O3'$ 結合の内部回転との間に相互依存性があることを、定量的に示したものである。リボヌクレオチドの U_p では、 $C3'$ endo- G^- 形が安定であるのに対し、

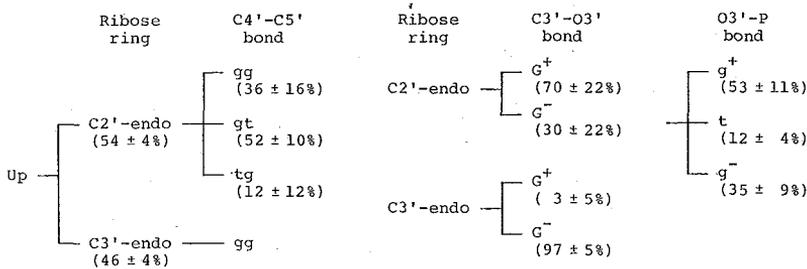


図5. Up のコンホメーション樹の最適解。

デオキシリボヌクレオチドの dTp では、C2'endo-G⁻形が最も安定であるが、C3'endo-G⁻形もとりに得る。このように、RNAがA型のらせん構造(C3'endo-G⁻形)のみをとり、DNAのらせん構造には、多様性(C2'endo-G⁻形、C3'endo-G⁻形)があるという、らせん構造の差異は、モノマーのコンホメーション特性の差異とよく対応している。

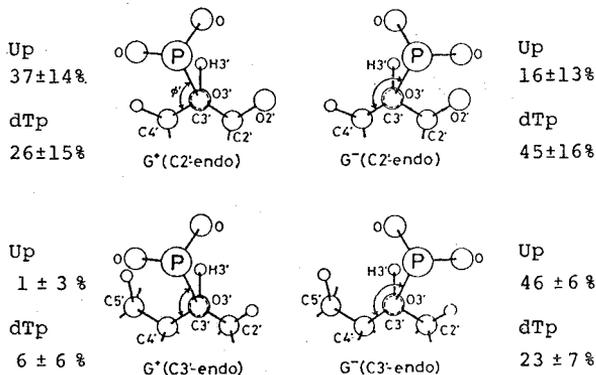


図6. Up, dTp の糖・リン酸部分のコンホメーション

《NMN》 ニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) については、以前報告した⁽³⁾が、今回、この定量性のある解析法により、あたりにコンホメーション解析を行なった。図7は、NMNについての、局所コンホメーションの間の相互依存性の diagram である。太線は、相互依存性を表わす。NMNでは、C4'-C5'結合のまわりのコンホメーションと、C1'-N1結合のまわりのコンホメーションとは相互依存性をとりいれると、R値は著しく改良される。

このようにして、gg形の際には、リン酸基とアミド基の水素結合により syn 形を安定にとるが (82%)、gt形または tg形では、ほとんど100%が anti 形であることが定量的に示された。

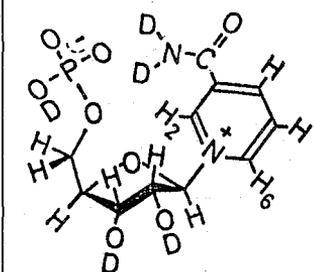


図8. NMN の gg-syn 形

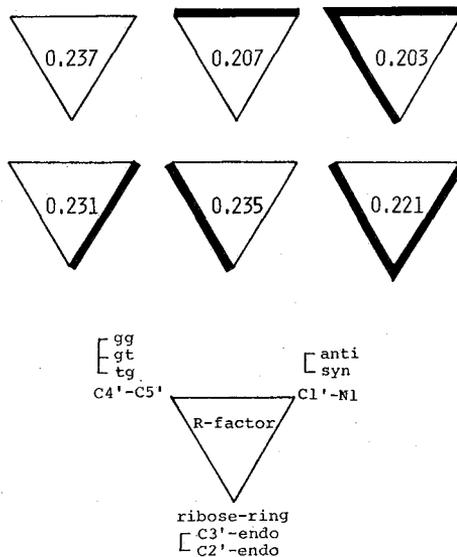


図7. NMN の局所コンホメーションのあいだの相互依存性

《文献》 (1) F. Inagaki and T. Miyazawa, Prog. NMR Spectroscopy, 14, 67 (1981)
 (2) S. Yokoyama, F. Inagaki and T. Miyazawa, Biochemistry, 20, 2981 (1981)
 (3) 老田哲也, 稲垣冬彦, 宮沢辰雄, 第16回NMR討論会講演要旨集 p.105 (1977)

1 序

西洋わさびペルオキシターゼ (HRP) は, 過酸化水素 (H_2O_2 ; 第一基質) による, フェノール・芳香族アミン等の各種電子供与体 (AH_2 ; 第二基質) の酸化を触媒するハム酵素 (分子量: 42000) である。



この酵素は, 補欠分子族としてプロトハムⅨを持ち, ハム鉄は $Fe^{III} (S=5/2)$ で, 活性である。このことから, ハム側鎖あるいはハム近傍に位置するプロトンの, ハム鉄の影響による常磁性シフトしたNMRシグナルをマーカーとして, ハム近傍アミノ酸残基の解離, あるいは外部配位子 (CN^{\ominus} , N_3^{\ominus} etc.), 基質との相互作用等多くのNMRによる研究¹⁾がおこなわれてきた酵素である。

この酵素には, 酵素1モルに対し2モルの Ca^{2+} が結合しており, 酵素活性及び温度安定性が Ca^{2+} に大きく依存している²⁾。NMR・ESR等を用いた我々の研究によれば, Ca^{2+} を除いた酵素 ($HRP(-Ca^{2+})$) のハム近傍の構造は, 元の酵素 ($HRP(nat)$) と異っており, その事が酵素の活性や安定性の減少と対応していると, 考えられる^{3), 4)}。

今回, $HRP(-Ca^{2+})$ への Ca^{2+} 以外の他の二価の無機イオンの結合とその効果について検討し, 加えてランタニド系イオンの Yb^{3+} の $HRP(-Ca^{2+})$ への結合と, Yb^{3+} が結合した酵素 ($HRP(Yb^{3+})$) の 1H -NMRスペクトルから, 酵素の Ca^{2+} 結合部位周辺の構造について知見を得たので, ここに報告する⁵⁾。

2. 実験

HRPは東洋紡社G-I-C およびSigma社タイプVIを用い, Ca^{2+} 抜き操作は, Haschkeらの方法に従った²⁾。 1H -NMRスペクトルはNicolet TT-100FTを付備した, Varian HR-200 (220 MHz) および Nicolet NT-300 (300 MHz) を使用し, QPD方式によるFT法により得た。測定温度は通常 $23^{\circ}C$, 酵素濃度は $1 \sim 2$ mM にて測定した。化学シフトは重水中のプロトンシグナルを内部基準とし, 低磁場側をアウスで示した。

3. 結果・考察

(A) HRPへの無機イオンの結合の効果

HRP ($-Ca^{2+}$) と HRP (nat) の構造及びその機能の相異は, 以下のようにまとめられる。

Horseradish Peroxidase As A Calcium-Bound Heme Enzyme. Use of Lanthanide-Shifted NMR Resonances for the Studies of Calcium Binding Site and Protein Conformations (Kyoto Univ.) Y. Shiro, I. Morishima,

- ①. Ca^{2+} を除いた事により、酵素活性が HRP (nat.) の 40% まで減少する。
- ②. 酵素 1 分子に、2 分子結合している Ca^{2+} の内、1 分子の Ca^{2+} がハム近傍の構造及び酵素機能を維持する為に必要である。
- ③. HRP (nat.) のハム鉄は $\text{Fe}^{\text{III}} (S=5/2)$ であるのに対し、HRP ($-\text{Ca}^{2+}$) のそれは $\text{Fe}^{\text{III}} (S=5/2) \rightleftharpoons \text{Fe}^{\text{II}} (S=1/2)$ の熱スピニ平衡である。

④. 反応中間体 Compound I の安定性も Ca^{2+} に依存している。

以上の 4 点について、 Ca^{2+} 以外の他の 2 価の無機イオンが、HRP に及ぼす効果について検討した。

HRP ($-\text{Ca}^{2+}$) の水溶液に、表 1 に示した種々の 2 価の無機イオンを添加し、その NMR スペクトルの変化を観測した。その結果 Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} の 3 つのイオンを加えた時のみ、

HRP ($-\text{Ca}^{2+}$) のスペクトルは変化し、新しいスペクトルが得られた (図 1)。他のイオンを加えた時はスペクトル変化はなかった。このスペクトル変化は、 Ca^{2+} 添加同様、NMR 時間スケールより遅い変化で、酵素濃度とイオンの濃度比が、およそ 1 : 1 になった時、最終的なスペクトルが得られた。その時、酵素活性は、HRP (nat.) のそれの 70% まで回復し、反応中間体 Compound I の安定性も回復した。この 3 つのイオンの HRP ($-\text{Ca}^{2+}$) のタンパク部への結合の結合定数は Ca^{2+} のそれと同じオーダーであった。以上の結果は、 Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} の 3 つのイオンは、HRP ($-\text{Ca}^{2+}$) の Ca^{2+} 結合部位に結合する事を示している。図 1 に示した、この 3 つの無機イオンが結合した HRP の NMR スペクトルは、HRP (nat.) のそれと比べてもわずかずつ異なり、特に 1 位、8 位のメチル基のシグナルの変化が大きい。これはイオン半径等それぞれの無機イオンの性質によるものと考えられる。又、これらのスペクトルで 4 つのハムメチルシグナルの温度依存性は Curie 則に従い、ハム鉄の電子状態は、HRP (nat.) 同様、単一のスピニ状態

表 1. HRP ($-\text{Ca}^{2+}$) への種々の 2 価の無機イオンの結合。

Metal	Binding to HRP ($-\text{Ca}^{2+}$)	Specific Activity	Binding Constant
Mg ²⁺	X	X	X
Ca ²⁺	O	80 %	1.6×10^4
Mn ²⁺	X	X	X
Co ²⁺	X	X	X
Cu ²⁺	X	X	X
Zn ²⁺	X	X	X
Sr ²⁺	O	(70±5) %	$(1.2 \pm 0.4) \times 10^4$
Cd ²⁺	O	(68±6) %	$(1.0 \pm 0.4) \times 10^4$
Ba ²⁺	O	(74±6) %	$(1.3 \pm 0.5) \times 10^4$

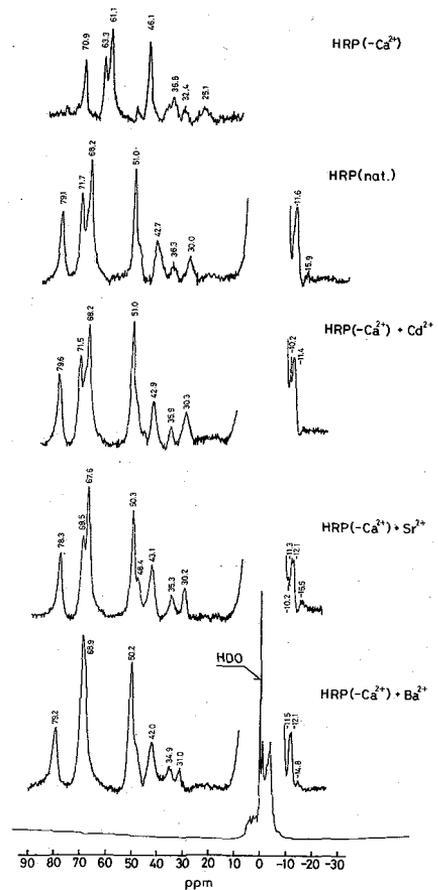


図 1. 種々の無機イオンの結合した HRP の ^1H -NMR スペクトル。

$F_{e^{III}}(S=5/2)$ である事を示している。

以上の結果は、 Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} の3つの無機イオンも Ca^{2+} 同様、HRPのタンパク部分に結合し、その活性中心近傍のタンパク構造及びハム鉄の電子状態を維持する事を示唆している。

又、 ^{113}Cd -NMRにより HRP内の無機イオン自身の環境を検討すると、2つの Ca^{2+} 結合部位の環境の違いが明らかになった。1つの Ca^{2+} 結合部位はハム鉄近傍に存在し、ハム鉄の常磁性の影響を受ける位置にあり、そこへは無機イオンは specific に結合する。他の1つの部位への無機イオンの結合にはタンパク構造の変化が伴わず、その化学交換の速度は速い事が明らかになった。

(B) HRPへの Yb^{3+} の結合と効果

HRP(- Ca^{2+})へ Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} が結合し、 Ca^{2+} 同様ハム鉄近傍の構造を維持する事がわかったが、 Ca^{2+} 結合部位周辺の構造については、明らかになっていない。そこで、NMRシフト試薬のランタニド系イオン Yb^{3+} の HRP(- Ca^{2+})への結合、及びこれを利用して Ca^{2+} 結合部位周辺のタンパク構造について検討した。

(1) HRP(- Ca^{2+})への Yb^{3+} の結合；

HRP(- Ca^{2+})の水溶液へ $YbCl_3$ の水溶液を滴定して、そのNMRスペクトルの変化を観測すると、 Ca^{2+} や他の無機イオン(Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+})の滴定の時と同様の変化がみられ、 Yb^{3+} は酵素と1:1でHRP(- Ca^{2+})に結合した。又、このHRP(+ Yb^{3+})の溶液に Ca^{2+} を再滴定すると、HRP(nat.)のスペクトルが再現し、逆にHRP(nat.)に Yb^{3+} を加えても変化はなかった。以上の結果は、 Yb^{3+} がHRPの Ca^{2+} 結合部位に結合し、その結合力は Ca^{2+} に比べて弱い事を示している。

図2E HRP(+ Yb^{3+})の 1H -NMRスペクトルを、HRP(- Ca^{2+})とHRP(nat.)のそれと併せて表わした。このスペクトルでは、48~78ppm

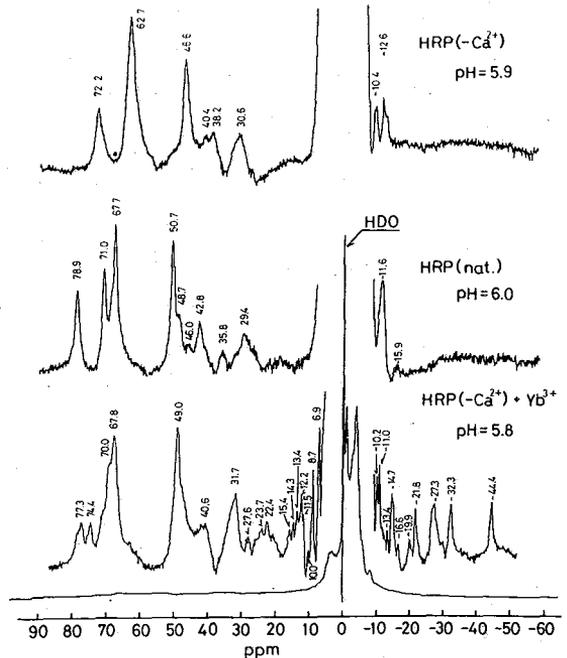


図2. Ca^{2+} -free HRP, native HRP 及び Yb^{3+} -bound HRP の 1H -NMR スペクトル

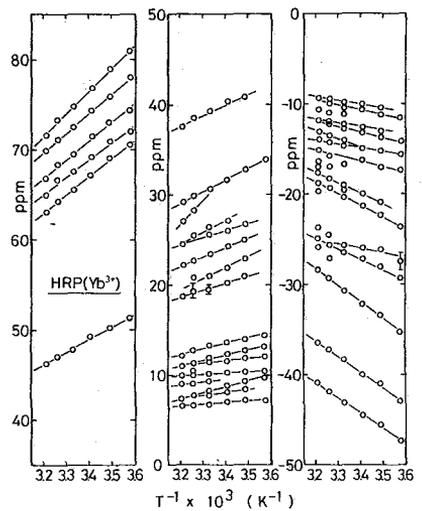


図3. HRP(+ Yb^{3+})のNMRスペクトルにおける、プロトンシフトの Curie プロット

のハムメチルシグナルに加え、 Yb^{3+} の結合の影響で常磁性シフトした、 Ca^{2+} 結合部位周辺のアミノ酸残基のプロトンシグナルが、タンパク質プロトンシグナルから分離して観測された。これらシグナルとハムメチルシグナルの温度依存性は Curie 則に従った(図3)。

(2) HRP(+ Yb^{3+})のNMRスペクトルのpH依存性; HRP(+ Yb^{3+})のスペクトルは溶液のpHが4~11の間で、pHに依存して2段階に変化して3種類得られた(図4)。これらの変化はNMR時間スケールより遅い変化で、そのpKは~5と~10であった。この結果は、HRPの Ca^{2+} 結合部位にpK~5及びpK~10の解離性アミノ酸残基が存在する事を示している。このpK値から推察すると、カルボキシル基を持ったAsp.がGlu, 及びフェノール基を持ったE Tyr.が Ca^{2+} の結合に大きく関与していると考えられる。

(3) HRP(+ Yb^{3+})への配位子や基質の結合; HRP(+ Yb^{3+})のNMRスペクトルの Yb^{3+} による常磁性シフトしたタンパク部のプロトンシグナルを、マーカーにして、HRP(+ Yb^{3+})のハム鉄への CN^{\ominus} の結合や、HRP(+ Yb^{3+})と基質(BHA; Benzhydroxamic Acid)の相互作用によるタンパク部の構造変化を観測した。

4. まとめ (図5参照)

- (1) HRPの Ca^{2+} 結合部位へは、 Ca^{2+} 同様、 Cd^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 及び Yb^{3+} の無機イオンが結合し、ハム近傍のタンパク構造及びハム鉄の電子状態を維持する。
- (2) HRPの1つの Ca^{2+} 結合部位はハム近傍に存在し、Asp.がGlu.及びTyr.が Ca^{2+} の結合に関与している。他の1つの結合部位の Ca^{2+} の交換速度は速い。

5. 文献

- 1) Morishima, I. et al. (a) Biochemistry (1977) 16, 5109, (b) J. Biol. Chem. (1979) 254, 2814, etc. 2) Haschke, R. H. & Friedhoff, J. M. (1978) B.B.R.C. 80, 1039, 3) Ogawa, S. et al. (1979) ibid, 90, 674, 4) Shiro, Y. et al. Biochemistry in submitted 5) Morishima, I. & Shiro, Y., J.A.C.S. in submitted

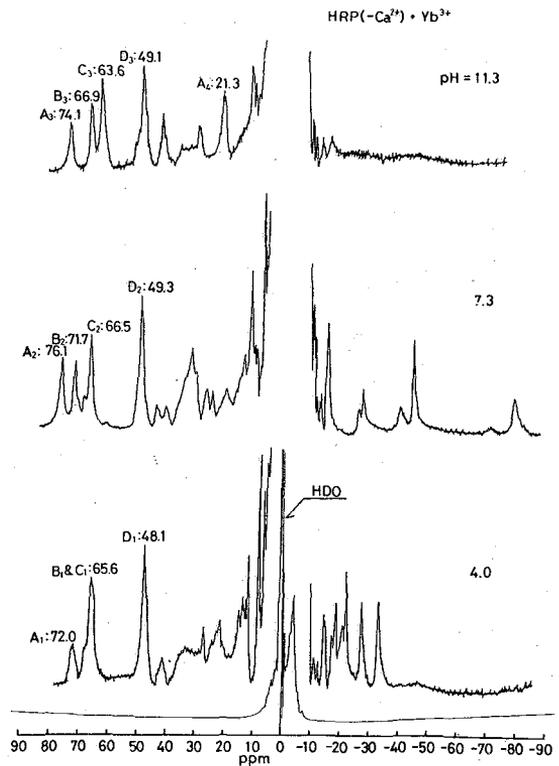


図4. HRP(+ Yb^{3+})の 1H -NMRスペクトルのpH依存性

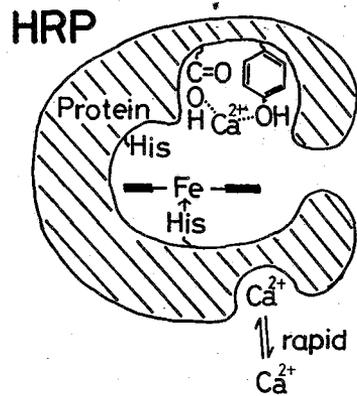


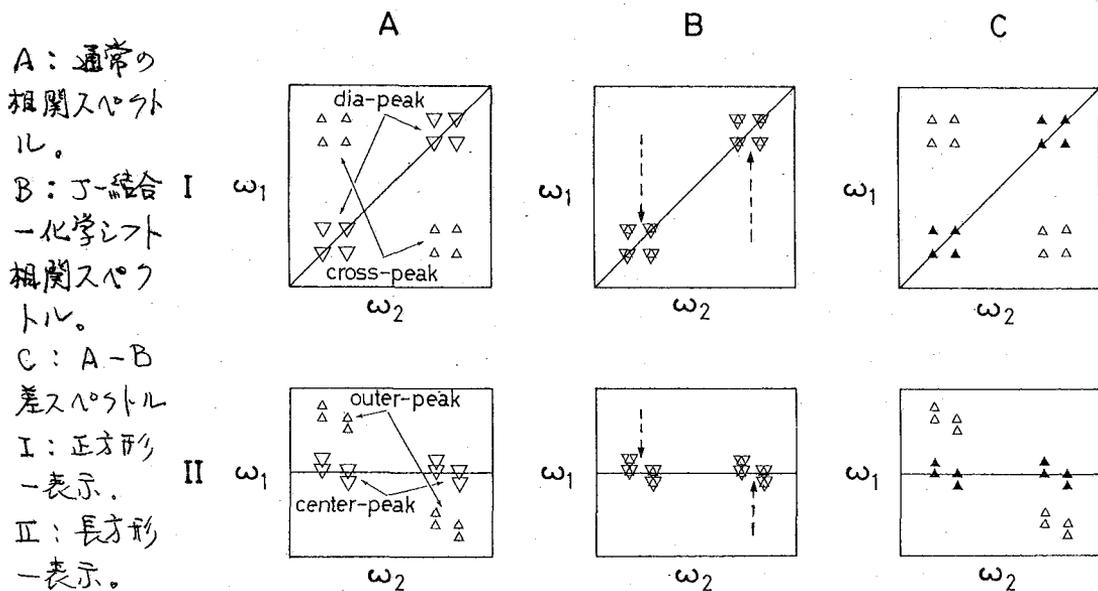
図5 HRPの構造の模式図

東大理, 阪大蛋白質*

永山国昭, 小林祐次*, 京極好正*

はじめに 2次元NMRにおける差鳴ピークの2次元展開は, 1次元対応スペクトルにおいて各ピークが, 新しい時間変数(間隔) τ_1 の間に位相変調又は強度変調を受ける事により可能となる。変調周波数は自身の差鳴周波数か又は結合した(J-結合, 双極子結合) 相手核の周波数である。前者は図1 A-I, A-IIにおいて dia-peak 又は center-peak として現われる。他方後者の周波数変調はスペクトル上に cross-peak 又は outer-peak を現出させる。核向のポンド情報, 空間構造情報はこの後者の2次元ピークにより荷われこいる。ところで cross-peak (outer-peak) の強度は dia-peak (center-peak) に較べ常に弱い。特に線中の広いNMRスペクトルではこの傾向が顕著であり, 高分子における2次元NMRの測定を困難なものとしている。すなわち2種類のピークの不均衡は, 1) 対角線(中心線)に近い cross-peak (outer-peak) の観測を妨げる。2) ω_1 軸方向に走る強い dia-peak 由来のノイズを生む。3) 大きな強度差は必然的にコンピュータメモリの大きな dynamic range を必要とする。等の不都合を生じる。従って何らかの方法でこの dia-peak (center-peak) を消すか強度を弱められれば2次元NMRの応用範囲を更に広げることが期待される。本報ではその実現方法として差スペクトル法が可能である事を報告する。(図1においてIとIIの2次元表示法は等価である。以後実験との対応を考え, IIについて言及する。)

図1. 差スペクトル法の概念図。AXスピン系の2次元相関法



Two Dimensional (2D) Difference NMR Spectroscopy
 (Univ. Tokyo, Univ. Osaka) K. Nagayama, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku

差入パルス法 *outer-peak* (図1 A-II) と *center-peak* (図1 A-I) は常に
 対になつて2次元スペクトル上に展開する¹⁾。従つてどちらかのみを取り出すのは本
 来不可能である。ところで以前にも述べたように *outer-peak* が中心線とかけ離
 れて2次元展開するのは、結合核間に共鳴周波数の差があるからである。もし両者
 の周波数に差がなければ、図1 B-IIに見るように *outer-peak* は作らぬし移動し
center-peak と重なるであろう。但し ω_2 軸方向には両者異なる位置にピークが
 現われるよう核間に共鳴周波数差がなければならぬ。通常のスเปクトル A と ω_1
 軸方向の化学シフトを消したスペクトル B との差を取れば、差入パルス C (A-B)
 が得られる。図1 C に示すように 本来の強い center-peak は消え、*outer-peak*
 と *outer-peak* の符号を変えたコピーである 新たな center-peak が差入パルス
 上に展開する。

ではいかにして図1 B のようなスペクトルを得るか。種々の方法が可能であるう
 が最も判りやすい測定法は、図2 A の通常法を 図2 B のように修飾して得られる。
 図2 はスピネコー2次元相関法 (SECSY)²⁾
 の実験スキームである。A ではハミルトニ
 アン $H^{(1)} = H^{(2)}$ であり当然図1 A-II のスペ
 クトルを得る。B では $H^{(1)}$ と $H^{(2)}$ を導入し
 た所が A と異なる。 $H^{(1)}$ は化学シフト項の
 抜け落ちた、核間相互作用のみを含む平均
 化ハミルトニアンである。従つて t_1 の共
 役軸 ω_1 方向の共鳴周波数 (化学シフト) の
 展開はない。すなわち図1 B-II を得る。

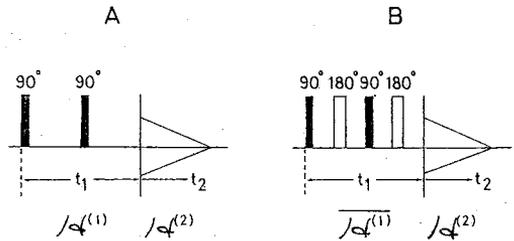


図2 2次元相関法 (SECSY)²⁾ の実験
 スキーム。A: 通常法, 図1 A-I と対比
 B: スピネコーパルス (180°) を挿入する事
 により t_1 時における化学シフトの展
 開を消す方法。

2次元差相関スペクトル (2D SECSY Difference) 実験法の根幹は図2に
 示したものと同一である。しかし図2 B のような数多くのパルスを用いる方法は、
 r.f. パルスの不完全性 (H_1 確率の不均一性、立上り下りのなまり、設定値のズレ)
 によるノイズを誘起する。1次元 NMR では表面化しないこのノイズは、 $\omega_1 = \pm \frac{1}{2}$
 ω_2 , $\omega_1 = \pm \frac{1}{4} \omega_2$, $\omega_1 = \pm \frac{1}{2} \omega_2$ の各 line 上に *center-peak* の ghost とし
 てシステムティックに現われる。ソフト的にこれらのノイズを消すには通常 r.f.
 パルスの位相を 90° ずつ変え t_2 時の FID を戻したり、引いたりして行われる。
 2nd, 3rd, 4th パルスの位相を色々変えてテスト (その結果、2nd, 4th 180° パルス
 には X と -X の 2 phase, 3rd 90° パルスには X, Y, -X, -Y の 4 phase と組み合
 せて良い結果を得た。図3に A_{B2} 系の SECSY 及び 2D SECSY 差入パルスを示し
 た。図3 (a), (b) の比較により、差入パルス法の次の特長が顕著に伺える。

- 1) *center-peak* の強度は常に *outer-peak* と等しくかつその微細構造は同じ。
- 2) 2次元展開に寄与しないピーク (ここでは $CHCl_3$ のピーク) は消え去る。

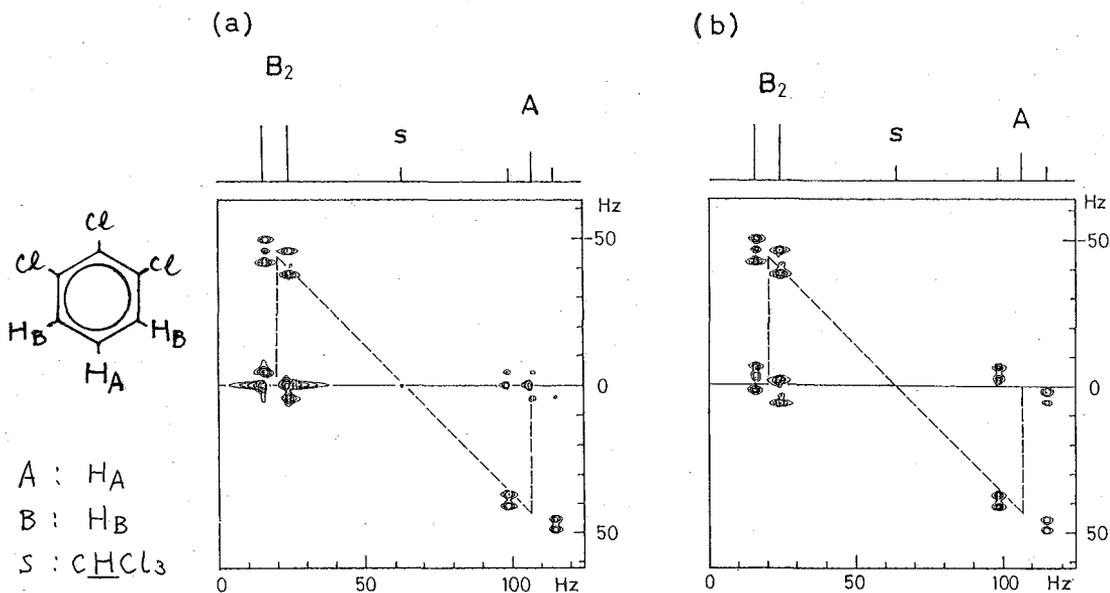


図3. 1,2,3-trichlorobenzene / CDCl₃ の SECSY スペクトル (27°C).

(a), 通常スペクトル。但し本実験では 2nd 90° パルスも意図的に 45° にして、center-peak ($\omega_1=0$) の強度を outer-peak より大きくしておく。

(b), 差相関スペクトル。図1 C-II に示してあるように符号を除いて outer-peak と center-peak は強度、パターンが完全に等しくなる事に注意。

S は impurity の CHCl₃ 由来のピークで、そのまま H_A と H_B の間に singlet として現われている。(b) では差を取る事でこのピークも消える。

2次元差NOEスペクトル (2D NOE Difference) ³⁾ 2次元NOE法の

実験スキームは図4 A に示してある。但し図1の長方形表示 (II) のスペクトルを得るためターゲタ取り込み開始前に $t_1/2$ の待ち時間が置かれている。図1 B-II に対応するスペクトルを得るには SECSY 法の時と同様に 2つの 180° パルスを図4 B のように挿入すれば良い。実際の測定ではシステムノイズを消すため、180° パルスには X, -X の位相, 2nd 90° パルスには X, -X, Y, -Y の位相, 3rd 90° パルスには 2nd 90° パルスと同じ位相の異なる4つの位相を与え、その組み合わせの16 phase rotation を行って良い結果を得た。AMP への応用例を図5に示した。ここでは中心線に近い outer-peak の現れ方を見るためボース環上の水素核間の2次元NOEピークを示してある。図5もこのように通常法では強度の大きい center-peak のスリにNOEピーク (outer-peak) は

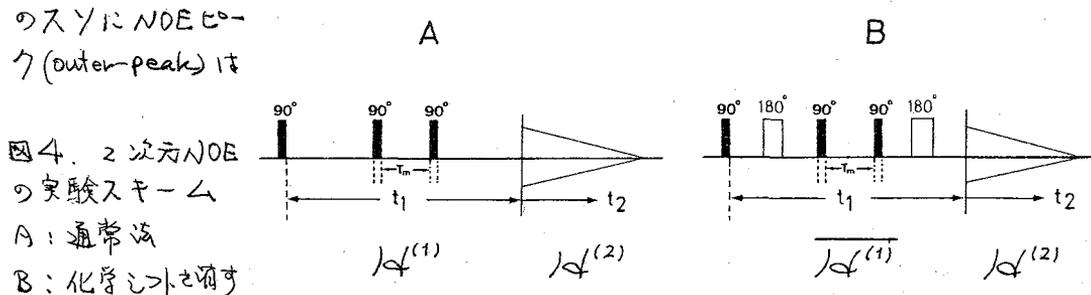
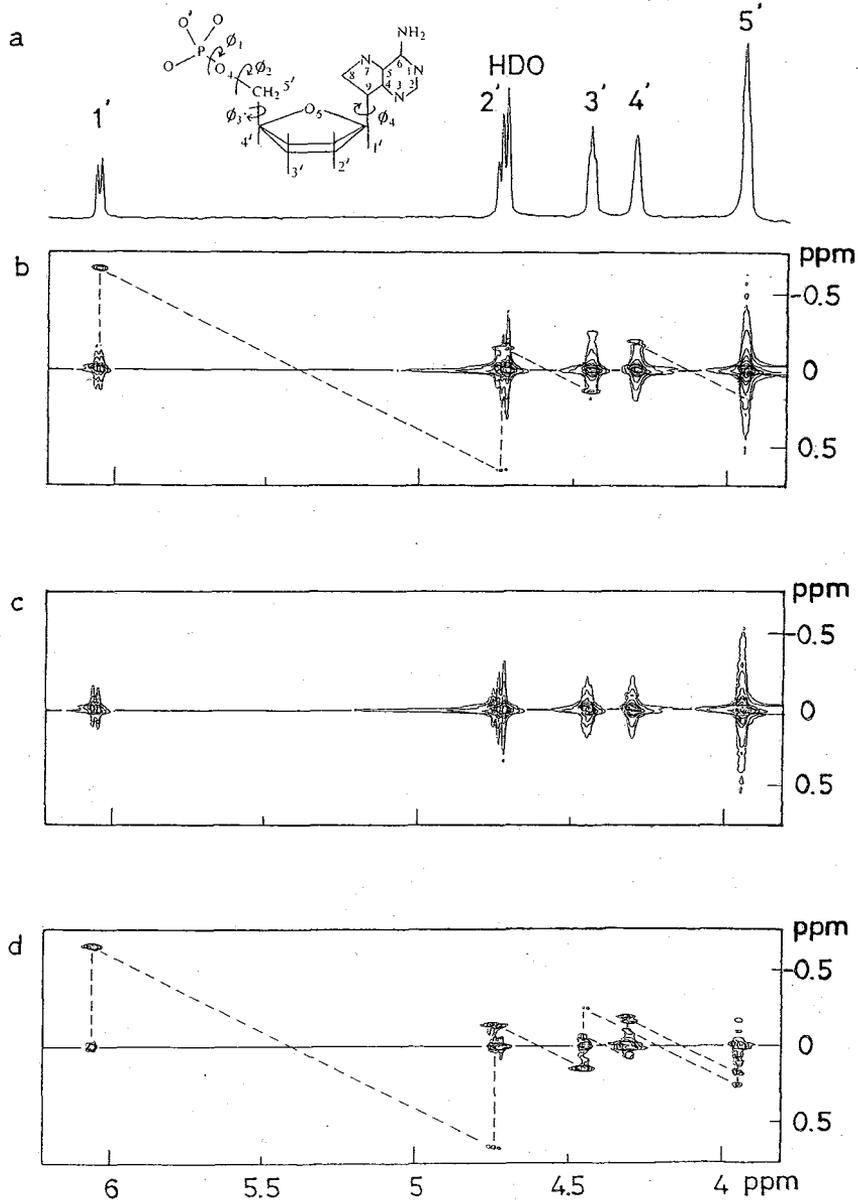


図4. 2次元NOEの実験スキーム

A: 通常法

B: 化学シフトを消す

図5. AMP/D₂O
(~50mM, 27°C)
の2次元NOE



a). 1次元NMR

b). 通常2次元
NOE。破線は
1'-2', 2'-3',
4'-5'の核間結合
がスヤクトルから
読み取れる事を示
している。

c). center-peak
のみを表示する,
spin echo modified
2DNOE

d). 2次元差NOE
スヤクトル。
スヤクトルb -
スヤクトルc,
bに較べ、2', 3', 4',
5'核間の結合関係
はより明瞭である。

隠れしてしまう。中心線から充分離れた、言い換えれば化学シフト差の大きい核間のNOEピーク(ここでは1'-2')のみが明瞭な2次元スヤクトルを示す。cの2次元スヤクトルは図4Bの実験スキームにより得たものが期待通りω₁軸(縦方向)方向のピークの展開はない。スヤクトルbとスヤクトルcの差を取ればスヤクトルdが得られる。bに較べ、2'-3', 3'-4', 3'-5', 4'-5'の核間のNOEピークがcenter-peakの減少と共により鮮明な帯び上っているのが見られる。又impurityのHDO由来のsingletはdのスヤクトルから消えている。

おわりに 糖々の特長を持つ2次元差スヤクトル法も感度的にはS/N比が1/2に落ちる不利がある。蛋白質分子への応用も含め、更にこの方法を検討したい。

文献 1. W.P. Aue et al. J. Chem. Phys. 54, 2229 (76). 2. K. Nagayama et al. J. Magn. Reson. 40, 321 (80). 3. Anil Kumar et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 1 (80).

(京大・工) 森島 績, 永峯千里, 原 光信
(神大理) 山田 博昭

1. 序

演者は簡便な耐圧NMRセルを利用し、高圧下における生体物質の構造変化を高磁場NMRを用いて研究している。¹⁾ 圧力(P)は温度(T)と熱力学的には等価なパラメーターであり、反応に対する圧力効果からは分子容変化(ΔV)が導き出せる。生体反応において ΔV は ΔH , ΔS に劣る重要な情報を含んでおらず、そのデータは少ない。演者はこれまで、ヘム蛋白質における熱的スピン平衡(高スピン \rightleftharpoons 低スピン)に及ぼす圧力効果も、その変化が微小で可視、紫外吸収スペクトル法では追究困難なためプロトンNMR法を用いて研究を行ってきた。¹⁾ これによって得られたスピン平衡に伴う ΔV の値から、スピン変化に伴うヘム鉄近傍の構造変化がタンパク質全体の構造変化も起きていることを示唆して来た。本研究では、熱スピン平衡にあるヘム蛋白質のモデルとしてポルフィリン鉄錯体を取り上げ、高スピン、低スピン、熱スピン平衡にある三種の錯体についてそのNMRの圧力効果を追究し、その圧力効果の有無、蛋白質の効果などを明らかにした。また、ミオグロビン(Mb)、ヘモグロビン(Hb)における酸型 \rightleftharpoons アルカリ型転移への圧力効果も調べ、圧力によるヘム近傍の微細構造変化も追究した。

2. 実験方法

高圧NMRの測定には山田の耐圧セル(図1)を用いた。²⁾ 即ち外径3.2mm, 内径1mmのガラス管を耐圧マイクロカプセルとして使用する方法である。作成が簡単で、特別な付属装置を必要としないうえ、圧力範囲が約2500気圧までに限定される。通常のがうス管の内壁を5% HF水溶液でエッチングした後水及び揮発性溶媒で洗浄し、乾燥後キャピラリーに細工する。これは熱膨張率の高い溶媒(95% フェニルアセチレンと5% エノロヘキサンの混合溶媒)、水銀、サンプルを導入し、溶媒側をマイクロバナーで封じた後、図1(i)のようにセットし、溶媒側を液体窒素バス中で凍らせた後、サンプル側を封じる。これを常温に戻し、溶媒の熱膨張による高圧を得る。これを外径5mm, 内径4mmのテフロン製安全ジャケット中に入れ(図1(ii))

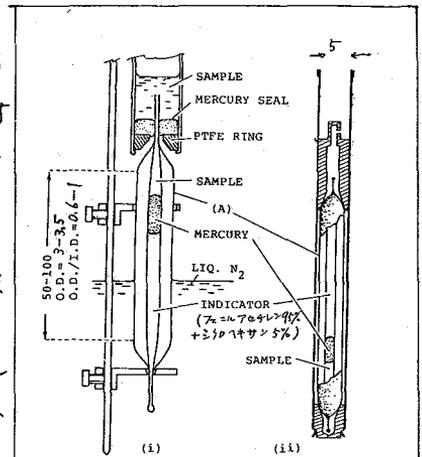


図1 高圧NMRセル。

(i)耐圧キャピラリーとサンプル導入方法 (ii)安全ジャケット

High-Pressure NMR Studies of Hemoproteins and Their Model Porphyrin Complexes

(Kyoto Univ.) I. Morishima, C. Nagamine and M. Hara
(Kobe Univ.) H. Yamada

30°Cに制御されたNMRプローブ中に置く。フェニルアセチレンのプロトンシフト(C₆H₅C≡CH)の圧力依存性はあらかじめわかっているが、各サンプルの圧力はシクロロキサンを内部基準としてこのC≡CHプロトンシフトに測定することによって、セル内の圧力を推定することが出来る。キャピラリーの細工に当っては、先端はできるだけ丸味を持たせ、短くなるようにした方が良く、またサンプル側の先端は、蛋白質が付着しない様、封じる前に重水で軽く洗浄すると破裂を防ぐことが出来る。

NMR測定にはVarian HR-220/Nicolet TT-100 スペクトロメータ(220MHz)及びNicolet NT-300(300MHz)分光計を用いた。いずれもサンプルスピニングを行わず、Lockを用いずに測定した(高圧セルを用いた場合)。

3. 結果および考察

(A) 熱スピン平衡にあるポリスリリン鉄錯体による圧力効果

ポリスリリン鉄錯体[OEPFe³⁺(L₁L₂)]ClO₄の4カチオン(L₁, L₂)をピリジン誘導体(3-ClPy, 3-BrPy, 3-CNPY等)に選んで、その¹H NMR常磁性シフトの温度変化を見ると(図2)、高温になるに従って、より大きな低磁場常磁性シフトがOEPのα-CH₂, meso Hシグナルに対して観測された。これは、この錯体が単一のスピン状態にあるのではなく、低スピン ⇌ 高スピンの熱平衡状態にあり、高温になるに従って、高スピン含量が増大し、単純なCurie則に従わないためと考えられる。そこで、各温度における磁化率から得られた有効磁気モーメント

$$\mu = \mu^{LS}\alpha + \mu^{HS}(1-\alpha)$$

(ここで $\mu^{LS} = 2.2$, $\mu^{HS} = 5.8$ 各スピン、高スピン状態に対する有効磁気モーメント)から、その温度における低スピン含量 α を求め、さらに常磁性シフトの温度依存性から、30°Cにおける低スピン、高スピン状態のリミティングシフトを算出した。表1にはこれらの結果を示す。

ここで δ^{LS} , δ^{HS} は低スピン、高スピン状態におけるリミティングシフトで、 $\delta^{obs} = \delta^{LS}\alpha + \delta^{HS}(1-\alpha)$

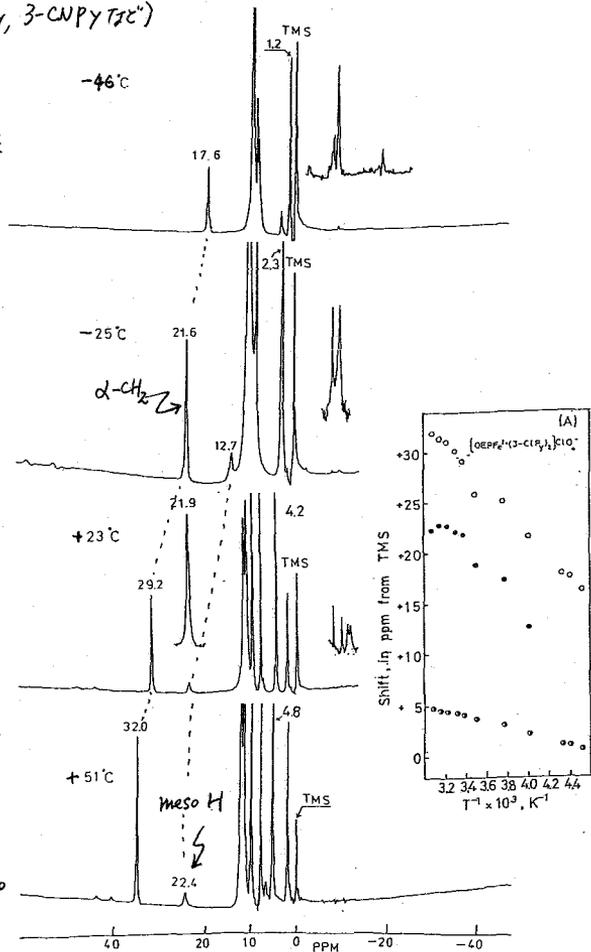
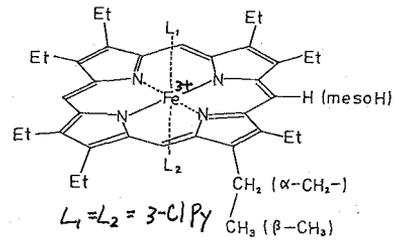


図2. [OEPFe³⁺(3-ClPy)₂]ClO₄の¹H NMRシフトにおける常磁性シフトの温度依存性

表 1. $[\text{OEPFe}^{3+}(\text{L})_2]\text{ClO}_4^-$ におけるプロトン常磁性シフト値およびスピン状態

L (ligand)	pK_a	Proton Chemical Shift (ppm)				Spin State	Spin Content (%)	
		δ	$\alpha\text{-CH}_2$	$\beta\text{-CH}_3$	mesoH		L. S.	H. S.
I m	6.95	δ^{obs}	6.5	1.0	3.0	Low Spin ($\frac{1}{2}$)	100	0
Py	5.22	δ^{obs}	13.4	1.1	5.2	Spin eq. ($\frac{1}{2} \rightleftharpoons \frac{5}{2}$)	87	13
		$\delta^{L.S.}$	6.9	-0.6	-2.3			
		$\delta^{H.S.}$	56.8	12.1	56.4			
3-ClPy	2.81	δ^{obs}	29.2	4.1	22.9	Spin eq. ($\frac{1}{2} \rightleftharpoons \frac{5}{2}$)	51	49
		$\delta^{L.S.}$	-5.0	-2.8	-16.2			
		$\delta^{H.S.}$	64.5	11.3	63.5			
3-BrPy	2.84	δ^{obs}	28.8	4.1	22.2	Spin eq. ($\frac{1}{2} \rightleftharpoons \frac{5}{2}$)	—	—
3-CNPy	1.40	δ^{obs}	31.7	4.7	25.2	Spin eq. ($\frac{1}{2} \rightleftharpoons \frac{5}{2}$)	—	—
4-CNPy	1.86	δ^{obs}	28.1	4.0	19.8	Spin eq. ($\frac{1}{2} \rightleftharpoons \frac{5}{2}$)	—	—

δ^{obs} の圧力依存性から、 $\delta^{L.S.}$ 、 $\delta^{H.S.}$ を用いてその圧力における低スピン含量 α を算出することが出来る。ここで鉄の低スピン又は高スピン状態にあるポルフィリン錯体では、その NMR 常磁性シフトの圧力依存性は認められなかった。従って図 3 に示す $[\text{OEPFe}^{3+}(\text{3-ClPy})_2]\text{ClO}_4^-$ の $\alpha\text{-CH}_2$ 、mesoH の常磁性シフトの圧力依存性は、低スピン含量 α が圧力によって変化した結果と解釈される。低スピン-高スピン平衡系の平衡定数 K は

$$K = \frac{\alpha}{1-\alpha}$$

で与えられる、その圧力依存性から、スピン平衡

$$\frac{\partial \ln K}{\partial p} = -\frac{\Delta V}{RT}$$

に伴う体積変化 ΔV が求められる。図 4 にその結果を示す。高圧下では低スピン含量が増大し、体積変化 ΔV

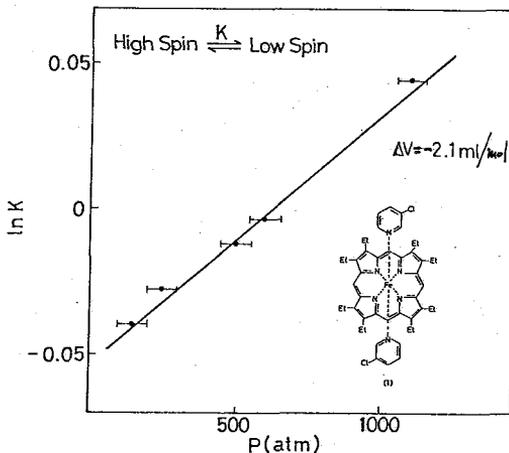


図 4. 低スピン-高スピン平衡に及ぼす圧力効果

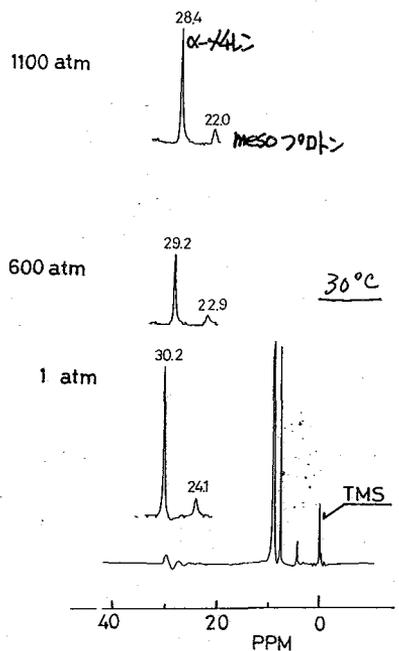
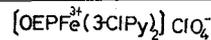


図 3. 低スピン-高スピン平衡にある $[\text{OEPFe}^{3+}(\text{3-ClPy})_2]\text{ClO}_4^-$ の ^1H NMR スペクトルの圧力依存性

この値は、X線構造解析によって得られたポルフィリン鉄錯体のスピン状態の変化に伴う鉄-リガンド結合距離の変化から求めた値である。

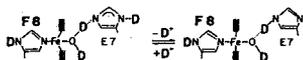
先に報告するは、懸スピン平衡系にあるミオグロビン誘導体 (Mb-N_3^-) に対し $\Delta V = -15 \text{ ml/mol}$ と見積られたが、今回の結果より、 γ 蛋白質では、 γ 鉄のスピン変化に伴

つてヘム部分のみならず蛋白質全体の体積変化，従って構造変化も伴っていることが推察される。

(B) ミオグロビン，ヘモグロビンの酸-アルカリ転移に及ぼす圧力効果

met Mb, met Hb はヘム鉄の6配位子である水のプロトン解離による酸-アルカリ平衡にあり，NMRでは，図5に示すように，

(a) acidic form (b) alkaline form



ヘム4ル基のプロトンシグナルはPHの上昇に伴って，酸化型 (Fe(H₂O)) から塩基型 (Fe(OH)) へと大きなシフトを伴って連続的に変化する。そのPK値はMbで9.1, Hbで8.3である。

さてこの平衡に及ぼす圧力効果は，図6に示すように，加圧によって，Mb, Hb いずれも酸-アルカリ平衡がアルカリ型へ移行するようなNMRスペクトル変化を伴っていることがわかる。一方水溶液のPHは加圧により極くおろすことがわかっているので，図6にみられる加圧によるヘムプロトンシグナルの高磁場側へのシフトは，高圧によってヘム近傍の構造が変化し，プロトン解離が促進され，上記の酸-アルカリ転移のPK値が下がったことによるものと解釈される。

この原因として，遠位ヒスチジン(E7)のイミダゾール窒素と水の水素との間の水素結合が，高圧下では，高圧下では蛋白質部分の構造変化によってより強くなり水のプロトン解離が促進されたと考えることができる。或はオク配位子の近位ヒスチジン(F8)のヘム鉄への配位が変化した結果によるものとも解釈される。

この原因として，遠位ヒスチジン(E7)のイミダゾール窒素と水の水素との間の水素結合が，高圧下では，高圧下では蛋白質部分の構造変化によってより強くなり水のプロトン解離が促進されたと考えることができる。或はオク配位子の近位ヒスチジン(F8)のヘム鉄への配位が変化した結果によるものとも解釈される。

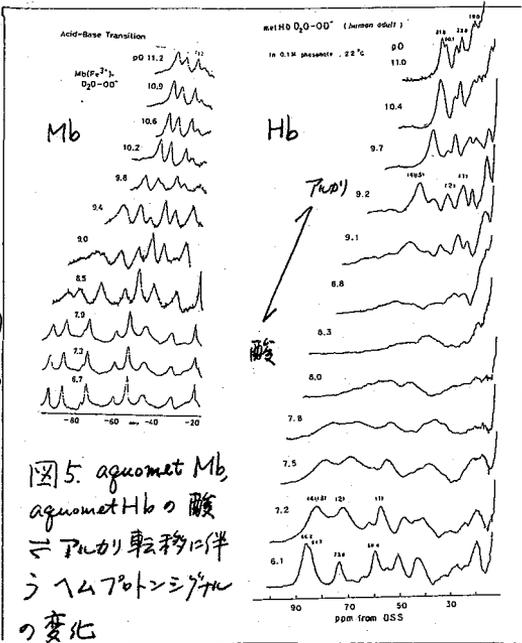


図5. aquomet Mb, aquomet Hbの酸-アルカリ転移に伴うヘムプロトンシグナルの変化

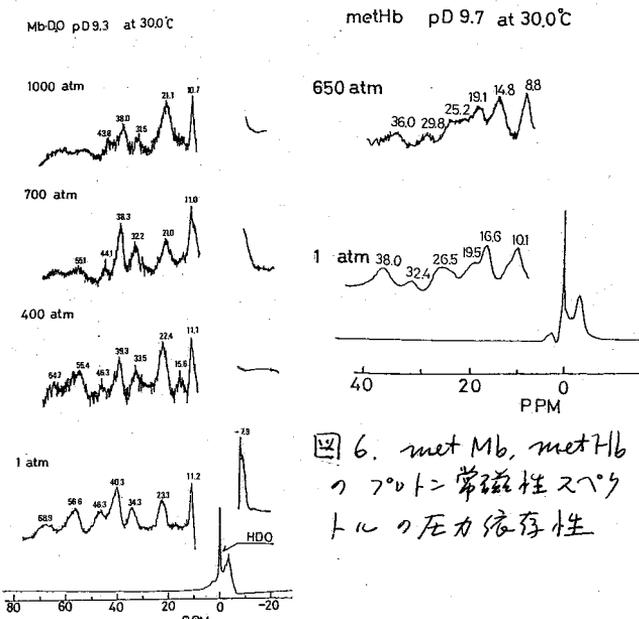


図6. met Mb, met Hbのプロトン-常磁性スペクトルの圧力依存性

[文献] 1) I. Morishima et al. J. Am. Chem. Soc., 101, 7074 (1979); Biochemistry, 19, 1569 (1980); 生物物理, 20, 351 (1980) 2) H. Yamada et al, Chem. Lett., 217 (1979) 3) I. Morishima and T. Iizuka, J. Am. Chem. Soc., 96, 5279 (1974); Biochim. Biophys. Acta, 371, 1 (1974). 4) I. Morishima et al, Biochemistry, 16, 5109 (1977).

(味の素中研) °之 尚志 (都立大理) 甲斐花 正恒

<序> 蛋白質の構造研究は、種々の分光学的手段により行われているが、近年 NMR のこの分野における有用性が注目されている。NMR による方法は、蛋白質の特定の部分に注目し、化学シフト、結合定数、緩和時間などのパラメータから、溶液中心の静的、動的な情報を引き出すことと特徴とする。その場合に、まず、プロトンは特定の核を見出すことが、第一の課題となるが、蛋白質のような巨大な分子を対象とする場合には、これはなかなか困難で、通常の方法では、アミノ酸残基のうち、特に分離のよい限られたものしか利用出来ない。これに対し、 ^{13}C などの同位体で蛋白質をラベルする方法は、目的の部分とよくラベルする手段があれば、極めて有用な方法となる。我々は、微生物起源のタンパク性プロテアーゼ阻害剤 SSI¹⁾ を用い、生合成的に特定の残基を同位体ラベルして、その ^{13}C -NMR スペクトルによる構造研究を行ない、その有用性及び結果の一部については既に報告した^{2),3)}。今回は、これまで報告した Met 残基のカルボニル炭素の他に、Phe 残基のカルボニル炭素、Arg 残基のグアニジル炭素を ^{13}C ラベルした試料を調製し、それらを用いて種々の実験を行なった結果、有用な知見が得られたので、併せて報告する。

<実験> ラベル SSI の調製: 同位体ラベルしたアミノ酸を含むアミノ酸混合物を栄養源とする培地中心、*Streptomyces albogriseolus* S-3053 E $\times 5^\circ\text{C}$ で 6~7 日間振とう培養した後、DEAE-セルロース、Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィー等により精製し、培養液 500ml から約 70mg のラベル SSI を得た。

^{13}C -NMR の測定: ラベルした SSI 30~60mg を 1.5~2ml の重水に懸濁させ、希重アンモニア水で pD を調節して溶解した後、12mm 管及び 10mm 管で測定した。スペクトロメータは Varian 社 XL-100、日本電子 FX-100、FX-200、Brücker 社 WH-070 を用い、化学シフトは、内部標準として用いたジオキサン⁴⁾の化学シフト値の 67.8 ppm とした TMS からの値に換算した。

<結果及び考察>

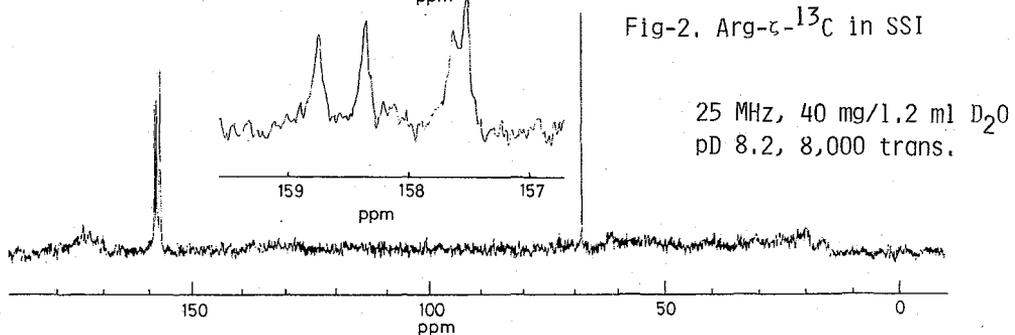
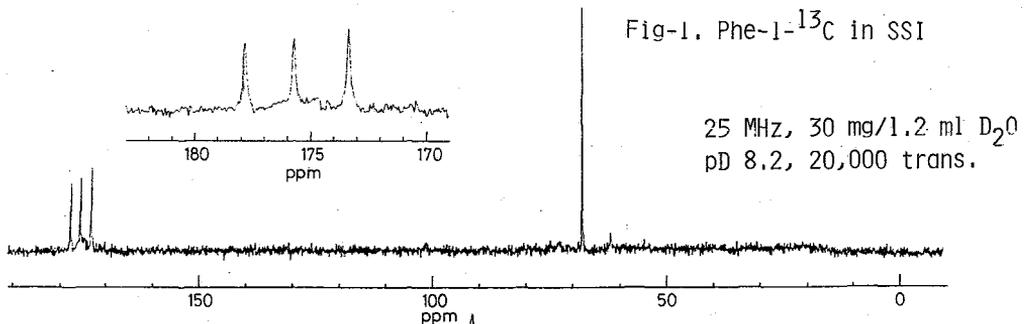
1. Phe 残基、及び Arg 残基をラベルした SSI の ^{13}C -NMR スペクトル

図-1、図-2 に Phe 残基のカルボニル炭素、及び Arg 残基のグアニジル炭素の ^{13}C -NMR スペクトルを示した。SSI は、アミノ酸残基 113 個からなる 27 の等価なサブユニットにより、 α グリマーを形成しているが、17 のサブユニット中、3 個の Phe 残基を含む⁴⁾。三つの X 線解析の結果によれば⁵⁾、そのうち Phe-97 のカルボニル基は、Val-78 の NH と水素結合を形成しており、Phe-11 は疎水領域にあり、Phe-

Structural Study of Protein by Isotope Labeling - Dynamic Structure of Streptomyces Subtilisin Inhibitor (SSI) in Solution by ^{13}C NMR Technique.

(Central Research Labs., Ajinomoto)*T. Tsuji, (Tokyo Metropolitan Univ.) M. Kainosho.

113 は C-末端にある。図-1 中の 3 本のピークのうち、最も低磁場側のピークは、通常のアミドのカルボニル炭素よりかなり低磁場側にあり、C-末端の Phe-113 に帰属出来る。また、水素結合しているカルボニル炭素は低磁場側にシフトするところから、残りの 2 本のピークのうち低磁場側のものを Phe-97 に帰属することが出来る。一方、Arg 残基は、サブユニット中 4 個あるが、そのうち、Arg-29 の Guanidyl 基は、Phe-113 のカルボキシル基と、また、Arg-90 はキジ一方のサブユニット中の残基と水素結合として、ダイマー形成に関与している。他の 2 つの残基の Guanidyl 基は、水素結合には関与していない。化学シフトの違いは、このように 2 次構造の差を反映しているものと思われる。明確な帰属は、今後の課題であるが、Arg 残基の側鎖は、SSI の構造形成上、重要な役割を果たしており、構造研究上の有用なプローブとなることが期待される。



2. 緩和時間

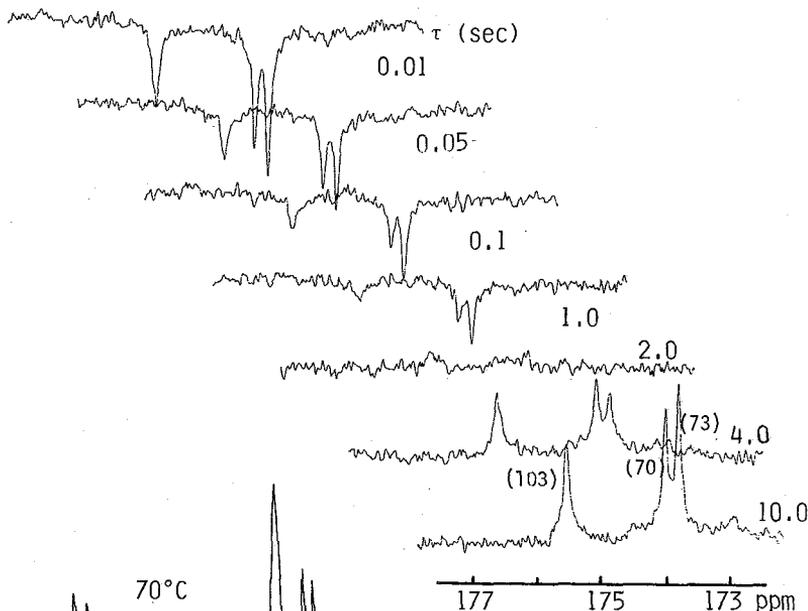
図-3 に Met 残基のカルボニル炭素の 50 MHz における部分緩和スペクトルを示した。各シグナルの緩和時間 T_1 , T_2^* は、表-1 にまとめて示した。緩和時間は分子の運動性を示す相関時間の関数となり、このように同一分子中の同じ残基に注目した場合、その差は、その部位の分子内運動の指標となることが期待される。Met 残基のカルボニル炭素の帰属は既に報告した⁶⁾。Met-103 は α-ヘリックス中であって、ランダムコイル領域にある Met-70, 73 よりも運動が阻害されていると考えられる。実際、 T_1 , T_2^* は、Met-103 が他の 2 つより短い。また、25 MHz における T_1 , T_2^* と 50 MHz における T_1 , T_2^* を比較すると、 T_1 は高磁場において長く、 T_2^* は高磁場において短くなる。双極子相互作用と化学シフトの異质性に基づく相互作用が主な緩和機構であるが、 T_2^* における前層の寄与の磁場依存性は小さく T_2^* の高磁場における減少は、後層の磁場依存性によるものと考えられる。一方、 T_1 における両層の寄

Table-1. Relaxation Time of ^{13}C Nuclei in SSI at 50 MHz and 25 MHz^{a)}

Met-1- ^{13}C		Phe-1- ^{13}C		Arg- ϵ - ^{13}C	
T_1 (sec)	T_2^* (sec)	T_1	T_2^*	T_1	T_2^*
2.3 (1.0)	0.061 (0.14)	3.4	0.080 (0.12)	1.8	0.071 (0.10)
2.5 (1.1)	0.075 (0.17)	2.6	0.064 (0.15)	1.5	0.085 (0.12)
3.1 (1.1)	0.085 (0.17)	2.4	0.067 (0.12)	1.7	
				1.6	

a). 低磁場側のピークから順に記した。()内は25MHzにおける値。

Figure-3. Partially Relaxed Spectra of Met-1- ^{13}C at 50 MHz



すは、磁場に強く依存することから知られる。高磁場における T_1 の増大を考えると、双極子相互作用の寄与がどの程度の磁場では支配的であると言える。

3. D-H交換反応

図-4は50%重

水中心測定した、Met残基のカルボニル炭素の種々の温度における、 ^{13}C

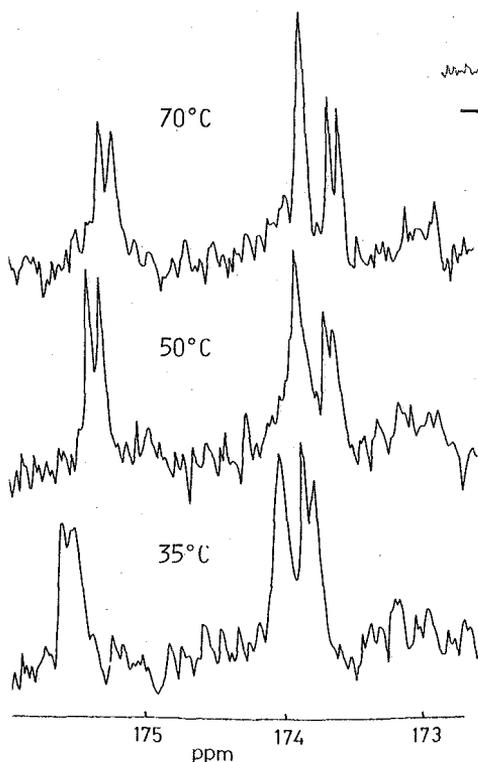


Figure-4. 67.8 MHz ^{13}C -NMR Spectra of Met-1- ^{13}C in SSI in 50% D_2O .

NMRスペクトルである。ナールリックス中のMet-103、及びランダムコイル領域のMet-73が2本に分裂している。同様の実験を25MHzで行った結果、この分裂の大きさは磁場に比例することが明らかになった。これは観測しているカルボニル炭素を含むD-H交換反応が遅いことを示している。これから、i) ナールリックス中のアミドグループは予想されるようにD-H交換反応が遅い。中性付近、室温でも交換する。ii) Met-73は、Met-70と溶媒接触能⁶⁾はほとんど環境に差がないにもかかわらず、Met-73のD-H交換の方が遅いことが判った。特にii)はMet-73が、この阻害剤の活性部位に相当することから興味深い。

また、同様の実験をPhe残基のカルボニル炭素について行なった結果、最も高磁場側のPhe-111のみが分裂を示し、これはPhe-111が疎水領域にあり、極めて溶媒と接触しにくい環境にあることとよく一致している。

4. 酸変性・熱変性

図-5に種々のpDで測定したMet残基のカルボニル炭素の化学シフト値の変化を示した。酸変性はpD2.6付近で急激に始まる

ことが、バーヘリックス中のカル

ボニル炭素(Met-103)のピークの高磁場シフトとして観測された。このことから逆にMet-103の低磁場シフトが、バーヘリックス形成によるものであることが判る。一方、かなりの塩基性条件下でも、バーヘリックス構造は保たれていることが判った。図-6に種々の温度で測定したMet残基のカルボニル炭素の¹³C-NMRスペクトルを示した。重水中、pD8.2では、熱変性は80°Cから85°Cの間で起ることが、酸変性の場合と同様に、Met-103の高磁場シフトとして観測された。Phe残基をプローブとして熱変性を見た場合も、変性に伴い、木素結合しているPhe-97の高磁場シフトと、疎水領域にあるPhe-111の低磁場シフトが同時に観測された。このように、カルボニル炭素の化学シフト値は3次構造の影響を強く受けるので、蛋白質の構造変化を追跡する上の有用なプローブとなることが明らかになった。

参考文献

- 1) S. Murao and S. Sato, Agr. Biol. Chem., 36, 160 (1972).
- 2) 甲斐荘・辻. 第31回タンパク質構造討論会要旨集. 東京 (1980).
- 3) 辻・甲斐荘. 第19回NMR討論会要旨集. 私観 (1980).
- 4) T. Ikenaka, S. Odani, M. Sasaki, Y. Nabeshima, S. Sato and S. Murao, J. Biochem., 76, 1191 (1974).
- 5) Y. Mitsui, Y. Satow, Y. Watanabe and Y. Iitaka, J. Mol. Biol., 131, 697 (1979).
- 6) Y. Satow, Y. Watanabe and Y. Mitsui, J. Biochem., 88, 1739 (1980).

Figure-5. Titration of SSI Monitored by Met-1-¹³C Chemical Shift

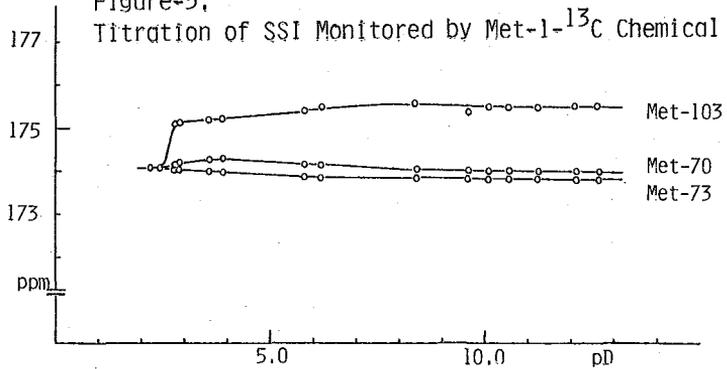
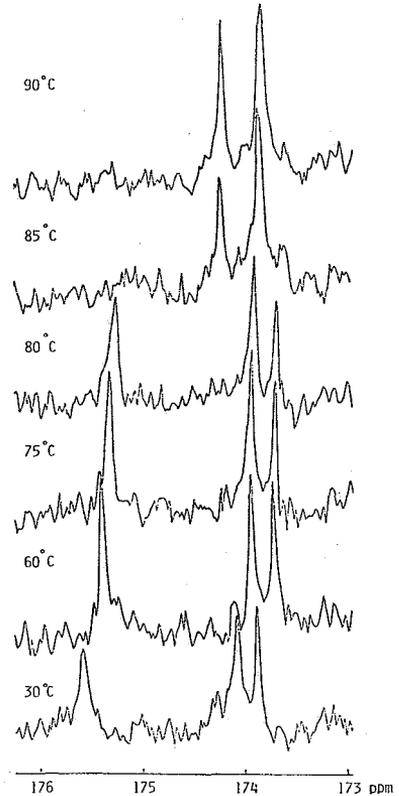


Figure-6. Thermal Denaturation of SSI, 67.8 MHz.



(国立がんセンター, 東大薬) 斎藤 肇, 多田涼子, 秋山敏行, 三川 潮

1. はじめに

ポリエン抗生物質は, ステロールと含有する真菌やヒトの細胞膜あるいはモデル生体膜に作用して, 水, イオン, 非電解質の透過を促進させる。その作用機構は, おもに電子顕微鏡的観察にもとづき, 細胞膜中のステロールと特異的に結合して, 細胞内物質を流出させるようなピットやポアを作つたためといわれている。¹⁾ われわれは, 同じように生体膜中でコレステロールと特異的コンプレックスを作るサポニンの効果を知つたために, 側鎖の26, 27メチルと選択的に重水素化した chol-d₆ を用いて²⁾ ²H NMRスペクトルの変化を調べ, 複合体生成によって核四重極分巻の値が149以上増大するこゝとを認めた。³⁾ ここでは, 同じテクニックを用いて, ポリエン抗生物質-コレステロール複合体形成に於ては, 脂質および温度の効果と調べると同時に, その分子機構について論ずることとする。

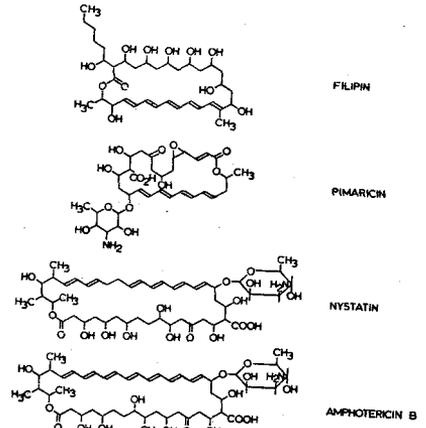
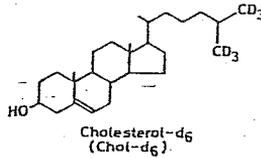


Fig. 1. Structures proposed for the different polyene antibiotics.

2. 実験方法

用いた脂質は, 卵黄レシチン, DPPC, DMPCであるが, 前者は標準的手法によって卵黄から抽出した。chol-d₆は選択的方法によって合成を行った。³⁾ ²H NMRの測定は, Bruker CXP-300スペクトロメータを用い, 90_x-e-90_y-echo-90_x-e-90_y----のパルスシーケンスにより, 行われたエコーをAdd/Subtractとくりかえしから積算した。水和に用いた水は, Aldrichから得た高純化水である。

3. 実験結果と考察

A. DPPC 多層膜におけるポリエン抗生物質-chol-d₆相互作用
DPPCのゲル-液晶相転移温度は41°Cである。chol-d₆を16モル%以下でDPPC多層膜の相転移は, ぶくまのい場合に比べてよりブロードになるこゝとが知

²H Quadrupole echo NMR. Properties of complexes between polyene antibiotics and cholesterol.
(Biophys. Div. Natl Cancer Centr. Res. Inst.;⁺Fac. Pharm., Univ. Tokyo) Hazime Saito, Ryoko Tabeta, Toshiyuki Akiyama⁺ and Ushio Sankawa⁺

られていますが、図2Aの ^2H NMRスペクトルは chol- d_6 の複重極分裂の値は 2.6 kHz であり、Davis らが示した DPPC の末端メチルの分裂中 2.1 kHz にくらべて大巾に小さい。一般にゲル相のリン脂質にコレステロールが添加されると、脂質がより流動化されるといわれているが、少なくとも chol- d_6 の末端メチルの配向状態からみる場合、配向状態が大巾に乱されていることがわかる。ポリエン抗生物質をコレステロールに対して 1:1 に添加した試料では、明らかにスペクトル成分が二成分の和からなる。すなわち各スペクトルの右側に与えたシミュレーションは、フィリビンやピマリシン存在下のスペクトルデータを単一成分として全く再現できない。

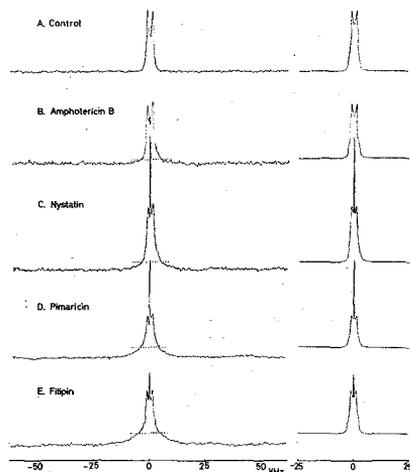


Figure 2. ^2H NMR of spectra of chol- d_6 in the presence of various polyene antibiotics in DPPC bilayers (18°C)

(図2B-E参照)。したがって、スペクトルのシミュレーションは、ブロード成分と、粉末スペクトルを示す中程度の成分の和からなると考え、後者のベースラインをブロード成分の量比に応じて上げを示した。

ブロード成分は、単一の粉末パターンではあらわすことができない。実際、サボニンの一種であるジギトニンとコレステロール (chol- d_6) の複合体は、図3に示すようにブロード成分のみから成り、しかも細かくみると多数の粉末スペクトルによるダブルレットピークの重なりのおよびであることがわかる。明らかに、図2のスペクトルのブロード成分は、図3の場合とよく似ており、同様の分子機構にもとづくものと考えられる。すなわち、ポリエン抗生物質やジギトニンと複合体を生成したときに、chol- d_6 の側鎖部分が

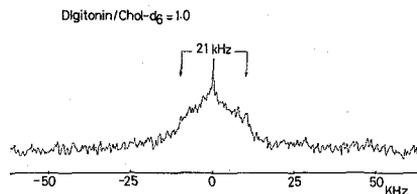
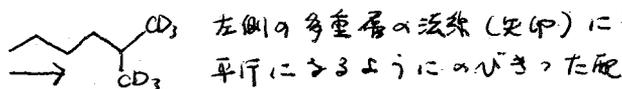


Figure 3. ^2H NMR spectrum of chol- d_6 in the presence of digitonin in DPPC bilayer.



列とするとすると、Davis らが重水希薄 DPPC の末端メチルの複重極分裂の最大値 2.1 kHz⁴⁾ (ゲル相) に近い値をとることはふしぎではない。なぜなら、ポリエン抗生物質やジギトニンのように構化分子と最大の相互作用を与えるには、単にリン脂質二重層にのみ入り込むと異なり、伸びさせたコンホメーションの最も妥当であるからである。しかし、すべての側鎖が伸びた構造をほとんど、コレステロール側鎖とポリエン抗生物質やジギトニンの疎水的な相互作用はほとんどなく、上記の値を最大値として種々の角度をもつたものの重なりとすると、ブロード成分にのみよると考えられる。

ジギトニン-chol- d_6 複合体は、ゲル相でも液晶相のリン脂質でも同じような安定性を示し、実際には温度変化による影響はみられない。しかし、図2と図3と比較してみると、ポリエン抗生物質の添加が明らかに複合体生成量が小さい。これは、

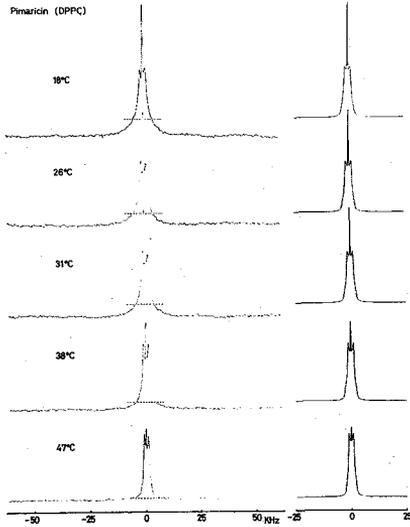


Figure 4. Variation of ^2H NMR spectra of chol- d_6 in the presence of pimarinin with temperature.

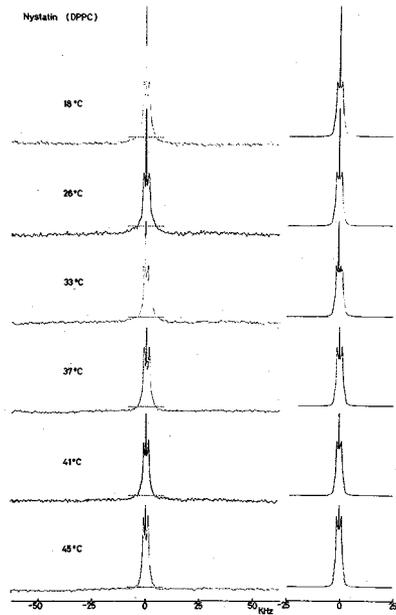


Figure 5. Variation of ^2H NMR spectra of chol- d_6 in the presence of nystatin with temperature

ジギトニンにくらべて、ホリエン抗生物質とコレステロール複合体の安定性がより低いことが示唆され、実際に前述の実験とその他向が一致する。

この点とより明確にするために、図4、図5に代表的な温度変化のスペクトルパターンの変化を示した。興味あることに、ホリエン-抗生物質-コレステロール複合体の存在比は、温度上昇とともに減少し、解離していくことである。この温度変化の過程で、ブロードコンポーネントのスペクトル形状に変化は小さく、単に強度が減少していることがわかる。図6に、ブロード成分の存在比を測定温度に対してプロットした。DPPCのゲル→液晶転移は、41°Cでシャープに変化する

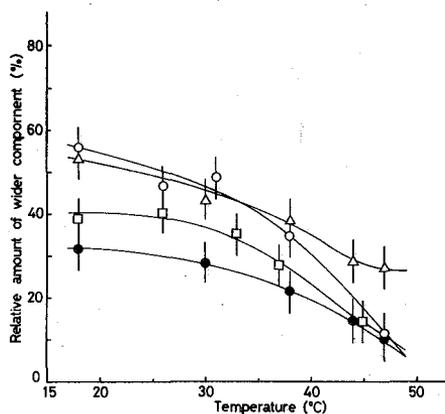


Figure 6. Variation of the relative amount of the wider component with temperature. Δ ; filipin, \circ ; pimarinin, \square ; nystatin, \bullet ; amphotericin B

変化するこれが知られている。コレステロールが添加されれば、この転移温度はブロードに広がり、ホリエン抗生物質の存在によって逆にシャープになることがDSCによって確かめられている。図6のデータはchol- d_6 の挙動に関する限り相転移温度で解離がシャープに変化するわけではなく、温度上昇とともに徐々に起こることがわかる。すなわち、この温度変化挙動は可逆的であり、複合体は多量層の内部に存在しており、少なくとも冬季外にのみ存在しているとは考えられまい。図6のデータは、ジギトニンの挙動とあわせて、複合体の安定性はジギトニン>フィリピン>ピマリニン>アンフェテリシン<ニスタチン<の順に

変化している。ビマリシンを除外すれば、この傾向は奥らによるグルコース構造の実験と平行関係にあり興味深い。特に図1から予測されるように、アンホテリシンB、ナイスタチンのように大分子のマクロライド構造よりは、フィリピン、ビマリシンのように小分子構造のものの方が、むしろとも Chol-d₆ の側鎖の挙動からみた複合体生成がより安定である。フィリピンとビマリシンの挙動の最も大きな差異は、後者の均合液品相リン脂質の多量層の中では、溶解度が大きいにもかかわらず、前者はより安定である。この結果は、卵黄レシチン多量層におけるデータとも平行関係にある。なお、上記の二成分の比と定量する場合、

$$A(\tau T) / A(0) = e^{-\tau T / T_{rel}}$$

の関係があり、 τ の値も変えて一般にはその量比と関係する必要がある。ここで $A(0)$ は $\tau=0$ のピーク強度、 T_{rel} は核四重線エコー緩和時間である。しかし、我々のこれについて定数をくりかえした結果、定数差は $\pm 7\%$ の範囲内にて依存しないことがわかった。

図7に、24°Cに相転移温度をもつ DMPC を使って、アンホテリシンB について同様の実験をくり返し、この場合もゲル相では複合体の安定化が、液晶相ではそれが溶解に連なることを確認した。

4. 結論

ポリエン抗生物質-コレステロール複合体の生成は、ゲル相の脂質において著しく、液晶相では溶解へと進む。この分子機構は、コレステロール側鎖が複合体生成時に多量層法相に平行にならざるコンホメーション変化を示し、これが複合体の安定化に寄与する。また、複合体の安定化の傾向と生物活性の両方に、平行関係がみられた。

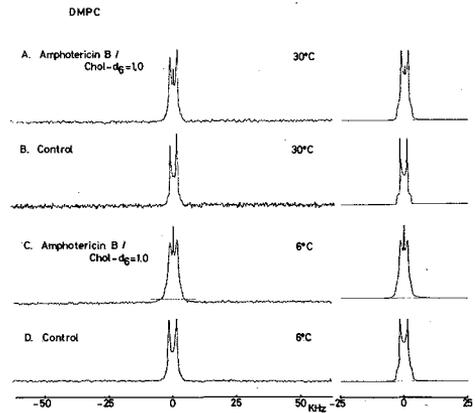


Figure 7.

²H NMR spectra of chol-d₆ in the presence of amphotericin B in multibilayer of DMPC.

- 1) B. DeKruiff and R. A. Demel, *Biochim. Biophys. Acta*, **339**, 57 (1974)
- 2) T. Akiyama, S. Takagi, U. Sankawa, S. Inari and H. Saitō, *Biochemistry*, **19**, 1904 (1980)
- 3) H.H. Mantsch, H. Saitō, and I. C. P. Smith, *Prog. NMR Spectroscopy*, **11**, 211 (1977);
J. Seelig, *Q. Rev. Biophys.*, **10**, 353 (1977); 斎藤 肇, "安定同位体のライフサイエンスへの応用", 講談社サイエンスライブラリー, 1976
- 4) J. H. Davis, *Biophys. J.*, **27**, 339 (1979)
- 5) N. Oku, S. Nojima, and K. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta*, **595**, 277 (1980)

〔はじめに〕 酪素蛋白のなかで凍結乾燥によつてその立体構造が多少の活性が失はれ一変性一するものがいくつが知られてゐる。これは糖やアミノ酸を加えておくことにより防御出来る。凍結乾燥による変性や防御物質の作用機構は、蛋白-水和水間の相互作用を調べる方法の一つとして興味がある。とまは、卵アルブミンをモデル的蛋白としてこれらの物質を加え、凍結乾燥後直ちに残留水分量(5~8%)と、蛋白-水和水間相互作用の指標としての昇温による残留水和水の離脱温度をDSCで測定すると、糖やアミノ酸は水分量を減少させ、1gの防御物質mol/蛋白mol=70で水分量は最小値となり、1gもこのモル比は変性防御に必要且つ最小限の濃度とほぼ一致した。又、残留水和水の離脱温度を著しく高温側へシフトせしめるという結果を示し、糖やアミノ酸は水和水の一部と置換されて相互の結合を強化するといふことが推論された。今回は、糖やアミノ酸が共存するとその水和水の性質により明らかとなるため、 ^1H NMRにより残留水和水の緩和時間を測定することにより、蛋白-水和水間の相互作用の大きさを定量的に調べその動的挙動から防御物質の作用機構を明らかにしようとしたのである。

〔材料および方法〕 モデル蛋白として、 $\times 2$ 結晶卵アルブミンを用い、20%水溶液に所定濃度(モル%)の各種物質を加え総濃度10%とし、蛋白のみのもを対照として、 -196°C で凍結後 10^{-3}Hg で6時間乾燥する。密封後直ちに試料管にとり(約50mg)測定に用いる。

NMR測定は、JEOL-FX100(温度可変、スピンドロツキレグ付)により、周波数99.6MHz、観測巾20KHz、 ^1H 50プローブにより、 -40°C ~ $+100^\circ\text{C}$ の昇温の過程で、 π パルスでのスペクトル、 T_1 、 $T_{1\rho}$ を測定した。 π パルス巾は各試料毎に最適した値(9~13 μsec)を用いた。 T_1 は反転回復法、 $T_{1\rho}$ はスピンドロツキレグ法($H_{\rho}=3$ から)を用いた。水の ^1H 緩和は主として、双極子-双極子相互作用に由来するので、寧ろ ^2D により、各温度での T_1 、 $T_{1\rho}$ の測定から緩和時間の最小値を求め、それら π パルスと向距離 r を求め、他の試料との比較のため 0°C を外挿した緩和時間の値から、 0°C に規格化した回転の分子相関時間 τ_c と、その範囲内での τ_c の値から回転の活性化エネルギー E_a を計算した。

〔結果と論議〕 昇温の過程で通常のNMRスペクトルをとると第2図に示すようには室温付近では半値巾数KHz程度の比較的広巾の単一ピークであるが、温度の上昇と共に強度の増加と先鋭化が起る。80~100 $^\circ\text{C}$ では強度は減少し広巾になる。対照(蛋白のみ)では比較的シャープであるが、糖やアミノ酸が共存すると非常に広巾になる。この時の相対積分強度を温度に対してとると、第3図のようになっている。

Naofumi HANAFUSA Inst. of Low Temp. Science, Hokkaido University

The Mechanism of Protective Substances against Protein Denaturation due to Freeze-Drying by ^1H NMR Relaxation

はなふみ 尚史

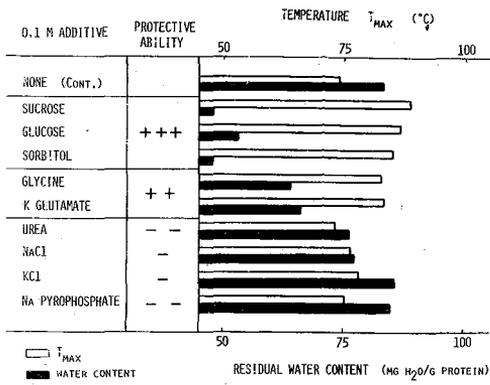


図1. 凍結乾燥した卵アルブミンの残存水量、脱水和の温度(T_{max})への各種添加物質(0.1M, モル比70)の影響。(防御能力は0.7-0.8ミレシの糖)

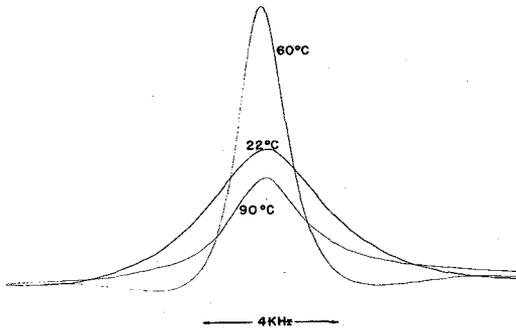


図2. 凍結乾燥した卵アルブミン(対照、尾部のみ)のNMRスペクトルの温度による変化

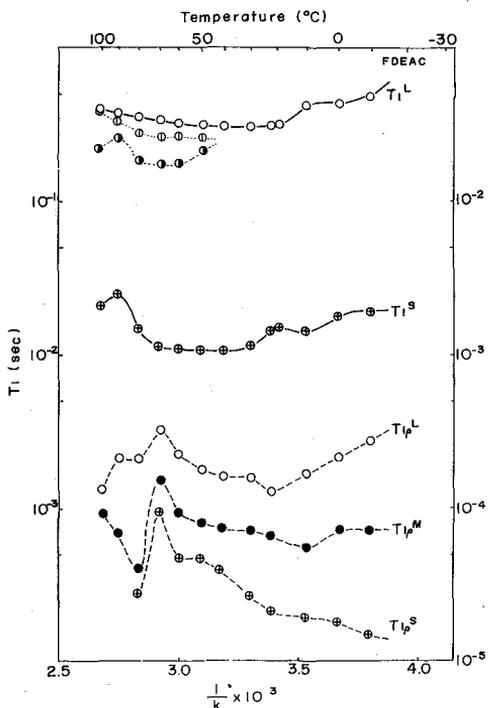


図4. 凍結乾燥した卵アルブミン(蛋白のみ)の $T_1, T_{1\rho}$ の温度による変化。

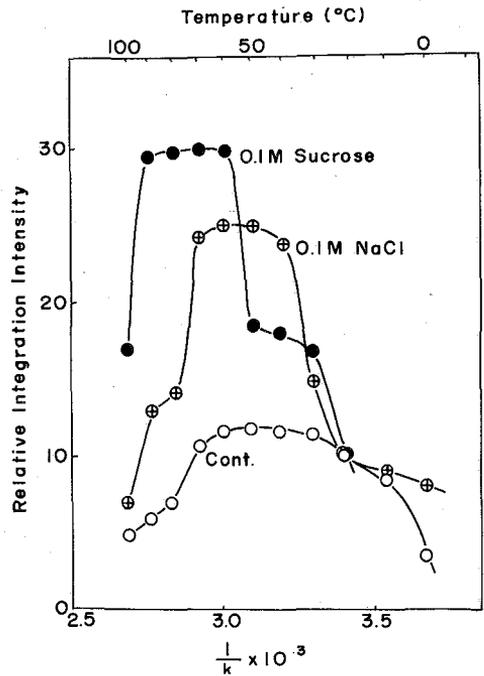


図3. 凍結乾燥した卵アルブミン(Cont. 8倍のみ)および0.1M(モル比70)の糖、塩が存在するときの相対積分強度の温度による変化

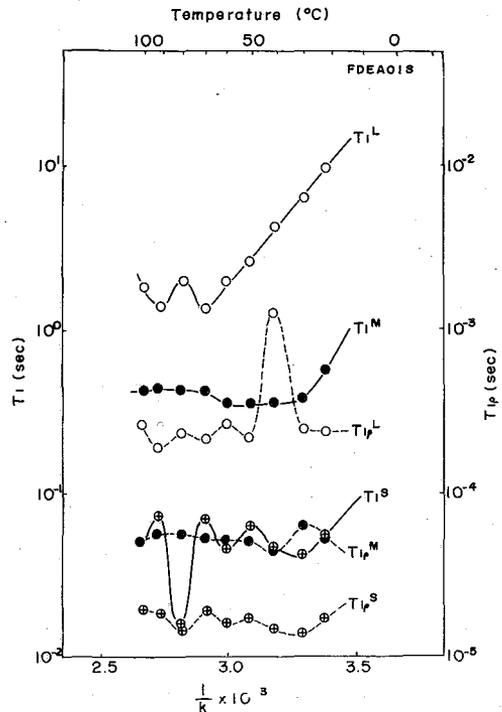


図5. 凍結乾燥した卵アルブミン(蛋白:蔗糖=1:70)の $T_1, T_{1\rho}$ の温度による変化

域で最大値をとり温度の上昇と共に再び減少する。この領域の中心をとり、温度上昇によるプロットの易動性の増大と、残存水和水の蒸発による凝縮による濃度の減少の平衡点と考える事が出来る。第1表右端の (Max. Integ. Int.) はその値で、糖やアミノ酸では著しく高温側へシフトし、水が強く結合してゐることを示し、DSCによる結果とよく一致してゐる。

これらの試料について、 T_i , T_p を測定して磁化の変化として値から T_i , T_p を求めると従つてプロットすると直線が一本でなく、 T_i ではこれから報告されたものより2成分、 T_p では3成分に分離出来る。これは高温側で更に数成分の割合がある場合がある、各々の成分を絶対温度の連続に対して図示したのが第4図(T_i)、と第5図(T_p)で、各成分(L, M, Sで表す)について更に数個の最小点が存在し、物理的には非常に複雑なものであることを示してゐる。 T_i , T_p の順序についてはこれから種々論議のあととさるのであるが、 T_i , T_p については一部蛋白質鎖の易動性のプロットの挙動が含むものをその大部分は水和水のプロットに由来すると考えられる。温度の上昇による脱水和による高温側では蛋白質自身のプロットの挙動が大になると考えられる。従つて、脱水和が著しくなる積分子数最大となる温度領域より低温側にある最小点を示す成分について、 τ , γ , E_a を求めた。第1表、第2表はそのうちの T_i , T_p についての結果を示す。表にみるように、糖やアミノ酸が存在すると最小点の温度は著しく高温側へシフトし、定性的にはこれから τ の増大を示している。 T_i では最も佳かではあるが表にみる。0°Cでの回転の分子間時間では T_i では著しく大きな値を示し、10~100倍に増加する。活性化エネルギーも著しく大きくなる。しかし対照中無効な塩の一部有効な脂肪酸塩ではほとんど変わらない。 T_p は傾向としては全く同様であるが、 τ 中取の増大の程度は T_i の結果と比べると小さい。 T_p の対象がどのような分子論的モデルで表すことができるか現在の段階では何ともいえないが、 T_p を示すより速い運動系より T_i の速い運動系に対しての方が糖やアミノ酸の効果はより大きいといえる。尚、ここでは低温側の成分についてののみを示したが、他の全ての最小点を示す成分についても同様の傾向を示してゐる。

表1, 2は、有効な最小限の、水分量最小の乾燥剤のモデル比(70)について示したが、糖やアミノ酸はそれ自体が水和してゐるので、モデル比…濃度…を種々変

表1 Effect of Some Additives on Nuclear Magnetic Properties of Hydration Water of Freeze-Dried Egg Albumin (T_i)

	T_i	Min. Point Temp. T_c (°C)	τ (sec)	Normalized τ_c at 0°C (sec)	E_a KCl/mol deg	Max. Integ. Int. °C	
Egg Albumin (Cryst.)	T_i	30°	9.59×10^{-10}	2.06	2.6×10^{-9}	-5.5	30°
FD-EA (Cont.)	"	40°	"	2.21	4.7×10^{-9}	-7.2	50°
" 0.1M Sucrose	"	70°	"	2.82	3.5×10^{-7}	-1.5	75°
" " Glucose	"	70°	"	2.37	8.3×10^{-8}	-1.2	60°
" " Glycine	"	55°	"	2.34	3.1×10^{-8}	-1.1	55°
" " K-Glutamate	"	60°	"	2.92	3×10^{-8}	-1.04	65°
" " P-Buffer	"	40°	"	2.14	5.6×10^{-9}	-7.5	65°
" " Pyrophosphate	"	40°	"	2.08	3.9×10^{-9}	-6.0	55°
" " NaCl	"	45°	"	2.28	4.7×10^{-9}	-6.1	55°
" " KCl	"	40°	"	2.21	3.1×10^{-9}	-5.0	55°
" " Urea	"	30°	"	2.13	3×10^{-9}	-6.3	-

表2 Effect of Some Additives on Nuclear Magnetic Properties of Hydration Water of Freeze-Dried Egg Albumin (T_p)

	T_p	Min. Point Temp. T_c (°C)	τ (sec)	γ (Å)	Normalized τ_c at 0°C (sec)	E_a KCl/mol-deg.
Egg Albumin (cryst.)	T_p	0°	6.35×10^{-6}	1.75	6.35×10^{-6}	-
ED-EA (cont.)	"	20°	"	2.17	1.1×10^{-4}	-23
" 0.1M Sucrose	"	70°	"	2.36	9.7×10^{-4}	-14
" " Glucose	"	55°	"	2.05	7.4×10^{-4}	-15
" " Glycine	"	40°	"	2.36	4.9×10^{-3}	-28
" " K-Glutamate	"	30°	"	2.27	6×10^{-4}	-27
" " P-Buffer	"	30°	"	2.17	4.4×10^{-4}	-26
" " Pyrophosphate	"	30°	"	2.47	1.1×10^{-4}	-17
" NaCl	"	25°	"	2.15	1.4×10^{-4}	-20
" KCl	"	50°	"	2.34	2.4×10^{-4}	-13
" Urea	"	5°	"	3.46	8.9×10^{-5}	-80

えて調べた結果、(1)がれの場合でも、これはこの水分量最小となるモル比で最も大
 主甘徳となり、モル比の増加と共に減り、これは減少した。

これらの結果から、糖やアミノ酸を加えて凍結乾燥すると凍結乾燥による変性を
 防御出来るが、このとき残存水分量となり減らすこと、そして残存水のDSC
 の回転の分子間時間などが極めて増大することから、相互作用-結合の度合いが著し
 く強化されることなどがわかった。概算するとアルブミンの場合、凍結乾燥して
 尚8%程度の水分が残存し、これが極性アミノ酸残基の約半分が分子表面に露出し

てこれに結合する。つまり極性アミノ酸残
 基量りの175と比べてほぼ単分子アの水和水
 が残り2と2である。モル比で防御物質が
 共存すると水和水量は5%、極性基量り0.47、
 このとき防御物質は極性基量り0.21となり
 ほぼ水和水量の減少に見合っている。(2)の
 ことから、糖やアミノ酸はその親水性の故に
 多量の水を捕獲することによって変性を防
 ぐのではなく、全く逆にその立体配置の許
 す限り残存水和水の一部と拮抗的に置換し
 て選択的水和水の形で水和水の結合サイトに

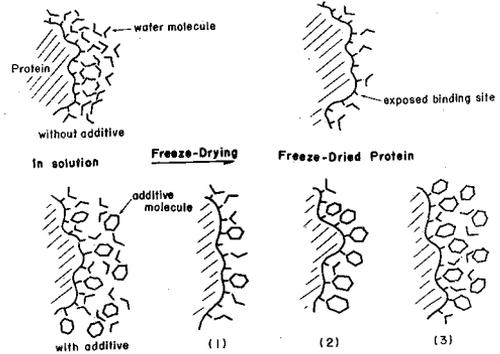


図6、糖やアミノ酸の防御機構を示す模式図
 残存水和水の一部と置換して結合サイトに入り
 下段(2) (モル比)のとき水分量最小と
 なり、変性防御に有効な最小濃度となる。

ネットワークを形成して水-蛋白質間の結合を強化させ、偶然的水和水を形成すること
 によって蛋白質分子全体の構造変化を防御すると考えられる。モル比を変え、防御物
 質の量が多くなるときは減りがえって減少すること、このときは多分子アにた
 り防御物質間相互作用と拮抗してかえって蛋白質との相互作用が弱くなるので、単分
 子アの場合の相互作用は最大となることと考へてよいと思はれる。(第6章)

糖やアミノ酸共存下では増大するのは、水分量減少に伴う平均水分子間距離の
 増加を反映していると思はれる。又、結晶アルブミンで比較するのは、水分量が
 多く多分子アを形成するので、水分子間相互作用と拮抗するものと考えられた。

磷酸緩衝液は凍結乾燥に対してある程度の防御効果を示し、この磷酸はミオシ
 ンの熱変性に対する防御剤として知られている。これは(1)が(前報での結果でも、
 水分量やDSCの結果で糖やアミノ酸と全く異なる挙動を示した)、今回の結果でも、
 中で互は対照中塩とほとんど変らず、これらの防御作用は水和水を介しての作用で
 はなりとことが今回の測定で明らかになった。恐らく磷酸基の強い荷電により、静電
 的相互作用で直接蛋白質分子の構造を安定化するものと想像される。

文 献

- 1) 花房尚史 1974. 低温科学 32, 1.
- 2) " 1977. 蛋白質・核酸・酵素 22, 301
- 3) フアラ-とバッカー, パルスおよびフーリエ変換 NMR. (赤坂, 井元記)
 吉岡書店, 京都. (1967)

(味の素中研) ○鈴木榮一郎、永嶋伸也

物質中の水和状態、とくに生体関連物質の水分特性の解明は、生物科学上、最も重要な問題の一つであるだけでなく、食品、医薬品、化粧品等の広範囲の産業にとって不可避の課題である。その為の研究手法としては、NMR法が、水および溶質プロトンの運動性を直接的に把握することができる点で有力である。^{1), 2)} 室温で物質中の水の状態を区別するには、NMR法の中でも、例えば、Carr-Purcell法により、スピンスピン緩和時間の多重性を解析する方法が掲げられるが、³⁾ これには、実験およびデータ処理上の難しさが伴うだけでなく、扱える対象に限界がある。それに対し、凍結法、特に我々の開発した広幅パルスNMR凍結曲線法、⁴⁾ 即ち、不凍水量と緩和時間を温度に対して連続的且つ自動的に測定する方法は、便利であると共に、応用範囲も広く、実際、例えば食品・医薬品の凍結乾燥技術に利用することができる。^{5), 6), 7)} 凍結法によって、生体系の水和状態を特色づけるには、Kuntzらの方法、即ち、不凍水の緩和時間の温度変化を(不連続的に)測定して、分子運動性を把握する方法がよく知られている。²⁾ 本報では、それとの比較についても、触れるが、主に、水の構造化(運動性低下)による過冷却等に由来する、凍結-解凍履歴現象を切り口として、生体高分子の水和特性を論じたい。

(実験方法)

図1に、装置の構成を示す。前回の報告⁸⁾ 後の改造点は、ミニコン(YHP, HP1000)と波形記憶装置(Kikusui, 8702S)を光ファイバーで連結している点である。本システム利点は、熱電対先端部を試料に直接接触させ、凍結-解凍過程でのプロトンの状態変化、すなわち、不凍水量(UFW^{*})とその緩和時間を、広幅パルスNMR(Bruker, minispec p20)を用いて、自動的に且つ連続的に測定、データ蓄積できる点にある。また、ミニコンは、プログラム開発(作成、変更、編集)が容易なものを使用しており、例えば、頻繁且つ綿密にNMR感度の補正ができる他、得られたデータの処理(平均、引算、変換等)も容易である。実際、前回に比べ今回は、ソリッドエコーの測定と緩和時間の相関時間への変換などに基づいた議論ができるようになった。

* unfrozen water の略。

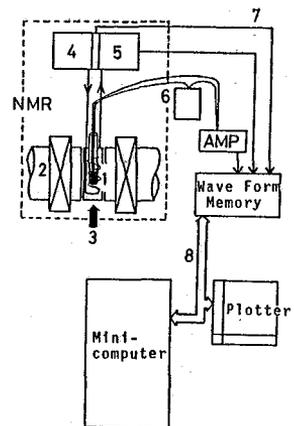


図1. 装置の構成

- 1: 試料、2: 磁石、3: 冷却/加熱用 N_2 ガス、4: 発信器、5: 受信器、6: 零度接点、7: サンプリングトリガー、8: インターフェースバス(HP-IB)。

An Investigation of Hydration Properties of Biopolymers
by Unfrozen Water Content and Spin-Spin Relaxation Time Measurements
with Proton Magnetic Resonance

(Ajinomoto Co.) E. Suzuki and N. Nagashima

(結果と考察) I. 不凍水の運動性

図2に、9%アルコール類水溶液の凍結後の解凍曲線を示す。エチレングリコールの例にみるように、X点で曲線が急に立ち上がるが、そのとき、ソリッド・エコーも観測され始める。ソリッド・エコーの条件は、 $90^\circ - \tau - 90^\circ$ ($\tau = 10\mu s$)なので、 T_2 が、 $10\mu s$ よりも長くなるとき、急激にその強度が増大すると考えられる。また、X点では、例えば熱分析を行なっても吸熱ピークが観測されないので融解現象ではなく、溶質・水の単なる運動性変化であるが、エタノール、メタノール、およびグリセロールの各水溶液のX点は、それぞれ、 $-143, -135, -63^\circ$ であり、それらのガラス点⁹⁾(それぞれ、 $-180, -170, -93^\circ$)の高低と同傾向である。

図3に、デキストラン(分子量6~9万)の40%水溶液の緩和時間の温度変化曲線を示す。本来、スピン-格子緩和時間 T_1 は、極小値をもつ性質のものであるが、この場合、多少下に凸ではあるものの、あまり明瞭でない。これについては、ヘモグロビン水溶液に関するKuntzらの解析でも示されているように、²⁾回転的ブラウン運動の相間時間 T_{cor} の分布に大きな広がりがあるためと考えられる。その点、スピン-スピン緩和時間 T_2 の方は、温度依存性が明瞭であるので、物性評価の手法として便利であろう。その場合、相間時間 T_{cor} に変換して使うと、物理的イメージがより明瞭になると思われる。

そこで、図4に、米および馬鈴薯澱粉の水分分散系(約40%濃度)の相間時間 T_{cor} の温度変化を比較した。生の澱粉粉末は、結晶性を有するが、前者はA型、後者はB型の結晶形と言われている。そして、A型結晶の結晶水は、量は少ないが強く束縛されているのに対して、B型のそれは、量が多く、自由度も高いとされる。¹⁰⁾ 図4は、そのようなA型、B型の違いをよく表わしていると言える。

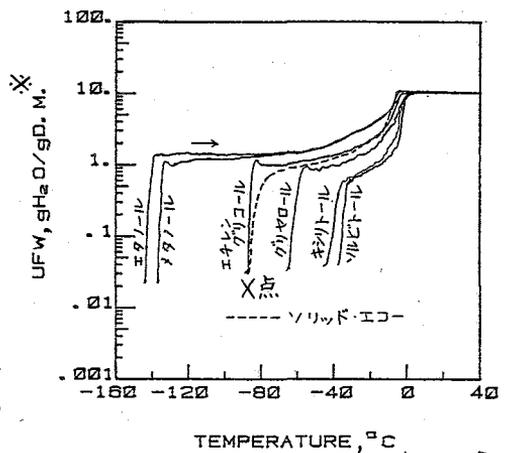


図2. 9%アルコール類水溶液の解凍曲線、*乾量(dry matter)基準

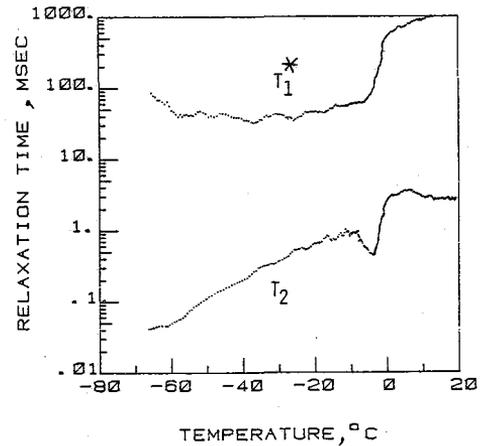


図3. 40%デキストラン水溶液の緩和時間の温度変化(解凍過程) * $90^\circ - \tau - 90^\circ$ ($\tau = 80ms$)法

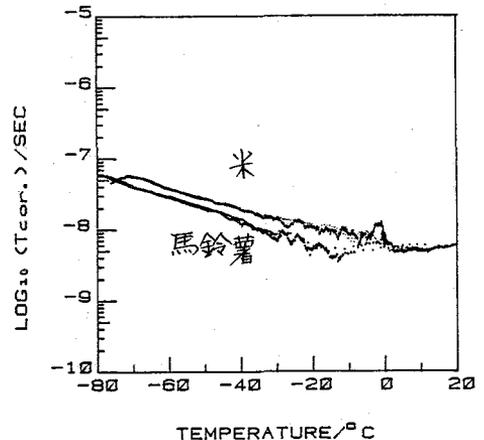


図4. 米および馬鈴薯澱粉-水分散系の相間時間の温度変化(凍結-解凍過程)

II. 生体高分子ゲル等に見られる凍結履歴現象

広幅パルスNMR凍結曲線法にすれば、凍結-解凍履歴現象を容易に測定することが可能である。図5は、小梅漬けの凍結履歴を示しているが、この場合、凍結過程で2度過冷却を起すなど、複雑な様相を呈していることに対応し、その原因も複雑であると考えられるが、一般に、凍結履歴現象の原因は、端的に言えば、単に過冷却のみである。しかし、比較的単純な系について、現象面から分類すると次のようになると思われる。

A. 糖アルコール、アミノ酸、ポリエーテルに見られる凍結水溶液中での再結晶と水和水の脱離氷晶化

図6は、9%ハイドロキシ-L-プロリン水溶液の顕著な凍結-解凍履歴現象を示す。これに対し、L-プロリン水溶液は、履歴を示さず対照的である。マンニール水溶液の例⁵⁾と同様、凍結過程で、溶質が結晶化する前段階のようなクラスターを形成して運動性低下を起し、解凍過程で、そのクラスターから水和水が脱離して氷晶化するという機構によって、解凍曲線上にピークPを有する。類似例は、セリンの場合に認められる他、(分子量6000の)ポリエチレングリコールで認められるが、互いに、X, Y, P, Q, R点は異なっている。

B. ゼラチンゲル中の水分子の運動束縛による過冷却と他の蛋白質との比較

図7は、グリシニン(大豆蛋白質11S)、 α_{S1} カゼイン、ゼラチンの3種類の蛋白質の水溶液を比較したものである。疎水性が強いと言われるグリシニンの不凍水量は少ないのに対し、親水性粘性ゲルを形成するゼラチンの不凍水量は多く、且つ凍結履歴を有する。また、 α_{S1} カゼインは、この両者の中間に位置し、中程度の凍結履歴を示すが、ゲル形成しないまでも、かなり高粘度の液体となることに対応する。凍結履歴現象は、対象系に、水分子を巻き込んだ強い分子間相互作用が存在する

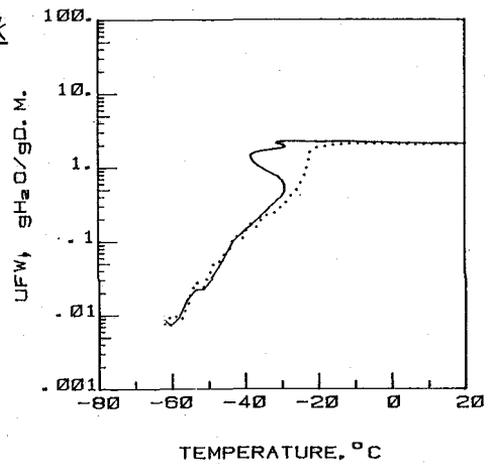


図5. 小梅漬けの凍結(—)および解凍(……)曲線

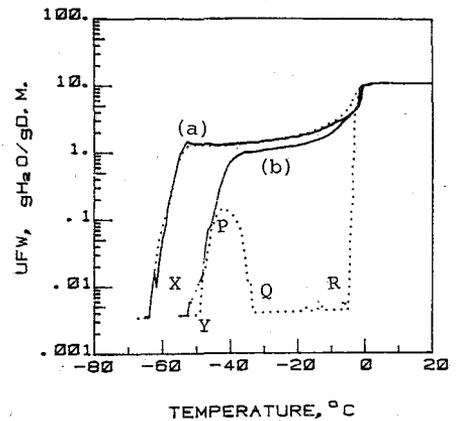


図6. L-プロリン(a)とハイドロキシ-L-プロリン(b)の9%水溶液の凍結(—)-解凍(……)曲線

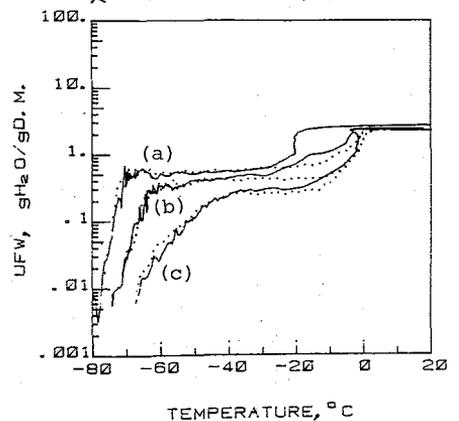


図7. 32%水性コロイドの凍結(—)-解凍(……)曲線(a)ゼラチン、(b) α_{S1} カゼイン、(c)グリシニン

とき、水分子は運動束縛を受け過冷却状態となるので、見出されると考えられる。

C. ツェイン、セルロース等の水に不溶な高分子の水分散系にみられる凍結履歴現象

図8(上)は、ツェイン(トウモロコシ蛋白質)および、綿セルロースの凍結解凍曲線である。ツェインの場合、 -37°C 付近で、不凍水の一部が凍結しているのがわかる。類似の例は、RNAについても見出されたが、不溶性物質のミクロ空間に束縛された水が、過冷却後凍結するのではないかと考えられる。Burkeらの研究¹¹⁾にあるように、融点 T_m の過冷却水の均一氷晶核形成の最低温度 T_h (homogeneous nucleation temperature)は、 $T_h = -38^{\circ}\text{C} + (1.8 \pm 0.4) T_m$ であり、ツェインの場合、 $T_m \approx 0$ の場合に相当する。これに対し、綿セルロースの場合は、図8(上)の(b)にみるように凍結履歴を示さない。しかし、図8(下)に示すように、緩和時間 T_2 の履歴現象は、ツェインと同様に観測されている。これは、例えばセルロースの結晶構造変化に対応した、水和水の運動性変化などの原因が考えられる。また、熱分析測定は、 -42°C に発熱ピークを観測し、それを、不凍水の凍結と誤まりがちだが、本法は、そのような間違いの防止にも役立つ他、熱分析に優る点が多いと考えられる。

以上、様々なタイプの凍結履歴現象をみる事ができた。

(文献)

- 1) J. M. Harvey, M. C. R. Symons, and R. J. Naftalin, Nature(London) 261, 435(1976).
- 2) A. Zipp, I. D. Kuntz, and T. L. James, J. Magn. Resonance 24, 411(1976).
- 3) P. S. Belton, R. R. Jackson, and K. J. Packer, Biochim. Biophys. Acta 286, 16(1972).
- 4) E. Suzuki and N. Nagashima, Chem. Lett. 1981, 181(1981).
- 5) E. Suzuki, Yakugaku Zasshi 101, 688(1981).
- 6) 永嶋、鈴木、化学工学協会第46年会研究発表講演要旨集、P66(1981)
- 7) 鈴木、永嶋、第4回糖質シンポジウム講演要旨集、p8(556.8).
- 8) 鈴木、永嶋、第19回NMR討論会講演要旨集、p85(1980.9).
- 9) 関葉三、化学と工業、23, 498(1970).
- 10) 二國二郎監修、中村道徳、鈴木繁男編集、"澱粉科学ハンドブック"(朝倉書店) p31(1977).
- 11) M. J. Burke, M. F. George, and R. G. Bryant, "Water Relations of Foods"(R. B. Duckworth ed.), p 111, Academic Press, London, 1975.

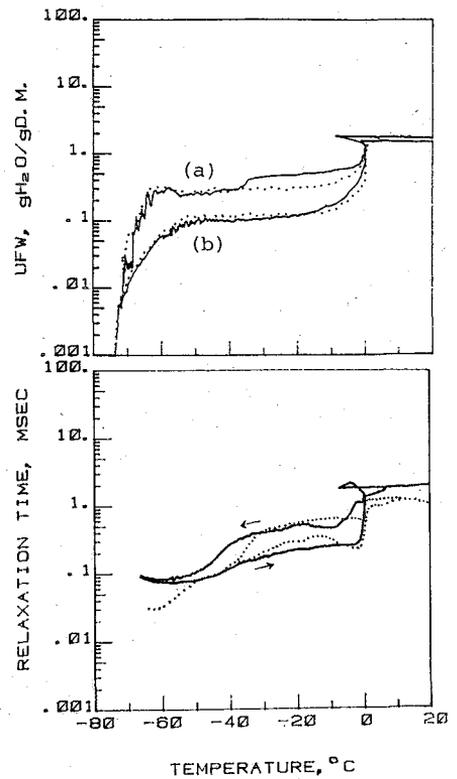


図8(上) 水分散系の凍結(—)解凍(.....)曲線。(a)ツェイン(31%)、(b)綿セルロース(39%)
(下) スピン-スピン緩和時間 T_2 の凍結解凍履歴現象 —: 綿セルロース、.....: ツェイン

(阪大蛋白研) 阿久津秀雄, 京極好正

【はじめに】

生体系は水溶性分子と巨大な分子集合体の巧妙な組み合わせにより、なり立っている。水溶性分子の構造及び機能の研究には高分解能NMRが大きな力を發揮している。特に超伝導マグネットが普及して以来、その進歩は著しい。一方、膜系、クロマチン等の巨大分子集合体についても、高分解能NMRの方法で取り扱う試みが行なわれたが、十分な成果を見なかった。むしろ、³¹P-NMRや³¹H-NMRの大幅なパクトルによる研究がこの方面では大きな成果を上げている。これは、巨大分子集合体の動的性質を考慮するならば当然のことと言える。こうして、DNAなどが固体NMRの手法を用いて研究されるようになって来た。しかし、生体系の巨大な分子集合体は生理的条件下では決して固体状態にはない。まさに液体と固体の中間にあると言える。固体NMRの方法がこのような系に対して、どのような利点と弱点を持っているかを明らかにすることは今後に残された課題である。

前回はクロスポーラリゼーション法(CP法)とシングルパルス法(SP法)を比較することにより、ポリプロピレンや、ポリエチレンにおける非晶質部分を検出できることを報告した¹⁾。われわれはこの方法が生体系の分子集合体の運動性を調べる手段となりうることを考え、二重膜としての存在様式と諸性質が様々な方法で調べられているジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)を用いて、検討を行なった。

【実験】 JEOL FX-100 NMR固体用システムに温度変化可能な³¹P高出力プロープヘッドを接続して、一定温度の下で高出力測定を行なった。振動磁場H₁は¹Hで12.5 Gauss、³¹Pで30.7 Gaussである。パルス照射による測定試料の温度上昇は試料容量が小さい程大きかった。測定に用いたクロスポーラリゼーション法(CP法)及びシングルパルス法(SP法)のパルス系列を図1に示す。mixing time, repetition timeはそれぞれ3 ms, 2.5 sである。mixing timeの最適値は16°C, 44°Cのチェックでは変わらなかった。又、コイルのチューニングは測定温度領域内ではほとんど変化しなかった。全温度領域に亘って、同じ繰り返し時間を用いる為に、SP法では45°パルス

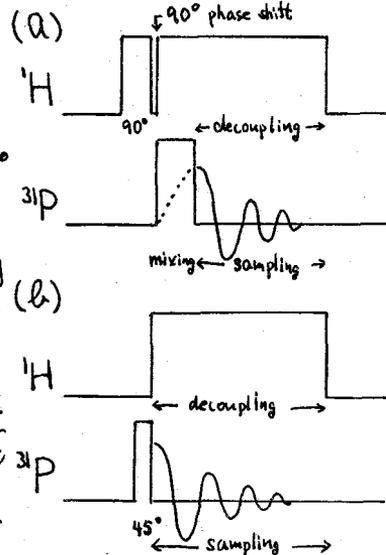


Fig.1 Pulse sequences of (a) cross polarization and (b) single pulse methods.

³¹P-NMR Studies on Lecithin Bilayers in the Gel State. Correlation between Efficiency of the Cross Polarisation and Mobility of the Headgroup of the Lecithin. (Osaka Univ.) Hideo Akutsu, Yoshimasa Kyogoku

を用いた。緩和時間の測定は inversion recovery 法によって行なった。試料は L- α -ジパルミトイルフォスファチジルコリン ($R_1-CH_2-CH(R_2)-CH_2-O-PO_2^-O-CH_2CH_2N(CH_3)_3^+$, $R_1=R_2=CH_2(CH_2)_{14}C(=O)-$) 50 mg を 0.5 ml の H_2O に $50^\circ C$ 懸濁し、3000 rpm で遠心して、測定に供した。

【結果】 DPPC 二重膜は $41^\circ C$ でゲル状態と液晶状態の間の相転移 (Main transition) を示し、 $33^\circ C$ 付近で pre-transition と呼ばれる小さな転移を示すことが知られている。図2にそれぞれの状態の温度領域に特徴的の ^{31}P NMR スペクトルを示した。CP法においても SP法においても高出力プロトシカッパリングをしているので、 $^1H-^{31}P$ の dipole broadening の除かれた典型的

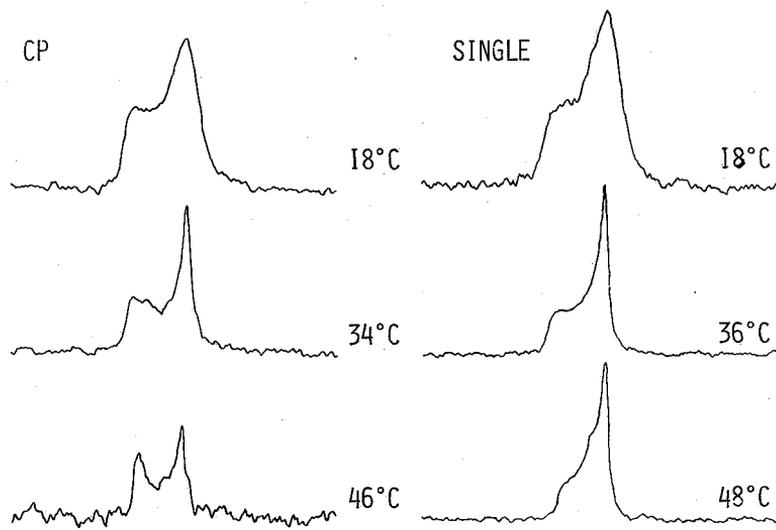


Fig.2 ^{31}P -NMR spectra of DPPC Bilayers at Different temperatures employing cross polarization method (CP) and single pulse method. mixing time: 3msec, repetition: 2.5s

なパウダー型スペクトルを示している。これらのスペクトルは液晶の状態においても ^{31}P 核は軸対称な運動を行なっていることを示す。その対称軸は膜面に垂直な方向 (レシチン分子の長軸) である。パウダー型スペクトルの両端の化学シフト差が化学シフトの異方性 ($\sigma_{||} - \sigma_{\perp}$) を与える。完全なゲル状態では、より rigid な状態を反映して、線幅 ($\propto \gamma^2$) も化学シフトの異方性も大きい。又、完全な液晶状態では、線幅は非常に狭くなり、化学シフトの異方性も小さくなっている。これはどちらの方法でも得られたスペクトルにも共通して見られるものであるが、強度変化は CP法と SP法で著しい違いを見せている。図3にそれぞれの方法によって得られた強度を温度に対してプロットした。SP法では温度による強度変化はあまり見られぬが、

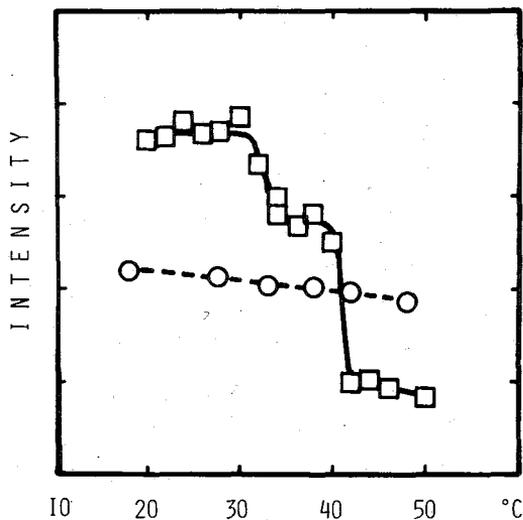


Fig.3 Temperature dependences of the signal intensity of DPPC bilayers. □: CP, ○: single pulse (76)

CP法では二つの温度領域で大きな変化が見られる。低温側の32°C付近はDPPC二重膜の pretransition の温度に対応し、41°C付近は main transition の温度に対応する。非固体では、交叉緩和時間 T_{1s} 本常に T_{1p} よりも小さいとは限らない。従ってその場合のクロスポーラリゼーションの効率 η は T_{1s} と T_{1p} の拮抗によって決まる。 T_{1s} は核の運動性と密接に関連しているが、特に系のスピン温度が成立しなくなるような領域で大きな変化が起ると考えられる。液晶状態でのDPPCの膜と垂直な軸のまわりの回転の相関時間 (τ_{11}) は誘電分散²⁾、や ESR³⁾ から、 10^7 sec の order であることが知られている。又、ESRの結果は pretransition のあたりで $\tau_{11} \approx 0.9 \times 10^{-6}$ sec、ゲル状態 (25°C) で $\tau_{11} \approx 5 \times 10^{-6}$ sec である³⁾ としている。

クロスポーラリゼーションの効率の温度依存性に見られた傾向は化学シフトの温度プロットにも表われている。図4に見るように 32°C 及び 40°C 付近で不連続的な変化が見られる。化学シフトの異方性 ($\Delta\sigma = \sigma_{11} - \sigma_{\perp}$) は秩序パラメータを用いて次のように表わせる⁴⁾。

$$\Delta\sigma = S_{11}(\sigma_{11} - \sigma_{22}) + S_{33}(\sigma_{33} - \sigma_{22}) \dots \dots (1)$$

ここで、 σ_{11} , σ_{22} , σ_{33} は ^{31}P 核の化学シフトテンソルの主値であり、 S_{11} , S_{33} は ^{31}P の化学シフトテンソルの基準座標の X 軸及び Z 軸の秩序パラメータである。基準座標は分子に固定されているので、その秩序パラメータは分子の運動と、静的構造の二つの寄与よりなる。この両者が独立であれば、

$$S = S(\text{fluctuation}) \times S(\text{geometry}) \dots (2)$$

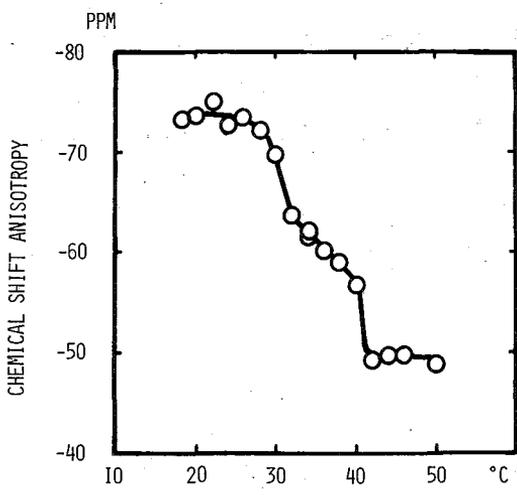


Fig. 4 Chemical shift anisotropy of phosphorus in DPPC bilayers as a function of temperature.

の関係がある。従って、化学シフトの異方性の変化から単純な結論を引き出せない。それは動的変化と共に構造的変化を含まれている可能性があるのである。ここにおける $S(\text{fluctuation})$ は軸対称な運動かたのずれを示すものであり、先に挙げた τ_{11} とは直接結びつくものではない。

極性基の運動性を直接調べるには、 ^{31}P 核の縦緩和時間 T_1 を見てみるのが一番よい。勿論、極性基の運動は著しい異方性を示すから、緩和時間が直ちに運動の相関時間を求めることはできない。しかし、緩和時間の温度依存性より、相

関時間のオーダーについて見当をつけることができる。42°C以上の液晶状態では T_1 は温度上昇と共に増大し、所謂 fast correlation time regime にあることを示している。実際、既に述べたように様々な方法によって得られた相関時間は 10^{-9} sec 程度である。一方、完全なゲル状態にある 30°C 以下では、緩和時間は温度と共に減少し、30°C で極小に近くなっている。このことは、ゲル状態では相関時間 τ_{11} は所謂 slow correlation time regime にあり、30°C 付近で 10^8 sec のオーダーに近しいことを示す。この結果は先に引用した ESR の結果と定性的な一致を示している。

る。

[考察]

図3の結果及び、スピ
ン格子緩和時間の結
果は、クロスポーラリ
ゼーションの効率が
 10^{-8} sec 付近の相対時
間を持つ運動に対して
非常に鋭敏であること
を示している。このこ
とは¹Hと³¹Pの交叉緩和

時間が大きく変化する
領域がこの付近にあることを示している。化学シフトの異方性の温度依存性も
図3と同様な傾向を示す。しかし、クロスポーラリゼーションの効率の方が化学シ
フトの異方性に較べて、運動性の情報を直接反映していると言える。

DPPC二重膜の相転移は、様々な手段で調べられている。41°Cで起る main
transition は至ての方法で観測されている。しかし、33°C付近で起る pre-
transition は熱測定で最初に観察され、ラマニア 螢光等で炭化水素鎖部分を
見る場合にはこの温度領域に変化が観測された。しかし、極性基を特異的に重水素化し
たものの ²H-NMR や ³¹P-NMR 等、極性基部分をフローブとした NMR 測定では
この温度領域に不連続的な変化が観測されなかった⁵⁾。しかし、今回高出力フロ
ーブヘッドを使用することにより、今まで変化がないと考えられていた化学シフトの異
方性にも不連続的な変化が見られたことが明らかとなった。更に、クロスポーラリ
ゼーションの効率は、より鋭敏に pretransition の存在を反映している。従って、
pretransition には炭化水素鎖よりなる疎水性領域ばかりでなく、極性基部分も関
与していると結論できる。

DPPC AT 32°C

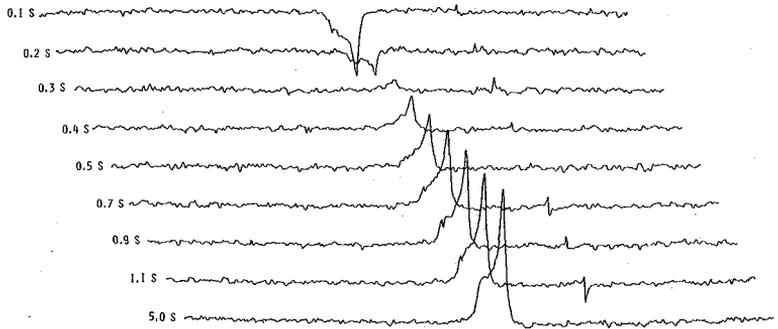


Fig. 5 T₁ measurement according to the inversion recovery method. DPPC bilayers at 32°C

[文献]

- 1) 前田史郎, 寺尾武彦, 雑誌西陽 (1979) 第18回NMR討論会要旨集 789
- 2) J.C.W. Shephard and G. Büdtk (1978) Biochim. Biophys. Acta 514, 83-94
- 3) D. Marsh (1980) Biochemistry 19, 1632-1637
- 4) J. Seelig (1978) Biochim. Biophys. Acta 515, 105-140
- 5) H.U. Gally, W. Niederberger und J. Seelig (1975) Biochemistry 14, 3647-3652

九犬・葉 °古賀けり子、高野律子、金沢洋子

〔序〕

NMRによる生体モデル膜の研究は広くおこなわれており、多くの知見が得られている。我々はリン脂質ベシクル系の動的構造を¹⁴N NMRを用いて研究している。今回は¹⁴N NMRに加えて¹³C NMRを併用し、レシチン(PC)ベシクル、PC・コレステロールベシクル、PC・フォスファチジン酸(PA)ベシクルを観測した。さらに、吸入麻酔剤と生体膜の相互作用のモデル的研究としてPCベシクル分散液、PC・PAベシクル分散液に低濃度のCHCl₃を吹まつけ、PC分子極性基部分の分子運動および分子間相互作用を研究した。

〔実験〕

PCは卵黄よりSingletonらの方法により得た。PAはPCにキャベツより抽出したフォスホリパーゼDを作用させて得た。PC、PC・コレステロールあるいはPC・PA混合物をBanghamらの方法に従って分散させ多重層膜を作製し、超音波処理(40 kHz)によりベシクルとした。CHCl₃は気液平衡の方法により添加した。

¹⁴N NMRはJEOL-PS-100電磁石と自家製パルスFTシステムにより7.2 MHzにて測定した。T₁は180°-τ-90°パルス系列により、T₂は線巾より得た。¹³C NMR測定はJEOL-FX-100にて25 MHz、パルスFT法によりおこなった。

〔解析〕

¹⁴N (I=1) の核緩和時間は、 $\omega_0 \tau_R \ll 1$, $(e^2 q Q / h) |S| \tau_R \ll 1$ の時次式であらわされる。

$$\frac{1}{T_1(^{14}\text{N})} = \frac{3}{10} \pi^2 \left(\frac{e^2 q Q}{h} \right)^2 \left\{ \left(\frac{\tau_R}{1 + \omega_0^2 \tau_R^2} + \frac{4\tau_R}{1 + 4\omega_0^2 \tau_R^2} \right) S^2 + 5\tau_R f(S) \right\} \quad (1)$$

$$\frac{1}{T_2(^{14}\text{N})} = \pi \cdot \Delta\nu = \frac{3}{10} \pi^2 \left(\frac{e^2 q Q}{h} \right)^2 \left\{ \left(\frac{3}{2}\tau_R + \frac{5\tau_R}{2(1 + \omega_0^2 \tau_R^2)} + \frac{\tau_R}{1 + 4\omega_0^2 \tau_R^2} \right) S^2 + 5\tau_R f(S) \right\} \quad (2)$$

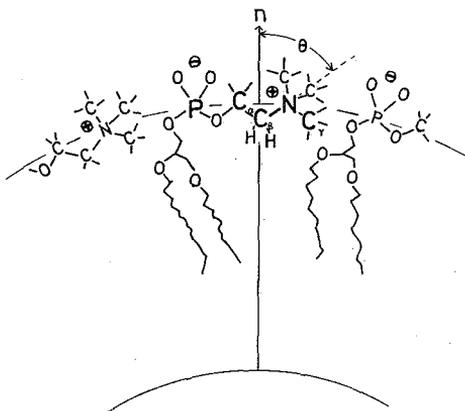
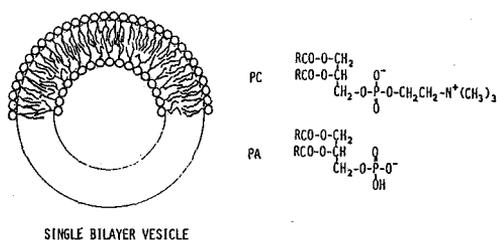


図1. リン脂質ベシクル

Molecular motion and intermolecular interaction in phospholipid membranes studied by ¹⁴N, ¹³C NMR

(Kyushu Univ.) °Keiko Koga, Ritsuko Takano, Yoko Kanazawa

ここで、 ω_0 はラーモア周波数、 e^2qQ/\hbar は四重極結合定数、 δ は角度 θ (図1参照) に関するオーダーパラメータ、 τ_r は $N-C\beta$ 軸のはやり局所的運動による再配向相関時間、 τ_R は遅い運動による再配向相関時間である。 τ_R に寄与する運動には 媒体中でのベシクルの回転運動 (相関時間 τ_a) と脂質の膜面内並進拡散運動 (τ_d) の2種類存在し次式であらわされる。

$$\frac{1}{\tau_R} = \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_d} = \frac{3kT}{4\pi a^3 \eta} + \left\langle \frac{6D}{R^2} \right\rangle \quad (3)$$

a はベシクルのストークス半径、 D は脂質の膜面内並進拡散係数である。

PC分子中の ^{13}C 緩和時間は主として直接結合している 1H との双極子相互作用により支配され、 $\omega_0 \tau_r \ll 1$ のとき次のようにかける。

$$\frac{1}{T_1(^{13}C)} = 2 \left(\frac{\hbar}{2\pi} \right)^2 \frac{\gamma_H^2 \gamma_C^2}{r_{CH}^6} \tau_r' \quad (4)$$

ここで、 r_{CH} は ^{13}C と 1H との距離、 γ_H と γ_C はそれぞれ 1H と ^{13}C の磁気回転比、 τ_r' は $C\beta-H$ 軸のはやり局所的運動による再配向相関時間である。 τ_r' が τ_r と等しいとすれば ^{14}N , ^{13}C 緩和時間より窒素原子のまわりの電場勾配を e^2qQ/\hbar として求めることができる。

[結果]

PC系

PC ベシクル (20-50°C)、DPPC ベシクル (24-65°C) の ^{14}N の T_1 , T_2 を測定し、 n -ヘキシルトリキシルアンモニウムブロミドの四重極結合定数 ($e^2qQ/\hbar = 111 \text{ kHz}$)⁽¹⁾ を用いて解析した結果を既に報告した⁽²⁾。今回 PC ベシクルの β 位炭素の T_1 を測定し、式 (1)(2)(4) に従って解析することにより得た $e^2qQ/\hbar = 129 \text{ kHz}$ を用いて

PC ベシクル、DPPC ベシクルの ^{14}N 緩和時間の解析をおこなった。PC、DPPC に対してそれぞれ $D = 6 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (20°C) および $D = (11 \sim 14) \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (50°C) を得た。

PC・コレステロール系

図2に PC・コレステロールベシクルの ^{14}N の T_1 と T_2 をコレステロールのモル分率 (X_{chol}) に対して示す。 X_{chol} の増加に伴って $T_2(^{14}N)$ は減少したが $T_1(^{14}N)$ には変化はみられなかった。 $X_{chol} = 0.35$ および $X_{chol} = 0.39$ における PC・コレステロールベシクルの β 位炭素の $T_1(^{13}C)$ において PC 系とのあいだに差は認められなかった。したがって ^{14}N および ^{13}C の緩和時間より求めた e^2qQ/\hbar

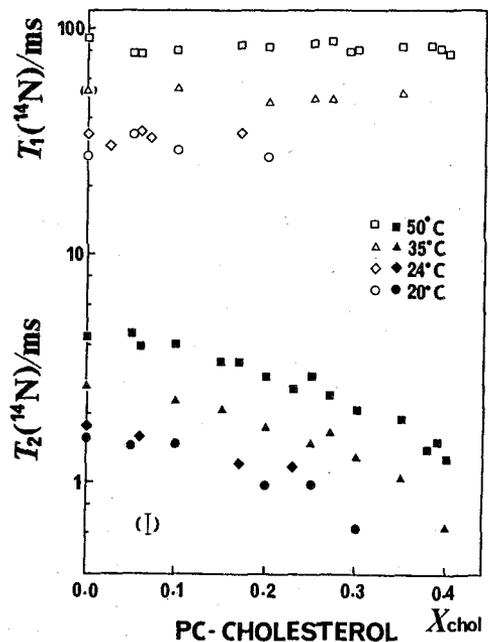


図2. PC・コレステロール系の ^{14}N の T_1 , T_2

にも PC 系との間に差が認められなかった。

PC-PA系

PC-PA ベニクイル ($X_{PA}=0.2$) においては e^2qQ/h は PC ベニクイルと比べて 30% 増加した。しかし T_1' には PC-PA 系と PC 系の間で差は認められなかった。

PC+CHCl₃系および PC-PA+CHCl₃系

PC-PA ベニクイル分散液に CHCl₃ を添加した時、低濃度すなわち CHCl₃ の分圧 2×10^{-4} atm 付近において ¹⁴N の T_1 , ¹³C の T_1 とともに極大を示した (図3)。¹³C の T_1 の結果は低濃度において T_1' に極小が存在することを示している。¹⁴N と ¹³C の緩和時間をあわせて解析することにより求めた e^2qQ/h は CHCl₃ の添加により急激減少を示した。CHCl₃ 添加による β 位炭素の ¹³C の化学シフトの変化は実験誤差内で検出されなかった。(β 位炭素は P と N とのカップリングを持つため線幅が広く化学シフトの測定精度は ±0.1 ppm であった。) PC ベニクイル分散液に CHCl₃ を添加した場合も PC-PA 系の場合と同様に CHCl₃ の低濃度において ¹⁴N の T_1 に極大値が観測された。しかしこの変化量は PC-PA 系の 70% ほどに比べて小さく 20% であった。

[考察]

¹³C と ¹⁴N の緩和時間をあわせて解析することによりいくつかのベニクイル系における e^2qQ/h を得ることができた。この方法により求めた e^2qQ/h は 1e_g のゆらぎの効果を含んだ量であるが、今のところゆらぎによる効果を見積ることのできないので (1)(4) 式に従って求めた値をそのまま e^2qQ/h とおいた。 e^2qQ/h の大きさは PC-PA 系 ($X_{PA}=0.2$) においては PC 系と比べて 30% 増加した (表1)。しかし PC-コレステロール系 ($X_{chol}=0.35, 0.39$) においては PC 系との間に差は認められなかった。PC 系に対してコレステロールを添加した時、PC の極性基間の距離が変化すること知られているが、その効果は $X_{chol} < 0.39$ においては e^2qQ/h に大きな影響を与

Table I. QUADRUPOLE COUPLING CONSTANTS ±15 kHz

Sample	Temp./°C	$\frac{e^2qQ}{h}$ /kHz	
PC	28	129	
	30	123	
	51	114	
PC-CHOL	$X_{chol}=0.35$	28	122
	$X_{chol}=0.35$	50	127
	$X_{chol}=0.39$	28	130
PC-PA	$X_{PA}=0.2$	30	161

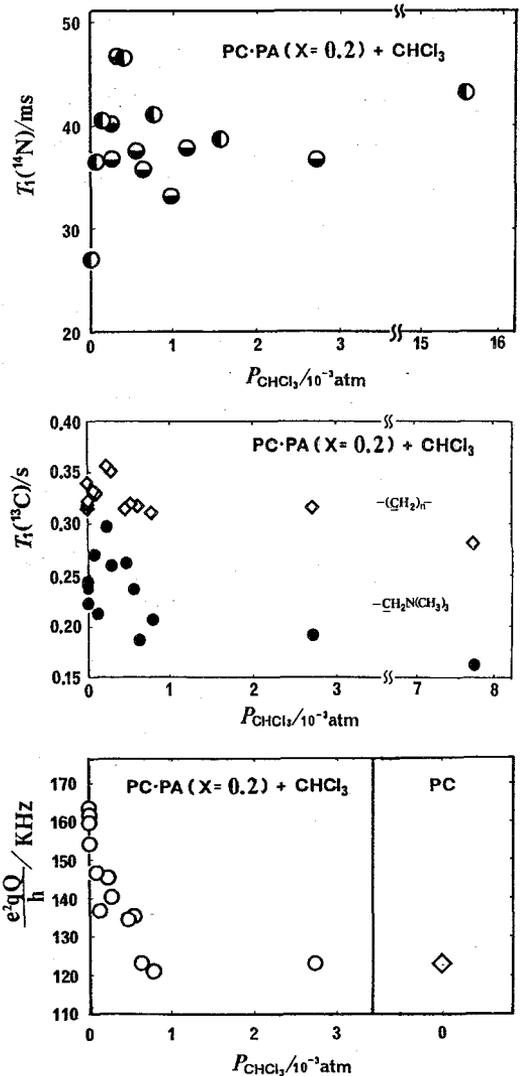


図3. PC-PA系におけるCHCl₃の効果(30°C)

えなりことかわかった。コレステロールは中性脂質であることを考慮すれば、酸性脂質であるPAの20%の添加による e_{290}/ρ の顕著な増加は膜表面における荷電状態の変化がPCの窒素原子のまわりの電場勾配に影響を及ぼすことを示している。CHCl₃添加によるPC-PAヘシクルの e_{290}/ρ の減少は、PC-PA系において正電荷に比べて過剰に存在するPO₄⁻基の負電荷の効果かCHCl₃との相互作用により弱められたためであると考えられる。

神経膜は酸性脂質を含んでいること、吸入麻酔剤の臨床的濃度が0.1~0.01 atmであり、神経膜に到達するのはそのうちの一部であることを考慮すればPC-PA系において、分子運動、電場勾配ともにCHCl₃の分圧 2×10^{-4} atm付近と低い濃度で変化がみられたことは、リン脂質ヘシクル-吸入麻酔剤系が吸入麻酔剤と生体膜脂質との相互作用を研究する上での良いモデルとなり得ることを示唆している。従来、麻酔作用は脂質の炭素鎖部分の流動性の増加により説明されることが多かったが、最近吸入麻酔剤では脂質の極性基部分との相互作用が重要であるという報告が出はじめであり⁽¹⁾、本研究の結果からも極性基部分への相互作用が示された。

さらに、プローブ分子として異物を用わずに膜中の脂質分子の並進拡散係数を求めることは膜系における物性と生理作用との関連を考えていく上で重要である。

(1)(2)(3)式に従って脂質の膜面内並進拡散係数Dを求めるためには α および ^{14}N の $(e_{290}/\rho) \cdot S$ を正確に求める必要がある。 α は現在測定中である。リン脂質膜系の ^{14}N NMRの四重極分裂が最近Jeffreyらのグループによって報告され⁽⁴⁾、 $(e_{290}/\rho) \cdot S$ が実測可能であることが示された。ところで四重極分裂において観測される $(e_{290}/\rho) \cdot S$ はヘシクルにおける T_R の時間スケールでは既に平均化された量である。一方、より早い時間スケールの運動に伴う電場勾配 $|e_{290}|$ のゆらぎが ^{14}N の T_1 と T_2 に寄与している可能性が残されておりこの点についてはさらに検討が必要である。

- (1). U. Henriksson et al., J. Phys. Chem., 81, 76 (1977).
- (2). K. Koga and Y. Kanazawa, Biochemistry, 19, 2779 (1980).
- (3). D. D. Shieh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73, 3999 (1976).
- (4). D. J. Siminovitch et al., FEBS Lett., 112, 79 (1980).

藤原 鎮 男

東大で戦後の荒廃の研究室で、僅かに可能の研究活動として高周波分析を始めた¹⁾。その機縁で電気通信大学でNMRを始めた。当時はBlockやPurcellの原報は日本に入っていないので、すべて手探りで、部品も手作りであった。電磁石も分光計も手作りで、最初の装置の費用は23万円の支出であった。それ以来、研究の必要に迫られ、つぎつぎに装置をつくり今日に至った。その間、一貫して努めたことは計算機の活用であり、当初はミニコンの利用で始まり、ついで大型計算機セクターシステムとのオンライン化に進んだ。とくに努力したのは変調波のフーリエ変換の活用で、それはポーログラフィーおよびESRについて好結果を得ることが出来た。

1 装置

1	1946	高周波分析	9	1964	迅速掃引NMR
2	1950	手製NMR分光計	10	1970	イオンサイクロロン分光計
3	1954	高分解能(イリノイ)	11	1970	オンラインポーログラフ
4	1957	全(電通大)	12	1972	相関NMR
5	1959	国産全	13	1972	FTポーログラフ
6	1960	小型ESR	14	1979	ST-ESR
7	1963	高分子用広巾NMR	15	1980	オンラインイオン選択性電極
8	1965	大出力ESR			

2 企画

NMRの研究の進展に伴って、内外に知人のおまし、これらの方達の協力によって下記の事業を行った。多くの人達によりそれぞれが、隆昌であり慶賀にたえない。

- 1 第1回日本化学会NMR討論会 1960
- 2 The 1st Intern'l Conf. on Mag. Res., Tokyo, 1965
- 3 NMR Committee of JCS for accumulation of NMR data, 1970
- 4 The 9th Int. Symposium of Mag. Res. on Biol. Systems, Nara, 1978

3 研究

アンモニア水中の化学種の決定に始まる状態分析、アミノ酸のコンホメーション、高分子のモデル化合物のコンホメーションに始まる生体系の研究、コバルト錯体その他にわたる錯体化学の研究、炭素についてのESRに始まるwhole tissue analysis、ホットイオンの系統的的研究等、これらは、化学の各部門に何れも新局面を開拓したものであり、それぞれに、現在有為な研究者が育ち、また内外に重要な在り界となっている。

高周波分析

試薬も装置も思うに任さない当時であつたので、秋葉原で進駐軍放出の真空管を2450銭で買い、発振器をつくつた。その同調回路のコンデンサーに植物の葉を置いて青ないし赤の光をあけると発振管の陽極電流が変化するのであつた。² これは非破壊の状態分析で、生体系の全分析のはしりであり、後年 ESR で葉の研究をするに至つたのも同じ趣旨である。昭和24年、電気通信大学に職を得、赴任したか、この前後に風聞で核磁気共鳴というものを知り、高周波分析を磁場の中で行なうものとなつた。

オ1号 NMR 分光計^{3,4,5}

そこで全く文献の無い状態で NMR 装置の製作にかつた。自製の電磁石で、当時は微細な電流制御と可能にする抵抗もないので、磁場を固定して、共振回路に加える電波の周波数を100 Hz づつ動かして出力をみて共鳴を探した。この方式で H, Na, Cu-63, -65, Br-79, -81, In-113, 少しおくれて N-14 と Co-59 の信号を検出した。標準電波をレレーバでうけて共鳴点を校正したので測定値は当時としては正確なものであり、当時よい値が知られていなかった Cu-63, -65 は米国原子力委員会編纂の原子核データ表に登載された。⁶

高分解能 NMR 分光計

1953年から1955年にかけて、イリノイ大学 Gutowsky 教授のもとで、Charles Holm 氏、Tom Farrer 氏らと永久磁石を用いる高分解能 NMR 分光計の製作にたづさわつた。Stanford で始められた試料管のスピニングで分解能が一等にあがり、エチルアルコールの超微細構造が観測された。藤原は、アンモニア水の NMR から化学種として NH_4^+ も、 NH_3 もない、700 MHz の交換系であることを示し、⁷ 当時、化学教育で論争していた論議を解説し、本人はまた「状態分析」の着想を得た。このときの装置では、臭化ベンゼンの微細構造が二重線以上に分かれなかつた。

1955年に帰国すると、科学研究費の援助でイリノイ大学でつくつた装置の部品を全部一式輸入し、イリノイの装置の再現をはかつたところ、分解能が0.3~0.5 Hz の装置をつくることゝ出来た。よつて、林昭一、清水博氏と一フウ化ベンゼンのスペクトルをとり、多重線であることを証明することゝ出来た。これは、イリノイ以来の宿題であつた一置換ベンゼンの陽子スペクトルは二重線であるのか、臭多重線であるのかという問いに答えたものである。すなわち、当時は Mulliken 教授の分子軌道論の勃興期であり、それによれば、一置換ベンゼンの環プロトンの電子は一本線であるのか（それなら二重線）局在性であるのか（それなら多重線）確然といふ難い状況にあつたのであつて、本結果はその解答である。さらに、当時は東京において新鋭の PC-2 高速電子計算機が動き始めたので、6スピニング系、オルソ、メタ、パラの別をつけて解析を行ない、実験のスペクトルを理論的に言正明した。^{8,9)} この解析は Pople, Schneider らのカマフラール-2 に先がけて6スピニング系を行つたものである。

磁気共鳴による化学的研究

1960年東大理学部に配置がえになったのちは、NMR, ESRを武器として、種々の化学系にある興味のある問題を説明してゆくことに努めた。

まずアミノ酸の詳細な研究を行うこととし、桃井荒田と最初の研究を行ない^{10, 11)}。オ1回生体系の磁気共鳴国際会議(MRBS)ホストン1964に招待講演として報告し、その後、小倉¹²⁾、石塚^{13, 14)}らの研究につき、さらに同系列の研究として、高分子モデル化合物のコンホメーション¹⁵⁾、溶媒効果¹⁶⁾の研究となり、グルタマオン¹⁷⁾に進み、ペニシリンなどの生体系物質の研究に連¹⁸⁻²¹⁾た。(藤原謙、植月正雄、袋井登美、Kozrowsky, 三森文行)

他方、山崎、矢島、小池、原口らは、Co²²⁾、Al²³⁾、Cu²⁴⁾、In²⁵⁾などについて手製の装置で困難を冒して克明な研究を行った。これにより、Co-NMRの加成性^{26, 27)}、Al-NMRのシフトと配位子場との関連が明らかにされた。この間合成されたコバルト錯体は500種に及び大きなコレクションとなり、これを電離性高エネルギー線(Co-60ガンマ線、ナールX線)で照射して異常系価コバルト(低スピンのCo(II))を得、ESRで徹底的な研究を行った(渡部)。この種のイオンはホットイオンと假に名付けられ、Ni, Pd, Pt, Ir, Rhなどの錯体に及んだ。この研究に当たったのは、渡部、坂口、中村、日笠、古田、天野、井上などの諸氏であり、また磁谷らは、Zn, Cd, Hgのホットイオンを研究した²⁸⁻³³⁾。

錯体の研究は東京大学で年来のテーマである。従って演者も磁気共鳴を武器として研究につとめ、以上のほか、Ti(III)(長島、岡、Codell)³⁴⁾、Ti(III)ESRの緩和機構³⁵⁾(渡部)、Co錯体の立体構造異性³⁶⁾、全加水分解速度³⁷⁾などの研究を行った。

以上の間、一貫して演者の興味の対象となった問題は、分子のコンホメーション、すなわち、周囲に対する異方性と、それが分子運動により平均化されて等方的な分光特性を示す場合との境界を知ることであった。この境界で分子一個当りに許される溶媒空間を分子空間と呼ぶとすると、これを実験するには分子分光法たるNMR、ナールESRが最適であり、また架橋PVA(ポリビニルアルコール)などの外的な空間規制とすることも有用であろう。この観点で種々実験を行ない^{38, 39)}、また理論(量子化学的)計算をも行ない^{40, 41)}、その大きさは約20±5Å立方とされ、さらにスピンラベルを用いた精細な研究では12~15Åの直径の球⁴²⁾と考えられるに至った。この状態が、イオン(水和)の自由回転が許される限界の大きさであるか、あるいはあることは、これを濃度に換算すると海水の塩濃度に当り⁴³⁾、ヒトの血液の塩濃度もほぼ分子空間域にあることである³⁸⁾。この状態のさらに詳細な研究は、現在も継続中⁴⁴⁾であり今後も考察をつづけてい新在である。(水和の観念で)

なお冒頭に述べた蚕のESRは、受精後の卵より幼虫となり成虫となる過程のESRで追跡され、その糸繭である色素の形成過程とも関連し興味ある研究テーマである。

文 献

- 1) 高周波分析法による銅グリシン錯体の組成の研究
中埜邦夫, 藤原鑑男, 岡村英雄, 東大放射研究報告, No. 4, 24 (1946)
- 2) Stable Apparatus for High-Frequency Analysis
K. Ishii, S. Hayashi and S. Fujiwara, Anal. Chem., 31, 1586 (1959)
- 3) Chemical Analysis by the Measurements of Nuclear Moment
S. Fujiwara, Bull. Chem. Soc. Japan, 24, 116 (1951)
- 4) 核磁気共鳴吸収の化学への応用 (I)
藤原鑑男, 林 昭一, 電気通信大学学報, No. 3, 101 (1952)
- 5) Construction of the Apparatus for the Measurements of Nuclear Magnetic Resonance with Broad Line-Width
S. Fujiwara and S. Hayashi, Reports of the University of Electro-Communications, 8, 95 (1956)
- 6) H. E. Walchli, " A Table of Nuclear Moment Table",
Oak Ridge Res. Lab., U.S. Atomic Energy Commission, 1952
- 7) Proton Magnetic Resonance and Structure of Ammonium Hydroxide
H. S. Gutowsky and S. Fujiwara, J. Chem. Phys., 22, 1782 (1954)
- 8) High Resolution Spectrum of Proton Resonance in Fluorobenzene
S. Fujiwara, M. Katayama, S. Hayashi and H. Shimizu, Proc. Japan Acad., 34, 432 (1958)
- 9) Analysis of the Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of a Six-Spin System of Mono-fluorobenzene
S. Fujiwara and H. Shimizu, J. Chem. Phys., 32, 1636 (1960)
- 10) Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Amino Acids and Their Derivatives. I
S. Fujiwara, Y. Arata, N. Hayakawa and H. Momoi, Bull. Chem. Soc. Japan, 35, 1658 (1962)
- 11) Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Amino Acids and Their Derivatives. III
S. Fujiwara and Y. Arata, Bull. Chem. Soc. Japan, 37, 344 (1964)
- 12) NMR Study of Amino Acids and Their Derivatives. IV. Structure of Serine in Aqueous Solutions
H. Ogura, Y. Arata and S. Fujiwara, J. Mol. Spectroscopy, 23, 76 (1967)
- 13) NMR Study of Amino Acids and Their Derivatives. V. Structure and Formation Constant of Zinc-L- Aspartic Acid Complexes in Aqueous Solution
H. Ishizuka, T. Yamamoto, Y. Arata and S. Fujiwara, Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 468 (1973)
- 14) NMR Study of Amino Acids and Their Derivatives. Dissociation Constant of Each Rotational Isomer of Amino Acids
S. Fujiwara, H. Ishizuka and S. Fudano, Chem. Lett., 1281 (1974)
- 15) Proton Resonance Spectra and Stereochemical Configuration of Polyvinyl Acetate and Its Model Compounds
K. Fujii, Y. Fujiwara and S. Fujiwara, Makromol. Chem., 89, 278 (1965)
- 16) Conformation Determination of 2,4-Pentanediol by Nuclear Magnetic Resonance
T. Fukuroi, Y. Fujiwara, S. Fujiwara and K. Fujii, Anal. Chem., 40, 879 (1968)
- 17) Conformation Study of Glutathione by NMR
S. Fujiwara, G. Kozłowska, and H. Kozłowski, Bull. Chem. Soc. Japan, 50, 3131 (1977)
- 18) NMR Study of Spontaneous Degradation of Penicillin G in Aqueous Solution
F. Mitsumori, Y. Arata, S. Fujiwara, M. Muranaka and Y. Horiuchi, Bull. Chem. Soc. Japan, 50, 3164 (1977)
- 19) The Phosphate on the Iron Core of Horse Spleen Ferritin as Studied by a ⁵¹H NMR Probe Method
N. Imai, H. Terada, Y. Arata and S. Fujiwara, Bull. Chem. Soc. Japan, 51, 2538 (1978)
- 20) Use of Proton Correlation NMR Spectroscopy in the Study of Living Cells. Anaerobic Metabolism of Escherichia coli
T. Ogino, Y. Arata, S. Fujiwara, H. Shoun and T. Beppu, J. Magn. Resonance, 31, 523 (1978)

- 21) Proton Correlation Nuclear Magnetic Resonance Study of Anaerobic Metabolism of *Escherichia coli*
T. Ogino, Y. Arata, S. Fujiwara, H. Shoun and T. Beppu, *Biochemistry*, **17**, 4742 (1978)
- 22) Nuclear Magnetic Resonance Studies on Cobalt Complexes. I. Cobalt-59 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Cobalt (III) Complexes
A. Yamasaki, F. Yajima and S. Fujiwara, *Inorg. Chim. Acta*, **2**, 39 (1968)
- 23) Aluminium Complexes in Solution as Studied by Aluminium-27 Nuclear Magnetic Resonance
H. Haraguchi and S. Fujiwara, *J. Phys. Chem.*, **73**, 3467 (1969)
- 24) Copper Nuclear Magnetic Resonance Study of Cyanocuprate(I) Ions in Solution. Formation of Polynuclear Species and of Mixed Complexes
T. Yamamoto, H. Haraguchi and S. Fujiwara, *J. Phys. Chem.*, **74**, 4369 (1970)
- 25) Indium-115 Nuclear Magnetic Resonance Study of Indium Complexes in Solvent Extraction Systems
H. Haraguchi, K. Fuwa and S. Fujiwara, *J. Phys. Chem.*, **77**, 1497 (1973)
- 26) NMR Studies of Cobalt Complexes. Theoretical Interpretation of Cobalt-59 Chemical Shifts
S. Fujiwara, F. Yajima and A. Yamasaki, *J. Magn. Resonance*, **1**, 203 (1969)
- 27) Cobalt-59 Nuclear Magnetic Resonance Study of Cobalt(III) Complexes. Empirical Rules for the Cobalt-59 Chemical Shifts and Line Widths of $[\text{Co}(\text{III})(\text{en})_x(\text{NH}_3)_{6-2x}\text{L}_2]$ -Type Complexes
F. Yajima, Y. Koike, A. Yamasaki and S. Fujiwara, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **47**, 1442 (1974)
- 28) Electron Spin Resonance of Pd(I) in γ -Irradiated Bis(acetylacetonato)palladium(II)
S. Fujiwara and M. Nakamura, *J. Chem. Phys.*, **52**, 6299 (1970)
- 29) Electron Spin Resonance of γ -Irradiated Cobalt(III) Complexes. Electronic and Spin States of Hot Cobalt(II) Ions
S. Fujiwara, T. Watanabe and H. Tadano, *J. Coord. Chem.*, **1**, 195 (1971)
- 30) ESR of Hot Ions: Zn(I), Cd(I), and Hg(I) in γ -Irradiated Potassium Tetracyanozincate(II), cadmate(II), and mercurate(II)
J. Isoya and S. Fujiwara, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **45**, 2183 (1972)
- 31) ESR of Hot Ions: Ni(I) Complex Ions Produced in Rigid Solutions by γ -Irradiation
C. Amano and S. Fujiwara, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **46**, 1379 (1973)
- 32) ESR Study of Hot Ions: Ir(II) and Ir(IV) in γ -Irradiated Ir(III) Complexes
S. Fujiwara, T. Watanabe and T. Inoue, *Chem. Lett.*, 755 (1974)
- 33) ESR of Hot Ions: Low Spin Pt(III) Complex Ions Produced by γ -Irradiation
C. Amano and S. Fujiwara, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **50**, 1437 (1977)
- 34) Mixed Chelate Compounds of Titanium(III) as Studied by Electron Paramagnetic Resonance and Spectrophotometry
S. Fujiwara, K. Nagashima and M. Codell, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **37**, 773 (1964)
- 35) EPR Studies of Ti(III) Chelate in Aqueous Solution. The Nature of Chemical Bonding and ESR Relaxation Mechanism
T. Watanabe and S. Fujiwara, *J. Magn. Resonance*, **2**, 103 (1970)
- 36) Cobalt-59 Nuclear Magnetic Resonance Study of Isomerization Reactions of *mer*- and *fac*- $[\text{Co}(\text{en})(\text{NH}_3)_2(\text{OH})_2]$ Ions
F. Yajima, Y. Koike, T. Sakai and S. Fujiwara, *Inorg. Chem.*, **11**, 2054 (1972)
- 37) Cobalt-59 Nuclear Magnetic Resonance Study of Acid Dissociation Equilibria in Aquo-pentaamminecobalt(III) Perchlorate and *cis*- and *trans*-Aquoamminebis(ethylenediamine)cobalt(III) Bromide
F. Yajima, A. Yamasaki and S. Fujiwara, *Inorg. Chem.*, **10**, 2350 (1971)
- 38) Electron Exchange as Evidenced by Electron Spin Resonance of Copper(II) Confined in Molecular Space
S. Fujiwara, S. Katsumata and T. Seki, *J. Phys. Chem.*, **71**, 115 (1967)
- 39) The Determination of Critical Volumes for the Free Motion of Solute Entities in an Aqueous Solution
S. Fujiwara, K. Nagashima, H. Morita and Y. Kanaoka, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **50**, 2851 (1977)

- 40) An Interpretation of the "Molecular Space" on the Basis of Quantum Chemical Calculations of Hydrated Ions
S. Fujiwara and B.M. Rode, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **52**, 3221 (1979)
- 41) A Quantum Chemical Study on the Ion Influence on Linear Water Polymer
B.M. Rode, R. Fujikura and S. Fujiwara, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **53**, 1965 (1980)
- 42) EPR Studies of the Molecular Motion of Nitroxide Radicals in Poly(vinylalcohol) Gels
T. Watanabe, T. Yahagi and S. Fujiwara, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5187 (1980)
- 43) The Basis of the Concentration of Salt in Sea Water
S. Fujiwara, *Geochem. J.*, **13**, 225 (1979)
- 44) NMR Study of the Freezing/Thawing Mechanism of Water in Polyacrylamide Gel
S. Katayama and S. Fujiwara, *J. Phys. Chem.*, **84**, 2320 (1980)
- 45) Electron Spin Resonance and Cell Division in Silkworm Egg
S. Fujiwara, H. Tadano and M. Nakajima, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **43**, 3023 (1970)
- 46) Electron Spin Resonance in Silkworm Eggs
S. Fujiwara and M. Nakajima, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **222**, 677 (1973)

第 3 日

11月11日(水)

(化技研) 山本 修 柳沢 勝

良く知られているように、NMRスペクトルはそのNMRパラメータ(δとJ)が知られているれば、十分な精度をもって計算により再現することができ、従ってNMRスペクトルデータベースを考へる場合、メモリーの経済性見地に立てば、NMRパラメータを用いることが最も有利である。しかし逆の操作、すなわち与えられたNMRスペクトルを解析し、NMRパラメータを抽出することは一般には容易なことではなく、限られた化合物にしか可能では有り。特にその範囲が比較的狭い¹Hスペクトルにおいてはその通りである。従って¹Hスペクトルデータベースとしてスペクトルパターンそのものを対象とせざるを得ない。ゆえにわれわれはこの線に沿ってパターンを対象とする¹Hデータベースの構築を考へ、その概要について昨年度の情報化学討論会において発表した。

しかしNMRパラメータによるデータベースは、メモリーの経済性以外の点についても多くの利点と有して居る。その主な点を拾えば次のようになるであろう。

1. 現在市販のNMRスペクトロメータは¹Hに対し60MHzから400MHzまでの共鳴周波数をもつものが多岐に亘っており、データベースを参照する場合にも、それぞれ周波数に合ったスペクトルがすぐ取あせることが望ましい。パターンデータベースでは、多くの周波数についてすべてパターンを収録することはほとんど不可能である。これに対し、パラメータデータベースでは計算の際に共鳴周波数を指定するだけであらゆる周波数に対応したスペクトルを得ることができよう。

2. ¹Hスペクトルのように化学シフトや濃度、溶媒、温度などの測定条件によつて僅かに変化し、それに応じてスペクトルパターンも微妙に変化する場合には、唯一つのパターンを収録して事足りるわけにはゆかないように思われる。たとえtry and errorの方法にしてもNMRパラメータを僅かに変化させ、それによつてパターンの変化が容易に得られるならば、有限のデータベースを補足する上においてかなりの威力を発揮できよう。この点に依つてはパラメータデータベースは遙かに有利である。

以上のようで見地からすれば、少くとも¹Hスペクトルデータベースについては、できるだけNMRパラメータを収録し、それによるデータベースを構築することが必要である。以下に化技研のスペクトルデータベース(SDBS)において試みた¹Hスペクトルパラメータデータベースについてその概要を報告する。

NMRパラメータを用いるスペクトルのセネレーションに依つては既に多くのプログラムが開発されているが、その代表的なものにはLAOCOONプログラムであろう。

¹H NMR Spectral Database by use of NMR parameters

(National Chem. Lab. for Industry) O. Yamamoto and M. Yanagisawa

現在最も広く使用されているのは LAOCN3 プログラムと思われすが、ここではそれよりももう一歩前進したと考えられる LAOCN4 プログラムを採用した。LAOCN4 においては、スピンの磁気的等価性が考慮されており、これによって取扱ひ得る見掛けのスピンの数を減少させ、計算容量と計算時間をかなり縮小することができ、例之は自由回転のあるエチル基の計算において、LAOCN3 では AA'A''BB' (実際には ABCDE と同じ) スピン系として取扱ひなければならぬのに反し、LAOCN4 では A₃B₂ スピン系として取扱うことができる等である。

この LAOCN4 を基調として、データベースのアクセスに適応させるために次のような変更を行なった。

1. 磁気的に非等価なグルーへの数を9個まで拡張し、また一つのグルーへの内部のスピンの数を9個まで拡張した。これによって例之は t-Bu 基などを含むスピンの系を取扱ひることができる。
2. 一つの化合物内部で互いにスピン結合のなりのスピン系が存在する場合、それらのスピンの系を各セグメントに分け、それぞれをセグメントを別々に計算し、最後にスペクトルを合成する方法とした。これによって例之は OC(=O)C などのスペクトルが非常に簡単に得られるようになる。セグメントの最大許容値は9個である。
3. 計算で最も時間がかかる部分は行列の対角化の部分であるが、この部分はヤコビ法を止め、QL法を用いることにした。QL法はスピンハミルトニアンを一度三角行列に直し、これにより対角化を行なう方法であるが、計算時間を著しく短縮することが出来る。これにより9スピンの系に現われる126次程度の行列も、TSSの忍耐の時間範囲 (FACOM M200 で10分程度) であることが処理することが出来る。

前にも述べたように、パラメータデータベースの利点の一つは NMR パラメータ (共鳴周波数を含む) の変化に対応してスペクトルパターンが容易に得られる点である。この利点を活用するために、ある特定の化合物の NMR パラメータをアクセスした後、自由にパラメータを変更して計算できるようにした。変更できる量は次の通りである。

1. 共鳴周波数
2. 各スピンの δ
3. 各スピンの J
4. 出力シフト範囲
5. 出力最小強度
6. 各スピンの線中

次に未知スペクトルから検索を行なうためには、その度毎に計算を行なうわけにはゆかないので、主要ピークを用いてインテグレーションファイルをつくらなくては必要である。またユーザーにはどの物質がパターンとして入っており、どの物質がパラメータとして入っているかは判らぬので、インテグレーションファイルの部分はパターンとパラメータとで共通に使用できるようにしておかなければならない。パラメータからこのようなインテグレーションファイルをつくる時、先の問題となったのは、どの共鳴周波数を選びおかなければならないことである。共鳴周波数が著しく異なると、当

然ハデータの相違が生じ、検索の後立たなくなるからである。ここでは将来のMRスペクトロメータの動向を考慮して、90, 200, 400 MHzの3つの音鳴周波数に付いてインデクシャル・ファイルをつくることにした。このようなインデクシャルファイルを用い、パラメータとデータの混在したデータベースから未知物質の検索を行なう方法は今後の検討課題となるであろう。

次に実際のデータベースからのアクセス例を示す。ここではm-ニトロトルエンをアクセスする例を掲げる。ユーザーの入力部分には下線と引いた。最初はSDBSの共通プログラムであるLOOKを起動する。これによりは分子情報化学討論会(1955年)要旨集を参照される。

```
LOOK
***** GOOD MORNING. WELCOME TO S D B S 09/02/81 11:08:34 *****
```

```
+FCA0001 FAIRS-1/JEF (V02/L06B)
RS>SEA MF EQ C7H7NO2
+FRS1001 S FOUND
RS> QUIT
```

KAGIKEN SPECTRAL DATA BANK

```
#1
SDBSNO 1190
NAME ANTHRANILIC ACID
O-AMINO BENZOIC ACID
VITAMIN L1
DATA IR-HTDA-00193 : KBR DISC
IR-JSDA-00199 : KBR DISC
```

```
#2
SDBSNO 1151
NAME M-NITROTOLUENE
DATA IR-HTDA-00121 : LIQUID FILM
NMR-HPM-01-002
```

```
#3
SDBSNO 1152
NAME P-AMINO BENZOIC ACID
DATA IR-HTDA-00197 : KBR DISC
```

```
#4
SDBSNO 1153
NAME M-AMINO BENZOIC ACID
DATA IR-HTDA-00200 : KBR DISC
```

```
#5
SDBSNO 1329
NAME METHYL ISONICOTINATE
DATA NMR-CDS-00-202
```

```
#6
SDBSNO 1490
NAME P-NITROTOLUENE
DATA IR-JSDA-00106 : KBR DISC
NMR-HPM-01-003
```

```
#7
SDBSNO 1504
NAME P-HYDROXYBENZAMIDE
DATA IR-JSDA-00120 : KBR DISC
```

```
#8
SDBSNO 1568
NAME O-NITROTOLUENE
DATA NMR-CDS-00-389
NMR-HPM-01-001
```

```
RS> AND AM EQ M-NITROTOLUENE
+FRS1091 MASTER SEARCH IN PROGRESS
+FRS1001 1 FOUND
RS> END
+FCA1001 FAIRS ENDED
```

```
***** ENTER OPERATION MODE. <DATABASE-NAME>, AND <PARAMETERS> *****
A<LL>, S<LECT>, C<ODE>, D<ISP>, T<HROUGH>, H<ELP>, R<EPEAT>, E<ND>
```

```
LOOK>A NMR
```

```
*** SDBS NO. . 1151, CODE: HPM-01-002 ***
```

```
M-NITROTOLUENE
C7 H7 N O2 (M.W. = 137.1)
5.0 MOL % IN CCL4
```

```
NMR(HPM):
1: DISPLAY PARAMETERS E1 END
2: DISPLAY TRANSITION TABLE
3: PARAMETERS TO LP A1 1-2
4: TRANSITION TABLE TO LP B1 3-4
5: LINE SPECTRUM K1 5 AUTO MODE
6: LINE SPECTRUM TO LP L1 6 AUTO MODE
7: PLOT ON GRAPHIC DISPLAY G1 7 AUTO MODE
8: PLOT ON XY-PLOTTER P1 8 AUTO MODE
9: CHANGE RF AND COMPUTE
0: CHANGE PARAMETERS AND COMPUTE R1 RESET PARAMETERS
```

```
NMR(HPM): 12
(A)H (B)
|
| C
| C
|
CH3-C C-H
(E) * * (C)
|
C * C
|
|
(D)H NO2
```

```
SEGMENT 1 INTENSITY FACTOR = 1
NUMBER OF NON-EQUIVALENT GROUPS 4
NMR PARAMETERS SPINS
D(A) = 7.431 PPM 1
D(B) = 7.357 PPM 1
D(C) = 7.964 PPM 1
D(D) = 7.979 PPM 1
J(A,B) = 7.620 HZ
J(A,C) = 1.000 HZ
J(A,D) = 1.690 HZ
J(B,C) = 8.240 HZ
J(B,D) = 0.470 HZ
J(C,D) = 2.320 HZ
```

```
SEGMENT 2 INTENSITY FACTOR = 1
NUMBER OF NON-EQUIVALENT GROUPS 1
NMR PARAMETERS SPINS
D(E) = 2.470 PPM 3
```

```
FREQUENCY RANGE ALL
MINIMUM INTENSITY 0.001
```

```
REFERENCE: TMS
ORIGIN: NCL1 HAO02, YAHAMOTO, O. ET AL. ANAL. CHEM. 44, 1794 (1972)
SMALL LONG RANGE COUPLINGS EXIST BETWEEN CH3(E) AND AROMATIC PROTONS
```

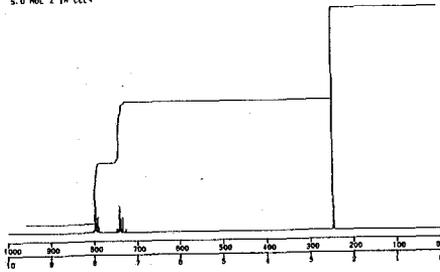
* RESONANCE FREQUENCY => 100

LINE	FREQUENCY	INTENSITY	SPINS	PART
21	809.23	0.004	ABC	1
34	805.60	0.012	ABC	1
2	802.94	0.029	C	1
27	800.21	0.013	C	1
9	800.63	0.187	C	1
1	799.69	0.197	D	1
18	799.58	0.052	D	1
15	798.26	0.070	D	1
26	798.25	0.214	D	1
42	798.21	0.205	C	1
37	797.95	0.186	D	1
11	797.58	0.039	D	1
56	795.95	0.191	D	1
46	795.65	0.024	D	1
19	795.18	0.186	C	1
33	795.19	0.059	C	1
52	792.94	0.205	C	1
24	791.06	0.006	ABD	1
55	790.62	0.084	C	1
25	786.67	0.012	ABC	1
41	785.97	0.010	ABC	1
45	783.41	0.003	ABD	1
9	781.78	0.001	ACD	1
4	750.68	0.011	A	1
8	749.22	0.007	A	1
13	748.54	0.004	A	1
30	746.81	0.049	A	1
16	745.98	0.011	ACD	1
22	745.06	0.250	B	1
3	742.13	0.263	B	1
6	742.03	0.177	B	1
35	741.75	0.251	A	1
40	740.82	0.193	A	1
33	739.22	0.186	A	1
12	738.79	0.077	BCD	1
7	737.64	0.074	BCD	1
29	734.56	0.177	B	1
43	734.36	0.002	B	1
28	734.35	0.016	B	1
13	734.39	0.108	B	1
47	732.00	0.010	BCD	1
44	729.23	0.016	BCD	1
54	726.97	0.039	E	1
48	726.67	0.026	E	1
58	247.00	1.000	E	2
60	247.00	0.500	E	2
57	247.00	0.750	E	2
59	247.00	0.750	E	2

NMR(HPM): P

SDBS NO. 1151
 N-NITROTOLUENE
 C₇H₇NO₂
 NPH-01-002, AT 100.000 MHZ
 S.O. SOL. 2 IN CCL₄

01-09-01 NCL1



全スペクトルの70%の出力

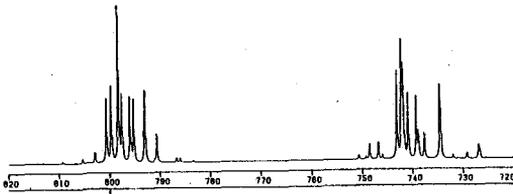
NMR:HPM>: 0

- SPECTRAL WIDTH AND SIGNAL HEIGHT =>: 100 50
 - LEFT AND RIGHT FREQUENCIES =>: 820 720
 - LENGTHS OF X- AND Y-AXES =>:
 - ANGLE AND SCALING FACTOR =>:
- INTEGRATION ?:

スペクトルの一部拡大

SDBS NO. 1151
 N-NITROTOLUENE
 C₇H₇NO₂
 NPH-01-002, AT 100.000 MHZ
 S.O. SOL. 2 IN CCL₄

01-09-02 NCL1



NMR:HPM>: 2

- RESONANCE FREQUENCY =>: 400

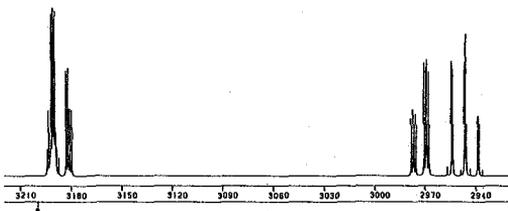
NMR:HPM>: 8

- SPECTRAL WIDTH AND SIGNAL HEIGHT =>: 300 100
 - LEFT AND RIGHT FREQUENCIES =>: 3120 2920
 - LENGTHS OF X- AND Y-AXES =>:
 - ANGLE AND SCALING FACTOR =>:
- INTEGRATION ?:

共振周波数変更の例

SDBS NO. 1151
 N-NITROTOLUENE
 C₇H₇NO₂
 NPH-01-002, AT 400.000 MHZ
 S.O. SOL. 2 IN CCL₄

01-09-02 NCL1



パラメータ変更の例

NMR:HPM>: 0

CHANGE PARAMETERS =>: 1

INTERPRETATION FOR 'PARAMETER CHANGE COMMANDS'

- RF : CHANGE RESONANCE FREQUENCY
- D : CHEMICAL SHIFTS CHANGED SUCCESSIVELY
- D A : CHEMICAL SHIFT OF SPIN A CHANGED
- D * 1.5 : ALL D'S TO BE ADDED 1.5
- J AB : J'S CHANGED SUCCESSIVELY
- J : J BETWEEN SPINS A AND B CHANGED
- J * -0.5 : ALL J'S TO BE ADDED -0.5
- LU A : LINE WIDTH FOR SPIN A CHANGED
- LU * 0.5 : ALL LU'S TO BE ADDED 0.5
- FR : LEFT AND RIGHT FREQ. LIMIT CHANGED
- FR * : FREQ. RANGE SET TO ALL
- INT : MINIMUM INTENSITY LIMIT CHANGED
- END : END OF THE SUB-OPERATION
- END C : END OF THE SUB-OPERATION AND COMPUTE

CHANGE PARAMETERS =>: RE

RESONANCE FREQUENCY =>: 100

CHANGE PARAMETERS =>: D

- D(A) : 7.431 =>: 7.5
- D(B) : 7.367 =>: 7.3
- D(C) : 7.964 =>: 8.0
- D(D) : 7.979 =>: 8.0
- D(E) : 2.470 =>:

CHANGE PARAMETERS =>: END C

NMR:HPM>: 8

- SPECTRAL WIDTH AND SIGNAL HEIGHT =>: 100 50

- LEFT AND RIGHT FREQUENCIES =>: 820 720

- LENGTHS OF X- AND Y-AXES =>:

- ANGLE AND SCALING FACTOR =>:

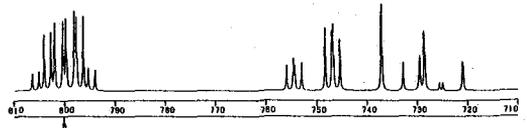
INTEGRATION ?:

NMR:HPM>: END

変更パラメータによるスペクトルパターン

01-09-02 NCL1

SDBS NO. 1151
 N-NITROTOLUENE
 C₇H₇NO₂
 NPH-01-002, AT 100.000 MHZ
 S.O. SOL. 2 IN CCL₄



上記例において、入力すべき行が空白に変わった時は、前の値が保存されたか、又は default 値が設定されたかのどちらかである。

ベースの内容とその利用(三菱レイヨン, 出光興産中研, 国立衛試, 第一製薬, ツッ石化, 豊田中研, 三菱油化中研) ○片桐 禪, 津村 修, 叶多謙藏, 四居靖彦, 大草忠雄, 長沢一彦, 酒井稔夫

1.はじめに 演者らは、数年前から標記検索システムの実用化検討を行ってきたが^{1,2,3)}本年5月末、サトラ標準スペクトル集(30000データ)を完成させた。このような本格的な大量データベース(DBと略す)は、HNMRでは世界で初めてであろう。当検索システムの実用性評価については、別途報告の予定である^{4,5)}。本講演では、大量DBの製作過程、ファイルの内容および応用について報告する。

2.製作過程 DBの製作手順をFig.1に示す。短期間に大量のデータを処理するためには、作業能率をあげることにエラーを極力防止することが要請される。それ

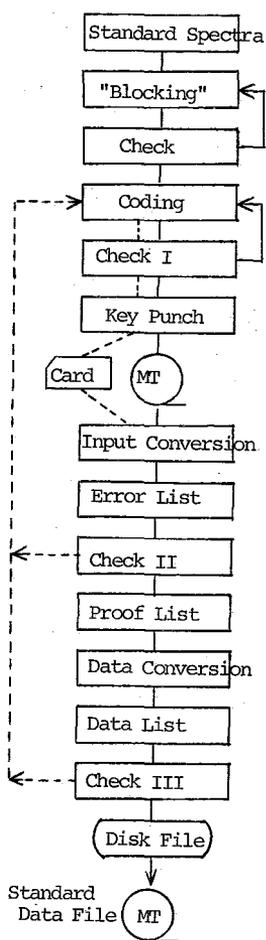


Fig. 1. Process.

ゆえ、手順としてコード化作業の分担(ブロック化とコーディング)および厳密なエラーチェック作業をとり入れた。

①ブロック化 これは与えられたスペクトルを解析し、コード化規則に従って、チャート上に直接、コード名・プロトン数・読みとるべき化学シフトの位置を記入する作業である。この作業の良し悪しが当DBの質を決定する。したがって、これはNMRの専門家およびそれに準ずる大学院生が担当した。さらに、コード化レベルの個人差をできるだけなくするために、演者が全スペクトルのコード化の適否についてチェックした。②コーディング これはブロック化工程でチャート上に記入されたマークに従って、所定事項をデータシート(特記品)に記入する作業であり、主として化学・薬学系の女子学生に担当させた。③チェック作業のうちチェックI, II, IIIは前工程と同様に女子学生に担当させた。コーディングエラーとしては化学シフト値の読み取りエラーとHコード記入漏れエラーが目立った。

④キーパンチ データのコンピュータへの入力媒体として一部カードを使ったが、大多数はKEY TO MTによるカードイメージのMTを使用した。TABセットミスによるパンチエラー(1ロットが約3500枚相当)が二回ほど発生したがMT媒体のため修正は容易であった。コード化された3万件のデータ量は、カード枚数で約215,400枚であり、1スペクトル当り平均7.2枚であった。⑤コンピュータ処理

入力・データ変換処理は三菱レイヨン(株)システム部で実施した。使用したマシンはIBM370-158で、処理プログラムはPL/I言語で作成した。このような大量DB作成にあたっては、ファイルの更新技術が重要なポイントとなる。更新プログラムの作成には多大な労力を費した。データの蓄積量が増えるにつれて、登録番号の記入ミスによる重複データが若干発生したが、適切なチェックルーチンにより正しく修正することができた。

3.標準ファイルのデータ構造 作成したDBは一本のMTに収録されている。その仕様をFig.2に示す。元素数欄にて、プロトン数が100以上の化合物に対しても99と入力してある。「ブロック」とは、当システムで便宜上使用している術語であり、「必須シグナルであって、同一のグループもしくは複数個のグループのシグナルで整数個のプロトンを割り当てられるシグナル群の意味である。ブロック番号は高磁場から数えたときのそのブロックの順番である。ただし、Uコードシグナルはブロックの順番から除外している。化学シフト値は本来小数点2桁の実数であるが、それを100倍して整数に変換した値を記録している。

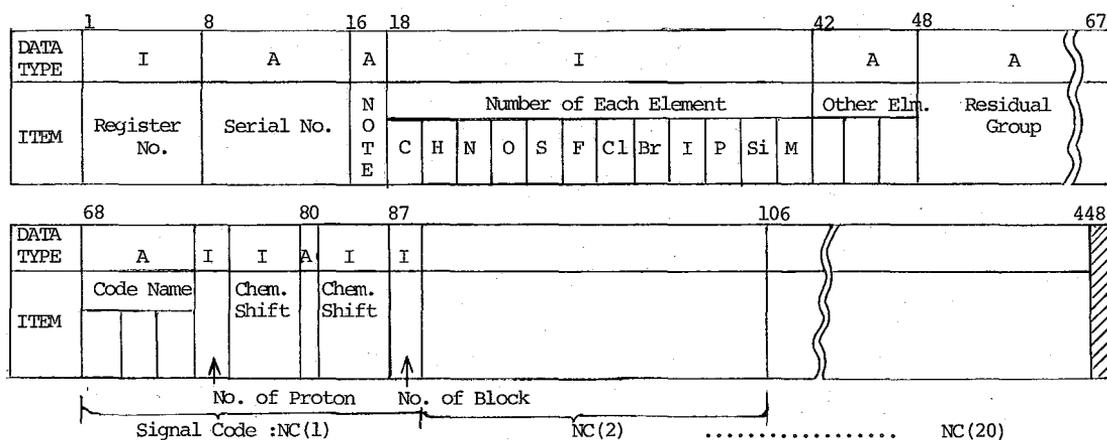


Fig. 2. Format of the standard data file (MT). IBM standard label, EBCDIC, 1600 bpi, 9 track. 448 Bytes/Spectrum.

4.コード化実施例 コード化規則の原則は、すでに発表した通りであるが¹⁾多様なスペクトルパターンをできるだけ忠実に表現するために、さらにいくつかの細則を作成した。それらのうち、主要な点について説明する。

- (1)シグナル幅の表示方法に、次の二種類の方法を採用した。^①連続幅 [H] 通常のシグナル幅の表示方法である(例 A 4 3.50-4.70)。化学シフト値の下限と上限の間に区間符号(マイナス符号で代用)を記入する。^②非連続幅 (|) これは区間符号を使わない方法であり、スピン結合定数Jが12Hz以上のDoubletや、後述のABX3スピン系パターン等の表示に使用される。これら二つの方法は、検索プログラム上で異なる演算処理を受ける。非連続幅を導入した理由は二つあって、^①デジタル化されたシグナルパターンを実スペクトルのパターンにできるだけ忠実に再現するため、^②後述の多重線パターン(特にQ)のうち、非対称パターンを対称的なパターンから積極的に区別するためである。

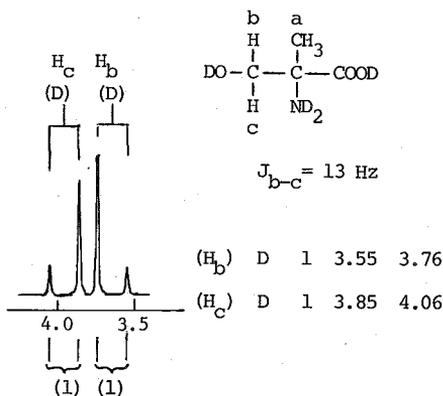


Fig. 3. Example of the coding for a discrete signal. Sadtler No. 23260M.

実施例を Fig. 3 に示す。
 (2) S コードは、原則としてスピン結合による分裂が認められず、その半値幅が 3 Hz 以内で、かつピークの根元(チャートの 1 目盛で実測スペクトルではベースラインより約 5 mm に相当)の幅が 0.15 ppm 以内の鋭いピークとする。
 (3) シグナルの分裂がスピン結合によるものかどうかの判断の基準は次の通りである。①ベンゼン環の P-位間のスピン結合(0.5 Hz 前後の大きさ)は、原則として結合がないものとして扱う。②O-, m-位間のスピン結合による分裂は積極的に認める。③ロングレンジのスピン結合(二重結合や三重結合を介してのカップリング)は、原則として認める。④スピン結合定数の符号はすべてプラスとみなす。
 (4) 多重線コード(D, T, Q, QN)の基準 ①原則としてシャープなパターンに対しそれぞれ指定する。ブロードであったり、微細構造の現われているシグナルは、A コード指定とする。②特に D, Q, QN コードは、いわゆる A m X n スピン系のみならず、AB, AA'BB', AMX, ABX スピン系等まで拡張して使用した。Fig. 4 に ABX 系スピン系のコード化例を示す。

(5) 他核(¹⁹F と ³¹P) とのカップリングパターンは、見かけのパターンでコード化した。コード化例を Fig. 5 に示す。理論的には、Fig. 5 のパターンは Doublet であるが、当 DB では、検索する側に立って、二本の S コードとした。理論通りが見かけが良いか、見解のわかるところであるが、ここでは見かけのパターンを採用した。¹⁹F と ³¹P 以外では、¹⁴N とカップリングしているシグナルをもつスペクトルも 5 件収録されている。

5. 応用 当 DB に含まれているいくつかの化合物について実際にスペクトルを測定し、検索条件をいろいろ変えて検索を試みた。その結果の一例を Table 1 に示す。これは coumarin (C₉H₆O₂) (サトラ-NO. 10407M) を検索した例である。表から明らかのように、検索条件を適切に設定することによって、正解を効率良く抽出

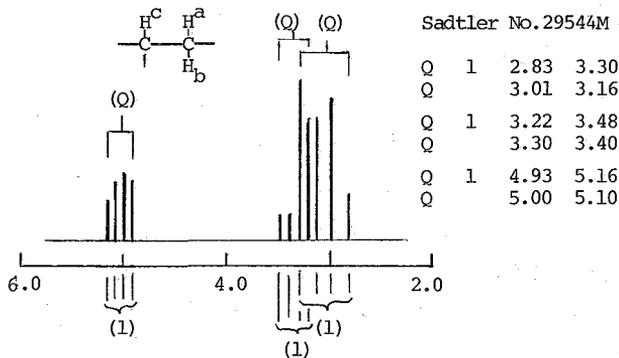


Fig. 4. Example of the coding for ABX pattern.

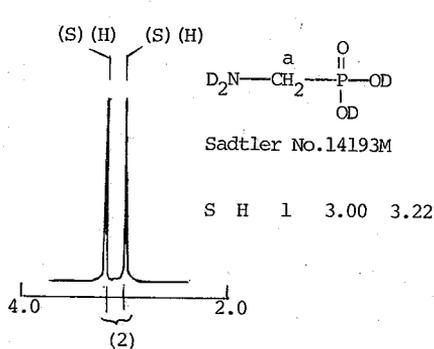
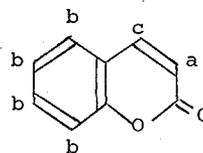


Fig. 5. Example of ³¹P-¹H coupling.

Table 1. Input data and results of search tests for coumarin.

(a) Input data

D	1	6.30 - 6.40
H		6.40
A	4	7.05 - 7.64
H		7.21
D	1	7.64 - 7.75



(b) Results

Sadtler No.10407M was selected with the score 80.

Run	Search Conditions						Hit Counts
	TLVAL1	TLVAL2	TLVAL3	FC	Present Element	Absent Element	
1	1	50	5	*	C ,H	-	532 (8)
2	1	50	5	*	C ,H ,O	-	289 (5)
3	1	50	5	*	C ,H ,O	N ,S	96 (2)
4	1	80	5	*	C ,H	-	10 (8)
5	1	80	5	*	C ,H ,O	N ,S	6 (5)
6	1	80	5	*	C ,H ,O	N ,S ,F ,Cl ,Br	3 (2)

() : Ranking of 10407M in hit counts.

することができた。このように、当検索システムは、シグナル群の個々の強度を入力しない半定量的な方法であるが、その検索実験では予想以上に優れた結果が得られることがわかった^{4,5)}。ファイル検索法のポイントは、データ量である。今後は、サトラー標準スペクトル集のみならず、文献データ(日本化学会誌, JACS等)の収録も検討してゆきたい^{注)}。

なお、当DBの製作にあたっては、サトラー社の著作権ならびに製作費用の点から、開発研究会方式を採用しているが、決して閉鎖的なものではない。会員になれば、誰でも自社内では自由にDBを使用することができる。また、当検索システムの実行にはミニコンでも十分である⁴⁾。

- 文献 1) 片桐, 日化才40秋季年会予稿集I, P.201 (1979)
 2) 演者ら, 日化才42秋季年会予稿集I, P.204 (1980)
 3) 同, Anal. chim. Acta, in press.
 4) 同, 分析化学会才30年会, 10月, 京都 (1981)
 5) 同, 才4回情報化学討論会, 10月 東京 (1981)

(注1) 結果論的であるが、当コード化方法はこれら雑誌における¹HNMRデータの記載方法に類似したものになった。ただし、文献値には最高ピーク位置の記入がなく、ABXスピン系等の多重線に対するコード名が当方と異なる。また、文献では、対称的なパターンについては中心の化学シフト値とJ値が記載されているので、シグナル幅の算出は容易である。

(国立公害研) O三森文行、伊藤 治

〈序〉 intact な生体系へのNMR法の応用の一環として、高等植物の葉に $^{13}\text{CO}_2$ を与え、光合成により ^{13}C 標識が同化される過程を ^{13}C -NMRを用いて追跡する試みを行なった。従来、光合成経路の研究には ^{14}C がトレーサーとして多用され、Calvin-Benson回路の発見をはじめ、多くの成果があげられている。これに比べ、 ^{13}C 標識の利用例は少く、Schaeferらがダイズの葉に $^{13}\text{CO}_2$ を与え、その種子内、葉内の主成分であるショ糖や油脂への標識の取りこみを観測している例があるにすぎない。¹⁾ また、甲斐若はintactなアオキの種子が、ショ糖や配糖体のきれいな高分解能スペクトルを与えることを報告している。²⁾ 我々も、intactな植物体が図1に示すように、主成分であるショ糖やグルコースの高分解能スペクトルを与えることを見いだした。しかし、本研究においては ^{13}C を濃縮した CO_2 を植物に与え、必ずしも主成分とはいえないアミノ酸や有機酸への ^{13}C 標識の分布を追跡するため、葉の抽出液をNMR測定の対象とした。特に、この結果から、 C_3 型の光合成経路(3-phosphoglycerateが初期産物となる)を有する植物と、 C_4 型の経路(リンゴ酸、アスパラギン酸が初期産物となる)を有する植物の標識パターンの差を捉えることを目的の一つとした。

〈実験〉 C_3 植物としてヒマワリ、 C_4 植物としてトウモロコシを用いた。 $^{13}\text{CO}_2$ 供与は、アクリル樹脂製のガスチェンバー(内容積200l)内でintactな単葉を対象として行なった。光強度は約25000 lux、チェンバー内の温湿度は、25℃、75%にコントロールした。 $^{13}\text{CO}_2$ は、適当な同位体比に濃縮された $\text{Ba}^{13}\text{CO}_3$ に、チェンバー内で1N塩酸を加えることにより発生させた。これによりチェンバー内の CO_2 濃度を約370ppmに維持した。長期実験(1.5、10、30分の $^{13}\text{CO}_2$ 供与を行う)では、30 atom%、短期実験(30、60、120秒間の $^{13}\text{CO}_2$ 供与を行う)では90 atom%の $^{13}\text{CO}_2$ を用いた。 $^{13}\text{CO}_2$ 供与を終えた葉は、たゞちに液体窒素で凍結し、以後、エタノール、水抽出を行なった。1時点あたり6枚の葉を集めて(ヒマワリでは新鮮重~15g)、1サンプルとした。短期実験の試料は、さるにイオン交換樹脂による分離を行い、陰陽両イオン交換樹脂に吸着しない糖画分、陽イオン交換樹脂に吸着するアミノ酸画分、陰イオン交換樹脂に吸着する有機酸画分に分離した。これらのサンプルにはLock用に10% D_2O を加え、pHを7.0に調整して、

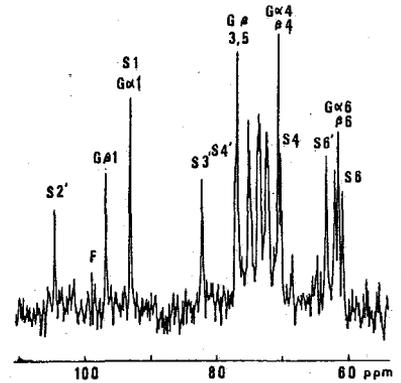


Fig.1 ^{13}C -NMR spectrum of intact sunflower stem.
NA:3600, S:Sucrose, G:Glucose.

NMR測定を行なった。測定温度は4°C。シフト基準はneatメタノールヒマワリを外部基準として用いた。スペクトルはTMSのシフト値が0ppmとなるようにこの外部基準シグナルのピーク位置を48.88ppmとして表示した。各シグナルのピーク強度は、このメタノールピークによる標準化を行い、葉の単位新鮮重量あたりに換算した。なお、測定時には10Wのプロトンノイズデカップリングを行なった。
 <結果および考察>

$^{13}\text{CO}_2$ (30 atom%) を30分間供与したトウモロコシ葉および对照葉の抽出液の ^{13}C -NMRスペクトルを図2に示す。供与葉では70本以上のピークが認められ、そのほとんどが、对照葉に比べて強度が著しく増加していることがわかる。また、 $^{13}\text{CO}_2$ 供与葉においては分子内の炭素の多重標識にもとづく ^{13}C - ^{13}C カップリングがサイドバンドとして観測される。これらのピークの帰属は、イオン交換による分別、および authentic sample

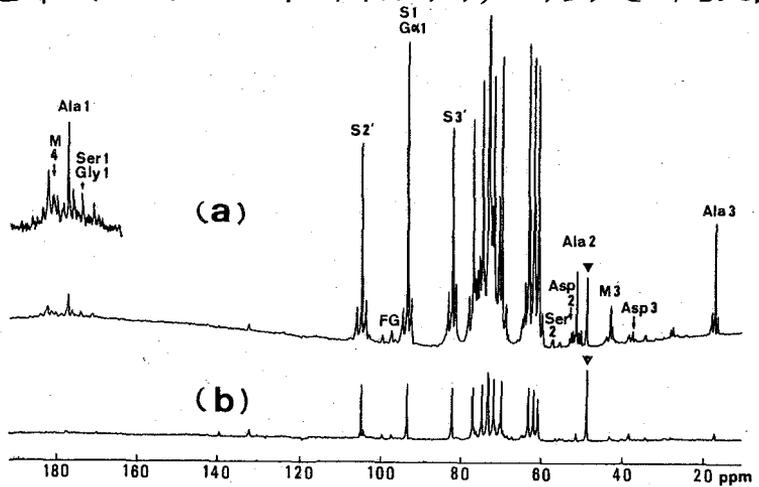


Fig.2 ^{13}C -NMR spectra of extracts of corn leaves fed with $^{13}\text{CO}_2$ (30 atom%) for 30 min. (a), and with natural CO_2 (b). NA:25000, M:Malate, \blacktriangledown :reference.

Table 1 Identified materials in ^{13}C -NMR spectra of sunflower and corn leaves.

sucrose, glucose, fructose,
alanine, serine, glycine, aspartate, glutamate,
malate, pyruvate, glycerate, fumarate, citrate, succinate.

との化学シフト値の比較により行なった。この結果、表1に示すように、3種の糖、5種のアミノ酸、6種の有機酸を同定した。これらの同定されたピークについて各 $^{13}\text{CO}_2$ 供与時間での強度変化をヒマワリとトウモロコシで比較した。ここでは、いくつかの特徴的例を示す。

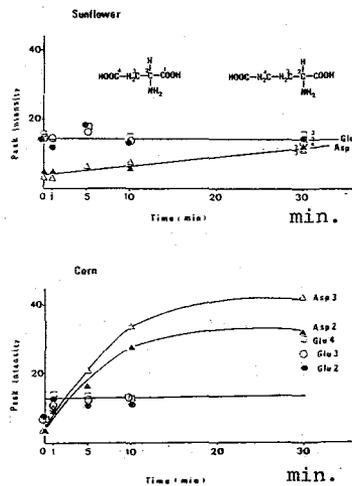


Fig.3 Time course changes in peak intensity of Asp and Glu in sunflower and corn leaves fed with $^{13}\text{CO}_2$ (30 atom%).

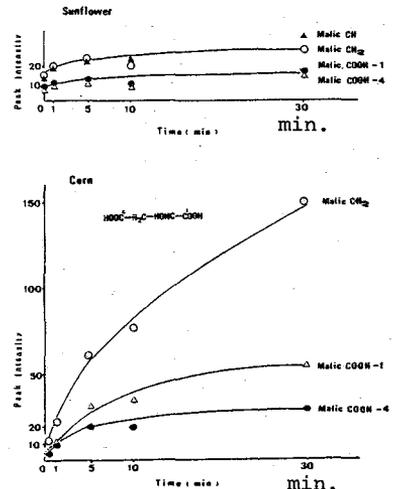


Fig.4 Time course changes in peak intensity of malate in sunflower and corn leaves fed with $^{13}\text{CO}_2$ (30 atom%).

これらの物質では、アラニン、ピルビン酸とともに、トウモロコシでは ^{13}C 標識の急激な増加がみられるのに対し、ヒマワリでは、それほど

大きな増大はみられず、両者で差が認められた。この結果は、これらの物質が図5に示すように、 C_4 植物の炭素代謝(C_4 回路)において重要な役割を果たしていることと符合している。³⁾しかし、 C_4 回路が回転するだけでは、アスパラギン酸、リンゴ酸のC-4位に標識が取りこまれるだけで、他の炭素位置に ^{13}C がはいることを説明できない。これは、まずC-4位に取りこまれた ^{13}C が Calvin-Benson

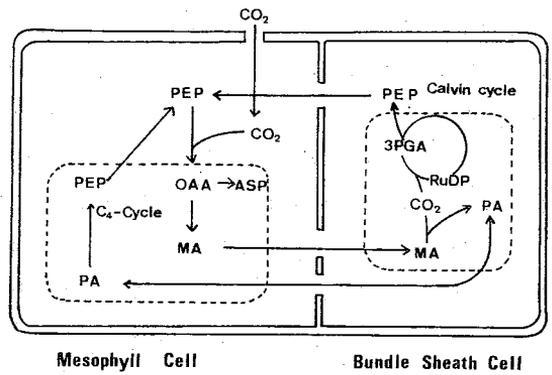


Fig.5 C_4 pathway (NADP-ME type).

回路に取りこまれ、ここで標識部位の mixing がなされ、各炭素が標識された C_3 化合物が生成し、これが再び phosphoenolpyruvate (PEP)の形で C_4 回路にもどるためにひきおこされたと考えられる。長期実験では、アスパラギン酸、リンゴ酸のC-4位にまず ^{13}C が固定される様子は、はっきり捉えられているので、より短時間の $^{13}CO_2$ 供与実験を行なった。図6に120秒間の $^{13}CO_2$ 供与を行なったヒマワリとトウモロコシのアミノ酸画分のスペクトルを示す。またトウモロコシのアスパラギン酸の各炭素のピーク強度の時間変化を図7に示す。トウモロコシにおいて、アスパラギン酸のC-4位が特異的に ^{13}C 標識されている様子が明らかに認められる。わずか30秒間の $^{13}CO_2$ 供与においても、この点は明瞭である。有機酸画分のリンゴ酸についても同様の標識パターンが認められた。また、図6において

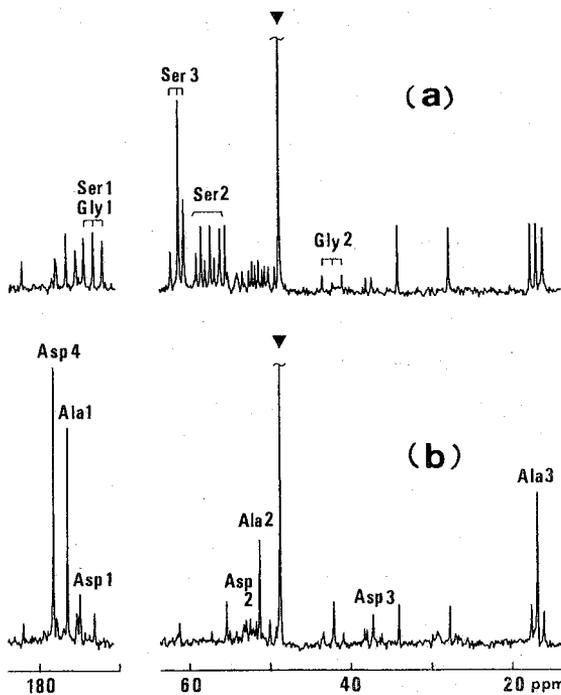


Fig.6 ^{13}C -NMR spectra of amino acids fractions of (a) sunflower and (b) corn leaves fed with $^{13}CO_2$ (90 atom%) for 120 sec. NA:50000, \blacktriangledown :reference.

みられるように、セリンについても、両植物の標識パターンには、大きな差が認められる。(なお、セリンのC-2, C-3のサイドバンドはAB系を形成しているため、C-3のサイドバンドは主ピークに対して非対称になっている。) すなわち、トウモロコシにおいては、セリンにはほとんど ^{13}C 標識がはいる

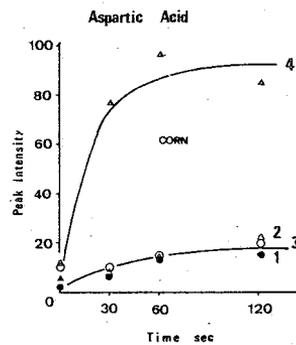


Fig.7 Time course of peak intensity of Asp in corn leaves fed with $^{13}CO_2$ (90 atom%).

るのに、ヒマワリでは急激な ^{13}C の取りこみが見られる。グリシン、セリンの短期実験での各炭素のピーク強度の時間変化を図8に示す。

グリシン、セリンは、植物葉中で光呼吸に密接に関与した物質と考えられている。すなわち、グリシン2分子からセリンが生成する際に1分子の CO_2 を放出することにより、光呼吸が営まれる。 C_4 植物においては、この光呼吸の活性が C_3 植物に比べ、低いことが知られており^{4,5}。上述のセリンの標識パターンの差は、この違いを反映したものであると考えることができる。しかし、トウモロコシにおいてもグリシンには ^{13}C 標識が取り込まれており、さらに、この経路(Glycolate pathway)において、セリンより下位にあるグリセリン酸にも標識が取り込まれることが観測されるので、トウモロコシのGlycolate pathway上の炭素代謝については、なお解明すべき点が残っている。

また、両植物ともに、グルタミン酸、フマル酸(ヒマワリにのみ観測される)には、少なくとも10分までの $^{13}CO_2$ 供与では、標識がはいり込むことが認められる。(図3) フマル酸はTCA回路の一員であり、グルタミン酸も炭素代謝上、TCA回路の α -ケトグルタル酸と隣接していることから判断して、炭素代謝上、TCA回路は、光合成で同化された炭素とは離れた位置にあると考えられる。

<結論> $^{13}CO_2$ を供与した植物葉の炭素代謝を ^{13}C -NMRにより有効に追跡できることが明らかになった。特に、本法により C_3 型植物、 C_4 型植物は明瞭に区別される。この方法は、 ^{14}C をトレーサーとして用いる方法に比べ、厳密な分離操作を必要とせず、各炭素原子への標識の取りこみを追跡できる点、様々な分子への標識の取りこみの展望を得られる点で、有用であると考えられる。

<謝辞> NMR分光計の運用について多大な助力を戴いた功刀正行氏に感謝致します。また、有益な御助言を戴いた荒田洋治助教授(東京大学理学部)に感謝致します。さらに、本研究の端緒となる実験を供にはじめた米山忠克博士(現、豊技研)に記して謝意を表します。

References.

- 1) J.Schaefer, E.O.Stejskal and C.E.Beard, Plant Physiol., 55, 1048 (1975), J.Schaefer, L.D.Kier and E.O.Stejskal, ibid, 65, 254 (1980).
- 2) M.Kainosho, Tetrahedron Lett., 4279 (1976).
- 3) M.D.Hatch and C.R.Slack, Biochem. J., 101, 103 (1966).
- 4) J.D.Mahon, H.Fock, T.Höhler, D.T.Canvin, Planta, 120, 113 (1974), J.D.Mahon, H.Fock and D.T.Canvin, ibid, 120, 125 (1974), ibid, 120, 245 (1974).
- 5) J.F.Morot-Gaudry, J.P.Farineau and J.C.Huet, Plant Physiol., 66, 1079 (1980).

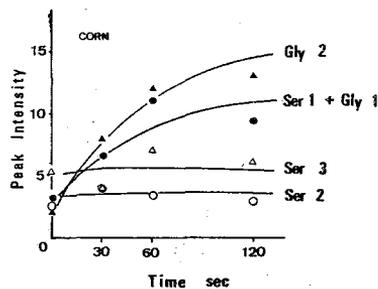
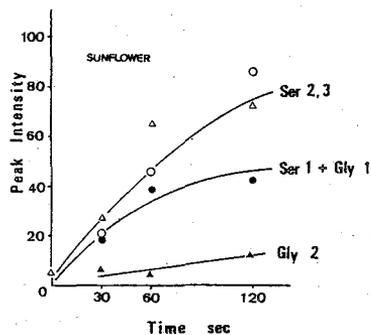


Fig.8 Time course changes in peak intensity of Ser and Gly in sunflower and corn leaves fed with $^{13}CO_2$ (90 atom%).

— 遅延型アレルギー及び炎症局所のpHと緩和時間 —

○山崎政城, 石松隆志*, 森野能昌, 神奈武*
 (熊本大学医学部・生化学教室, *病態生理学教室)

遅延型アレルギー及び炎症とは

免疫は抗体を伴う血清中のγ-グロブリンが体液中を流れて、異物抗原と特異的に反応する体液性免疫(humoral immunity)と、感作リンパ球が特異的に直接抗原(微生物, 非自己の細胞, 組織, がん細胞, タンパク質など)と反応する細胞性免疫(cellular immunity)との2つのタイプがある。細胞性免疫反応によると考えられる生体内の免疫現象は、①遅延型アレルギー反応, ②移植拒絶反応, ③感染防禦免疫に大別される。これらの免疫現象の特徴は“即時型”とは異なりいわゆる“遅延型”であること、反応局所では血管透過性が弱く従って浮腫が少なく、単核球(マクロファージとリンパ球)の浸潤が著しく多核白血球の浸潤は弱いことなどである。

遅延型アレルギー反応(Delayed Hypersensitivity)はある種の感染症, 移植免疫, および多くの自己免疫疾患の本態をなす重要な免疫学的機構であり各方面で研究されている。しかし本反応などの細胞性免疫応答においては、体液性免疫における免疫グロブリンに相当する“抗体様物質”が物質としてどう考えられているか、そのメカニズムについては不明な点が多く細胞レベルから分子レベルの訪へ近づいていない。ゆえゆえは炎症においては病変局所を重視する立場から、炎症のモデルとして遅延型アレルギー反応をとり炎症局所の組織そのもの(不均-複合系)のn.m.r. (^{31}P , ^1H)による解析をこころみられた。

遅延型アレルギー及び炎症局所のpHについて

遅延型アレルギー及び炎症の病変局所では単核細胞の浸潤が著しく、単核球に特異的に作用する遊走活性物質の存在が考えられ、その産出にあらたな局所のproteaseの存在が明らかになり、病変局所のpHを病理学者の関心がよせられてきた。

病変局所のpHについては、Opie(1906年)は炎症反応単に由来する酵素の最適pHより、またSchade(1923年)は水素ガス電極法により炎症局所のpHが酸性であることを述べた。Menkin(1939年)は色素吸収法により細胞対液のpHを測定し、炎症時の組織pHと細胞液との間に関連のあることを主張した。一方、安子(1955年)はガラス電極を直接皮肉組織に挿入し、炎症初期では弱アルカリ性であるが、滲出液の糖量が増加し、乳酸が増加するにつれて酸性側へ傾むくことを明らかにした。

Applications of NMR to Immunology — pH and Relaxation Time of Delayed Hypersensitivity Skin Site —

Masaki Yamasaki, Takashi Ishimatsu, Yoshimasa Morino, and Takeshi Kambara

Department of Pathophysiology and Department of Biochemistry, Medical School Kumamoto University.

しかし、従来の色素吸収法や微小電極を用いる方法は膜をきざつて、物理的的刺激を与えると、いろいろ問題が多い。一方、 ^{31}P 核 n.m.r. を用いる方法は "intact system" で pH を測定できると、いろいろ、このような反応の正確な pH を明らかにする手段として期待される。

n.m.r. による皮膚組織の測定上の問題点

正常皮膚組織および遅延型アレルギー皮膚組織の正確な pH を求めるには、観測可能な皮膚組織の位置に n.m.r. 受信用コイルの中心がくるように生きたモルモットをセットし、皮膚組織に焦点を合わせて測定する方法 (in vivo での測定) が理想である。しかし、かわかれが用いる JNM FX-200 の装置では 15 mm のサンプル管の制約を受けるため、およそ in vivo での測定は不可能である。一般に臓器などでは、生体を凍らすと n.m.r. サンプル管の中に入れ、灌流法 (血液灌流法、組織外液灌流法など) を用いることにより長時間生理学的に一定の状態を保持し、"生物としての機能をもちたままの状態 (生理的条件下)" での測定が可能である。しかし皮膚組織ではこのような測定法は不可能であり、皮膚組織を採取して測定するという方法をとらざるを得ない。

今回、遅延型アレルギー皮膚反応の抗原としてウシ血清ブドウ糖 (BSG) を用いた。感作は 10 μg BSG を完全フロイント・アジュバントとともにモルモット (300~350g, 男) の両足蹠の皮下に接種した (図 1. A)。感作 1 週間後、背部皮下に BSG 10 μg (6 箇所注射) で challenge (惹起, 図 1. B) の反応が最大になる 24 時間後 (図 1. C) に採血し、 ^{31}P -n.m.r. の P_i の chemical shift を測定した。



図 1. 遅延型アレルギー皮膚反応。n.m.r. のサンプルとして、(C) の背部皮膚を用いた。

皮膚組織の測定法として、凍結法では代謝速度が著しくおとされるため反応の初期過程を求めるに適していると考え、採血後すぐに液体窒素温度で凍結し、低温 (-20°, -10°, 0°, 5° の条件) で測定した。しかし、脳などの臓器とは異なり、皮膚組織の細胞は凍結により破壊され正確な pH を求めることは出来なかった。

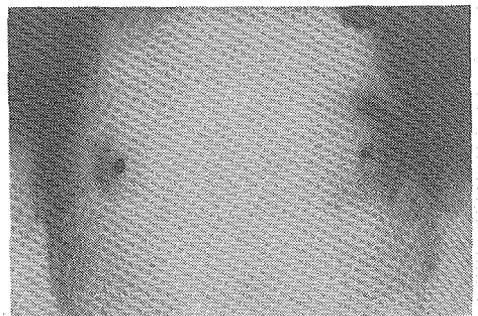


図 2. BSG を対する遅延過敏症を獲得したモルモットの抗原注射後 24 時間目の皮膚で、発赤がみとめられる。

遅延型アレルギー反応の病変局所のpHの測定

正常モルモットの背部皮膚組織を採取し、n.m.r. サンプル管に挿入し、室温で凍結を行ないP_iの経時変化を観察した(図3)。経時的にP_iのレベルは低磁場側(酸性側)へシフトし、その一次反応プロットが直線性を示した。この直線グラフの時間のchemical shiftを外挿してpHを求めた結果、正常皮膚組織のpHは7.135 ± 0.040 であることが明らかになった。

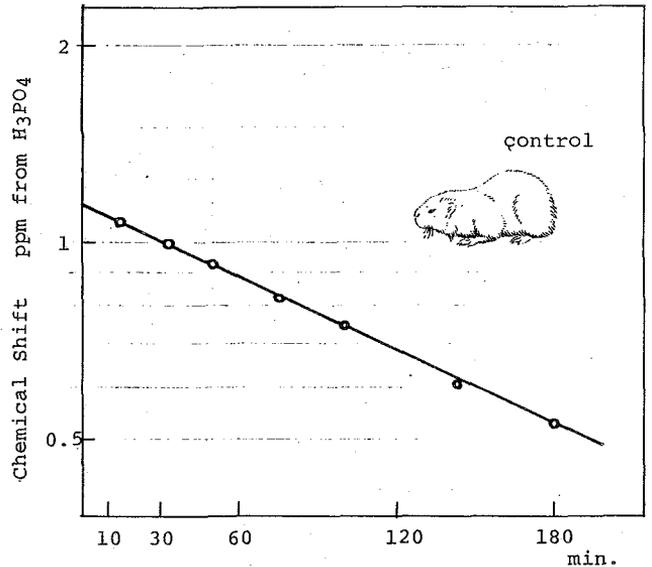


図3. 正常モルモットの皮膚組織におけるP_iの経時変化。

つまり、遅延型アレルギー反応組織では正常皮膚組織と同じpHとどのような変化があるかを明らかにするため、感作1週後のモルモット背部皮膚にBGGでchallengeし、24時間後の炎症局所を採取(図1.Cおよび図2を参照)して測定した。

炎症局所におけるP_iの経時変化を図4に示した。正常皮膚組織と同様に経時的にP_iのレベルは低磁場側へシフトするが、その一次反応プロットは正常皮膚組織とは異なり2相性(図4.AおよびB)を示した。比較的P_i産生の遅い系(B)から外挿して求められたpHは7.158 ± 0.033で、正常皮膚組織のpHとよく一致した。一方、P_iの産生の速い系(A)から求められた炎症局所におけるpHは7.400 ± 0.050で、今まで長い間病理学の分野で論じられてきた“炎症局所のpHの酸性化”とはまったく逆の結果を得た。

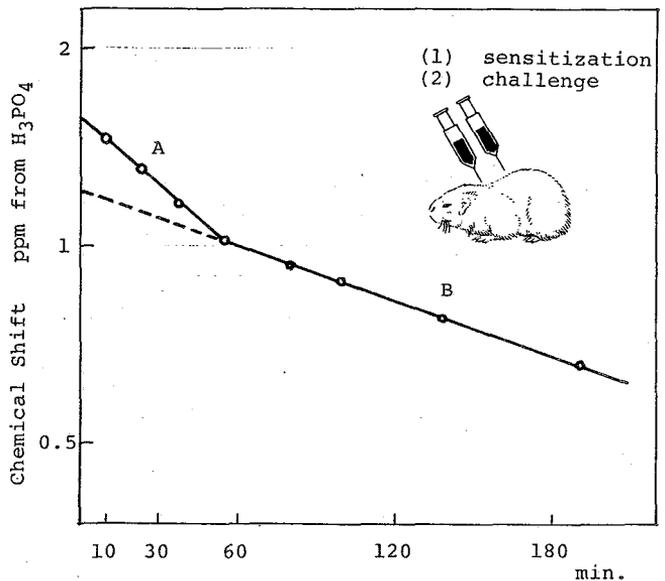


図4. 遅延型アレルギー反応の病変局所におけるP_iの経時変化

さらに神経系では、BGGでchallengeした皮膚遅延型アレルギー薬よりアルカリ性プロテアーゼを分離精製することによって成功している⁵⁾。この事実をn.m.r. から求められた炎症局所におけるpHの妥当性を強く示唆している。

炎症局所の測定では、初期過程において P_i の chemical shift の変化が大きいためモルモット背部及び組織を採取し検算を行なうまでの時間を最小にする必要がある。よって、さらに上げるために検算回数を多くすること、正確に P_i のシグナルの位置を知るためには1プロットに要する時間をなるべく少なくすることのあい矛盾するこの条件の一致を見い出さなければならぬ。各プロットとも400~600回の検算で測定した。

遅延型アレルギー反応の病変局所の緩和時間

遅延型アレルギー反応の病変局所では単核細胞の浸潤が著しく、炎症時では皮膚組織中の水の存在状態が大きく変化しているものと思われる。正常および炎症による皮膚組織中の水のプロトンの T_1 , T_2 を測定し、図5に示すような結果を得た。

遅延型アレルギー炎症での challenge 後の time course は (B) で表わされる。ここで challenge 操作による影響を除くため、無操作モルモットへ challenge 操作のみを行ない (C) その影響を求めた。 T_1 , T_2 値とも challenge 直後は challenge による影響が認められるが、9時間後にはその影響は殆んど認められず T_1 , T_2 値はともに炎症局所の後期的変化を来していること

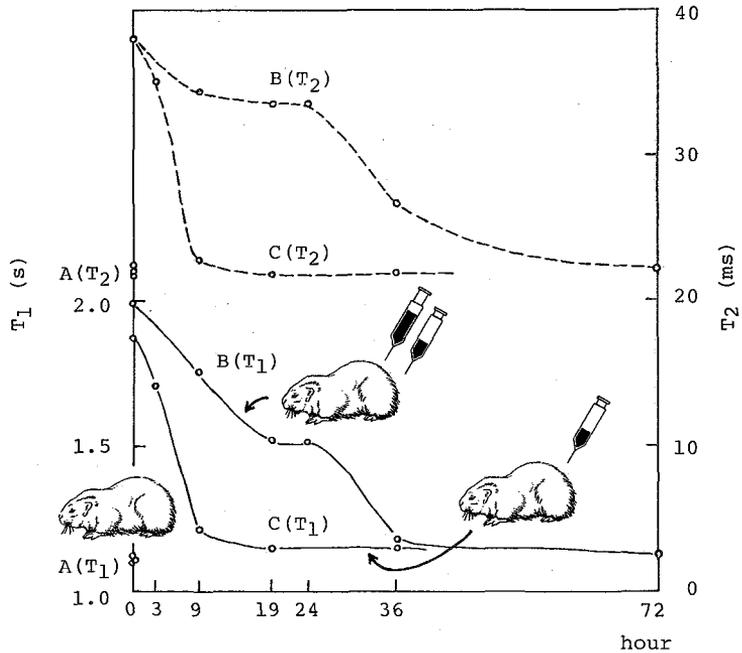


図5. 正常(A), および炎症(B)モルモットの challenge 操作後の経時変化。

と異なる。すなわち challenge 後 19~24 時間で炎症のピークをむかえ、36時間後には炎症が修復していることが明らかになった。遅延型アレルギーの病変局所では T_1 , T_2 値がともに増大していることは、炎症発現とともに自由水と結合水との量的な変化、すなわち自由水の結合水に対する割合が増大していること、炎症皮膚組織内では水の「構造性」の割合が相対的に減少していること、また K^+ , Na^+ などのイオン濃度および生体高分子との相互作用が著しく変化していることを示している。よってこれらの T_1 , T_2 値は遅延型アレルギー反応において、いままでの形態学的診断と同時に「炎症の度合の数量化」の可能性を提示している。

References

- 1) Opie, E.L.: J. Exper. Med., 8, 410 (1906).
- 2) Schade, H.: Die Physikalische Chemie in der Inneren Medizin (1923).
- 3) Menkin, V.: Arch. f. Pathol. 27, 115 (1939).
- 4) Yasuhira, K.: Acta Haem. Jap.: 18, 215 (1955).
- 5) Kambara, T. and Hashimoto, M.: Experientia, 35, 1110 (1979).

(徳大教養, 予衛研*, 日本電子**) ○吉川研一, 逢坂 昭*, 松下和弘**

はじめに

NMRの臨床検査への応用は, ここ1~2年めざましいものがある。その中でも「NMR映像法」は, 無侵襲的に生体の断層像を得ることのできる手段として特に注目をあびている。国内においても, 今年になって「NMR医学研究会」が発足し, 「NMR映像法」による臨床検査も, 近々開始されようとしている。この「NMR映像法」は, 外部から磁場勾配をかけることにより, 生体内の特定の部位の水($^1\text{H}_2\text{O}$)を測定し, それを空間的に掃引して, 断層像を得ようとするものであり, 得られる情報は, 水の量的分布および緩和時間の分布図である。従って, 現在迄のところ, このNMR映像法では, 化学シフトの差による“化学的”情報は捨てられていることになる。

一方, ^{31}P -NMRは, 生体組織中の無機リン酸, ATP, ADP, クレアチンリン酸などのリン酸誘導体の“高分解能”のシグナルを与えることが知られている。 ^{31}P 核は, 天然存在比100%であり, 感度も比較的良いために, 生体中の代謝研究の有力な方法として, ^{31}P -NMRが使われ, すでに数多くの報告がなされている。これに対して, ^1H -NMRは, 測定感度が ^{31}P 核よりも1桁以上優れているにもかかわらず, 生体中の水($^1\text{H}_2\text{O}$)の大きなシグナルにかくされて他の分子種の観測が困難であることや, ^{31}P に比して化学シフトが小さいことなどの理由により, 生体中の水の測定以外には, 不均一な生体試料への応用例は数少ない。¹⁻³⁾

われわれは, NMRの病態解析への応用研究を, ここ数年来おこなってきた。その中で, 例えば第18回の本討論会でも報告したように, ガン患者の血清には, 高率で乳酸の ^1H -NMRシグナルが観測されることなどから, ^1H -NMRによる血清の測定は, ガンの予備的診断方法の一つとして用いられる可能性があることがわかっている。³⁾

このような, 病態解析への ^1H -NMRの応用研究の一環として, 従来から血液と並んで, 臨床検査の対象としてよく用いられてきた尿について, “高分解能”の ^1H -NMR測定を試みたのでその結果を報告したい。

試 料

健康人尿13検体, 糖尿病患者尿7検体, 腎疾患患者尿10検体について, ^1H -NMR測定をおこなった。尿は採取後ただちに凍結保存し, 測定直前に室温にて解凍して測定に供した。すべての尿試料について, 市販の尿試験紙により, ウロビリノーゲン, 潜血, 蛋白, ブドウ糖, pHを調べた。患者尿を提供された慶応義塾大学医学部内科学教室土屋雅春教授, 徳島大学医学部内科学教室安岡劭助教授および試料作成に協力していただいた徳島大学医学部法医学教室原田寛子講師に感謝する。

測定方法

尿試料0.3mlを5mm径サンプル管に入れ, 内部ロック用に重水0.02mlを加え, さらに, 内部規準(化学シフトおよびシグナル強度の基準)として, 最終濃度0.43mMのDSSを添加した。 ^1H -NMR測定には, 日本電子JNM-FX100パルス・フーリエ変換NMR分光器を用い,

¹H-NMR of Human Urine. An Application of NMR Spectroscopy in Clinical Pathology.

(Univ. Tokushima, Natl Inst. Health, * JEOL **) K. Yoshikawa, A. Ohsaka*, K. Matsushita**

100 MHzにて測定した。測定時には水 (H_2O) のシグナルを除去するために, homogated decoupling 法により, 水のシグナルを選択的にラジオ波照射し, 45° パルス ($11\mu\text{sec}$)にて, 4秒毎, 200回積算した(一検体当りの所要時間は約13分である)。測定時のスペクトル幅は2 kHz, データ点は8 Kにとり, 倍精度にて積算した。従って, 実際に使用したコンピューターのメモリーは16 K語である。

軽水試料の測定方法としては, 今回用いた homogated decoupling 法 (selective presaturation 法) 以外にも, 次のような方法が知られている。

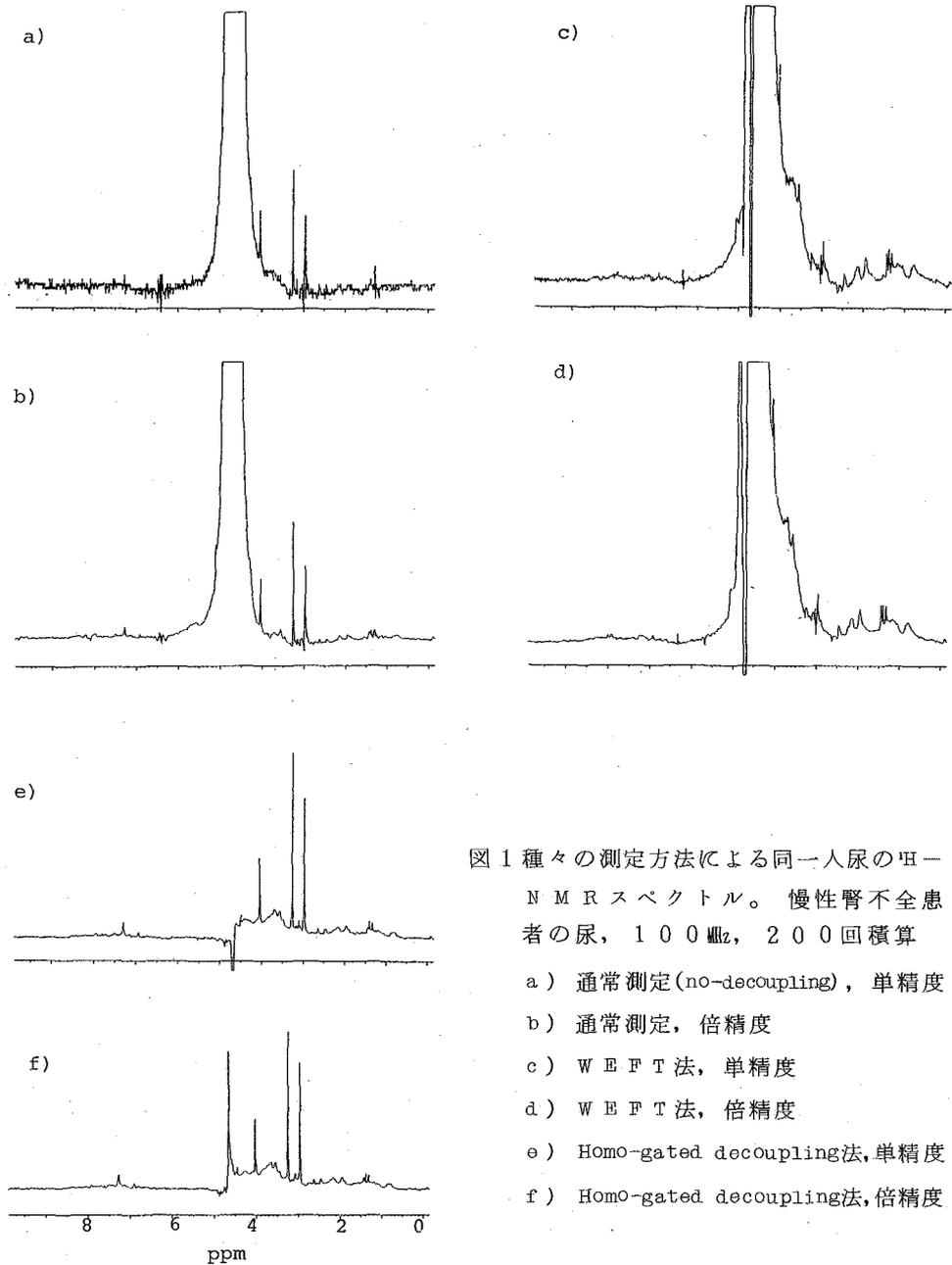


図1 種々の測定方法による同一人尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル。慢性腎不全患者の尿, 100 MHz, 200回積算
 a) 通常測定(no-decoupling), 単精度
 b) 通常測定, 倍精度
 c) WFT法, 単精度
 d) WFT法, 倍精度
 e) HomO-gated decoupling法, 単精度
 f) HomO-gated decoupling法, 倍精度

- 1) W E F T 法。T₁の差により、溶媒以外のシグナルを得る方法。
- 2) notchフィルターを用いることにより、F I D (Free Induction Decay) 中の¹H₂Oの成分を除く。
- 3) 選択励起による方法。H₁の強度の弱い selective pulseにより測定する。
- 4) 相関 N M R 法。

W E F T 法は、水 (¹H₂O) の T₁ と、その他のシグナルの T₁ との間に大きな差があることが必要であり、そのため軽水中のタンパク質の測定などによく用いられている。しかしながら、今回の尿試料の場合には、尿中の有機酸やアミノ酸などの低分子有機物の T₁ と、水の T₁ との差は余り大きくないために W E F T 法では、シグナル強度が正しくあらわれない (図 1 c, d 参照)。一方、3) や 4) の方法では、水より高磁場側と低磁場側を別々に積算する必要がある。また、2) などの方法では、ベースラインのうねりがおこりやすいなどの欠点がある。このため、今回は、市販の測定装置でも、容易に測定することのできる、Homogated decoupling 法を用いた。本方法では、水の近傍のシグナル強度が、照射ラジオ波の影響で、小さくなる恐れがあるが、図 1 e, f に示したように、シグナル強度に対する影響は余り大きくないことがわかる (図 1 b のスペクトルと比較されたい)。

結 果

測定した尿試料のうち、4 検体のスペクトルを図 2 に例示した。a, b は健康人尿、c は慢性腎不全患者尿、d は糖尿病患者の¹H-N M R スペクトルである。図 2 a) において、高磁場側から、アラニン (δ 1.46, d)、クエン酸 (δ 2.60, d)、クレアチニンおよびクレアチンのメチル (δ 3.03, s)、クレアチンのメチレン (δ 3.92, s)、クレアチニンのメチレン (δ 4.04, s)、馬尿酸 (δ 7.6, m) などのシグナルがみられる。 δ 3.25 および δ 3.56 のシグナルは現在のところ帰属不明である。 δ 7.0 ~ 7.4 のシグナルは、種々のフェノールおよび安息香酸誘導体のシグナルであると考えられる。図 2 b) では、 δ 1.30 に乳酸のメチル基の doublet がみられる。他の健康人の尿の場合も、図 2 a, b) と類似のスペクトルが得られた。

一方、慢性腎不全患者尿のスペクトル (図 2 c) では、 δ 3.25 の未同定のシグナル強度が増大し、クレアチニンのメチルシグナルよりも大きくなっている。このような傾向は、他の腎疾患 (ネフローゼ、腎性尿崩症など) 患者尿についてもみられた。今後、このシグナルの帰属を明らかにすることは診断上重要であろう。 δ 0.9 ~ 1.0 は尿蛋白のメチル基由来のシグナルであると考えられる。この結果は、尿試験紙による高濃度の蛋白の検出結果と対応している。

糖尿病患者 (図 2 d) においては、 δ 3.0 ~ 5.3 に高濃度のブドウ糖の存在を示すシグナルが現われており、他のものによるシグナルは殆どみられないことが注目される。

臨床診断上の意義

以上のように、前処理なしで人尿中の各種の有機酸やアミノ酸、糖などを同時に、しかも短時間に測定できることは、本測定方法の大きな利点であると思われる。このことは、従来尿の検査法として用いられてきた試験紙法や生化学的分析法 (マルチ・チャンネル

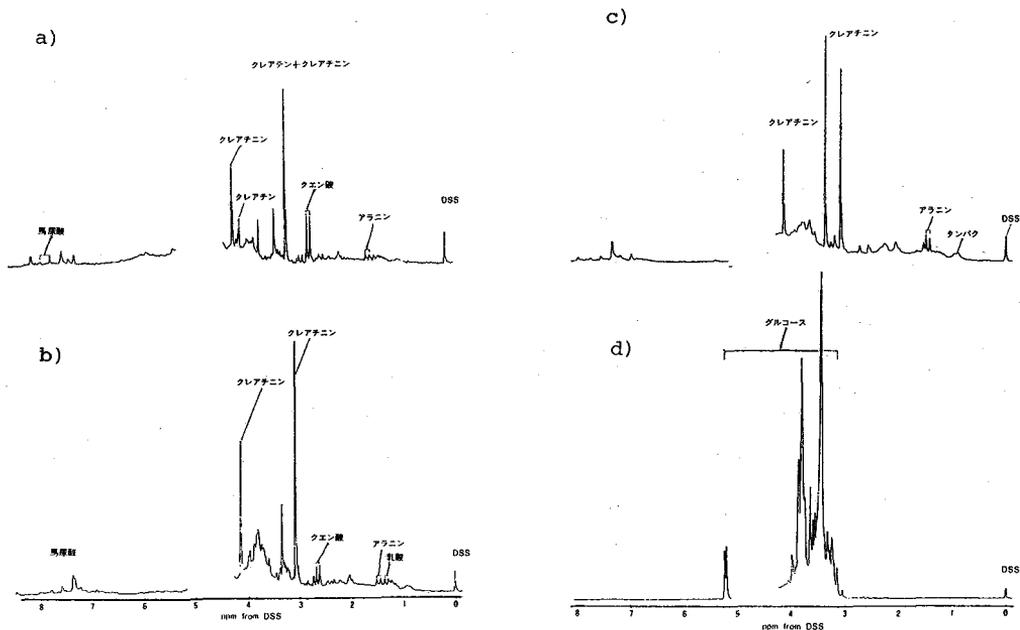


図2 人尿の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(DSS濃度はいずれも 0.43 mM 、その他の測定条件は本文参照) a), b)健康人の尿のスペクトル, c)慢性腎不全患者の尿, d)糖尿病患者の尿

アナライザーを含む)では、みられなかった利点である。NMRは原理的に検出感が低いことから、微量成分の検出には適していないが、他の分析法と相補うことにより臨床診断のための有力な手段となることが期待される。尿の $^1\text{H-NMR}$ から得られると考えられる病態情報としては次のようなことがあげられる。

- 1) クレアチン——筋ジストロフィー等の筋肉疾患の鑑別診断上重要。従来は、ピクリン酸との化学反応による比色法(Folin法)が主であったが、除蛋白などの前処理が必要な上、誤差も大きかった。
- 2) 糖——酵素法(試験紙)又は還元法が従来用いられてきたが、ビタミンCなどにより、誤差が生じる。又、先天性代謝異常として、尿中に乳糖、果糖、ガラクトース、五炭糖などが存在することがあるが、これもNMRにより判別可能である。
- 3) クエン酸——近年、尿石の生成の抑制作用をもつことが明らかとなってきた。腎結石、膀胱結石などの病態との関連性が考えられる。
- 4) 乳酸——尿路感染症などの病態と関連していると思われる。

おわりに

200 MHz NMRを用いると、1分程度の積算時間で良好なスペクトルが得られることもわかった。今後、基礎的データの蓄積をはかることにより、NMRの臨床診断手段としての有用性を明らかにする予定である。

- (文献) 1)吉川, 逢坂「化学の領域」35, 174(81). 2)松下, 吉川, 逢坂「日本電子ニュース」21(2), 25(81). 3)逢坂, 吉川, 松橋, Japan. J. Med. Sci. Biol. 32, 305('79).

(京府医大, 生理研*) ○吉崎和男, 成瀬昭二,
堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, 巨 弘*

(はじめに)

最近NMR法の臨床医学への導入, 特に癌組織のT₁時間が正常組織に比べ長く, そのことが癌の診断に有用であることが示唆されて以来, NMR-CTやtopical magnetic resonanceが新しい診断法として注目されている。本研究では脳組織を対象とし, 脳腫瘍の¹Hの緩和時間を測定するとともに, 脳浮腫における水の緩和時間の変化を実験動物モデルで追跡したので報告する。さらに脳組織の¹H-高分解能スペクトルが選択的氷飽和法で測定可能となったことも報告する。

(方法)

脳腫瘍の試料はヒト脳外科手術摘出標本を用いた。脳浮腫の実験動物モデルにはラットを用い, 代表的な2種類の実験的脳浮腫を作成した。すなわちcytotoxic type(細胞毒性)としてtriethyltin bromide(TEET)を1mg/kg/day腹腔内に投与したもの, vasogenic type(血管性)としてラット頭部に直径4mmの骨窓を開け, -80°Cに冷却した銅柱を硬膜上から30秒あてて大脳にcold injury(寒冷障害)を生じさせたものを用いた。

この前処置を行ったラットの大脳皮質および白質を用い, 水の緩和時間(T₁: inversion-recovery法, T₂: Meiboom-Gill法)を測定した。装置はJEOL PFT-100 NMRで¹Hの共鳴周波数99.54MHzで室温24°Cで測定した。¹Hスペクトルの測定には選択的氷飽和法(homonuclear gated decoupling)を用いた¹⁾。

(結果および考察)

1. 脳腫瘍のT₁およびT₂時間

脳外科手術により摘出された種々の脳腫瘍標本の緩和時間(T₁, T₂)をFig. 1に示

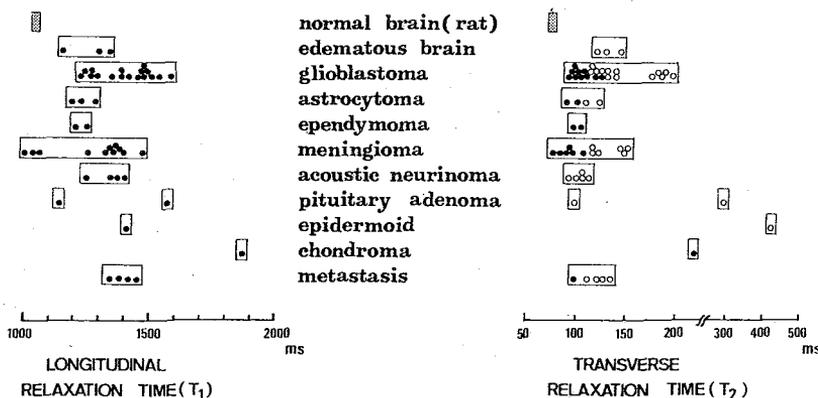


Fig. 1 脳腫瘍標本の緩和時間(T₁, T₂), 黒丸は単一指数的減衰を示したもの, 白丸は単一指数的減衰を示さず, 2成分に分離した遅い緩和成分のみを示す。

¹H NMR study on brain tissue

(Kyoto Pref. Univ. Med., Natl. Inst. Physiol. *) K. Yoshizaki, S. Naruse, Y. Horikawa, T. Tanaka, K. Hirakawa, H. Watari*

す。正常脳組織の T_1 および T_2 はラットにおいて約1.1secおよび76msecであった。脳腫瘍標本ではこのラットの値に比較して T_1 および T_2 の延長化が認められた。すなわち他の癌組織と同様な所見が脳腫瘍についても認められた。ただし T_2 に関しては、

エコーの減衰が単一指数的減衰を示さないものが多く、その遅い緩和成分の T_2 のみを示した。ところで、この T_1 および T_2 の延長化は脳腫瘍だけでなく脳浮腫でも認められた。

2. 実験的脳浮腫の水の T_1 および T_2 時間の経時的変化²⁾。

Fig. 2 A)に大脳皮質(gray matter)および白質(white matter)の T_1 の変化を示す。正常脳組織では T_1 は皮質の方が白質よりも長い、TET投与とともに白質の T_1 の延長化が認められた。Fig. 2 B)およびC)に大脳皮質および白質の T_2 の変化を示す。 T_2 は正常脳組織では単一指数的減衰を示し、皮質および白質とも76msecであったが、TET投与とともに白質の T_2 の延長化が認められた。この T_2 の延長化とともにエコーの減衰は単一指数的減衰を示さなくなり成分の減衰に分離可能となった。この遅い緩和成分は著明な T_2 の延長化を示した。この時ラットは動きがにぶく、尿失禁や下肢麻痺が認められ

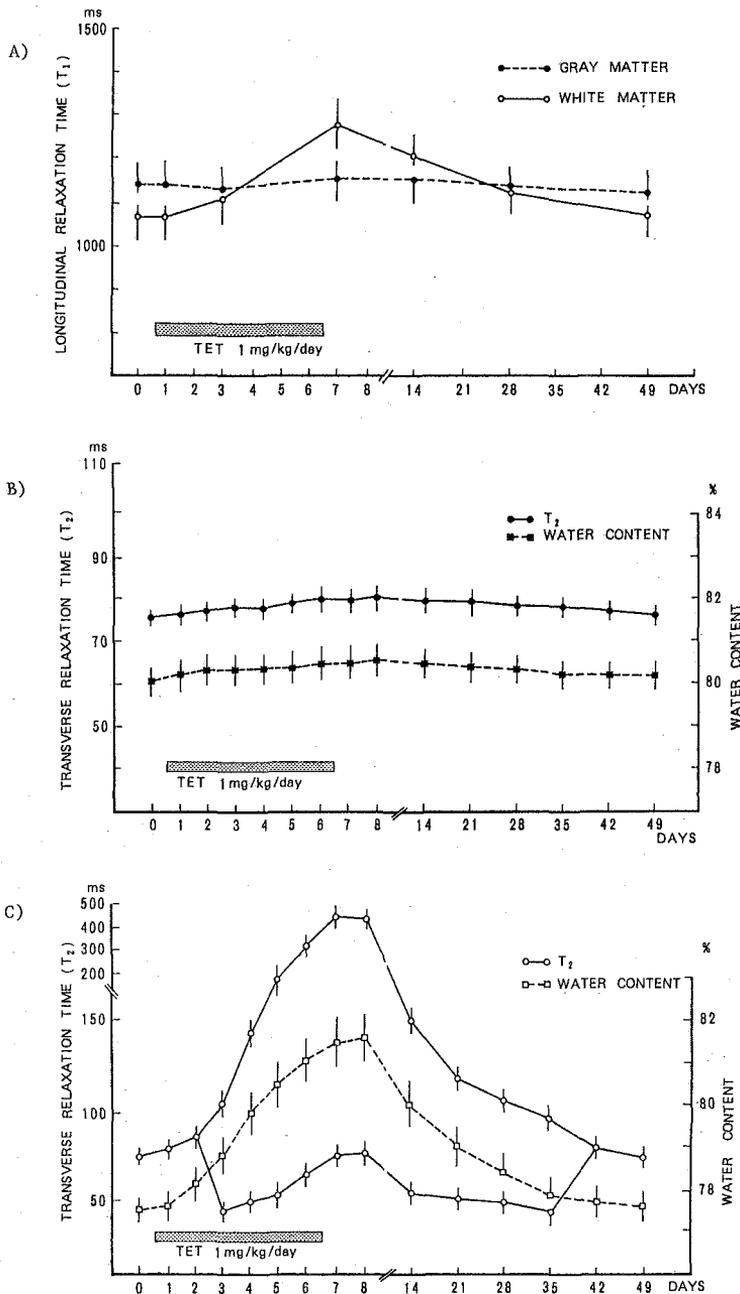
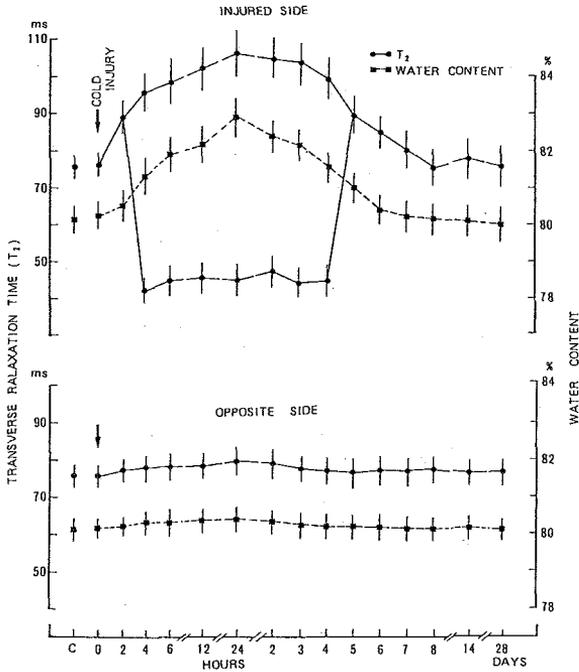


Fig. 2 TET中毒ラットの脳皮質および白質の水の緩和時間(T_1 , T_2)の変化。TETは腹腔内に7日間連日投与した。A)は T_1 の変化を、B)およびC)は皮質および白質の T_2 の変化を示す。各測定点は5~7例の平均値と標準偏差を示す。

A)



B)

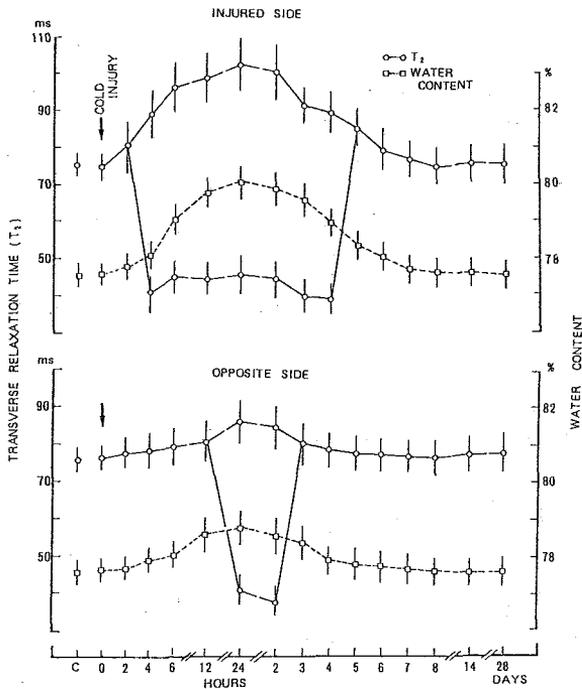


Fig. 3 cold injury ラットの 大脳皮質(A)および白質(B)の緩和時間(T_2)の変化。

損傷だけでなく、その後血管系の損傷部位から脳実質への水分移動が生じていることを示している。またこの水分移動は反対側の白質にまでおよぶ事が明らかとな

た。TET投与を中止するとこの白質における T_1 および T_2 の延長化は徐々に回復し、約1ヶ月後にもとの値にもどり、ラットの麻痺症状も消失した。一方、cold injuryを与えたラットでは、損傷側大脳半球の皮質および白質とも T_1 および T_2 の延長化が認められた。この延長化は1~2日後に最大に達し、その後徐々に回復しもとの値にもどった(Fig. 3)。 T_2 はその延長化とともに単一指数函数的減衰からはずれ、2成分に分離可能となり、この遅い緩和成分の T_2 の延長化が著明となった。なお損傷の反対側の大脳皮質ではほとんど変化が認められないが、白質では若干の T_2 の延長化が認められた。

これらの脳浮腫に伴う緩和時間の延長化は水分含有量の増加を良く反映している(Fig. 2, 3)。TET中毒による脳浮腫では、形態学的に白質のミエリン鞘の解裂が生じ、そこに水が貯溜することが明らかになっている^{3,4)}。したがって白質における緩和時間の延長化や遅い緩和成分の出現は、その貯溜した水によるものと思われる。一方、cold injuryでは、損傷直後よりも1~2日後の方が緩和時間が長く、しかも水分含有量も増加している。これは直接的な

った。以上の様に脳腫瘍だけでなく、脳浮腫時にも緩和時間の延長化がみられ、さらにその軽時の変化を追跡すれば、脳浮腫の程度やその後の時間的变化の予測も可能となり、今後の臨床医学への診断ならびに治療の評価に役立つものと思われる。

3. ラット脳組織の¹H-高分解能スペクトル

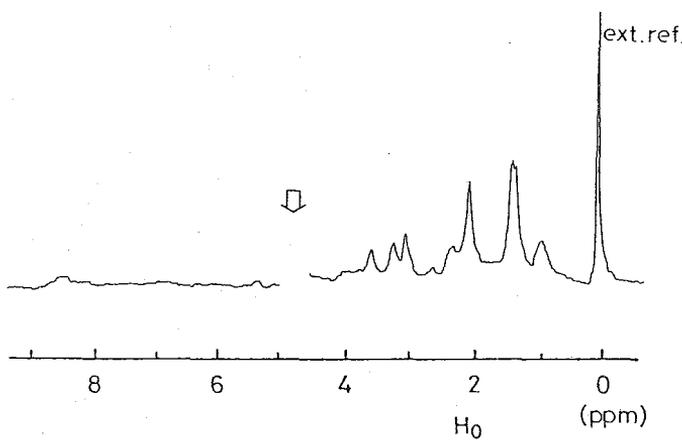


Fig. 4. ラット脳組織の¹H-高分解能スペクトル
選択的水飽和法を用い、矢印は水の照射位置を示す。

脳組織の緩和時間の変化が脳腫瘍や脳浮腫の程度を良く反映するが、¹H-NMR法で高分解能スペクトルが得られれば、代謝などの知見を与えてくれると期待できる。以前に報告した筋組織などの高分解能スペクトルを得る方法である選択的水飽和法¹⁾を脳組織に用いたところ、巾の広い成分とその上に重なった高分解能スペクトルが得られた。この巾の広い成分は蛋白質

などの高分子に由来すると考えられ、その成分を除去した高分解能スペクトルをFig. 4に示す。これら高分解能スペクトルを与える物質として、脳組織内に多量に存在する低分子が考えられ、乳酸や脳内伝達物質のシグナルである可能性がある。従って脳の代謝や生理機能に対する知見を与えてくれると期待され、また³¹P NMR法と併用すれば、脳のエネルギー代謝に対する知見も得られる⁵⁾。さらに³¹P NMR法では、脳組織と筋肉組織との区別はスペクトル上では困難であったが、¹H NMR法を用いれば両者の区別も可能となる。

また、脳腫瘍でも同様な¹H-スペクトルが測定できるが、脳組織とは全く異なる組織由来の腫瘍では異なったスペクトルパターンが得られる。従って、将来、NMR-CTで腫瘍が検知された場合、その腫瘍のスペクトルをtopical magnetic resonance法で測定できれば、その腫瘍が脳組織由来のものであるか否かが明らかになると期待される。

〔謝辞〕 本研究の一部は文部省科学研究費補助金の助成をうけた。本研究の一部は京都府立医大、西川弘恭氏、瀬尾芳輝氏との共同研究による。

〔文献〕

1. Yoshizaki, K. et al. J. Kyoto Pref. Univ. Med. **82**, 337 (1980), Biochim. Biophys. Acta (in press)
2. 成瀬昭二他, 脳神経 **33**, 569 (1981)
3. Lee, J.C. and Bakay, L. Arch. Neurol. **13**, 48 (1965)
4. Klatzo, I. J. Neuropath. Exp. Neurol. **26**, 1 (1967)
5. Nishikawa et al. J. Biochem. **87**, 663 (1980)

(京府医大)

吉崎和男, 〇瀬尾芳輝
森本武利

〔はじめに〕

^1H NMR 法に選択的水飽和法を用いると, 生体組織の高分解能スペクトルが得られることをすでに報告した¹⁾。今回, カエル筋肉を用い嫌氣的条件下における静止筋の経時変化, 筋収縮に伴う変化を主に ^1H NMR スペクトルを用いて追跡し, 乳酸産生に伴う細胞内pHの酸性化より筋肉の緩衝能の計測を試みたので報告する。

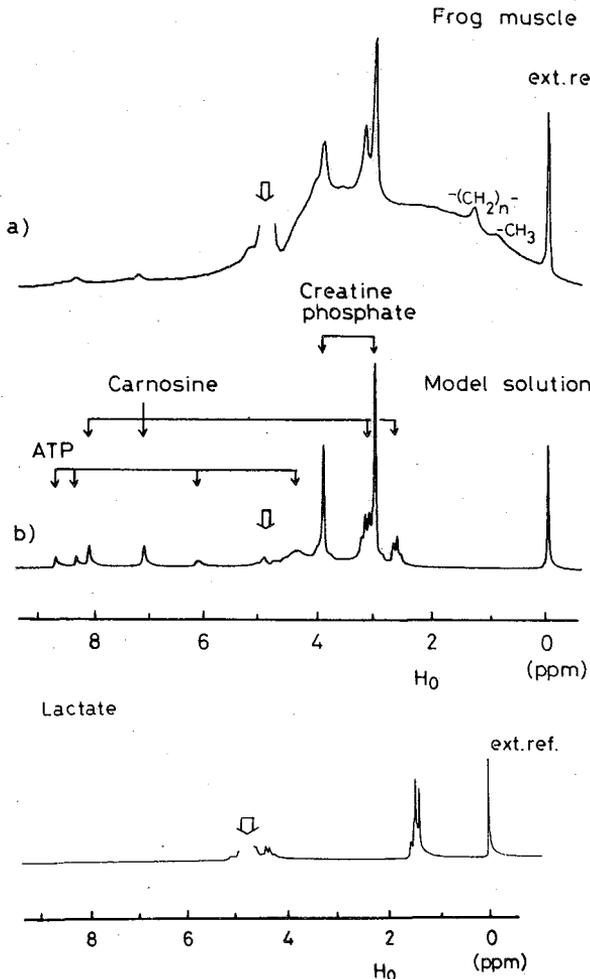


Fig. 1. カエル筋肉(a), モデル溶液(クレアチン磷酸30mM, カルノシン14mM, ATP5mM, D_2O)(b) および50mM 乳酸溶液の ^1H スペクトル。さらに, 1.2, 0.9ppmに脂質のメチレン,

〔方法〕

試料は食用ガエル大腿二頭筋を用いた。筋肉は窒素ガスで飽和したリンガー液をみたした径10mmの試料管に入れ密栓し, 嫌氣的条件とした。

測定は, JEOL PFT-100 NMR で, ^1H の共鳴周波数は99.54 MHz であり選択的水飽和法を用い, 約15分間の積算を行った。また ^{31}P の共鳴周波数は40.29 MHz, 約30分の積算を行った。測定温度は室温24℃で行った。

〔結果および考察〕

Fig. 1に筋肉のスペクトルを示す。スペクトルは半値巾約4ppmの巾広い成分と, その上に重った高分解能な成分とからなる。巾広い成分は蛋白質等の巨大分子由来であり, 高分解能な成分は細胞質可溶成分である低分子に由来する。水の低磁場側にカルノシンのヒスチジン由来の2つのシグナルが検出される。水の高磁場側には3および4ppmにクレアチン, クレアチン磷酸の2つの大きなシグナルがあり, さらに, 1.2, 0.9ppmに脂質のメチレン,

Intracellular pH and buffer value in muscle measured by ^1H and ^{31}P NMR.

(Kyoto Pref. Univ. Med.) K.Yoshizaki, Y.Seo and T.Morimoto.

れるが、カエル筋肉においては、1.3 ppmのシグナルは主に乳酸に由来する。

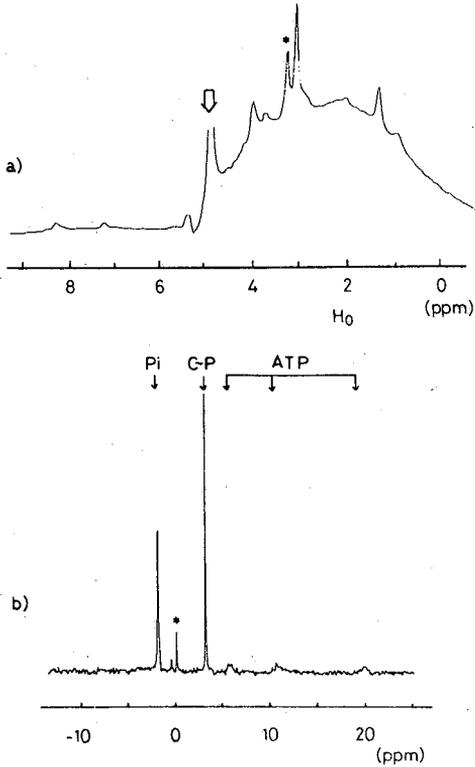


Fig. 2. 同一筋肉の¹Hおよび³¹P NMR スペクトル。
glycerolphosphorylcholine 由来のシグナルを*印で示す。

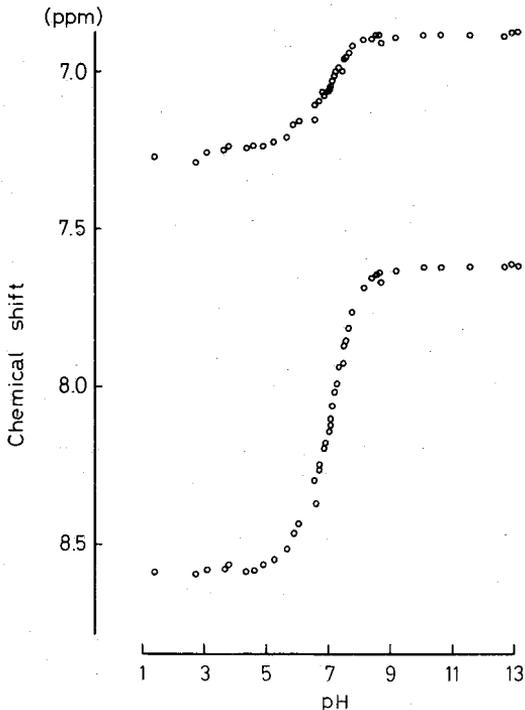


Fig. 2 は同一の筋肉について¹Hおよび³¹P NMRスペクトルを得たものである。

³¹P スペクトルでは通常、無機リン、クレアチンリン酸、ATPが検出される。¹H スペクトルからクレアチンの総量を求め、³¹P スペクトルからクレアチンリン酸量を求めると、クレアチンのリン酸化率は0.9であった。また、冬ガエルでは³¹P スペクトルにglycerol phosphorylcholine(*)が検出され、この時¹H スペクトルにおいてもコリンのN-メチル領域にシグナル(*)が検出される。以上のように¹Hと³¹P NMRを併用すると筋細胞内のカルノシン、クレアチン、クレアチンリン酸、無機リン酸、乳酸、ATP、脂質、glycerol phosphorylcholineの測定が可能となる。

〈¹H NMRによる筋細胞内pHの測定〉

カルノシンのヒスチジン由来の2つのシグナル(高磁場側がC₄-H, 低磁場側がC₂-H)は生理的pH領域で化学シフトが変化する。Fig. 3

にカルノシン重水溶液のpH滴定曲線を示す。C₂-Hは、生理的pH領域で約0.8 ppmのシフトを示し、C₄-Hに比べシフトが大きいので、pH測定には、C₂-Hの化学シフト変化を用いることとした。KCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, CaCl₂ 15 mM, 筋肉モデル溶液(クレアチンリン酸30 mM, カルノシン14 mM, ATP 5 mM, H₂O), 筋肉ホモジネートを加えた溶液について測定した。これらの影響は誤差範

Fig. 3. カルノシンのヒスチジンのC₄-H, C₂-HのpH滴定曲線。カルノシン14 mM, クレアチンリン酸30 mM, リン酸バッファ10 mM, 重水溶液を用いた。

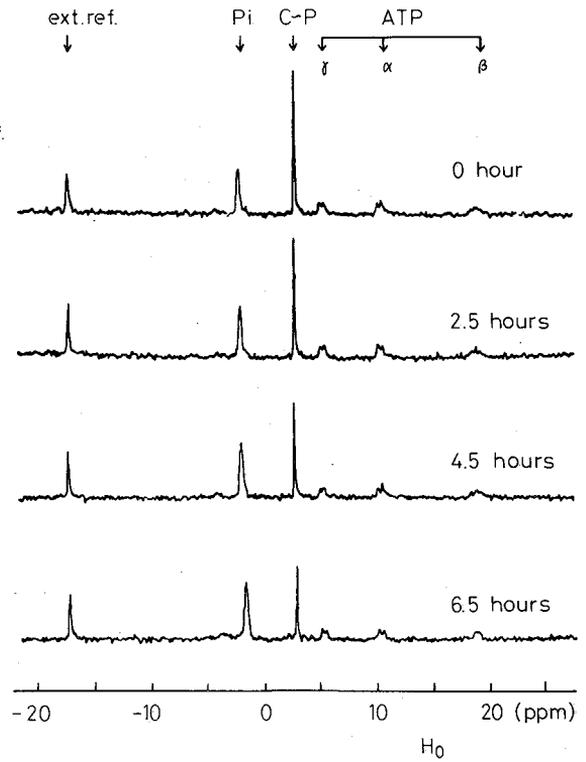
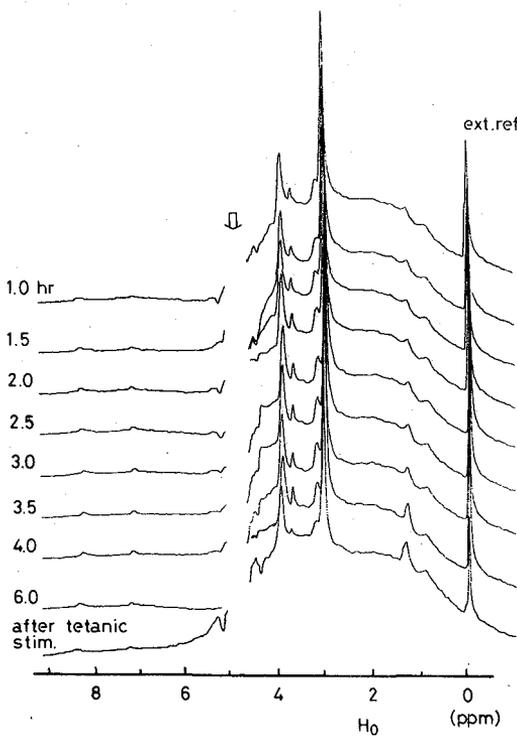


Fig. 4 ^1H スペクトルの経時変化, 試料作成からの時間を左に示す。12ppmのシグナルが乳酸のメチル基, 8.2ppm 付近のシグナルがカルノシンの $\text{C}_2\text{-H}$ である。

Fig. 5 ^{31}P スペクトルの経時変化 無機リン (Pi), フレアケン燐酸 (C~P) ATP (ATP α , β , γ) のシグナルを矢印で示してある。

圏内 (0.1 pH unit 以下) であった。 $\text{C}_2\text{-H}$ の pH 滴定曲線と, 筋スペクトルの $\text{C}_2\text{-H}$ の化学シフト値から筋細胞内 pH を算定するとカエル筋肉の pH は 7.1 ± 0.1 ($n=5$) となった。

<嫌氣的条件下における静止筋の経時変化>

Fig. 4 に ^1H スペクトルを示す。乳酸が徐々に増加し, カルノシンのシグナルは低磁場側へシフトする。即ち, 嫌氣的解糖系により, 乳酸が産生され, 細胞内の酸性化が生じている。Fig. 5 に ^{31}P スペクトルを示す。フレアケン燐酸が徐々に減少し, 無機リンが増加している。しかし, ATP の α , β , γ の量は変化していない。従って, 嫌氣的解糖によるエネルギー産生が行われているにもかかわらず, エネルギー産生は, 静止筋におけるエネルギー消費に対して不十分であることがわかる。²⁾

<筋収縮による変化>

嫌氣的条件下で電気刺激 (50ボルト 50Hz) により大腿二頭筋を 5 秒間強縮させた時のスペクトルの変化を Fig. 6 に示す。

a) は静止時, b) は 1 回強縮後, c) は 2 回強縮後のスペクトルである。約 50 分間隔でとったものである。乳酸の増加と, pH の酸性化 (カルノシンのシグナルの低磁場

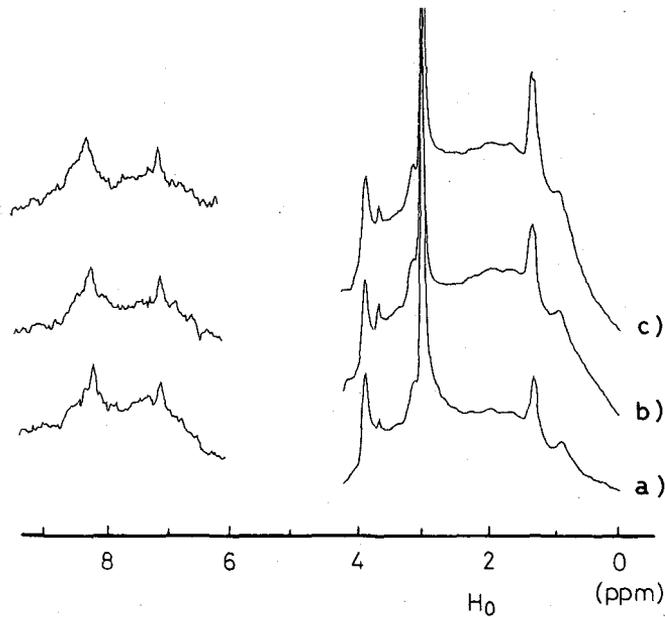
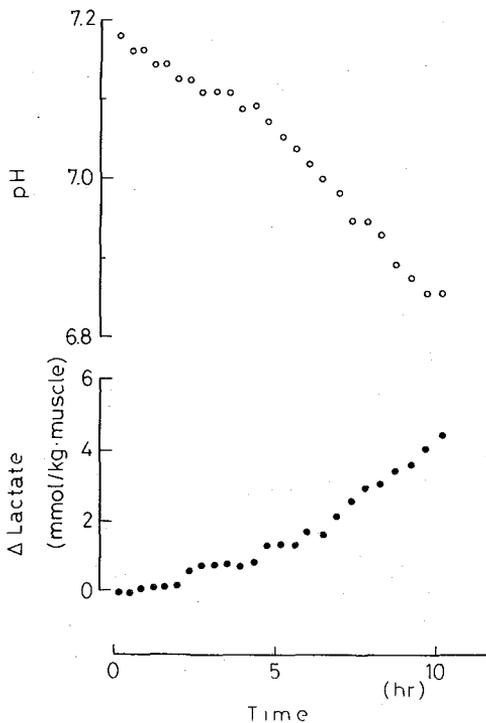


Fig. 6. 強縮による¹Hスペクトルの変化。水より低磁場側のスペクトルは4倍に拡大してある。



量を示す。10時間の嫌氣的条件下で約4 mMの乳酸の増加がみられた。また筋肉pHは、7.18から6.85まで変化した。乳酸の増加量に対する筋pHの変化から、みかけの緩衝能が求められ、約13 mEq/kg·muscleの結果を得た。

〔文献〕

- 1) 吉崎和男他, 才18回NMR討論会講演要旨集, 137 (1979)

Yoshizaki, K. et al. J. Kyoto Pref. Univ. Med. 89, 337 (1980), Biochim. Biophys. Acta (in press)

- 2) Yoshizaki, K. J. Biochem., 84, 11 (1979)

Fig. 7. 嫌氣的条件下での静止筋の乳酸産生量とpH変化。横軸は試料作成からの時間を示す。

側へのシフト)が認められる。この時1回の強縮で約2 mmol/kg·muscleの乳酸が産生されている。従って筋収縮により、クレアチン燐酸が大量に消費され、それを補うために、解糖系が急速に働くことが明らかにされた。

〔細胞内緩衝能の測定〕

Fig. 7に静止筋の¹Hスペクトルより求めた乳酸増加量と筋肉pHの変化を示した。乳酸増加量は乳酸のシグナルの面積から求めた。乳酸のシグナルは脂質のシグナルと重なっているため、最初のスペクトルからの変化

(生理研) 巨 弘・志賀 潔 (大阪医大) 村上政隆・今井雄介
 (名大医) 富田忠雄 (大分医大) 山田和広・米谷快男
 (京府医大) 吉崎和男・瀬尾芳輝

まえおき

生体の組織は種々の機能を持ち、これの集合した器官では独立した生理機能を示す。この生理機能にはエネルギー消費をともなっているが、器官でのエネルギー修復機構が問題となる。たとえば筋の収縮はATPの分解によって力学的エネルギーを得ているがその補給の問題、また消化管や腎における大量の水の吸収や分泌はイオンの能動輸送により浸透圧差が作られる結果として起る水の移動現象であるが消費したATPの再生の問題がある。個々の生理現象にともなうATPの利用については生化学的によく研究されているけれども、器官として見たときのエネルギー代謝の知見は欠けている。このため無侵襲計測による燐化合物の動態が知られねばならないが、これには ^{31}P -NMRの適用が考えられる。問題点として、i) 生体中の燐化合物は細胞膜を構成する燐脂質とエネルギー代謝に関係するATP, ADP, クレアチン燐酸, 糖燐化合物, NAD^+ , NADH などがある。前者は運動性が悪く緩和時間が短いので両者の分離は可能である。ii) 生体組織中のエネルギー代謝に関係する燐化合物の濃度は骨格筋を除き数mMであり組織での反応は時間分解測定によらねばならないが、測定にあたっては量的に多くすると共に感度も高くしなければならない。iii) 組織や器官では酸素の供給がないと活動を停止するので動静脈へのinfusionや組織の場合perfusionを行う必要がある。最近では磁場焦点法を用いたTopical magnetic resonance (TMR)の開発も行われているが、従来の高分解能NMRにおいて広径試料管(30mmφ)を用いたときの測定を行って検討した。

実験装置

Brucker WM-360wbを使用した。30mmφの広径試料管の使用できるプローブを装着した。これは ^1H のdecouplingも温度制御も不可能である。90°パルスの測定にあたって、パルス中を200μsecまではFIDは大きくなるがこれ以上は飽和する傾向にある。0.1Mのスピニングをした時燐酸緩衝液の線巾は1~2Hzが得られ測定可能な容量は35mlである。実験結果

i) 骨格筋 食用蛙の腓腹筋4筋(約20g)を30mmφ試料管に挿入し、測定した結果を図1に示す。これは1.4secの繰り返しを400回の積算をして線巾=10Hzウィンドウ処理してあるが低磁場側より、無機燐酸, クレアチン燐酸, ATP, ADP, NAD^+ , NADH の吸収が見られる。図1の下は12回積算(15sec)で得られたものを示すが、これを用いると15秒の時間分解が可能であることを示している。データ集録時間が短いため濃

わたりひろし、しがきよし、むらかみまさてる、いまいゆうすけ、とみたさだお
 やまだかずひろ、こめたにかおる よしざきかずお、せおよしてる

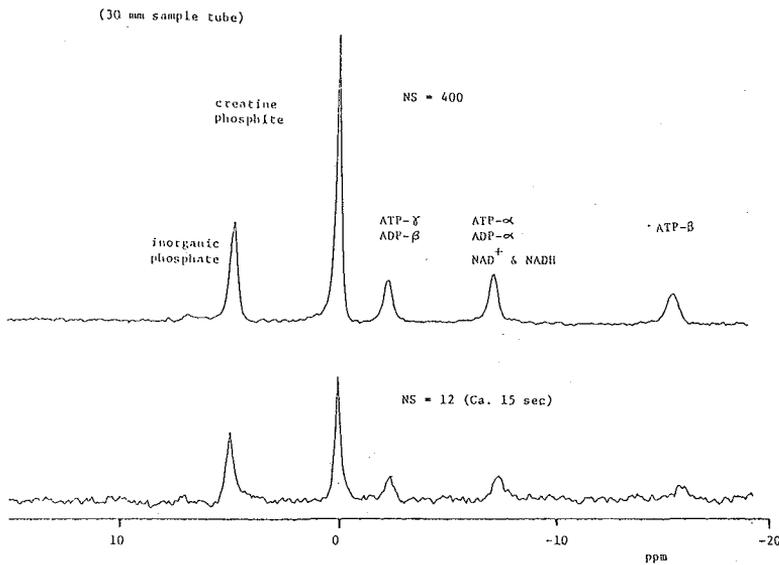


図1. 蛙腓腹筋(20g)の ^{31}P -NMR. 下のスペクトルは12回加算のものを示した。

度の比は求め得ない。
この実験ではperfusionは行っていないが、用いた腓腹筋の厚さが1cmもあるので、十分な酸素供給は不可能である。筋収縮のエネルギー機構の研究には縫工筋を用い、十分なperfusionの実施が要求される。
2)平滑筋 正常 Krebs 液中におけるモルモット結腸経の平滑筋の収縮活動はグルコースを除いても著明な変化を受

けないが、 K^+ イオンで脱分極し拘縮を起させるとグルコース除去により緊張性の張力発生は強く抑えられる様になり、またグルコースの再投与によって急速な回復が見られる。 Ca^{2+} 欠如・高 K^+ 液で脱分極しておき、一定時間ごとに Ca^{2+} を一時的に再投与する時発生する張力と、ATP及びブクレアチン燐酸の濃度との関係をluciferin-luciferase 反応を用いた生化学的方法によって研究されている。NMRでは灌流しつつ非侵襲測定ができるが、手技上3~5g (モルモット35匹分)の平滑筋を用いた。実験では95% O_2 , 5% CO_2 で飽和させた Krebs 液をperfusionを行って測定したが、十分なS/Nを得るのに1600回の積算を必要とした。したがって試料はさらに数倍のものが要求される。 Ca^{2+} freeの灌流液に切換えて測定を行ったが、図2の結果に変化は見られなかった。この結果生化学的手法による測定の確証を得るには至っていない。

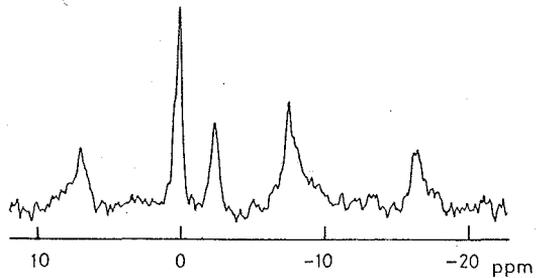


図2. モルモット結腸経の平滑筋(4g)の ^{31}P -NMR

3)唾腺 イヌ顎下腺は鼓索神経刺激(Ach投与)により大量に唾液分泌を起す(0.6ml/分/g腺重量)。これに伴い腺の代謝量も増加し、熱測定法から静止時、約8mW/gのものが分泌時、約60mW/gにまで上昇する。また分泌時には酸素消費、二酸化炭素産生も7~8倍増加し、産熱増加と対応する。唾液分泌の本態はイオン能動輸送に伴う浸透流と考えられ、分泌時7~8倍にも増加した代謝エネルギーは主にイオン能動輸送系にATPの形で供給され $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaseなどで消費されると予想される。イヌはチオペンタールによる静脈麻酔下で両側の顎下腺(それぞれ約6g)を灌流できるように手術した。灌流液はPVP(ポリビニールピロリドン)5%を膠質浸透圧維

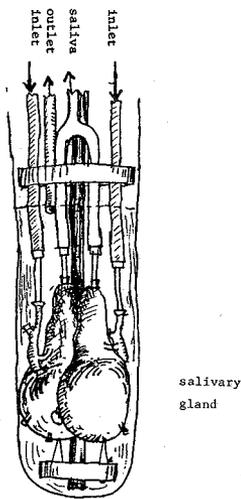


図3. 犬唾液腺のNMR試料管 (30mmφ)への装着図

持のため添加した Krebs Henseleit Ringer (Na^+ : 151, K^+ : 4.3, Ca^{++} : 2.5, Mg^{++} : 1.0, Cl^- : 136.3, HCO_3^- : 25, H_2PO_4^- : 1.0, glucose 5mM, pH: 7.5, PVP 5%) を 95% O_2 , 5% CO_2 の混合ガスを飽和させて用いた。

刺激には Ach を 10^{-6} M 加えた KH Ringer を流した。灌流は定流ポンプを使用し、約 1 ml/分/g の流速を用いた。分泌唾液は道管に挿入したカニユーレを介して分泌を確認した(図3)。

灌流は 30mmφ の試料管内で行い、静脈側よりの流出灌流液は吸引により外部へ排除するようにしてある。

先づ Ringer 液のみを試料管に灌流させて無機燐の測定を行ったが 1000 回約 20 分の積算で 5.1 ppm の信号を得たが、この Ringer 液の pH は 7.6 であった。次に一箇の唾液腺(顎下腺)の灌流を行いつつ測定(1000 回, 20 分)したのが図4である。この結果クレアチン燐酸と思われる吸収を 0 ppm としたとき、6.5, 6.0, 4.7, 3.0, 0, -3, -8, -10, -17 ppm の部位に吸収が認められた。4.7 ppm のものは無機燐であり、 P_1 と P_2 燐酸イオンの pK を 6.85 とするとき、pH が 6.85 として計算される。この値は低いので pK についての検討を要する。6.5 と 6.0 ppm のものは糖燐化合物

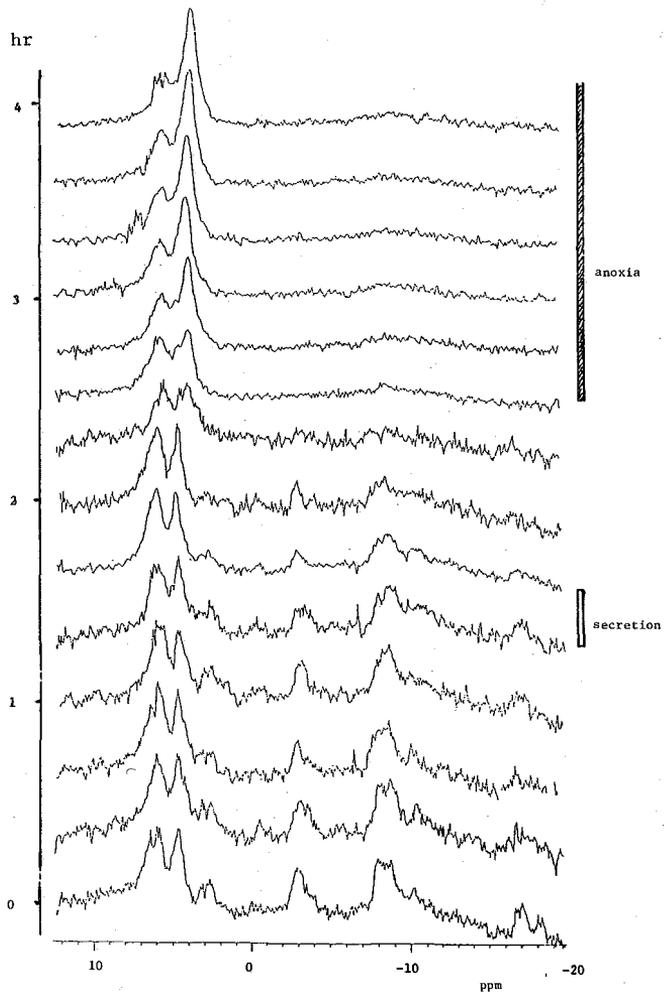


図4. 唾液腺(10g)の ^{31}P -NMRスペクトル。灌流開始後20分ごとのスペクトルを示す。アセチルコリンを投与したスペクトルは secretion で表してある。また灌流停止は anoxia で表してある。スペクトルの同定は本文中に示す。

の fructose-1,6-diphosphate であろう。3 ppm のものは Glycerol phosphoryl choline
あるいは Glycerol phosphoryl ethanolamine である。ATP の α , δ , β 位の磷はそれぞれ
-3, -8, -17 ppm であり, ADP の α , β 位のもは -3, -8 ppm である。また
 NAD^+ , $NADH$ の磷は -8 ppm の吸収に含まれる。-10 ppm のものは $NADH^+$, $NADPH$ の
ものであろう。このように組織の ^{31}P -NMR 測定で $NADP^+$, $NADPH$ の検出が可能に
なったもので, さらに S/N の向上があれば代謝の研究に貢献するものと思われる。

アセチルコリンを加えた Ringer で灌流すると無機リンの吸収が上昇し, ATP の吸
収および APP の吸収が低下した。また糖磷化合物がやや増加した。唾液分泌は導管
破損で外部に唾液を導けず確認できなかった。アセチルコリンぬきの Ringer で再び
灌流を行ったが ATP, APP とともに元のレベルにまでは回復しなかった。また 4.5 ppm
に別の吸収があらわれるが, これは無機磷のものである。このことは唾液腺中で部
位の異なるところに別の pH のあることが示される。イヌ顎下腺の分泌時, 酸素消
費量は高く Ringer に飽和した。 O_2 のみでは不足気味である。代謝量が 7~8 倍にな
る分泌時には cell 内の ATP および CP は消費され, 無機磷の増加があったのは O_2 が
不足気味であったこと, 解糖ではそれを代償できなかったことを示唆している。
灌流液を停止すると ATP, ADP, NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$, $NADPH$ の吸収は全く見られ
なくなる。これらのものが分解されるのは細胞が全く破壊されていることを示すも
のと思われる。なお 3 ppm の信号はアセチルコリン投与後消失する。外分泌腺でア
セチルコリンの投与が膜の磷脂質の turn over を促進するという報告は外分泌が Exo-
cytosis の存在から理解できるが, Glycerol phosphoryl choline や Glycerol phosphoryl
ethanolamine の消失が膜と関連するか否かは検討課題であろう。

今回示したのは 1 側の腺で行った結果であるが, 現在両側の腺をもって 2 側の腺
を灌流出来る様にして 30 mm 中の試料管に収めるのは難しいが不可能ではない。不利
な点は (1) 同時に 2 側とり出すことは不可能でいずれか先にとり出した腺は疲弊する。
(2) 試料管にゆとりが少いので脈管系を圧迫してしまう危険が 1 側の場合より大きい。
利点は (1) 試料の多さで S/N が改善される。(2) (1) によって時間分解をあげることか
できる。(3) 2 側の腺の平均的な値がえられる。

おわりに

生物試料を用いて広径試料管での ^{31}P -NMR を行ったが, 試料の絶対量が S/N の
よいスペクトルを得るという当然の結論を得た。しかし, 実験に対するいろいろな
配慮を加えて実験を継続中である。

(新潟大・医) 今井 昭一, 仲沢 幹雄 (山形大・医) 片野 由美
(日本電子) 松下 和弘, 大内 宗城, 梅田 雅宏

—はじめに—

1974年に ^{31}P -NMRがintactな状態で抽出された骨格筋中に含まれるリン酸代謝物の観測に使えると示されて以来⁽¹⁾種々の臓器(心臓, 肝臓, 腎臓, 脳)へも拡張され, 生化学, 医学, 生理学的問題を研究する方法として利用されている。我々もこの ^{31}P -NMR法の利点である非破壊的にリン酸代謝物の濃度変化を同時に観測できることを生かして, モルモット心臓(Guinea-Pig Hearts)を灌流した状態で測定し, 心筋エネルギー代謝研究へのアプローチを行なっている。^{(2),(3)}

高エネルギーリン酸化合物の消長観察から心筋エネルギー代謝についての研究を行う場合の最大の問題点は,

- (1) 生体内そのままの状態⁽²⁾, いかにしてリン酸化合物を定量するか。
- (2) 虚血(灌流停止)又は薬物投与による変化の時間経過を同じ動物で追跡できるかということにある。我々は上記観測からモルモット心臓の生存時間を可能な限り保持するための灌流方法とNMR条件を検討し, 少なくとも常に3時間以上保持することに成功したので, その結果について報告する。

—実験—

実験には離乳期を経過した体重200g前後の雄モルモットを用い, 延髄を殴打して失神させた後直ちに心臓を摘出し, Langendorff式に灌流した。灌流開始後10分程度経過し, 標本の状態が安定化したところで, 外径15mmφ又は25mmφのNMR管に移し, ^{31}P -NMRの測定を開始した。測定にはJEOL FX200(^{31}P 共鳴周波数80.76MHz)を用い, 3分から10分間隔で高エネルギーリン酸化合物(無機リン・クレアチンリン酸・ATP・糖リン・ADP)を観測した。

(1) 灌流方法(Langendorff式)

Fig.1に灌流方法の概要と灌流に使用した人工塩類溶液の成分を示す。灌流液は混合ガス(95% O_2 +5%(CO_2))による酸素化を行い, 温度は38°Cに保って流した。流量は体重200g前後のモルモット心臓に対し6ml/min程度とし, NMR管の中で自由に流出した灌流液は吸引ポンプにより排出した。灌流停止(虚血)時には吸引ポンプも停止した。

(2) NMR条件

心臓を移すNMR管(15mmφ又は25mmφ)は酸素欠乏を防ぐために頭部側面に2つの穴を開けた。灌流実験では心臓の生存時間を保持する上で ^1H デカップリングの条件が最も大きな影響を与えることが判明したので, 通常の ^1H 完全デカップリング法(9W)の採用を止め, Bi-levelデカップリング法(0.4W→1W)か, NOE

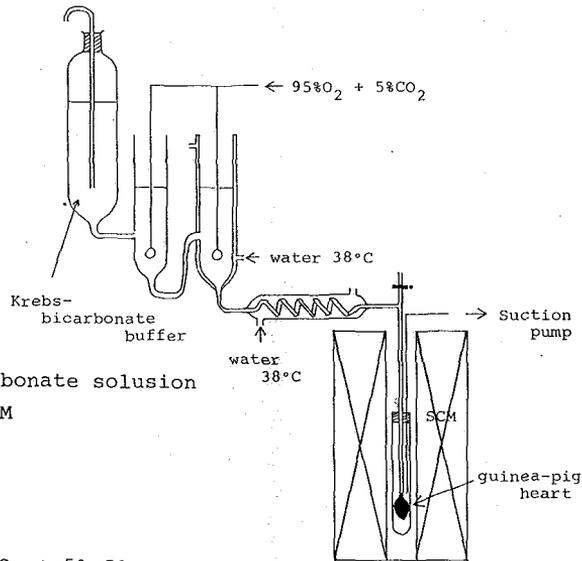
³¹P-NMR Studies in Perfused Guinea-Pig Hearts

(Univ. Niigata) S. Imai, M. Nakazawa (Univ. Yamagata) Y. Katano

(JEOL) K. Matsushita, M. Ohuchi, M. Umeda

消去に利用されるゲーテッドデカップリング法(1Wで行う, NNE)を採用した。時間保持の裏では、ゲーテッドデカップリング法が最適であった。更にデカップリング時間を短くするために観測範囲10kHzを2kポイントでサンプリングし、FT時8kポイントのゼロフィル法を採用した。積算は45パルス(13 μ sec), 0.5 secくりかえして、350回か51200回行い、時間経過の追跡は自動測定で行った。また測定温度も灌流液と同じ

Fig.1 灌流装置(Langendorff式)



A modified Krebs-Ringer bicarbonate solution

NaCl	127.2 mM
KCl	4.7
CaCl ₂	2.5
KH ₂ PO ₄	1.2
NaHCO ₃	24.9
Glucose	5.5
Pyruvate	2.0
Equilibrated with 95% O ₂ + 5% CO ₂	

38°Cに保った。³¹Pケミカルシフトは85%リン酸を基準として表示してある。

—結果—

Fig. 2 に灌流状態の³¹P-NMR スペクトルを示す。このスペクトルは15mmφ管中、45パルス、0.5 secくり返しで1200回積算したもので無機リン(Pi)、クレアチニン酸(Cr-P)、ATP (α, β, γ)が観測されている。ATPの α にはADPの α 、ATPの β にはADPの β が重なっている。無機リン(Pi)の低磁場側は糖リンに由来するものである。(測定温度 38°C, NNEモード)

Fig.2 灌流状態の³¹P-NMR

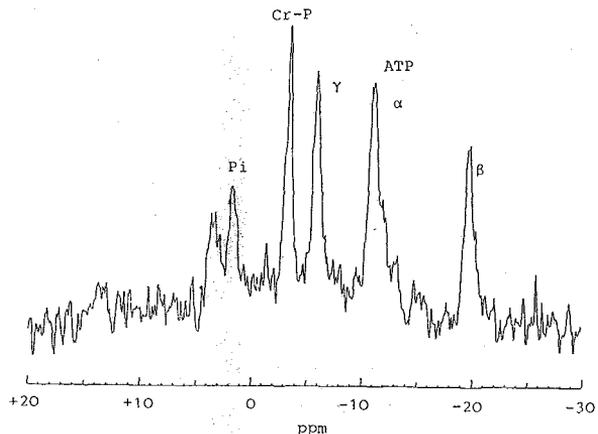
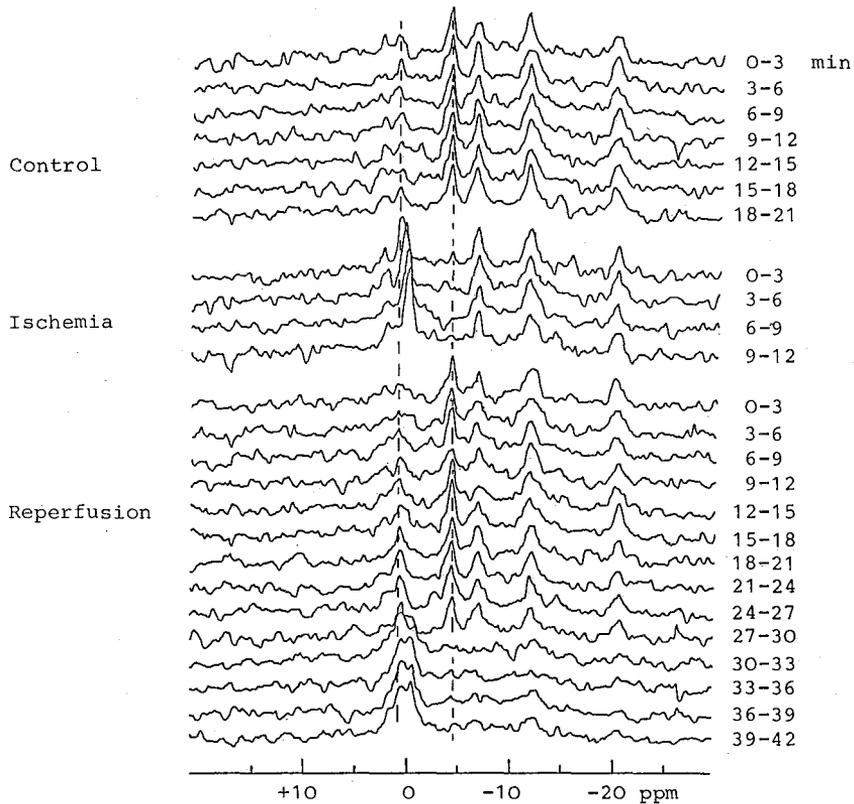


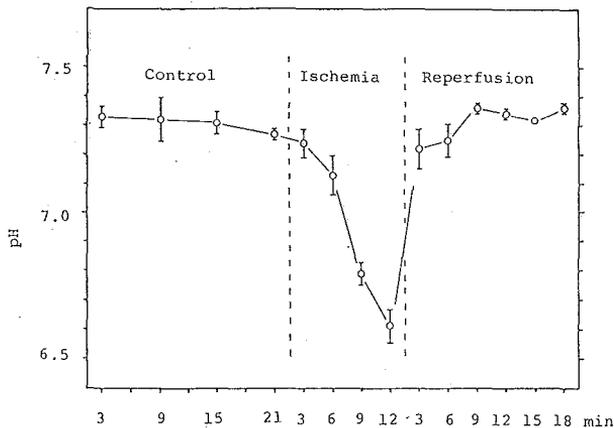
Fig.3 には灌流-灌流停止(虚血)-再灌流による時間経過を3分間隔で追跡したスペクトルを示す。灌流停止(虚血)するとクレアチニン酸が直ちに減少し無機リンが大幅に増加することが分かる。これを定量してみると虚血後6~9分経過した時無機リンの量は約140%増加し、クレアチニン酸

Fig-3 灌流-虚血(灌流停止)-再灌流状態の³¹P-NMRスペクトル(38°C)



は90%減少した。一方ATPは30%程度の減少を示した。次にATP 5mmM, クレアチンリン酸 5mmM, 無機リン 5mmMの標準溶液で予の校正したPH曲線(38°C)を利用して, 無機リンのPHをプロットしたのがFig.4である。無機リンのピークは細胞の内外とに分離し切れず、一応細胞内と考えると、灌流→灌流停止(虚血)後12分経過した時PHは7.32から6.40にまで変化し、酸柱側に寄っていることが分かる。Pieper等(4)は心筋酸性症を防止するPropranololを投与して実験しているが、彼等より更に3倍希釈したPropranolol(10⁻⁶mol)を投与してみたところ、

Fig.4 無機リンのPH変化



無機リンのPH低下が抑制されることを認めた。さらに Propranolol の d 体, l 体による薬理効果の差についての検討と観測時間を3分間隔より更に短くすることは 25mmφ 検出器を用いるもって実験中である。

—まとめ—

動物臓器の³¹P-NMR を灌流状態で観測する目的は臓器の生存時間を可能な限り長く保持し、種々の薬物を投与し、リン酸化合物の代謝状態の変化を追跡することにあるが、モルモット心臓の場合には我々の実験によれば次の条件を満たせばほぼ目的を達成できることが分かった。

- (1) 摘出した心臓に灌流液を流しはじめた後から10分程度経過し、状態が安定化してから NMR 管に移すこと。
- (2) 灌流液は実験動物の体温と同じに保つことが望ましい。
- (3) NMR 管は酸素欠乏を防ぐ意味から頭部側面に穴を開ける。
- (4) 心臓から自然に流出した灌流液は吸引ポンプで排出するが、灌流停止(虚血)時はポンプを停止すること。
- (5) ¹H デカップリングは Bi-level (0.4W→1W) で行うか、NOE 消去に使うゲートッドデカップリング(1W程度)で行う。
- (6) ¹H のデカップリング時間を短くする意味から測定はゼロフィル法を利用した方が良い。

References

- 1) Hoult, D.I., Busby, S.J.W., Gadian, D.G., Radda, G.K., Richards, R.E., and Seely, P.J.: Science, 225, 285(1974)
- 2) Jacobus, W.E., Taylor, G.J.IV., Hollis, D.P. and Nunnally, R.L.: Nature, 265, 756(1977)
- 3) Imai, S., Nakazawa, M. and Katano, Y.: Preprint of 54th Nihon-Yakuri-Gakkai P156(1981) Fukuoka
- 4) Pieper, G.M., Todd, G.L., Wu, S.T., Salhany, J.M., Clayton, F.C. and Eliot, R.S.: Cardiovascular Research, 14, 646(1980)

(電総研)

亀井 裕孟, 片山 義朗

NMR断層映像技術の最近の進歩は目覚しく、欧米諸国においては、既に人体について鮮明な像が報告されている。NMR断層映像法の安全性については、種々検討されているようだが、まだ確固たる結果は得られていない。われわれは、より安全性の高いNMR断層映像法の開発を目指して、より低い磁場での断層映像法を試みている。比較的小さな被検体についての試みは前回報告した¹⁾。今回は人体頭部程度の被検体を対象にNMRトモグラフィを試みたので、その結果について報告する。

〔装置〕

電磁石は前回と同様に、直径1mの疑似ヘルムホルツ型空芯コイルを使用した。静磁場強度 $H_0 \sim 188$ G, 静磁場均一度 ΔH_0 は、 $23 \times 23 \times 4$ cmの領域で 2×10^5 である。電磁石部の写真を図1に示す。

検出系は前回同様、クロスコイル型で、トランスミッタコイルは $26 \text{ cm}^{\phi} \times 20 \text{ cm}$ のくう型、受信コイルは単層ソレノイドを使用した。観測周波数 $\nu \sim 800$ kHz、回転磁場強度 $H_1 \sim 0.4$ Gである。

観測系のブロック図を図2に示す。型名の記入してない部位は全て手作りのものである。

映像法としては、Lauterburによって開発された投影-再構成²⁾を用いた。スライ

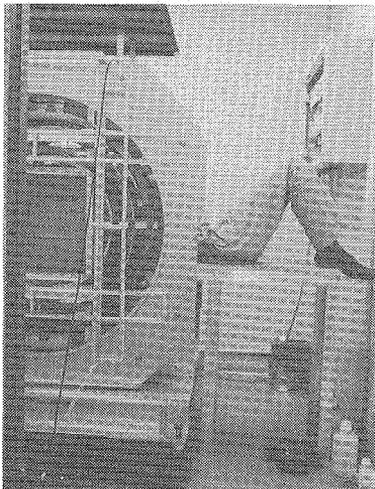


図1. 試作電磁石部。頭部測定中

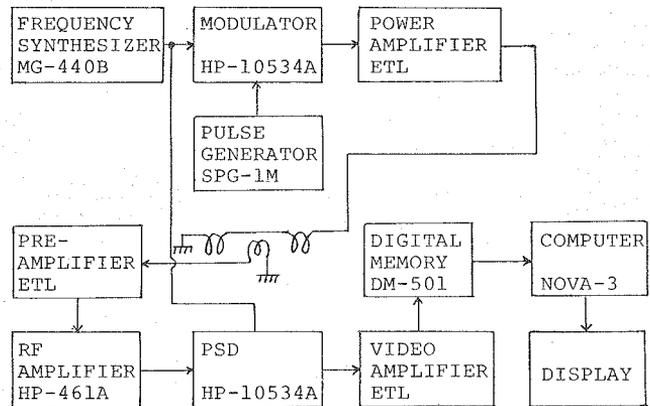


図2. NMRトモグラフィ装置ブロック図。

ETLは自家製を表わす。

ス法としては、Hinshawらによって開発された交流勾配磁場法³⁾を用いた。

〔結果と考察〕

スライスには、交流勾配磁場を使用した。周波数、波形、振幅等について種々検討を加えた結果、1 Hzの三角波を用いた。交流勾配磁場印加によって、観測される信号の線幅が広がる。この様子を図3に示す。図3は、19 x 19 mm角柱の常磁性イオンをドープレした水を5 mm間隔で4本並べたファントムによる投影スペクトルで、aはスライス用交流勾配磁場を印加しないときの、bは印加したときの厚さ約10 mmの層によるスペクトルである。

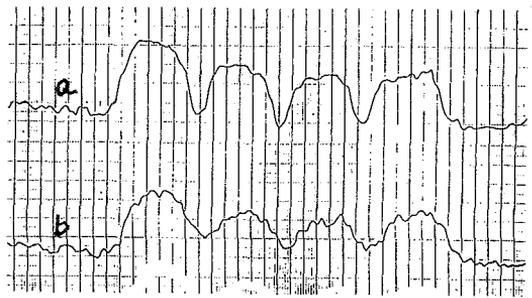


図3. ファントム(角水柱4本)の投影スペクトル。bは厚さ~10mmにスライスしたとき。

硫酸銅を少量ドープレした水を用いたファントムについて得られた像を図4に示す。像が円形をしているのは、ダッシュマーの印字を用いたことによるもので、縦は横に比べ0.839に圧縮されている。画素数は64 x 64、強度は8階調である。投影スペクトルは64回積算したものを、11.25°間隔で得た16個の投影スペクトルから再構成した。

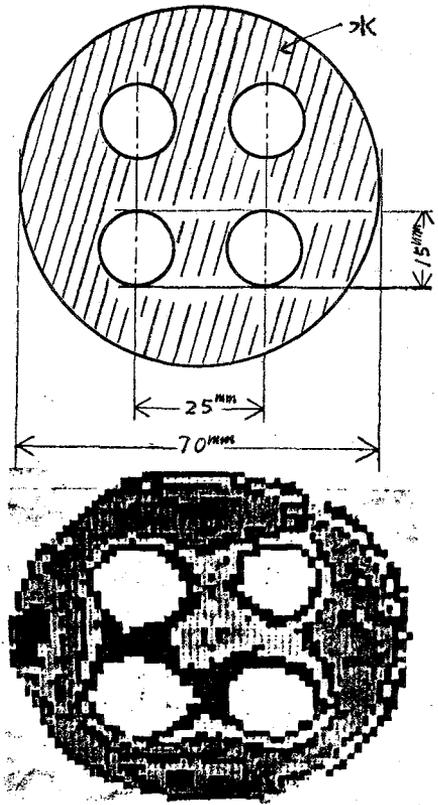


図4. ファントムのHスピン密度像。

ヒトの手について得た像を図5に示す。画素

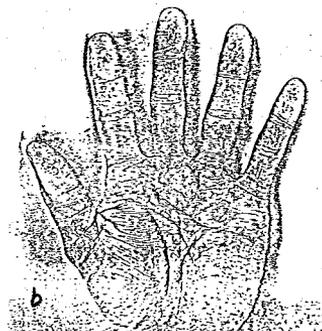
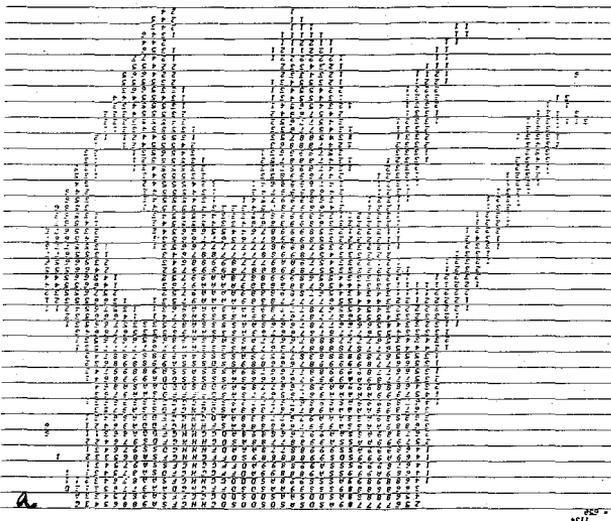


図5. a. 手のHスピン密度像。16進数で表示。bは、参照図

数は 64×64 、128 回積算して 16 個の投影スペクトルから再構成したもので強度は 16 階調、16 進数で示してある。

図 6 にヒト頭部(部分)の NMR トモグラムと解剖図とを示す。画素数は 64×64 、強度は 16 階調、縦方向は横方向に比べ 0.839 に圧縮されている。スライスの厚さは約 20 mm である。積算回数は 5 / ス回で、16 個の投影スペクトルから再構成した。

以上、簡単な試作装置を用いて、低い静磁場での実験を行ったが、初期段階としては一応満足すべき結果が得られた。

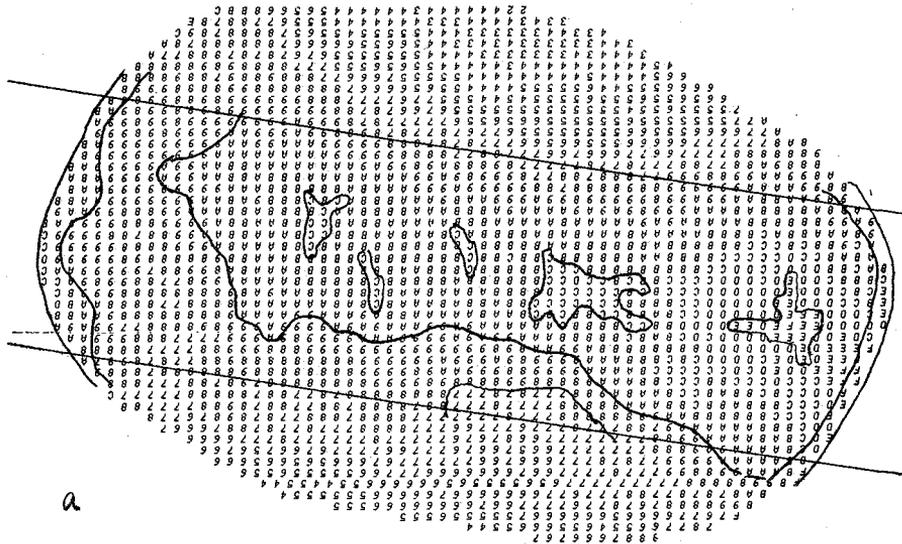
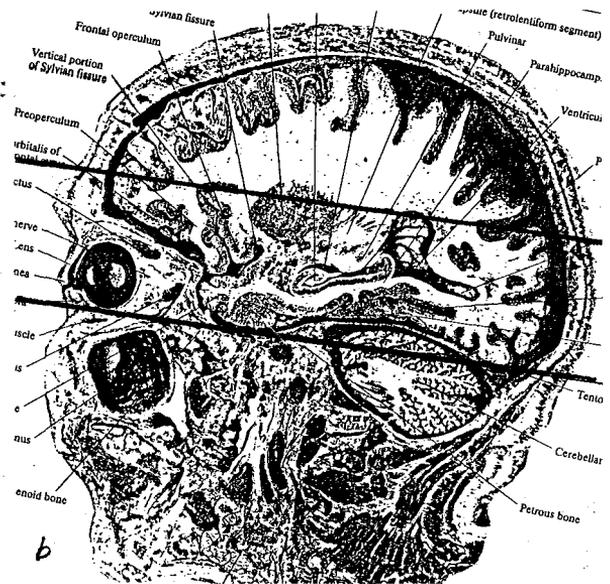


図 6. a. ヒト頭部(部分)の NMR トモグラム。

b. 参照解剖図 (G. Salamon, Y. P. Huang: Computed Tomography of the Brain)



【参考文献】

- 1) 藤井, 片山, 磯山: 第19回 NMR 討論会 (1980. 9. 札幌).
- 2) P.C. Lauterbur: Nature 242, 190 (1973).
- 33) W.S. Hinshaw: J. Appl. Phys. 47, 3790 (1976) 他.

(化技研) 早水紀久子・山本修

$^{13}\text{C NMR}$ はこの十数年の間にめざましい進歩があり、すでにばく大なデータの蓄積が行なわれてはいるが、そのほとんどが純粋な物質を対象にしてはいる。 $^{13}\text{C NMR}$ の化学シフトにおいては、特殊な相互作用がある場合を除いて、溶媒効果、濃度効果は小さいとされている。ところが一方、強度は同一測定条件下で繰返し測定してもバラツキがみられる上に、測定条件が変化すると、かなり変動することが知られている。従って $^2\text{H NMR}$ の時に可能であった混合系の定量分析はむずかしいと考えられていた。その結果、 $^{13}\text{C NMR}$ による混合系の定性定量のための基礎データは著しく不足しているように思われる。

一方、化石エネルギー源の石炭・石油はともに複雑な混合系であり、これらの分析に $^{13}\text{C NMR}$ は有効に用いられている。この場合構造の多様性を得る方法がとられ、スペクトル領域毎の積分値が求められている。積分値の精度をよくするために、 $^{13}\text{C NMR}$ の長い緩和時間を加速する緩和試薬を用い、NOE効果と減ずるためにゲート付デカップリング法が採用されている。この方法は試料自体のキラウタリゼーションを行なう上では可くれているが、混合成分についての情報は得られない。

$^{13}\text{C NMR}$ によって定性分析を行なう時、 $^1\text{H NMR}$ に比較するといくつかの利点がある。一つは1個の炭素に架鎖的には1本のスペクトル線が対応し、1つの化合物で大体の場合複数のスペクトル線が存在する。また ^{13}C 化学シフト値はその環境によりあまり変化しないと予想できることである。しかしながら純物質の時と混合系になった場合とで、どの程度の相違があるかは明確にされていない。

本研究では多環縮合化合物の混合系を取り上げ、以上の点を明らかにすると同時に、定性定量分析法のプログラムを開発しテストサンプル及びユールターール蒸留成分であるクレオソート油に適用した。また本分析法の最終目標は石炭液化過程の問題になる種々の中間生成物の分析であるため、モデル化合物約150種類の $^{13}\text{C NMR}$ の化学シフト値と強度値がコンピュータ内のファイル中に格納されている。

実験 モデル化合物は主に市販品を用い、精製することなく、

$^{13}\text{C NMR}$ を測定した。溶媒は CDCl_3 、内部規準はTMSである。ほぼ15-20% (w/w) の溶液と調製したが、溶解度が低い場合には飽和溶液を用いた。 $^{13}\text{C NMR}$ の測定はVarian XL-100で行なった。スペクトル幅5/20 Hz、パルスはやみすましくこやまとあせぬ

Table I. The Test Sample for the Mixture of Polycyclic Aromatic Compounds.

Compound	Ring	Mixed		Calcd. mole%
		mole%	wt%	
Naphthalene	2	17.0	13.0	14.5
2,3-Dimethylnaphthalene	2	15.6	14.5	13.8
Fluorene	3	13.7	13.6	14.3
Dibenzofuran	3	22.3	22.3	22.6
Phenanthrene	3	7.1	7.4	8.8
Fluoranthene	4	10.6	12.7	10.6
Pyrene	4	13.7	16.5	15.4

くり返し時間6.6秒, フリップ角 23° , テータ領域16Kで、デジタル分解能は0.05ppmである。T₁は通常の $180^\circ-90^\circ$ パルス法で測定し、NOEはゲート付デカフロンクと交替に行なう方式で測定した。

混合系の¹³C NMRパラメータ

混合系の定量分析を行う上で、T₁およびNOEを求めておく必要がある。ここでは混合系として環の数が2~4の7種類の化合物を選び、詳細に検討した。混合比は表1に示されている。純粋の時のT₁値、NOEおよび¹³C化学シフト値を表2に示す。また表3には純粋の時と混合系になつた時との比較を示す。¹³Cシフト値はほぼ0.05ppm以内で一致し、これは測定値のデジタル分解能程度である。特に四級炭素の¹³Cシフト値はほぼ129.0ppmより大きく、広く分布するので重なり合う事は少ないので、定性分析には非常に有用である。

Table II. The ¹³C NMR Parameters for the Polycyclic Aromatic Compounds

Compounds	No. ^{a)}	T ₁ (s)	NOE	¹³ C Shift(ppm)
Naphthalene	1	63	1.6	133.45
	2	11.9	2.4	127.84
	3	9.7	2.8	125.75
2,3-Dimethylnaphthalene	1	49	2.0	135.32
	2	56	2.0	132.45
	3	7.0	2.9	127.36
	4	6.8	2.8	126.86
	5	5.2	2.8	124.92
	6	6.0	2.9	20.01
Fluorene	1	48	2.5	143.14
	2	65	1.8	141.67
	3	4.7	3.0	126.62
	4	5.7	2.6	124.92
	5	5.5	2.5	119.79
	6	2.4	2.6	36.80
Dibenzofuran	1	71	1.7	156.19
	2	3.9	3.0	127.03
	3	70	1.7	124.21
	4	5.1	3.0	122.60
	5	6.3	2.7	120.55
	6	6.1	3.0	111.59
Phenanthrene	1	48	1.9	131.99
	2	57	1.9	130.25
	3	5.2	2.7	128.48
	4	5.2	2.5	126.84
	5	4.5	2.7	126.46
	6	5.4	2.7	122.59
Pyrene	1	74	1.7	131.04
	2	5.6	3.0	127.25
	3	5.3	2.9	125.70
	4	5.6	2.9	124.81
	5	101	1.3	124.58
Fluoranthene	1	63	2.0	139.34
	2	63	1.9	136.82
	3	74	1.6	132.28
	4	53	1.7	129.87
	5	3.5	3.0	127.76
	6	3.2	3.0	127.36
	7	3.1	3.0	126.46
	8	3.7	2.7	121.40
	9	3.6	3.0	119.88

Table III. The Comparison of the ¹³C Shift, the T₁ Value, and the NOE between the Mixture and its Component Pure Compounds.

No.	¹³ C Shift(ppm)		T ₁ (s)	NOE		Compound
	Mixture	Pure		Mixture	Pure	
1	156.14	156.19	-0.05	58	71	1.5 1.7
2	143.11	143.14	-0.03	43	48	1.6 2.5
3	141.65	141.67	-0.02	58	65	1.6 1.8
4	139.41	139.34	0.07	47	63	1.6 2.0
5	136.89	136.82	0.07	43	63	1.7 1.9
6	135.29	135.32	-0.03	43	49	2.0 2.0
7	133.45	133.45	0.00	58	63	1.6 1.6
8	132.41	132.45	-0.04	52	56	1.7 2.0
9	132.00	{ 132.28 131.99	{ -0.28 0.01	49	{ 74 48	{ 2.1 { 1.6 1.9
10	131.07	131.04	0.03	40	74	1.7 1.7
12	130.26	130.25	0.01	51	57	1.9 1.9
12	129.93	129.87	0.06	42	53	1.5 1.7
13	128.45	128.48	-0.03	5.3	5.2	2.2 2.7
14	127.81	{ 127.84 127.76	{ -0.03 0.05	9.4	{ 12 3.5	2.7 { 2.4 3.0
15	127.39	{ 127.36 127.36	{ 0.03 0.03	4.7	4.7	2.9 { 2.9 3.0
16	127.26	127.25	0.01	5.5	5.6	3.0
17	126.99	127.03	-0.04	4.1	3.9	2.9 3.0
18	126.81	{ 128.86 126.84	{ -0.05 -0.03	6.0	{ 6.8 5.2	2.8 { 2.8 2.5
19	126.59	126.62	-0.03	4.7	4.7	3.0
20	126.49	126.46	0.03	4.5	4.5	3.0
21	126.42	126.46	-0.04	4.9	3.1	3.0
22	125.70	{ 125.75 125.70	{ -0.05 0.00	7.9	{ 9.7 5.3	2.9 { 2.8 2.9
23	124.88	{ 124.92 124.92	{ -0.04 -0.04	5.0	{ 5.7 5.2	2.8 { 2.6 2.8
24	124.83	124.81	0.02	5.4	5.6	2.9
25	124.61	124.58	0.03	-	101	- 1.3
26	124.16	124.21	-0.05	-	70	- 1.7
27	122.55	{ 122.60 122.59	{ -0.05 -0.04	5.2	{ 5.4 5.1	3.0 { 2.7 3.0
28	121.42	121.40	0.02	4.3	3.7	2.9 2.7
29	120.51	120.55	-0.04	6.4	6.3	2.8 2.7
30	119.89	119.88	0.01	4.6	3.6	3.0
31	119.77	119.79	-0.02	5.2	5.5	2.6 { 2.5 2.5
32	111.54	111.59	-0.05	6.4	6.1	3.0 3.0
33	36.76	36.80	-0.04	2.4	2.4	2.3 2.6
34	19.95	20.01	-0.06	5.5	6.0	3.0 2.9

a) The carbons are numbered according to the ¹³C Chemical shifts from the lower-field side.

T₁値は四級炭素では長く40秒~80秒であるが、混合系に存在すると必ずかに短くなる傾向がある。70ドットンが結合している炭素では混合系に存在してもきつた変化するのみならず、NOEも測定誤差を考之ると、純粋系と混合系とで一致していると仮定してよい。以上の結果から、混合系の¹³C NMRは、化学シフト値、T₁値、NOE値からみて、純粋系化合物の¹³C NMRの重なり合わせとして近似してよいと112る。

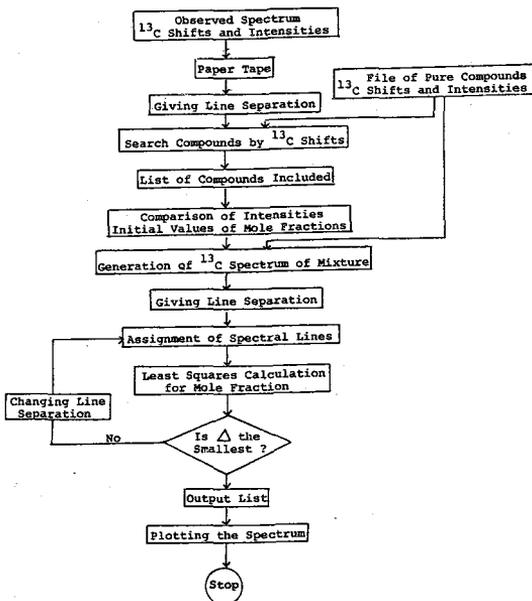


図1. 定性定量分析プログラムのフローチャート

時に許容されるシフト値の誤差 (LS) を ppm 単位で入力する。この値が大きければ当然引き出してくる化合物の数も多くなる。検索は未知試料のスペクトルの低磁場側のスペクトル線から始まる。そのシフト値を中心に LS の範囲内にはスペクトル線と与之化合物がリストされる。次にこの化合物のすべてのスペクトル線が未知試料のスペクトルに含まれているかどうかをチェックする。この過程を繰返しながらい定性分析を行なう。定量分析の初期値と得る目的で、未知試料のスペクトル線強度とそれに対応するファイル内の強度で割り、その平均値からモル比を得る。定性分析の確実性の目安として、

$$Score = \frac{N \cdot (\text{Mole Fraction})}{\sum_i (\delta_i^{\text{Mixture}} - \delta_i^{\text{pure}})^2} \quad (N \text{ はスペクトル線の数})$$

と計算した。次にファイル中のデータに基づいて混合系の¹³C スペクトルを発生する。ここで再びスペクトル線の分離幅 (LS) と与之、帰属を行なう。実際のスペクトルと計算スペクトルの強度を比較したから最少二乗法を行ない、混合比の補正値を求め、強度の RMS 誤差が最小になるように LS を変え、収束した値を LP で出力し、プロッター上にスペクトル線図を出力する。

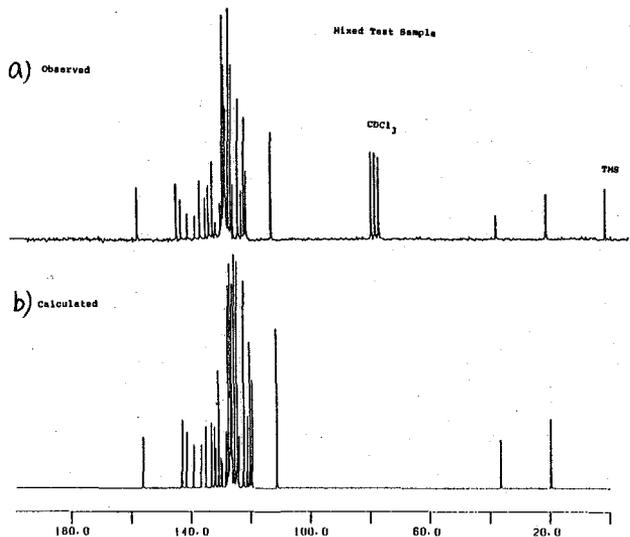
純粋な化合物の¹³C NMR のファイル

モデル化合物、約 150 種類の¹³C NMR の化学シフト値と強度とコンピュータ内のファイルに格納した。この時強度の規格化を行なう必要がある。70 トンが結合した炭素の NOE はほぼ 2.9 に近く、T₁ 値も 3~7 秒であるため、その強度を標準にして 1 モル当り 1 個の炭素の強度を 100 にして、他の炭素の強度を計算した。

定性定量分析プログラム

プログラムのフローチャートと図 1 に示す。未知試料の¹³C NMR のシフト値と強度とを紙テープ上にはパンチ (XL-100 のミニコンピュータによる) して、これとコンピュータに入力する。先ず化合物と¹³C シフト値に基づいて検索するが、この

図2 混合系の¹³C NMR スペクトル



結果と考察 7成分混合系の実測と計算の ^{13}C スペクトルを図2に示す。強度の信頼性に関する種々の要因を考へると、スペクトルの全体的な一致は満足すべきものである。また最小二乗法から求めたRMS誤差も十分小さくなり、混合比の誤差も10%以下になっている。混合比は表1に示されている。秤量から求めたモル%と計算したモル%とを比較してみると、計算値の方は分子量が小さくなるほど小さくなる傾向があり、ナフタレンの場合顕著である。これはナフタレンにおいて T_1 値(約10秒)が長く、混合した場合にもあまり変化しないので、十分緩和してはなかつたためと思われる。そこで秤量値の方を重量%にしてみると、見掛けの一致は改良されるようである。定量分析の実際の精度は $\pm 15\%$ 程度であるが、一連の実験における反応条件等に対するプロットには、十分に使用できる分析法といえる。

クレオソート油への応用

コールタールの蒸留油 (bp 230 $^{\circ}$ -300 $^{\circ}$ C) のクレオソート油に本分析法を適用してみた。 ^{13}C スペクトルは図3に示されているが、全体的な一致はよいものと思われる。含有成分と成分比は表4に示されている。測定線は126本で、最大強度の0.3%の強度をもつ線まで含まれている。帰属された線は90%、帰属されなかった強度は7%である。従来から行なわれていたキャピラリーガスクロマによる結果が表4には示されている。ナフタレン及びナフタレン誘導体両者の一致がよくないものもあるが、他の化合物での一致は良好である。ナフタレン誘導体であまりよい結果が得られなかった原因はピークの重なりにある。ただナフタレン誘導体全体として考えた際には、両法ともよく一致しているといえる。 ^{13}C NMRによる方法は、GCでは1つの化合物に1本のピークであるのに対して、はるかに信頼性が高いことがわかった。

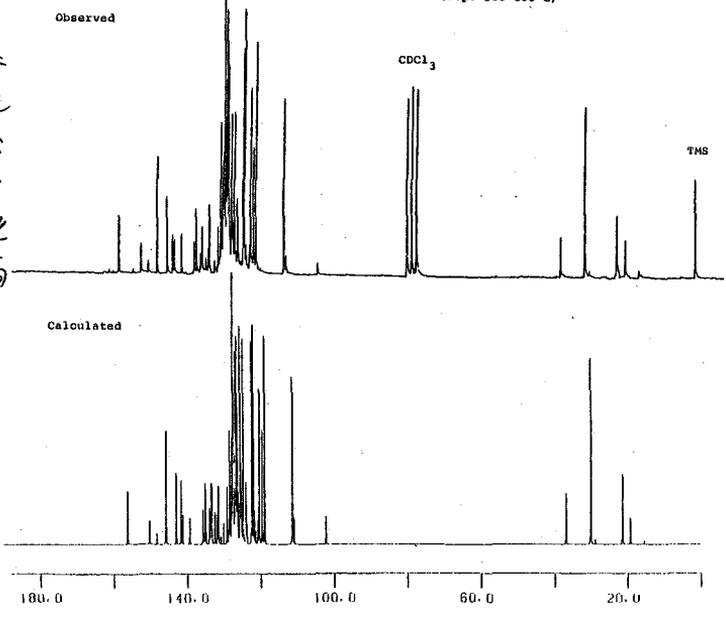
Computer-Aided Qualitative and Quantitative Analysis by ^{13}C NMR for the Mixture of Polycyclic Aromatic Compounds.

Table IV. The Results of the Creosote Oil

Compound	Ring	Moles (^{13}C NMR)	Area (GC)
Naphthalene	2	7.5	2.9
1-Methylnaphthalene	2	6.5	7.0
2-Methylnaphthalene	2	19.8	15.6
2-Ethylnaphthalene	2	1.0	5.0
1,3-Dimethylnaphthalene	2	3.7	2.1
Diphenyl	1 + 1	5.1	2.3
Quinoline	2 (N)	5.9	5.9
Indole	2 (N)	4.8	2.4
Dibenzofuran	3 (O)	13.8	10.8
Dibenzothiophene	3 (S)	1.2	0.3
Acenaphthene	3 (-CH ₂ -)	17.5	16.6
Fluorene	3 (-CH ₂ -)	8.8	9.2
Phenanthrene	3	3.8	4.4
Anthracene	3	0.6	0.7
Total		100.0 ^{a)}	85.2

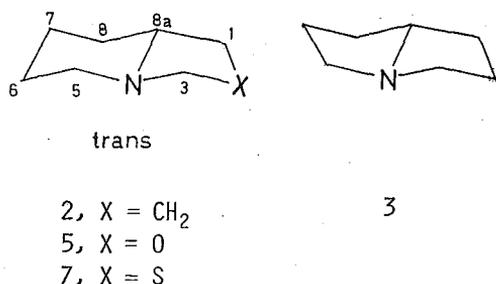
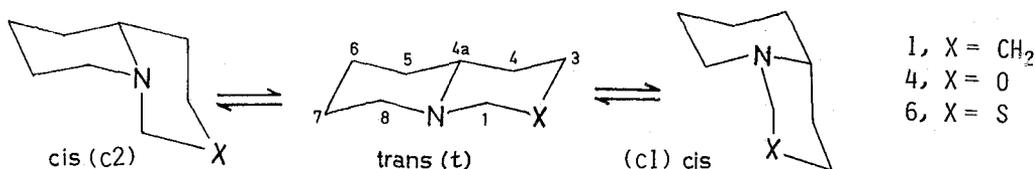
a) Unassigned intensities for the ^{13}C NMR spectrum is 7.0%.

図3. クレオソート油の ^{13}C スペクトル



橋頭位に窒素原子をもつキノリジジン(1), インドリジジン(2), ピロリリジジン(3)は、生物活性ないし薬理活性をもつ化合物の骨格をつくる重要な化合物である。橋頭位に窒素原子があるため、*trans*-テカリンとは異って環の反転が容易に起るので、二つの環が *trans* 配置の異性体 *t* と、*cis* 配置の異性体 *c* の両異性体間に配置平衡が存在するのが、構造上の重要な特徴である。2の例では、*2t* は *2c* よりも少くとも 2.7 kcal/mol 安定であり、常温では *2c* の寄与は事実上無視できる。

橋頭位窒素のβ位にヘテロ原子をもつ4-7も、1-3と同様に配置平衡にある。ただし前者における平衡の位置は後者における位置とはかなり異なる。すなわち1-3において *cis* 体を著るしく高エネルギーとしているCH₂/CH₂ 1, 3-ジアキシャル相互作用は、4-7においては、相互作用はとくに *c1* 型では小さく、そのため、この型の寄与が無視できない。*c2* 型ではやはりCH₂/CH₂ 相互作用があり、ほとんど寄与しない。4-7における配置平衡の位置は、双極子モーメント、 J_{HH}^{gem} などによって求められている。



Distribution of Isomers in 4 - 7

compd	% of stab isomer	method	ref
1	95%	dipole moment	1
5	67%	H-1 nmr	2
6	80%	dipole moment	1
6	73-79%	C-13 nmr	3
7	64	H-1 nmr	2

- 1) Katritzky and Crabb, J.C.S. Perkin II 418(1976).
- 2) Crabb, Org. Magn. Reson., 13, 63(1980).
- 3) Takeuchi and Crabb, J.C.S. perkin II, 51(1975).

本研究は、この配置平衡を¹³Cおよび¹⁵N NMRを用いて、より詳細かつより直接的に調べることが目的とする。この目的のために以下の実験をおこなった。

(1) 4-7の位置を、配置平衡が凍結した低温における¹³C NMRより直接的に

C-13 and N-15 Nmr Spectra of Bicyclic Compounds with Bridgehead Nitrogen Atoms

Yoshito Takeuchi (Department of Chemistry, College of General Education,

The University of Tokyo, Komaba, Meguro-ku, Tokyo), and

Trevor A Crabb (Department of Chemistry, Portsmouth Polytechnic, Portsmouth, England)

C-13 Chemical Shifts* and Thermodynamic Properties of 4 - 7

	4		6			5		7	
	stab	unst	stab	unst		stab	unst	stab	unst
C-1	87.1	86.7	56.2	60.3	C-1	71.5	62.6	37.3	32.7
3	68.0	68.0	28.5	30.3	3	85.9	88.4	58.0	63.6
4	32.9	23.6	35.6	24.3	5	47.8	47.2	53.6	46.9
4a	61.5	52.0	63.2	57.4	6	25.2	25.9	25.9	25.9
5	33.2	30.8	34.0	32.1	7	24.5	19.2	24.8	19.2
6	25.4	19.9	25.2	21.8	8	26.9	23.0	31.6	26.1
7	26.0	26.9	26.6	26.6	8a	62.2	57.7	65.6	64.6
8	49.8	45.0	56.7	45.3					
T_c	-55°C		-58°C			-91°C		-45°C	
ΔG_c°	1.25kcal/mol		0.23kcal/mol			0.45kcal/mol		0.23kcal/mol	
ΔG_c^\ddagger	11.52kcal/mol		10.60kcal/mol			8.75kcal/mol		10.59kcal/mol	

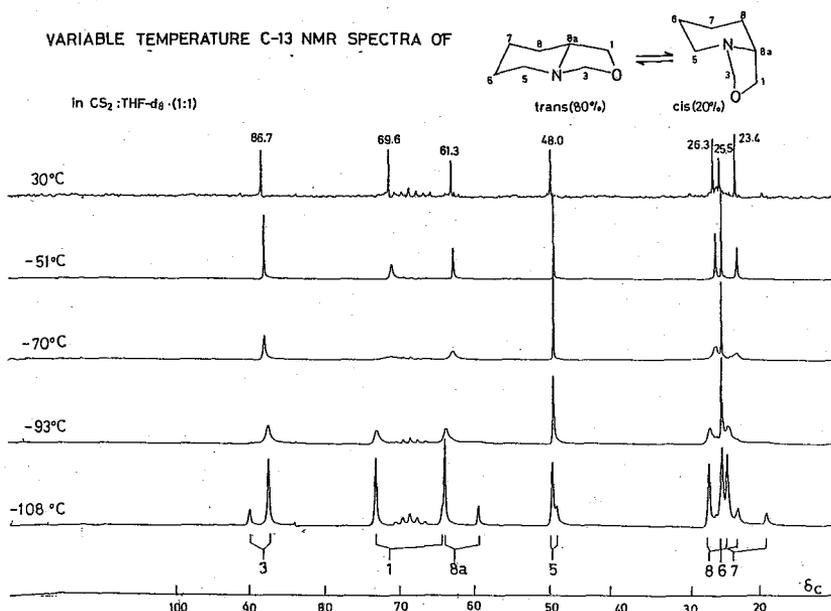
* in ppm relative to TMS

求める

- (2) この配置平衡の熱力学パラメーターを¹³C ダイナミックNMRで求める。
 (3) 4-7. の常温および低温での¹⁵N NMR スペクトルを測定し、 δ_N と構造との関連を調べる。

スペクトルの測定 各試料を THF-d₈/CS₂ (1:1) 溶液 (20-25% v/v) とし、試料管に入れて冷却凍結・脱気を反復した後、減圧のまま封じ切った。スペクトルの測定には JEOL FX-90 Q を用いた。典型的な測定条件は、¹³C NMR の場合、スペクトル幅 1K, テータ角 4K, ノルス角 45°, 待ち時間 2-3s で 0.5~1K 回の積算である。線形解析は DNMR3 によって行った。

¹⁵N NMR の場合は、スペクトル幅 2.5K, テータ角 4K, ノルス角 30°, 待ち



時間3~5sで2~5K回の積算を必要とした。なお ^{15}N 化学シフトは、外部基準として用いた $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ 水溶液の $^{15}\text{NH}_4^+$ ピークを20.68 ppmとする(液体アンモニアに対して)、Lichtenらの方法を採用して表した。

^{13}C 化学シフト 表1に4-7の安定形(存在比大)と不安定形(存在比小)の δ_c を示した。不安定形の存在比は、すでに報告されているように、両系列を通して、O体では小さく、S体ではかなり大きいことが確認された。

また可能なミス配置のうち、実際に寄与しているのがC2型ではなくC1型であることは、安定形(トランス配置)と不安定形の化学シフト差から確認できた。すなわち、例之は4, 6のC-1, 5, 7のC-3はC2型においては大きな δ 効果を受け、したがってC型より高磁場に吸収を示すはずである。しかし、実際には δ 効果は観測されない。これに対して、不安定型をC1配置とすれば、実測化学シフト差がよく説明される。

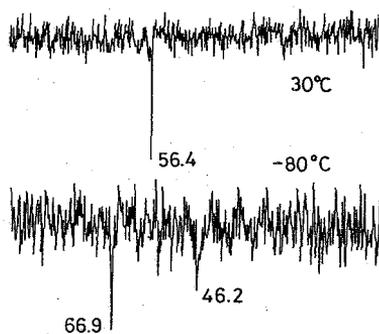
表1には4-7の速度過程の熱力学パラメーター、存在比を示した。この速度過程は、窒素原子の反転と環の反転を組み合わせたものである。すでに知られているように、 β 位にヘテロ原子を持つ窒素原子の反転障壁(ΔG^\ddagger at Tc)は $\sim 7 \text{ kcal/mol}$ (1,3-オキサジンなど)程度であり、環反転の障壁はそれより高い。したがって観測にかかっているのが環の反転障壁であるのは明らかである。

5の障壁だけが他の化合物の障壁に比べて著るしく低いのが目につく。この理由についても考察する。

N-15 Nmr Chemical Shifts of 4-7

compd	ambi temp	low temp(major, minor)
4	60.8	
5	56.4	66.9, 46.2
6	65.5	67.7, 67.1
7	68.0	70.8, 68.3

N-15 Nmr Spectra of 5 →



^{15}N 化学シフト 常温では、各化合物はその速い平衡を反映して鋭い1本線を示す。温度を下げるとピークは一たん消失するが、やがて2本線が表われる。6と7において安定形(trans型)と不安定形(C1型)との化学シフト差がそれぞれ0.6, 2.5 ppmであることはすでに報告した。一方、5においては低温における両異性体の化学シフト差は20 ppmにも達した。対応する4の不安定型の化学シフトは、あまりにも低い存在比のため観測できなかった。

1,2-ジメチルピペリジンでは、trans型とcis型の ^{15}N 化学シフト差は17 ppmに達すると報告されている。しかし、5と7とで大きな違いがあるのは奇妙である。一般に ^{15}N 化学シフトについてはまだまだ基本化合物のデータも不十分である。我々は、さし当り橋頭位に窒素原子をもつ化合物の構造と ^{15}N 化学シフトとの関係を系統的に研究する予定である。

謝辞 DNMR3使用許可を頂いた大木道則教授に感謝する。

1. 序.

シフト試薬 Ln(fod)₃ と、ドナー酸素原子をもつ遷移金属錯体との結合が知られており、有機塩基の場合と同様、化学平衡、コンホメーション等に關する知見がランタニドシフトから得られている。この研究の目的は、このような Ln を含む複核錯体における中心遷移金属(M)自体のランタニドシフトを検出し、合わせて Ln~M の結合の性質を調べることである。

今回は3ヶのグリッチ酸素による強い結合のため溶液での化学交換が常温で非常におそい系として、Co(acac)₃, Al(acac)₃ についての結果を報告する。²⁾

2. 実験

tris(acac) 錯体としては Co(acac)₃, Al(acac)₃ (市販品) および Co(ET-acac)₃, Co(t-Bu-acac)₃, Co(phenyl-acac)₃, Co(p-methoxyphenyl-acac)₃ (合成品) を用いた。濃度(S)は0.05M。溶媒は、CHCl₃, CCl₄, (Co錯体) ベンゼン(Al錯体), シフト試薬(L)は Ln(fod)₃, Ln(dpm)₃ (Ln=Ln, Pr, Nd, Sm, Eu) を用いた。濃度比 [L₀]/[S₀](P)は ~0.5 とした。

装置はバリアン CFT-20 (プロトボナア7セカリ一付) である。周波数, 19.104MHz (Co), 20.727MHz (Al); acquisition time, 0.05 s; number of transients, 500~1000; pulse width, 20 μs (Co), 30 μs (Al)。

3. 結果と考察

3-1. Co(acac)₃

Co(acac)₃-Ln(fod)₃ (CHCl₃) 系の ⁵⁹Co スペクトルを Fig. 1 に示す。常温では化学交換が極めておそいのぞ(NMR time scale に比べて)、free complex とアダクトが別々に観測される。free complex を基準とした main peak のシフト値、線中を Co(acac)₃-Ln(dpm)₃ 系と共に Table 1 に示す。Ln(fod)₃ および Ln(dpm)₃ によるかなり大きな高磁場へのアダクト生成シフト(AFS)が観測され

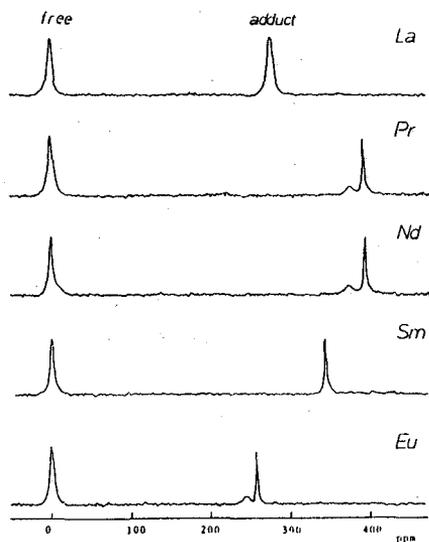


Fig. 1. The ⁵⁹Co NMR of free Co(acac)₃ and its adducts with Ln(fod)₃ in CHCl₃ at 25°C. ρ≅0.5.

The Separation of a Contact Term from Lanthanoid-induced ⁵⁹Co and ²⁷Al Shifts for Co(acac)₃ and Al(acac)₃

(Ibaraki Univ.) M. Hirayama, Y. Kawamata, and K. Kitami.

るが、これは⁵⁹Coのσ_{para}が一般に配位子の種類や対称性により大きく影響を受け
るから、アダクト生成によるわずかな配位子の対称性の歪みおよび酸素原子上の
電子密度の変化による配位子場の対称性のわずかな変化等によるものと思われる。
またこれはCo³⁺の基底状態と第一励起状態¹T_{2g}間のΔEがアダクト生成により増加し
たことに対応する。

Co(acac)₃-Ln(fod)₃の結晶解析データは、Ln-Co軸のまわりの対称性がよりこと

を示してい
るが、³双
極子シフト
(pcs)に軸
対称性の近
似を適用し
更にCoの超
微細結合定
数(A)と幾
何学因子(G)
はLnによ
り変わるな
いと仮定し
て

Table 1. Lanthanoid-induced ⁵⁹Co shifts of the Ln(fod)₃- and Ln(dpm)₃-adducts of Co(acac)₃ and its separation into cs₃ and pcs^{a)}

	δ _{Co} ^{b)}	Δν ^{c)}	AFS ^{d)}	δ' _{Co} ^{e)}	calculated		
					pcs	cs	total
La(fod) ₃	281	202	281	0			
Pr(fod) ₃	394 (376)	126	305	89	62.8	27.7	90.5
Nd(fod) ₃	396 (375)	76	317	79	24.0	41.8	65.8
Sm(fod) ₃	344	50	341	3	3.6	-0.6	3.0
Eu(fod) ₃	257 (247)	50	353	-96	-22.8	-99.6	-122.4
La(dpm) ₃	332	680	332	0			
Pr(dpm) ₃	416 (383)	450	350	66	34.2	31.9	66.1
Nd(dpm) ₃	417 (381)	400	359	58	13.1	48.1	61.2
Sm(dpm) ₃	378 (317)	875	376	2	2.2	-0.7	1.5
Eu(dpm) ₃	252	600	385	-133	-12.4	-114.6	-127.0

a) In ppm. Downfield shifts are given as negative. The accuracy of all the observed shifts is ±1 ppm. b) Relative to free Co(acac)₃. Values in parentheses are of the small peaks. c) The line widths of adduct peaks in Hz. d) δ'_{Co}(La) + α·N, where α is 12.0 ppm for Ln(fod)₃ and 8.9 ppm for Ln(dpm)₃, and N is the number of 4f electrons. e) δ'_{Co} - AFS.

$$\delta'_{Co} / \langle S_z \rangle = A + G \cdot D / \langle S_z \rangle$$

とおいた。δ'_{Co}はδ_{Co}よりAFSを差し引いたものとしてδ'_{Co} = cs + pcsと仮定する。
D、⟨S_z⟩はそれぞれBleaney⁴⁾およびGoldring⁵⁾の理論値を用いた。しかしながら有
機塩基についてこれまで見られていた様に、これらの仮定が妥当であればδ'_{Co}/⟨S_z⟩
vs. D/⟨S_z⟩プロットはより直線になると予想される。ところがAFSとして
δ_{Co}(La)を用いると直線とはならず、一方同じ様な立体構造をとると思われる
Al(acac)₃-アダクトの場合(3-2)はかたより直線性を示すことから、AFSは
Lnにより大きく変動するとした。これは4f電子によるAFSへの効果は電子数(N)
に単純に比例するとして

$$AFS' = \delta_{Co}(La) + \alpha \cdot N$$

と仮定(αは4f電子1つあたりの効果)、直線性が最高になる様にαを決めた。
結果はFig. 2に示すように満足なものであり、得られた勾配と切片を用いてδ'_{Co}を
csとpcsに分離した。(Table 1)

勾配より直接αを求めることはBleaneyの式における結晶場パラメーターA₂⟨r²⟩
が不明なため出来ないが、逆に結晶解析より得られたG = 0.053 Å⁻³ (Ln-Co = 3.33
Å)³⁾を用いるとA₂⟨r²⟩ ~ 175 cm⁻¹となり、これは200 ~ 500 cm⁻¹ (f₂-e_g - Ln(fod)₃
in CCl₄)⁶⁾, (100 ~ 150 cm⁻¹ (γ = 2) - Ln(fod)₃ in C₂DCl₃)⁷⁾等と比較される。又、Co-
(acac)₃-Ln(dpm)₃系でCo-Ln_{ax}^{IV}上向き率と同様に仮定すればA₂⟨r²⟩ ~ 95 cm⁻¹

となる。Aが負であることからLa-O-Coのスピンの伝達は主にスピン分極機構によると考えられる。main peakの低磁場側に現われている小さいサテライトはmain peakとの比がρにより変化しないことからアダクトの幾何異性体によるものではないかと思われる。又、線中はアダクトの方がfree complexよりも小さいことは大変興味があるが、今のところまだ解釈がなされていない。

なお、アセチルアセトンのメチル基1つをエチル、n-ブチル、フェニル、p-メチルフェニルの各基に置換した誘導体についても同様なAFSの取扱いでよい結果を得ているが、ここは省略する。これは誘導体から得られるAの大きさの比較より、Co-O配位結合の共有結合性への置換基効果等について検討中である。

この様に交換速度が非常におそく1:1アダクトそのものを観測している系なので、電子スピンのTiの長い後半のLn(GdへYb)によるシフトは常温では観測出来なかった。

Table 2. Lanthanoid-induced ^{27}Al shifts of $\text{Al}(\text{acac})_3$ and its separation into cs and pcs^{a)}

	δ_{Al}	$\Delta\nu^{\text{b)}$	δ'_{Al}	theoretical		
				cs	pcs	total
La(fod) ₃	-2 ± 1	165	0			
Pr(fod) ₃	70.2 ± 1	229	72.2 ± 2	16.0	55.0	71.0
Nd(fod) ₃	44.5 ± 1	178	46.5 ± 2	24.2	21.0	45.2
Sm(fod) ₃	2 ± 1	216	4 ± 2	-0.3	3.5	3.2
Eu(fod) ₃	-81.7 ± 1	191	-79.7 ± 2	-57.7	-20.0	-77.7

a) In 7 ppm. Highfield shifts are denoted as positive. The ^{27}Al NMR spectra were measured on a Varian CFT-20 with a broad band accessory at 20.727 Mz; for 8065 Hz spectral width, 807 data points were available, taking the acquisition time as 0.05 s. b) Line widths of peaks of adducts.

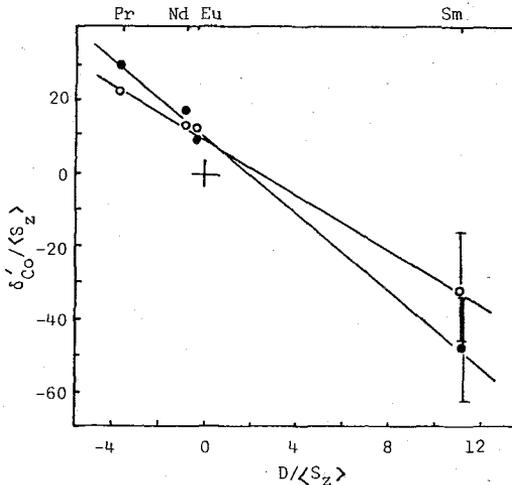


Fig. 2. The ratios of δ'_{Co} to $\langle S_z \rangle$ plotted vs. $D/\langle S_z \rangle$. $\text{Ln}(\text{fod})_3$ - and $\text{Ln}(\text{dpm})_3$ -adducts are denoted by filled and open symbols, respectively.

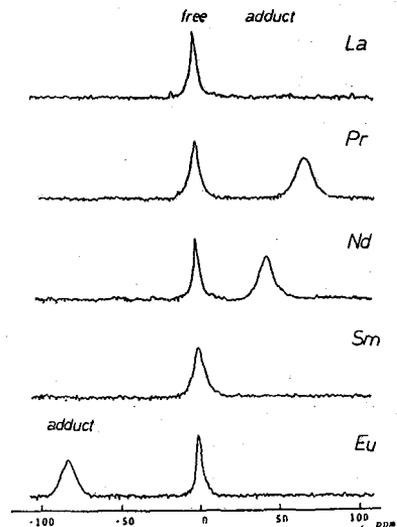


Fig. 3. The ^{27}Al NMR of free $\text{Al}(\text{acac})_3$ and its adducts with $\text{Ln}(\text{fod})_3$ in benzene at 25 C. $\rho = 0.5$.

3-2 Al(acac)₃

Al(acac)₃-Ln(fod)₃ (ベンゼン) 系の ²⁷Al-NMR を測定した結果、同様は free complex とアダクトが別々に観測された。(Fig. 3) Co(acac)₃ の場合と同じく、3ヶのブリンジ酸素による強固な結合のためは、化学交換がゆっくりしていると思われる。又、サテライトは観測されていなく、free complex を基準としたラニタニフトと線巾を Table 2 に示す。AFS² として、 $\delta_{Al}(La)$ (~2 ppm) 自作を用いて、(3-1) と同じ方法にエリ解析した結果極めてよい直線性が得られた。(Fig. 4) Sm の場合 free とアダクトの peak がほとんど重っているが両方の線巾、強度比等より δ_{Al} を決定した。Sm の $\langle S_2 \rangle$ がかなり小さいので $\delta_{Al} / \langle S_2 \rangle$ の値には大きな巾を覚込ませなければならぬ。cs と pes の分離の結果を Table 2 に示す。この様に Co の場合と同程度のアダクト生成による配位子場の変化を知して、

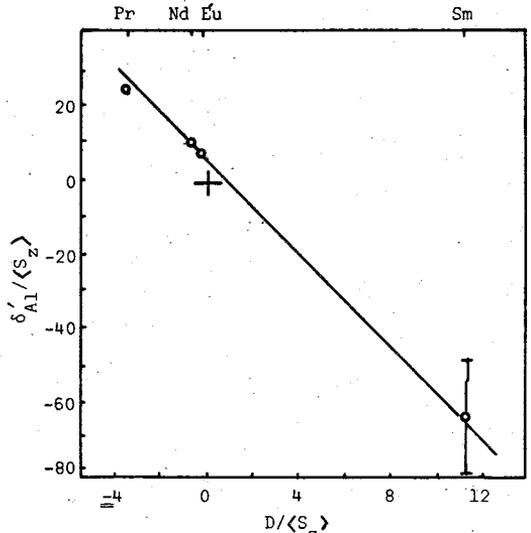


Fig. 4. The ratios of δ'_{Al} to $\langle S_2 \rangle$ plotted vs. $D/\langle S_2 \rangle$.

Al(acac)₃ の場合は非常にわずかなシフトしか示さず、Ln による変化もみられぬ。これは Al の ΔE が配位子場の変化にあまり敏感でなるとは思われる。句配は Co(acac)₃-Ln(fod)₃ 系よりもやや大きいのが、A₂<V²> が Co の場合と同程度と予想されるので G も同程度となり、両者の立体構造には予想どおり大きな違いがないと云える。

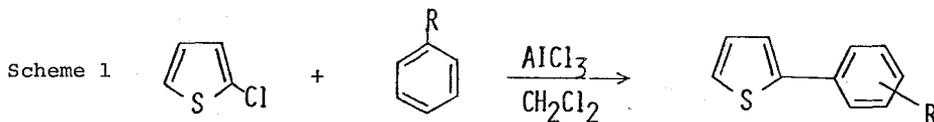
なお、¹H, ¹³C NMR からは、溶解度およびシフトが小さいこと、線巾が広過ぎることのため満足なデータが得られなかった。

- 1) L. F. Lindoy and W. E. Moody, J. Amer. Chem. Soc., 97, 2275 (1975); 99, 5863 (1977); J. K. Beattie, L. F. Lindoy, and W. E. Moody, Inorg. Chem., 15, 3170 (1975).
- 2) M. Hirayama and Y. Kawamata, Chem. Lett., 1295 (1980); M. Hirayama and K. Kitami, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1030 (1980).
- 3) L. F. Lindoy, H. C. Lip, and H. W. Louie, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 778 (1977).
- 4) B. Bleaney, C. M. Dobson, B. A. Levine, R. B. Martin, R. J. P. Williams, and A. V. Xavier, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 791 (1972).
- 5) R. M. Golding and M. P. Halton, Aust. J. Chem., 25, 2577 (1972).
- 6) K. Ajisaka and M. Kainosho, J. Amer. Chem. Soc., 97, 330 (1975).
- 7) M. Hirayama, M. Sato, M. Takeuchi, and M. Saito, Bull. Chem. Soc. Jpn., 48, 2690 (1975).

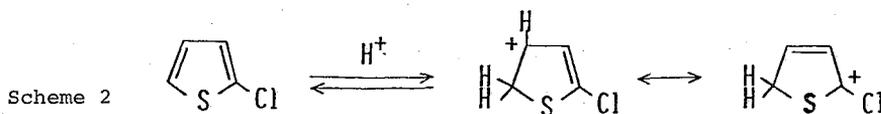
(名工大) ○ 横山 幸弘・山下行秀・高橋 憲助
(山形大工) 曾根 澄

1. 緒言

この研究は次に示すような反応, 即ち2-クロロチオフェンが塩化アルミニウムの存在のもとに活性なベンゼン誘導体と反応して2-4エニル化が起るといふ反



応から提起された。¹⁾ この反応を説明するためにはプロトン化した中間体の存在が仮定され, チオフェンに附加するプロトンは多分空気中の水分と塩化アルミニウムの反応から生ずると考えられる。(Scheme 2)



多くのカルボニウムイオンの研究が Olah により超強酸中で勢力的に行なわれていた。²⁾ この研究では初に述べた反応の中間体としてのカチオンを観測することを目的としたので、反応で生ずると思われる AlCl₃-HCl-solvent の系を人工的につくって、生成するカチオンを観測した。また超強酸中で生成するカチオンもあわせて観測し、それら二つの系で観測できたカチオン種が同じであることを確認することができた。得られた結果の一部は既に報告した。³⁾ 塩化アルミニウム中で生成するカチオンの研究はこれまでに Belen'kii⁴⁾及び小川⁵⁾により行なわれているがこれらの研究は活性な置換基、たとえばアルキル基を有する化合物について行なわれたものであるが、不活性なハロゲン基を有する化合物に関する研究はこれまでに行なわれていない。

2. 実験

研究に使用されたクロロチオフェンはすべて合成されたものである。他の試薬は市販のものを精製せずにそのまま使用した。¹H NMR測定は日立 R-20B分光計を使用し、60 MHzで行なわれた。化学シフトはTMSを封じたキャピラリーをサンプル管に入れて補正した。

AlCl₃-HCl-溶媒系中でのカチオンの生成

約 10 ml のパイレックス製の容器に塩化アルミ粉末約 1 gr. を入れ、これに HCl

¹H NMR Study of Protonated Chlorothiophenes

(Nagoya Institute of Technology) Y. Yokoyama, Y. Yamashita and K. Takahashi, and (Yamagata Univ.) T. Sone.

ガスを5分間吹き込む。この容器を -40°C の低温浴に入れて、溶媒5ml. を加える。更にHClガスを90分以上吹き込み、低温でHClと AlCl_3 で飽和した溶媒をつくる。小さな反応器にNMR測定管を連結しておき、1:1のモル比に相等する AlCl_3 を加え -40°C に保ちながら前述の溶媒を約1ml. を加え、良く攪拌する。出発物質を約50~100mg. 加え、2-6分間反応させる。反応物を手早くNMR管に移し、これを -80°C の冷浴に浸す。NMR測定管を切り離し、テフロン製の蓋をし、 -80°C に保ったまま、NMRの測定を行なう。

3. 結果と考察

生成したカチオン種の ^1H NMRデータを表1に示した。表ではカチオン種は1から6までに番号をつけて示し、またプロトン化の起った位置は α -位であるように統一して、各カチオン種の比較が容易となるようにした。

プロトン化2-クロロチオフエン(1)

プロトン化した2-クロロチオフエン(1)のスペクトルを図1a, bに示した。1の化学シフトは AlCl_3 -HCl-溶媒と HSO_3F 中で観測したものは約0.5ppmの差があるが同じカチオン種であり、プロトン化は α -位置に起っていることがわかった。観測された吸収の強度比は低磁場から1:1:2となり、化学シフトの値が互いにかなり違っているので、各吸収の帰属は容易である。チオフエン環の親電子反応は α -位が β -位より容易に起ることが知られており、 α -位のプロトン化はチオフエン環の性質と良く一致する。

プロトン化2,5-ジクロロチオフエン(4)及び2,3,5-トリクロロチオフエン(6)

ニつの α -位が既に置換されている場合でもプロトン化は α -位で起る。その例として2,5-ジクロロ及び2,3,5-トリクロロチオフエンから生ずるカチオンとして4及び6のデータが表に示してある。このプロトン化はクロロ基の附いている炭素で起っている、 α -オクロベンゼン類ではクロロ基の附いていない炭素で起っていることが報告されている。⁶⁾ 2,3,5-トリクロロチオフエンのカチオンは SbF_5 をとかした HSO_3F 中では単純なカチオン種が観測された。しかし単に HSO_3F 中では不活性なクロロ基の導入によって、反応はあまり進行せず、他の副反応を生ずるようである。2,5-ジクロロチオフエンのプロトン化に於ても低温では表に示した単純なカチオン種が観測されたが、室温で反応させると複雑な生成混合物を生じ、その同定は単純とはならない。2,5-ジクロロ-3-メチルチオフエンのプロトン化は比較的容易に進行するようであった。

プロトン化2-クロル-5-メチルチオフエン(2及び3)

2-クロル-5-メチルチオフエンのプロトン化は α -位と共に2-位でも起り2種のカチオン2と3を生ずる。その生成比は3:1から10:1まで変わり、出発物質と超強酸を反応させる時間により変わる。低温では2が多量に生じている(図2A)。

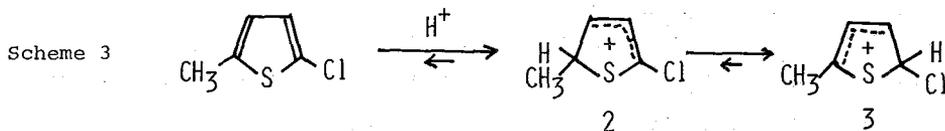


Table 1. ^1H NMR Data of Protonated Chlorothiophenes measured at 60 MHz

Cation	Substituents	Solvent	Temp.	Chemical Shift, ppm ⁺			
				2-H	3-H	4-H	5-H
1	2-Cl	A ⁺⁺	-50	---	8.05(5.5) ⁺⁺⁺	9.22(5.5)	5.55
		B	-70	---	8.55(5.5)	9.69(5.5)	+++
		C	-40	---	8.65	9.78	6.19
2	2-Cl, 5-CH ₃	A	-70	---	7.92(5.5)	9.07(5.5)	2.13(CH ₃ ,7.5) 5.75(7.5)
		B	-70	---	8.42(5.5)	9.60(5.5)	2.61(CH ₃ ,7.5) +++
		D	-50	---	8.00	9.07(5.5)	2.22(CH ₃ ,7.0) 5.83(7.0)
3	2-CH ₃ , 5-Cl	A	-70	3.51(CH ₃)	7.84(5.5)	8.64(5.5)	6.92
		D	-50	3.59(CH ₃)	7.92	8.63(5.5)	7.00
4	2,5-Cl ₂	A	-70	---	7.89(5.5)	8.83(5.5)	7.10
		B	-70	---	8.43(5.5)	9.41(5.5)	7.78
		C	-40	---	8.51(5.0)	9.47(5.0)	7.80
		D	-70	---	7.96(5.5)	8.90(5.5)	7.18
5	2,5-Cl ₂ ,4-CH ₃	A	-70	---	7.79	2.94(CH ₃)	6.85
		B	-70	---	8.25	3.43(CH ₃)	7.38
		C	-45	---	8.29	3.45(CH ₃)	7.39
		D	-70	---	7.83	3.02(CH ₃)	6.89
6	2,3,5-Cl ₃	D	-70	---	7.99	---	6.90

⁺ ^1H Chemical shifts are referred to an external neat TMS contained in a capillary.

⁺⁺ Abbreviation: A, HSO₃F; B, AlCl₃-HCl-dichloromethane; C, AlCl₃-HCl-1,2-dichloroethane; D, HSO₃F-SbF₅ (7.7 mol/l). ⁺⁺⁺ The values in parentheses are the splittings observed in the signal in Hz. ⁺⁺⁺ Not available because of the large solvent peaks.

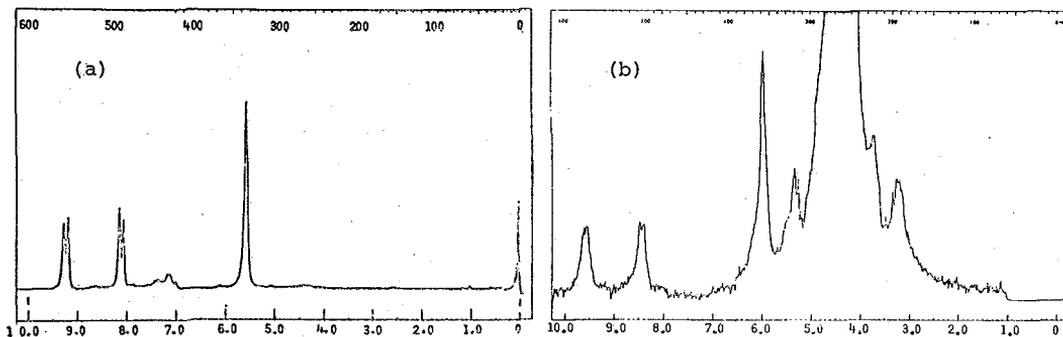


Fig. 1. ^1H NMR spectrum of protonated 2-chlorothiophene at 60 MHz;

(a) in HSO₃F at -50°C; (b) in AlCl₃-HCl-dichloroethane at -30°C.

しかし温度を -70 から -30°C に上げると3が2と同量まで増加する(図2b)。その試料を再び低温にしても3と2の比は変わらない(図2c)。 $\text{AlCl}_3\text{-HCl-CH}_2\text{Cl}_2$ の系ではカチオン2のみが生成した(図2d)。そこで2と3の熱力学的安定性は同じと考えられるが、Scheme 3に示すように、プロトン化は初め5-位に起り、2を産じ、これが3に転移するものと考えられる。

プロトン化チオフェン類の安定性

これまでに述べたカチオン1~6の観測はすべて低温で行われた。カチオンを徐々に昇温してゆくとNMRスペクトルが変化する。この変化は種々の転移、他の分子との反応、分解反応によるものと思われるが、初めに観測されたカチオンが消失し始める温度は約 $-30\sim-10^{\circ}\text{C}$ であった。

文献

- 1) 曾根、横山、奥山, 日本化学会第41年会講演, 2N10
- 2) G.A.Olah and P.Von R.Schleyer, 'Carbocation Ions', John Wiley & Sons, Inc., New York, 1973, Vol. 1-4.
- 3) Y. Yokoyama, Y. Yamashita, K.Takahashi, and T. Sone, Chem. Letts., 1981, 813.
- 4) L.I.Belenkii, A.P.Yakubov, and Ya. L. Gol'dfarb, Zhur.Org.Khim., 11, 424 (1975).
- 5) Y.Okami, N.Otani, D.Katoh, S.Hamanaka and M.Ogawa, Bull.Chem.Soc.Jap., 46, 1860 ('73)
- 6) D.M.Brouwer, Rec.Trav.Chim., Pays-Bas., 87, 335 and 342 (1968).

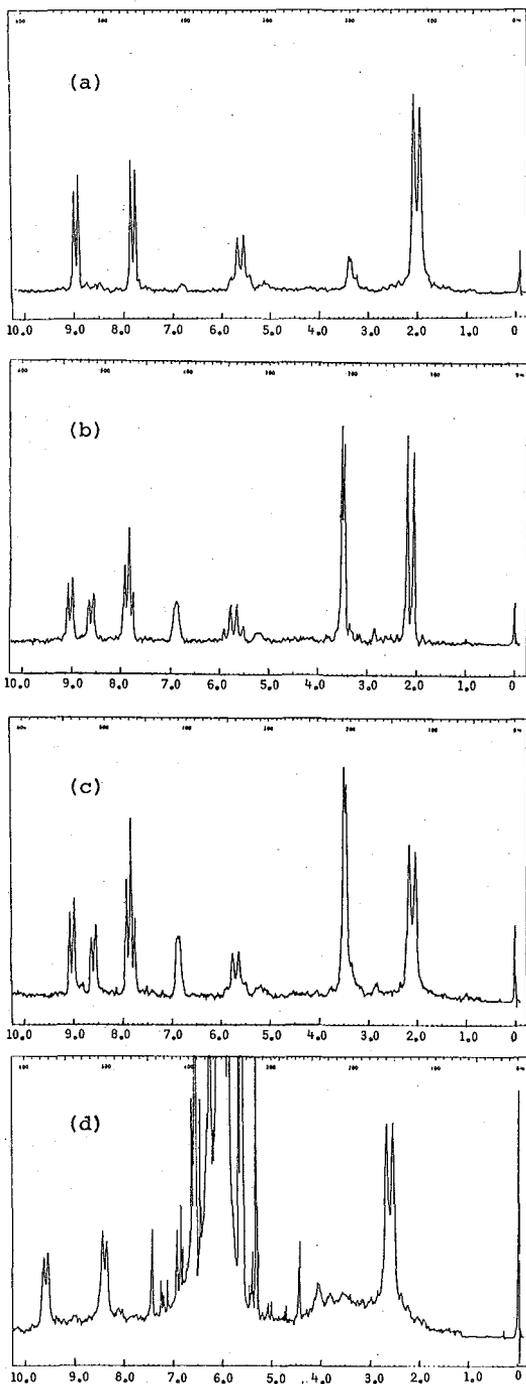


Fig.2. ^1H NMR spectrum of protonated 2-chloro-5-methylthiophene; (a) in HSO_3F at -70°C ; (b) at -30°C ; (c) again at -70°C after observing the spectrum (b); (d) in $\text{AlCl}_3\text{-HCl-dichloromethane}$ at -70°C .

(阪大薬)

○山里洋吉 藤原英明

佐々木喜男

(序論)

これまでNMRシフトにおける溶媒効果の研究は数多く行なわれて来た。ここでは、*vander Waals*力による効果は、水素結合、電荷移動等の相互作用に基づく化学的因子に対し、物理的因子とも呼ばれており、*Buckingham*らによる蒸発熱との比較に注目した検討¹⁾、および*London*近似を用いて、分散力の計算結果と比較する事²⁾などにより論議されている。現在までの研究には、*Buckingham*らの成果を、さらに展開した例はないので、我々はその観点から溶媒効果の検討を行ない、¹Hと¹³Cにおける溶媒効果の差異についても検討を行なった。

(実験)

¹H-NMR測定は、日立R-22型NMR装置(90MHz)により、¹³C-NMR測定は、日立R-900M型FT-NMR装置(22.63MHz)により、行なった。¹Hにおいては、内部ロック方式で測定したが、CO₂, CS₂溶媒では外部ロックで行ない、¹³Cにおいても外部ロックにより測定した。シフトの基準は、¹H, ¹³CともにTMS外部基準を採用した。プロ-フ温度は34°Cであり、シフトの読取誤差は¹Hでは~0.001ppm, ¹³Cでは~0.013ppmであった。溶質濃度は¹Hの場合6mmole/lとし、¹³Cの場合は2.02mole/lとした。

¹Hシフトは、5回測定しその平均値を(誤差±0.3Hz), ¹³Cシフトは1回のみ測定したものを用了。さらに各々に対し、体積磁化率の補正を行なった。

試薬は総て市販品を、一部精製して用いた。用いた溶媒をTable 1. に示す。

(結果及び考察)

1) 溶質

溶質として用いたテトラメトキシシラン(TMOS), ヘキサメチルジシロキサン(HMD)は、いづれも有機ケイ素化合物である。TMOSは等方性分子であるが結合の回転に併なう双極子能率を有する。TMOS, HMDとも双極子能率は1.7~1.8Dである。

Table 1. Index of solvent molecules

Index number	Molecule	Index number	Molecule	Index number	Molecule
1.	n-C ₆ H ₁₄	19.	MeCOEt	37.	C ₆ H ₅ Et
2.	n-C ₇ H ₁₆	20.	i-PrCOMe	38.	C ₆ H ₅ i-Pr
3.	n-C ₈ H ₁₈	21.	MeCOOEt	39.	C ₆ H ₅ t-Bu
4.	n-C ₁₀ H ₂₂	22.	(C ₂ H ₅) ₃ N	40.	C ₆ H ₅ Hex
5.	n-C ₁₆ H ₃₄	23.	i-PrOH	41.	o-Xylene
6.	c-C ₅ H ₁₀	24.	t-BuOH	42.	m-Xylene
7.	c-C ₆ H ₁₂	25.	CS ₂	43.	p-Xylene
8.	c-C ₈ H ₁₆	26.	MeI	44.	Mesitylene
9.	Me-c-C ₆ H ₁₁	27.	CH ₂ Cl ₂	45.	C ₆ H ₅ F
10.	c-C ₆ H ₁₀	28.	CH ₂ BrCl	46.	C ₆ H ₅ Cl
11.	MeNO ₂	29.	CH ₂ Br ₂	47.	C ₆ H ₅ Br
12.	EtNO ₂	30.	CHCl ₃	48.	C ₆ H ₅ I
13.	i-PrNO ₂	31.	CHBr ₃	49.	C ₆ H ₅ NO ₂
14.	MeCN	32.	CCl ₄	50.	C ₆ H ₅ CN
15.	EtCN	33.	CH ₃ CHCl ₂	51.	C ₆ H ₅ CHO
16.	n-PrCN	34.	CHCl ₂ CCl ₃	52.	C ₆ H ₅ NH ₂
17.	n-BuCN	35.	C ₆ H ₆	53.	C ₆ H ₅ N(CH ₃) ₂
18.	Me ₂ CO	36.	C ₆ H ₅ Me	54.	C ₆ H ₅ COCH ₃

Solvent effect on the chemical shifts of tetramethoxysilane

(Univ. Osaka) O.Y. Yamasato, H. Hujiwara, Y. Sasaki

○やまさとようきち ふじわらひであき ささきよしお

2) 溶質 C₄H₄での溶媒シフトと δ' の比較

Buckinghamらによる C₄H₄の溶媒シフトと TMOS における溶媒シフトを比較すると、Fig. 1 の様になる。C₄H₄と TMOS の間にはよい直線関係が得られる。この事実から、TMOS の持つ双極子能率があまり大きくない為、それによるシフト変化はほとんど無視出来る程度のものである。従って TMOS の場合も C₄H₄と同様に、極性に関与しない分散力による影響を大きく受けていると思われる。Numbering of solvents is according to Table 1.

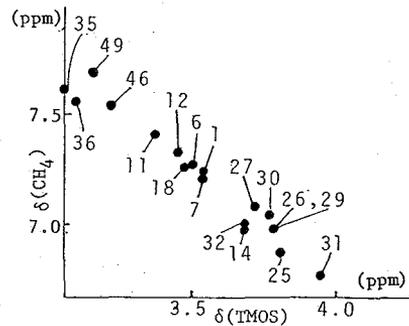


Fig. 1. Comparison of ¹H solvent shifts. $\delta(\text{CH}_4)$ vs. $\delta(\text{TMOS})$

3) TMOS における溶媒シフトと蒸発熱との関係

液体の蒸発熱は、その液体の持つ分子間力を表現している。そこで溶媒の蒸発のエネルギーと溶媒シフトとの比較を行なった。(Fig. 2)

アルカン類及び極性のあまり強くない脂肪族化合物では、一つの直線関係が得られ、ハロゲン化合物は、その直線から大きくずれる。これは Buckinghamらの結果に一致する。

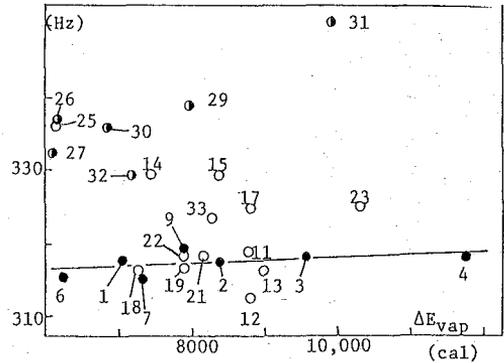


Fig. 2 ¹H solvent shifts of TMOS vs. Energy of vaporization (ΔE_{vap})

蒸発熱の主な内容には、分散力、誘起力、配向力及び水素結合が考えられる。上にも述べたように、TMOS における溶媒シフトは、分散力による影響が大きい。従って配向力あるいは水素結合力の大きい NO₂, CN, OHなどは、そのまま蒸発熱を用いる事は適当でない。そこで大きな双極子能率を持たない溶媒のみを選び、溶解度パラメータ ($\sigma = (\Delta E_{\text{vap}}/V)^{1/2}$) に対してプロットすると Fig. 3 の様に、ハロゲン化合物も含め、かなりよい相関が得られた。従って溶媒シフトは、蒸発熱のみでなく、分子容を考慮する必要がある。

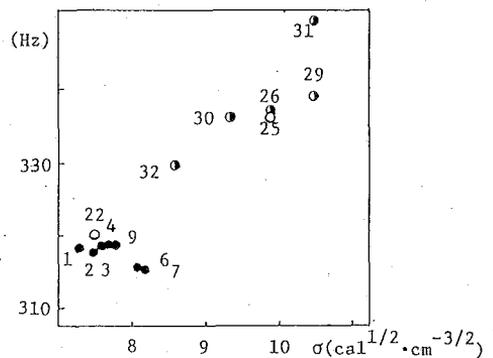


Fig. 3 ¹H solvent shifts of TMOS vs. Solubility parameter (σ)

Rummen³⁾らにより London の分散モデルから計算される因子に、さらに Site factor ($1/(1-89^3)$) (Fig. 4) を加味すると、ハロゲン化合物を含めよい直線性が得られることが示されている。

今、TMOS におけるプロトンに関する $(1-89^3)$ を求め、溶媒の分子容の逆数 V^{-1} に対してプロット

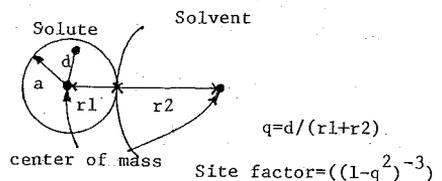


Fig. 4 Site factor

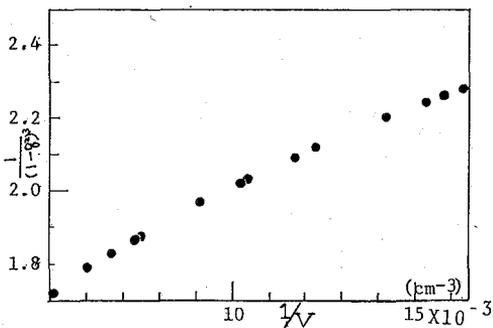


Fig. 5 Site factor $((1-q^2)^{-3})$ vs. $1/V$

トを行なうと Fig. 5 の様になり、非常によい相関関係が得られた。

以上の結果より分散力によるシフトと呼ばれているものは、単にエンタルピー項にのみ依存するのではなく、エントロピー項も大きな役割を果たしている事が推定出来る。

4) 溶質の極性効果

TMOSは、双極子能率を有するが、通常双極子と異なって、方向性を持たない。上記の様に、TMOSは双極子能率を有するにも関わらず、あたかもメタンの様な、無極性分子の様に振舞う。この事実をより明確にするために、TMOSと同程度の双極子能率を有し、かつ異方向性を有するHMDとの比較検討を行なってみた。(Fig. 6-1, 6-2) 溶媒として無極性溶媒を用いた場合は、TMOSとHMDのシフトがよい相関を示す事から、TMOS, HMDとも、無極性分子様の挙動を示す事がわかる。これに対して、極性溶媒を用いた場合は、TMOS, HMDとも、*n*-ヘキサン中のシフトを基準として、ベンゼン系溶媒における溶媒シフトを表わし、これらのシフト差を、 σ_i に対してプロットを行なうと(Fig. 7-1, 7-2)の様になる。図から明らかのように σ_i に対して相関が認められる。従ってこのシフト差は溶媒分子との極性的相互作用の違いを反映すると考えられる。それにはTMOSとHMDとの分子容が異なる事、あるいは双極子以外の多極子が、異なる事が指摘されよう。

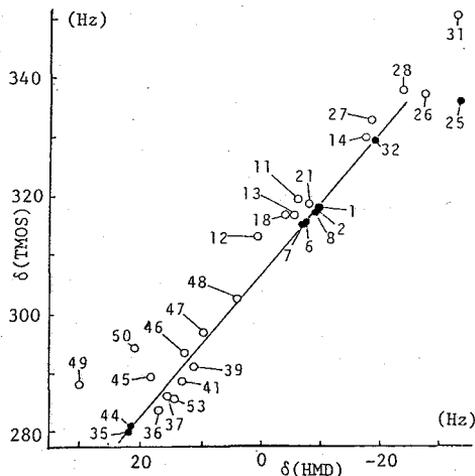


Fig. 6-1 Comparison of ^1H solvent-shifts. $\delta(\text{TMOS})$ vs. $\delta(\text{HMD})$

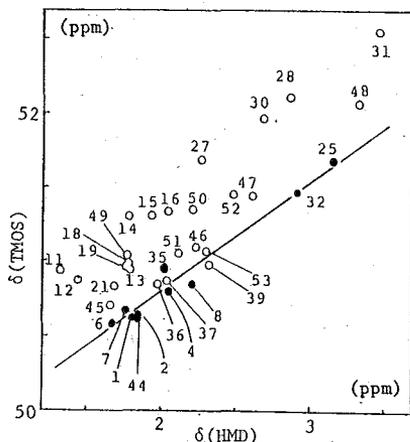


Fig. 6-2 Comparison of ^{13}C solvent-shifts. $\delta(\text{TMOS})$ vs. $\delta(\text{HMD})$

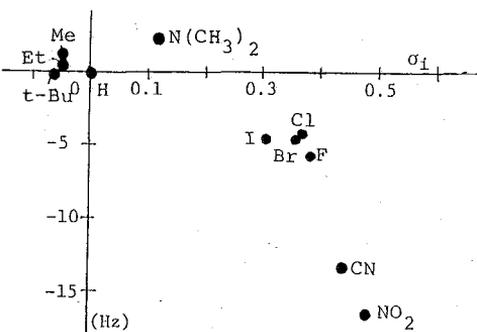


Fig. 7-1 $\delta(\text{TMOS}) - \delta(\text{HMD})$ vs. σ_i in $\phi\text{-X}$

4) ^{13}C と ^1H における溶媒シフトの差異について
 TMOSを溶質とした時の ^1H と ^{13}C の溶媒シフトは、Fig.8に示すように、ある一定の比例関係がある。これは ^{13}C と ^1H の溶媒シフトが同一の因子に支配されている為である。しかしながら ^{13}C と ^1H における大きな差異は、ベンゼン系溶媒が、その他の溶媒とは異なるほぼ平行な直線を示す事である。今まで述べてきた様に、分散力による溶媒シフトは、溶媒の溶解パラメータに支配される事から、総て同一直線上に乗るはずである。従って分散力による溶媒シフト以外の他の相互作用によるものと考えられる。一般に、ベンゼン系溶媒においては、ASISと呼ばれている効果によるものと考えられる。

(まとめ)

- 1) 双極子能率を有する溶質であるTMOSの溶媒シフトとBuckinghamらのメタンにおける溶媒シフトの間にはかなりよい相関性が見られ、TMOSの持つ双極子能率による極性効果は、分散力による溶媒シフトに比較して、非常にわずかであり、ほぼ分散力により溶媒シフトが規定される。
- 2) TMOSにおける溶媒シフトは、あまり強くない双極子能率を持つ溶媒に関しては、溶解度パラメータに対してよい相関性を持つ。従って分散力による溶媒シフトは単にエンタルピー項だけでなく、エントロピー項にも依存する事が推定される。
- 3) TMOSとHMDは、同程度の双極子能率を持つにもかかわらず、その間のシフト差は、溶媒の極性に対して依存性がある。
- 4) TMOSを溶質とした場合 その ^{13}C 及び ^1H の溶媒シフトの間には、よい相関性を有し同一の相互作用を受けている事が推定される。又、ベンゼン系溶媒とその他の溶媒とのずれは、測定核の環境の相違のために、ASIS効果の影響が、 ^1H の方により大きく現われた為と推定される。

(参考文献)

- 1) A.D.Buckingham, et al.; J.Chem.Phys., 32, 1227 (1960)
- 2) F.H.A.Rummens; Chem.Phys.lett., 31, 592 (1975) etc.
- 3) F.H.A.Rummens; Can.J.Chem., 54, 254 (1976)
- 4) 湯川泰秀, 都野雄甫, 日本化学雑誌, 86, 873 (1965)
 M.Sawada, M.Ichihara, et al.; Chem.Soc.Jpn., 53, 2055 (1980)

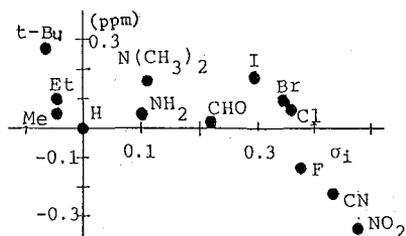


Fig.7-2 ^{13}C $\delta(\text{TMOS}) - \delta(\text{HMD})$ vs. σ_i in ϕ -X

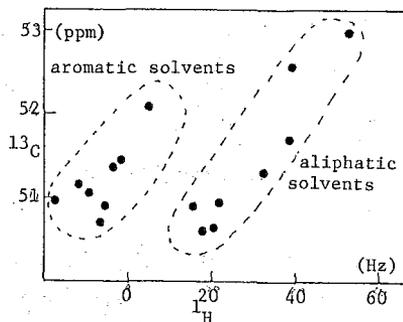


Fig.8 ^{13}C vs. ^1H solvent shifts of TMOS

試料作成

空気中の湿気の混入を避ける為、試料は真空ライン中で混合、密封した。

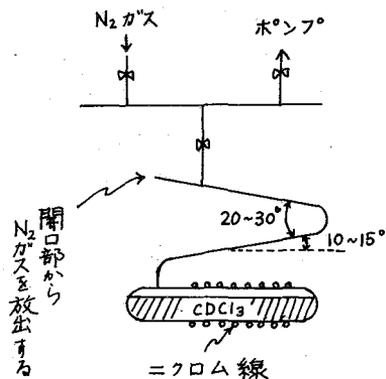
CDCl_3 の乾燥

以前NMR討論会で発表した、酸・塩基=成分系のNMRの研究の際、ポリジメチルシラン等を精製するのに用いた方法を、 CDCl_3 に適するように改造して用いた。あらかじめ 10^{-4} Pa以下に排気、ベーキングを繰り返して十分乾燥しておいた真空ラインの蒸留器に、市販のスペクトル用 CDCl_3 を入れ、乾燥窒素雰囲気中で自然空冷の状態に加熱還流を行った。還流カラムの頂上から2~3 cm下のところで全還流するように加熱を調節し、カラム頂上部に50 cm/sec程度の流速で乾燥窒素ガスを流し、拡散してきた先留分の蒸気を系外に排出した。水は CDCl_3 と共沸するので、先留分に多く集まり、20~30%の CDCl_3 のロスで目的レベルまで含水量を下げる事ができた。

又一図に装置の略図を示した。液が沸騰すると、フラスコ中の液組成のままの飛沫が拡がること、系内の圧力変動を生じ、カラムの各位置での気液平衡が乱れ、また、還流部位も一定せず、分離が悪くなる。これを避けるために、蒸留フラスコを横型にし、周囲から均一に加熱されるようヒーターを配置した。先留分を液体で捕集することは、中留分の通過する部分を先留分で汚す恐れがあるので避けた。カラムを途中で折り返したのは、図のように、ラインに一箇所を懸垂する際の荷重のバランスを考えたためである。

水の計量

真空ラインの一部を375 Kに保ち、その中に真空コックとアンフルを組み合わせて10~100 mlの計量ができるガスビュレットを設けた。273 Kに保った氷の上の水蒸気をこのガスビュレットで計量し、NMR試料管に導入した。



又一図 溶媒精製装置

1) T. Endo, A. Kuwahara, H. Tasai, T. Murata, M. Hashimoto and T. Ishigami, Nature, 268 74 (1977)

2) 吉田、藤原、池上他, 第9回~13回 NMR討論会要旨集

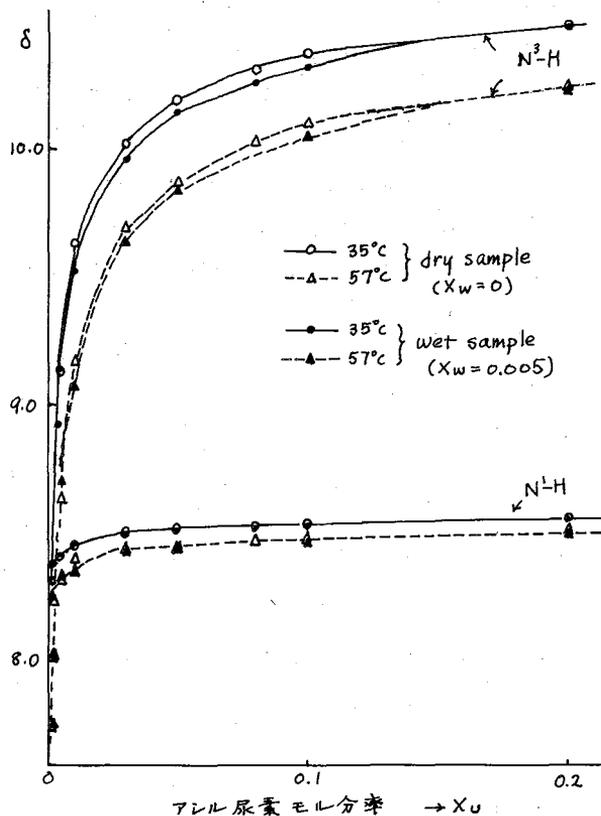
結果

1-ethyl-3-propionylurea の N¹-H および N³-H プロトンの化学シフトを、乾燥 CDCl₃ 中 (= 成分系)、およびこれに一定量の水 (0.005 モル分率) を加えた三成分系において、濃度、温度依存性を測定した結果を δ 図に示した。次頁 I 式に示すように、N¹-H は分子内水素結合をしており、濃度、温度変化に対してごくわずかにしか依存を示さないのに対し、分子間水素結合をしていると思われる N³-H は、溶液が希薄になるに従って大きく高磁場シフトし、また温度が高くなるとやはり高磁場シフトする。

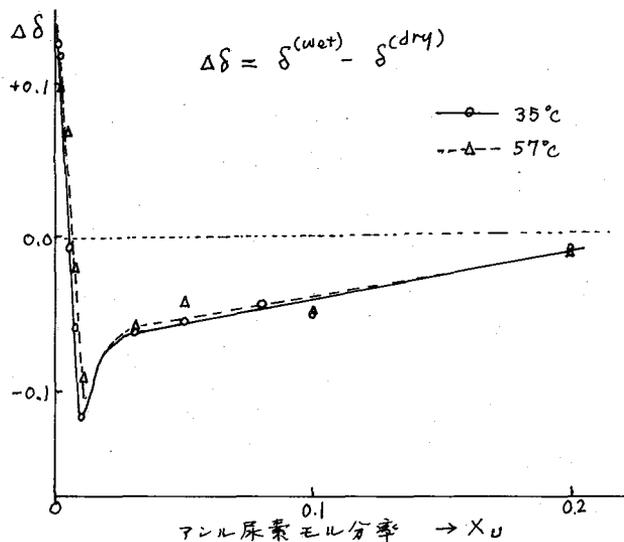
次に、水による効果を明らかにするため、三成分系 (wet) と二成分系 (dry) で得られた N³-H プロトンのシフト差 $\Delta\delta$ ($=\delta_{\text{wet}} - \delta_{\text{dry}}$) の濃度による変化を δ 図に示した。水 ($X_w=0.005$) が含まれると、アシル尿素の濃度が比較的高い部分では N³-H プロトンは高磁場シフトを示す。アシル尿素が十分希薄になると、高磁場シフトは更に顕著になるが、水の濃度と同程度になると、今度は低磁場シフトするため、 $\Delta\delta$ の符号の逆転が起こっているのが見られる。

考察

水を含む水素結合系を取扱う場合、まず考慮しなければならないのは、観測された変化が水との交換によるものか、または平衡によるものか、という問題である。もし交換によるものとするとき、CDCl₃ 中の水の化学シフト $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ は約 1.5 ppm であるから、 $\Delta\delta$ が負になる効果 (高磁場シフト)



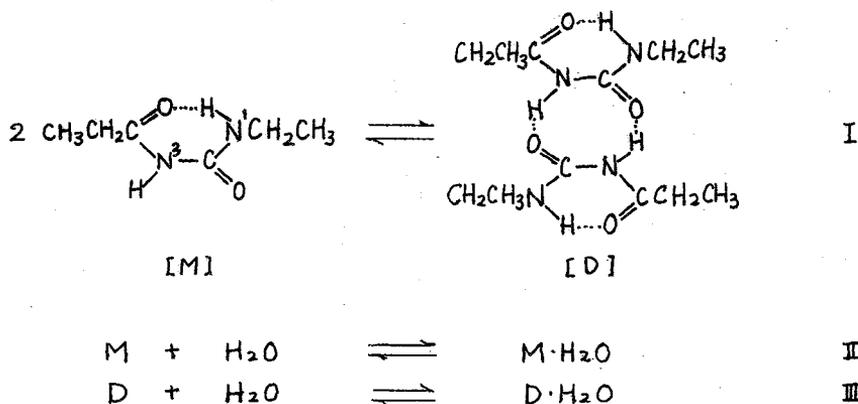
δ 図. N-H プロトンシフトの濃度、温度依存性及びそれに対する水分子の効果



δ 図. 二成分系と三成分系の分子間水素結合 N-H プロトンの化学シフト差の濃度依存性

を与えるはずである。X_uの大きい所ではΔδが負になっているが、効果が最大となるべきX_uが小さい領域でΔδが正に転じているのは不自然である。D₂Oで飽和したCDCl₃中で観測すると、N-Hプロトンの信号は約13分の半減期で小さく落ちていくこと、中心周波数60MHzと90MHzのNMR装置を用いて得られるδ_{obs}に差がないこと等からも、水との交換による影響は本研究においては無視できるものと考えられる。

アシル尿素と溶媒CDCl₃との水素結合や双分子-双分子相互作用等による会合体は無視できるものとする、溶液内では次の三種の化学平衡を考慮することができる。



2 dimer ⇌ tetramer という平衡の上述べた酸化反応の過程を解析するためには重要であるが、ここではIの平衡に含まれると考えることができる。

分子間水素結合に関与するN-Hプロトンの化学シフトを、二量体の場合をδ_D、単量体ではδ_M、水と会合している場合をδ_{M·H₂O}、δ_{D·H₂O}とし、それらの大きさをδ_D > δ_{D·H₂O} ~ δ_{M·H₂O} > δ_M と考えると、上記の結果を定性的にではあるが説明できる。アシル尿素の濃度が十分高い所では平衡Iが支配的であり、希釈によつて単量体が増加する分だけ高磁場シフトする。また、三成分系ではIIIの平衡が奇号している分だけ高磁場側に寄り、更には、希釈によつて単量体の奇号が相対的に大きくなると、三成分系において平衡IIのM·H₂Oの奇号が無視できなくなる。δ_{M·H₂O} > δ_Mであれば、M·H₂Oの奇号分だけ三成分系のδ_{obs}は二成分系より低磁場側に寄ることになり、この結果δ_{obs}対濃度のカーブはX_u ~ 0.005の近傍で二成分系と三成分系が交叉することになる。温度の高い所での測定では、交叉がやや高濃度側で起きているが、平衡Iが温度の上がることにより右側に寄ることから説明できる。

分子内水素結合に関与しているN-Hプロトンの動きは小さいながらも濃度、温度依存性を示す。これは、単量体、二量体、又は水との会合体中での各々の分子内水素結合の化学シフトの値が多少づつ異なることを反映していると考えられる。

結論

水分子はアシル尿素の濃度が高い場合にはδ_{NH}を高磁場シフトさせ、低濃度では低磁場シフトさせた。水分子の共存は必ずしも観測を妨げる方向で作用するものとは限らず、相互作用の差を増中する方向の効果も期待できる。

INTRAMOLECULAR EFFECTS ON NUCLEAR MAGNETIC SHIELDING

by W.T. Raynes

(Department of Chemistry, The University, Sheffield, S3 7HF, U.K.)

The effects of isotopic substitution on nuclear shielding and of temperature on the chemical shifts of low density gases have been known for many years. However, a full quantitative explanation of these phenomena has not been made for any polyatomic molecule.

An ab initio calculation of the way in which the nuclear shielding of the water molecule is affected by molecular geometry has enabled the construction of " ^1H and ^{17}O nuclear shielding surfaces" from which it has been possible to calculate the effects of molecular rotation and vibration on these properties. This has led to the prediction of isotope shifts and the prediction of the temperature dependence of the nuclear resonances for this molecule.

The results of experimental work being carried out to test this theoretical work will be presented.

東工大

山並 健・桜井 実・安藤 勲
中條 利一郎

1 はじめに

共役系化合物は π 電子が非局在化により移動しやすいため 周囲 (例えば溶媒) からの擾動にその電子構造が大きく影響を受けることはよく知られている。電子構造を強く反映している ^{13}C -NMR化学シフトはそれにより影響される。したがって ^{13}C -NMR化学シフトを通して電子構造の変化を推測することが可能である。

本研究では この問題を探究するのに適切な化合物として 末端に分極の大きいカルボニル基を持った直鎖の共役系化合物の ^{13}C -NMR化学シフトと電子構造の関連性 及び この関連性が溶媒との相互作用によりどのように変化するかを取り扱う。また これらの関連性の起因についても取り扱う。ここではより大きな生体分子 (例えばレチナール) に適用することを考慮し, INDO法により計算を行った。

2. Solvaton モデルによる ^{13}C -NMR化学シフトの評価

2.1 Solvaton モデル

溶媒の誘電率が ^{13}C -NMR化学シフトに及ぼす効果 (以下, 溶媒効果という) の評価を考慮する際 Klopman¹⁾ が提案した Solvaton モデルを 半経験的分子軌道法である INDO法²⁾ に組み込んだ。Solvaton モデルでは 溶質分子内のそれぞれの原子によって誘起される溶媒中の仮想電荷 Solvaton が 溶質分子のそれぞれの原子と静電相互作用を行う。その際 相互作用の大きさは 誘電率 ϵ に依存する。

この Solvaton モデルをハミルトニアンに導入して 溶媒効果を波動関数の係数に反映させた。ハミルトニアンは 溶媒によらば 11 項 \mathcal{H}_{inh} と 溶媒効果による項 \mathcal{H}_{solv} よりなる。

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_{inh} + \mathcal{H}_{solv} \quad (1)$$

$$\mathcal{H}_{inh} = \sum_i^N \left(-\frac{1}{2} \nabla_i^2 \right) - \sum_{n=1}^N \frac{Z_n}{r_{in}} + \frac{1}{2} \sum_{i,j}^N \frac{1}{r_{ij}} + \frac{1}{2} \sum_{i,j}^N \frac{Z_i Z_j}{r_{ij}} \quad (2)$$

$$\mathcal{H}_{solv} = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon} \left[\sum_i^N \frac{Q_i}{r_{si}} - \sum_{i,j}^N \frac{Q_i Z_j}{r_{sj}} \right] \quad (3)$$

Q_i : Solvaton の電荷, r_{si} : Solvaton と電荷 i の距離

r_{sj} : Solvaton と核 j との距離

r_{si} としては Solvaton と電子が同じ原子中心にある場合は van der Waals 半径が用いられている。しかし ここでは実験結果を再現できるように parameterization して van der Waals 半径の 1.6 倍を用いた。INDO法でのパラメータも

^{13}C NMR Chemical Shift and Electronic Structure in Linear Conjugated Compounds.

T. Yamanobe, M. Sakurai, I. Ando, and R. Chûjô (Department of Polymer Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo)

実測値が再現できるように parameterization した。

2.2 ^{13}C -NMR化学シフトの評価

一般に NMR化学シフトは (4)式のように表わすことができる²⁾。

$$\sigma = \sigma^d + \sigma^p + \sigma' \quad (4)$$

ここで σ^d は反磁性項, σ^p は常磁性項, σ' は他の原子からの寄与である。 ^{13}C 核では σ' は小さいので無視する。常磁性項, 反磁性項の評価には Finite Perturbation法 (FPT法)⁵⁾⁶⁾を用いた。FPT法では常磁性項は bond orderの磁場欠配として評価され, 反磁性項及び常磁性項はそれぞれ次式のように表わされる。

$$\sigma_{\mu\nu}^d(A) = \frac{e^2}{2mc} \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu}(0) \langle X_{\mu} | \frac{\sigma_{\mu\nu}^d(A) - \sigma_{\mu\nu}^d(A)}{(r_A)^3} | X_{\nu} \rangle \quad (5)$$

$$\sigma_{\mu\nu}^p(A) = -\frac{e^2}{mc} \sum_{\mu} \sum_{\nu} \left(\frac{\partial P_{\mu\nu}(H_A)}{\partial H_A} \right)_{H_A=0} \langle X_{\mu} | \frac{r_{\mu\nu}}{(r_A)^3} | X_{\nu} \rangle \quad (6)$$

これらの計算は以下 東工大総合情報処理センターの HITAC M180, M200及び分子科学研究所 HITAC M200 を用いて行った。

3. ^{13}C -NMR化学シフト測定

本研究で取り扱う化合物は クロトニアルデヒド, アクロレイン, アセトアルデヒド, 及びアセトンである。 ^{13}C -NMR化学シフトの測定は 誘電率の広い範囲をカバーする溶媒系として 誘電率が大きい DMSO-d₆ と 誘電率が小さい CCl₄ 又は n-ヘキサンの混合系を用いた。混合溶媒の誘電率は Abrahamらによる式を用いて評価した。

$$\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2} = \frac{\epsilon_1-1}{\epsilon_1+2} V_1 + \frac{\epsilon_2-1}{\epsilon_2+2} V_2 \quad (7)$$

ここで ϵ_i は溶媒 i の誘電率, V_i は溶媒 i の体積分率である。

^{13}C -NMRスペクトルは PFT/100パルスプログラマーを備えた JEOL JNM PS-100型 スペクトロメーターにより得た。測定周波数は 25.15 MHz でプロトンデカップルして 3H でロックをした。外部基準として テトラメチルシランを用い体積分率の補正を行った。帰属は ゲート付デカップル法により行った。

4. 結果と考察

図1に 各化合物のカルボニル炭素の ^{13}C -NMR化学シフトの実測値(点)と計算値(点+線)を $\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2}$ の関数としてプロットした。縦軸は実測の場合 $\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2} = 0.457$, 計算の場合 $\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2} = 0.494$ の ^{13}C -NMR化学シフトの値からの差を示したものである。 $\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2} < 0.276$ の範囲は n-ヘキサン + CCl₄系でカバーし, また $\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2} > 0.276$ の範囲は CCl₄ + DMSO-d₆系でカバーした。実測及び計算ともに カルボニル基の二重結合のみを持つ化合物(アセトン)とカルボニル基の二重結合と共役する二重結合を持つ化合物との差による大きな変化は現われていない。即ち カルボニル炭素に共通な変化のみが現われている。実測

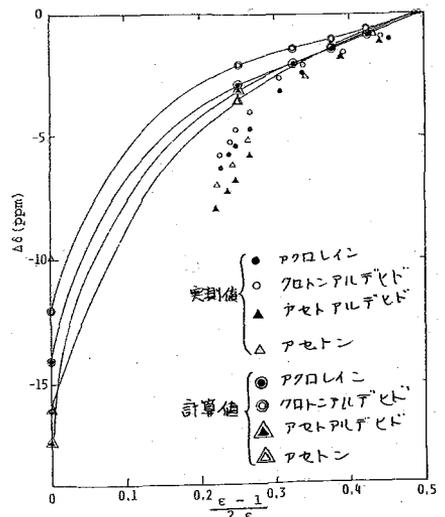


図1 カルボニル炭素の ^{13}C -NMR化学シフトの $\frac{\epsilon-1}{\epsilon+2}$ 依存性。

の結果において特徴的はことは極性基を持つ溶媒中と、持たない溶媒中での変化に違いが出ていることである。このことは、それぞれ及び van der Waals 力に起因するものと考えられる。即ち誘電率の大きい $Cl_4 + DMSO$ 系では静電相互作用が支配的で、 n -ヘキサン + Cl_4 系では van der Waals 力の影響が大きいであろう。Solomon モデルでの相互作用として静電相互作用を考えているので、本実験 $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon}$ の全範囲をこのモデルでカバーできるかどうかは検討を要する。そこで、実験値と計算値の比較を試みる。計算値は実験値の範囲内でほぼ直線的に変化して、実験値の変化を定性的に説明しているが、 $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon} < 0.3$ では実験値とのずれが大きくなる。したがって $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon} < 0.3$ の範囲では静電相互作用だけでなく van der Waals 力の効果も入ってきているものと思われる。

次に計算結果について考えてみる。図1から $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon} < 0.2$ で計算値の $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon}$ 依存性が大きいことがわかる。図1の縦軸上の△印はアセトンの気相での誘電率が真空中と同じ $\epsilon=1$ と仮定したときの値である⁹⁾。これによると誘電率の小さいところでの大きな変化は計算により定量的に説明されている。そこでこの誘電率の小さい範囲の大きな変化は何によるのかをもう少し詳しく調べてみる。図2にクロトニアルデヒドのカルボニル炭素の電子密度とカルボニル炭素と酸素間の結合次数を $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon}$ の関数としてプロットした。これによると電子密度は $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon}$ に対して直線的に変化しているのに対して結合次数は直線的に変化してはいない。したがって電子密度の変化よりも結合次数の変化が ^{13}C -NMR 化学シフトに大きく反映されているのであろう。このことを詳しく調べてみよう。カルボニル炭素の遮蔽定数を ρ の μ, ν の属する原子により分割してみる。次のようになる。

$$\sigma_{\mu\nu}^p(A) = \sigma_{\mu\nu}^p(A, AA) + \sum_{B(AA)} \sigma_{\mu\nu}^p(A, BB) + \sum_{B(AB)} \sigma_{\mu\nu}^p(A, AB) \quad (5)$$

$\sigma_{\mu\nu}^p(A, AA)$, $\sum_{B(AA)} \sigma_{\mu\nu}^p(A, BB)$, $\sum_{B(AB)} \sigma_{\mu\nu}^p(A, AB)$ を $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon}$ に対してプロットすると図3になる。

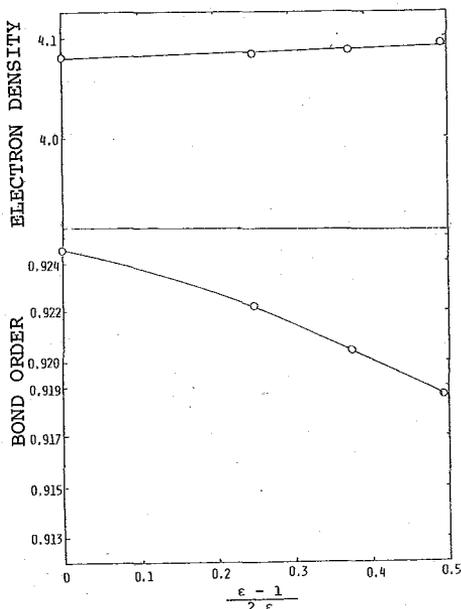


図2. カルボニル炭素の電子密度と $(\epsilon=1)$ での結合次数

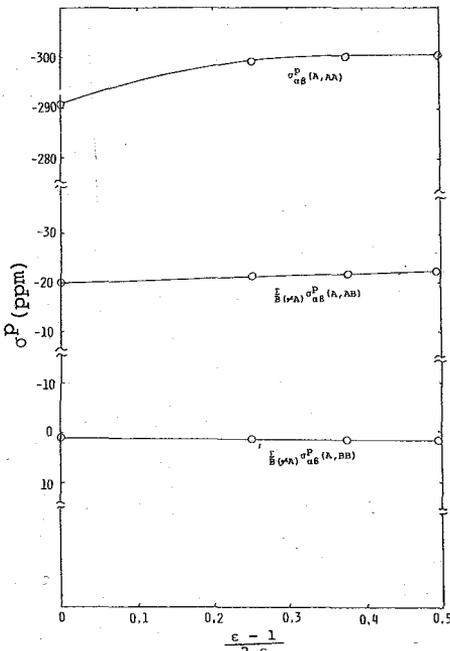


図3. カルボニル炭素の遮蔽定数の原子別寄与

る。これから $\sigma_{\mu\nu}^p(A, AA)$ 即ち monoatomic 寄与と誘電率の小さいところでの大きな変化に寄与していて隣接炭素からの変化への寄与は無視できることがわかった。さらに $\sigma_{\mu\nu}^p(A, AA)$

のテニソル成分 $\sigma_{xx}^p, \sigma_{yy}^p, \sigma_{zz}^p$ の値を $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon}$ に対してプロットすると図4を得る。それによると σ_{xx}^p 成分が $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon}$ の値によって一番大きく変化している。Ditchfield

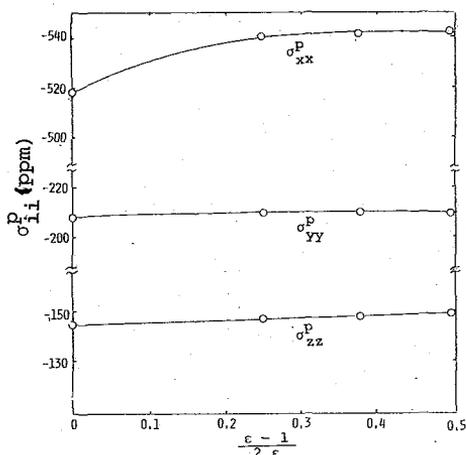


図4. カルボニル炭素の σ^p のテニソル成分.

図式によると結合次数の変化がこの効果を通して現われてくることをわかる。従ってカルボニル炭素の異常な変化は結合次数の変化によるものであり、溶媒はカルボニル炭素の關係する結合の multiple-bond-effect を大きく受ける。

5. 結論

以上のことをまとめると次のようになる。

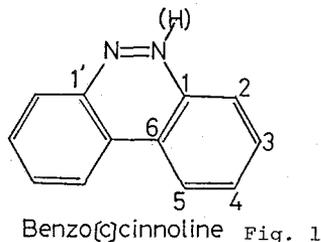
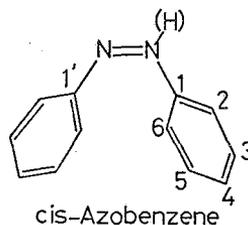
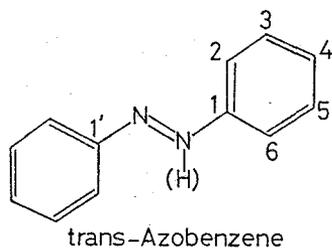
1. 溶媒の誘電率が大きくなるとカルボニル炭素の $^{13}\text{C-NMR}$ ピークは低磁場側へシフトする。
2. カルボニル炭素の $^{13}\text{C-NMR}$ 化学シフトの挙動は極性溶媒中と非極性溶媒中で異なっている。極性溶媒中での挙動は静電相互作用に起因し、非極性溶媒中では静電相互作用以外(van der Waals力)も支配的になっている。
3. 上記の実験事実は Solvation モデル + INDO + FPT 法による化学シフトの計算によりおおむね説明できる。
4. 計算結果では誘電率の小さい範囲でカルボニル炭素の $^{13}\text{C-NMR}$ 化学シフトの $\frac{\epsilon-1}{2\epsilon}$ 依存性が大きい。これは誘電率の変化が結合次数を通じての multiple-bond-effect によるものである。

$$(Q_{NB})_{\text{an}} = -\frac{2}{3} [P_{zNzB}^{(0)\sigma} (P_{xNxB}^{(10)\pi} + P_{yNyB}^{(10)\pi}) + P_{xNxB}^{(0)\pi} \cdot P_{yNyB}^{(0)\pi}] \quad (9)$$

References, 1) G.Klopman, Chem. Phys. Lett., 1, 200 (1967). 2) J.A.Pople, et al, J. Chem Phys., 47, 2026 (1967). 3) J.A.Pople, J. Chem. Phys., 37, 53, 60 (1962). 4) A.Saika, C.P. Slichter, J. Chem. Phys., 22, 26 (1954). 5) M.Kondo, et al, J. Mag. Res., 24, 315 (1976). 6) 福井 洋え, 分析機器, 12, 754 (1975). 7) R.J.Abraham, et al, Mol. Phys., 11, 471 (1966). 8) 額田 健吉, 核磁気共鳴法, オーム社 (1969). 9) J.A.Pople, Mol. Phys., 7, 301 (1964). 10) R.Ditchfield: Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy, Vol.1, John Wiley & Sons, Inc. (1974). 11) B.Tiffon, D.Cans, J. Mag. Res., 27, 147 (1977).

アゾベンゼンおよびベンゾ[C]シニリンの ^{13}C - ^{15}N スピン結合定数の相対符号の決定とINDO-MO計算
(京大薬, 京都薬大*) ○黒田義弘, 藤原靖弘*

1. ^{13}C - ^{15}N スピン結合定数, ${}^nJ(\text{C-N})$, はその大きさはおよび符号が ^{15}N 核の混成状態および lone-pair の配向に大きく依存することが知られており興味深い。¹⁾ 先に我々は4-アミノアゾベンゼンへのプロトン付加の位置に関する研究において ${}^nJ(\text{C-N})$ をINDO-MO計算の結果と比較して報告したが,²⁾ 実験値の符号が未定であったため, 計算値との一致に関して深く論ずることが出来なかった。 ${}^nJ(\text{C-N})$ の符号を定める一般的な方法としては off-resonance あるいは selective プロトンデカップリングにより ${}^nJ(\text{C-N})$ と ${}^{n+1}J(\text{N-H})$ との相対符号を決める Jakobsen 等の方法が見られる。³⁾ 今回4-アミノアゾベンゼンよりもさらに単純なアゾベンゼン(AB, Fig. 1) について検討した結果その磁的対称性が高いために ^{15}N 化合物の ^{13}C スペクトルは ^{15}N 核とのいわゆる second order カップリングパターンを示し, その ^{13}C スペクトルの解析により, ${}^nJ(\text{C-N})$ の相対符号に関する知見を得ることが出来たので これらの結果について報告する。具体的な方法としてまず AB- ^{15}N のスピンス系については $A \times X^r$ (A: natural abundance ^{13}C , X^r : ^{15}N enrich したアゾ窒素) 系と見なされ, A部分すなわち ^{13}C スペクトルは triplet として観測され, その分裂は $\frac{1}{2}({}^nJ(\text{C-N}) + {}^{n+1}J(\text{C-N}))$ である。すなわち2種のスピンス結合定数 nJ 及び ${}^{n+1}J$ の和の $\frac{1}{2}$ である。一方, AB- ^{15}N の ^{13}C スペクトルは単なる $A \times X$ 型のスピンス系と見なされ, この系では2種の doublet の重なり ($A \times X$ 及び $A^r \times X$) として観測されると考えられ, nJ 及び ${}^{n+1}J$ それぞれの絶対値が得られるので両者の結果を合わせることにより ${}^nJ(\text{C-N})$ とそれに対応した ${}^{n+1}J(\text{C-N})$ との相対符号を決めることが出来る。なお本研究においてはさらに ${}^nJ(\text{C-N})$ と lone-pair の配向との関連についての知見をも得るために cis アゾベンゼン及びベンゾ[C]シニリン(BC) に関して同様の方法で相対符号を定めた。

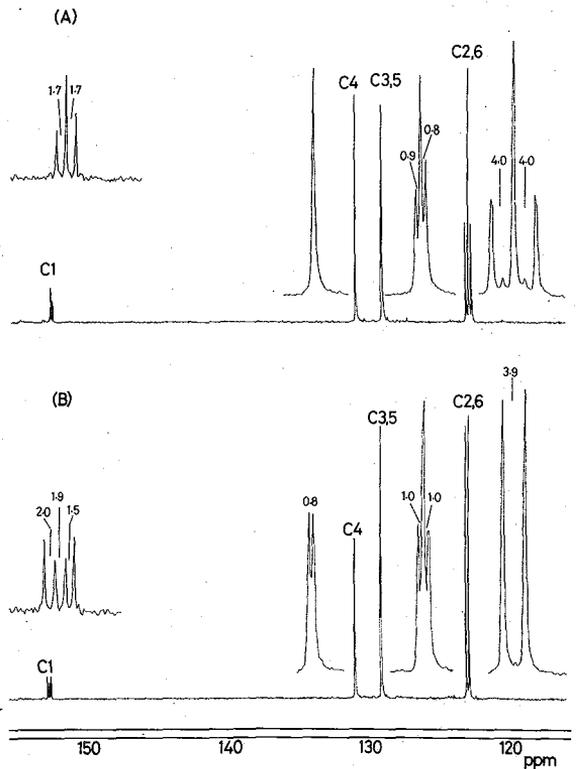


2. AB- ^{15}N (trans形は市販品(95%enrich)を精製して使った。AB- ^{15}N はアニリン- ^{15}N (95%enrich)とニトロソベンゼンより合成した。アゾベンゼンの cis 形は trans 形よ

Determination of Relative Signs and INDO-MO Calculations of ^{13}C - ^{15}N Spin-spin Coupling Constants of Azobenzene and Benzo[c]cinnoline
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University and Kyoto College of Pharmacy*)

○Y. Kuroda and Y. Fujiwara*

り光異性化した後精製して得た。BC- $^{15}N_2$ 、BC- $^{15}N_1$ はそれぞれAB- $^{15}N_2$ 、AB- $^{15}N_1$ より合成した。 ^{13}C NMR スペクトルは1.4~0.7 mol·dm $^{-3}$ の溶液(中性: CDCl $_3$, 酸性: 22N D $_2$ SO $_4$ -EtOH(7:1, v/v))として Varian CFT-20 (20 MHz)により測定した。



3. Fig. 2 に *trans*形の AB- $^{15}N_2$ (Fig. 2A) および AB- $^{15}N_1$ (Fig. 2B) の ^{13}C NMR スペクトルを示す。期待どおり、 $^{15}N_2$ 体では分裂が観測されたシグナルは全て *triplet* である。一方 $^{15}N_1$ 体では *quartet* (C1) 以外に *triplet* (C3,5) および *doublet* (C2,6, C4) と見かけ上いろいろな分裂パターンを示す。 $^{15}N_1$ 体では一般的には2種類(2 $^+$ J, ^{2+}J による)の *doublet* の重畳合わせとして *quartet* になるはずであるから *triplet* の C3,5 は 2J または 3J のどちらかの絶対値が小さくて分裂していないと、また *doublet* は例えば C2,6 では 2J と 3J の絶対値がほぼ等しいためと考えられる。C1 の ^{13}C シグナルにおいて *quartet* としての分裂幅が等しくないのは2つのデニゼン環の化学シフトが ^{15}N 同位体効果のために等しくないためであり、このことは *cis*-AB- $^{15}N_1$ や BC- $^{15}N_1$ においても観測された。

Figure 2. ^{13}C NMR spectra of (A) *trans* azobenzene- $^{15}N_2$ and (B) *trans* azobenzene- $^{15}N_1$ in CDCl $_3$.

Table I に *trans* および *cis* AB, BC の CDCl $_3$ 中で観測されたシグナルの分裂の大きさ(単なる隣り合わせのピーク間 *interval*)とそれらから導かれた J の値を示す。例えば *trans* AB の $^1J(C1-N)$ と $^2J(C1-N)$ の絶対値は $^{15}N_1$ 体の分裂の大きさから 1.9 と 5.4 Hz であり、 $^{15}N_2$ 体の分裂幅は 1.7 Hz であるから 1J と 2J は異符号であることがわかる。この $^{15}N_1$ 体の C1 の *quartet* のシグナルからスピン結合をした *doublet* の pair を選ぶ時には任意性はないが他の場合には任意性があるので(例えば4本の peak の1本おきに *doublet* として選ぶ) 25 または 50 MHz ^{13}C NMR スペクトルも随時測定して *pairing* の確認をした。また 1J と 2J の帰属(すなわち 1.9 と 5.4 Hz のどちらが 1J または 2J に相当するか) は先の α -アミノアゾデニゼンの 1J , 2J の大きさ及び 1J について *one-bond lone-pair* 効果⁴⁾ を考慮して決めた。その他の場合にはさらに *lone-pair* の配向を考慮にいれて ^{n+}J と ^{n+}J の帰属を行なった。またすでに絶対符号の定まっている化合物 (E) and (Z)-acetophenone oxime, Pyridine 等)との比較によって絶対符号の推定が可能なものについてはそれを示した。

Table II に Blizzard と Santny の方法 (IND の近似)⁵⁾ によって計算された計算値と実測値の一部との対比を示す。この表から明らかのように計算値は必ずしも J の

符号を正しく再現していない。特に σ に対しては \oplus で大きすぎ σ に対しては \ominus の方向に大きすぎる傾向が見られる。INDO-MO計算におけるこの前者の傾向はキノリ σ の場合にもWasylishenによって同様のことが指摘されている。⁶⁾しかしながら σ の符号は常に正しく再現されている。 σ に関して、一般に lone-pair は cis の関係にある ^{13}C とのスピン結合定数について \ominus の寄与を

Table I: Observed ^{13}C - ^{15}N Splittings and ^{13}C Chemical Shifts of trans-Azobenzene, cis-Azobenzene, and Benzo[c]cinnoline in CDCl_3

Carbons	Chemical shifts ^a	Signal splittings ^b		$n_{\text{J(C-N)}}^{\text{b}}$
		$^{15}\text{N}_2$	$^{15}\text{N}_1$	
trans-Azobenzene				
1	152.8	1.7, 1.7	2.0, 1.9, 1.5	$^1\text{J}=+1.9$, $^2\text{J}=-5.4$
2,6	122.9	4.0, 4.0	3.9	$^2\text{J}=-3.9$, $^3\text{J}=-3.9$
3,5	129.1	0.9, 0.8	1.0, 1.0	$^3\text{J}=\pm 2.0$, $^4\text{J}=\mp 0.3^{\text{d}}$
4	130.9	(0.4) ^c	0.8	$^4\text{J}=\pm 0.8$, $^5\text{J}=\mp 0.8^{\text{d}}$
cis-Azobenzene				
1	153.6	6.9, 6.9	2.8, 3.9, 3.3	$^1\text{J}=+3.9$, $^2\text{J}=+10.0$
2,6	120.5	2.5, 2.5	2.5	$^2\text{J}=-2.5$, $^3\text{J}=-2.5$
3,5	128.7	(0.8) ^c	(1.1) ^c	
4	127.3	(0.6) ^c	(0.8) ^c	
Benzo[c]cinnoline				
1	145.2	5.5, 5.4	1.6, 3.4, 2.3	$^1\text{J}=+3.4$, $^2\text{J}=+7.3$
2	131.2	6.3, 6.4	3.4, 3.1, 3.2	$^2\text{J}=-9.7$, $^3\text{J}=-3.1$
3	129.2	1.6, 1.5	1.7, 1.8	$^3\text{J}=\mp 3.5$, $^4\text{J}=\pm 0.4$
4	131.4	(0.6) ^c	0.8	$^4\text{J}=\pm 0.8$, $^5\text{J}=\mp 0.8^{\text{d}}$
5	121.3	(0.8) ^c	(0.4) ^c	
6	120.8	1.9, 1.8	2.0, 0.8, 1.7	$^2\text{J}=+4.5$, $^3\text{J}=-0.8$

^aIn ppm from Me_4Si , ± 0.1 ppm.

^bIn Hz (at 20.0 MHz), ± 0.2 Hz.

^cUnresolved. Half-height line-width is shown here.

^dUnreliable.

することが知られており、このことは BC の $^2\text{J}(\text{C}2-\text{N})$ と $^2\text{J}(\text{C}6-\text{N})$ の計算値において正しく再現されている。また、lone-pair の s 軌道性は σ のフェルミ項に対して \oplus の寄与をすることが知られており cis AB 及び trans BC は trans AB に比べて lone-pair の s 軌道性が大きい (C2,6 位 水素との反発相互作用が弱い) ために \oplus の方向により大きな値となることが予想され、事実実験値もそうになっているが、この傾向も計算値は良く再現している。つまり INDO 近似の計算値は σ については符号は正しくまた絶対値についてもほぼ満足すべき値を、 ^2J , ^3J については例えば lone-pair の配向のちがひといった大まかな傾向は正しく再現するといえよう。本研究においてはさらに酸性溶液中での測定および INDO-MO 計算を行なった。これらの結果についても報告する予定である。なお本研究の一部は J. Phys. Chem. 85 巻 (1981)

に掲載予定
である。

Table II: Calculated and Experimental Coupling Constants (in Hz)

ⁿ J(C-N)	J(exptl)	FC	OB	SD	J(total)
trans-Azobenzene					
¹ J(C1-N)	+1.9	1.1	0.6	-1.5	0.2
² J(C1-N)	-5.4	3.0	-0.4	1.0	3.6
² J(C2,6-N) ^b	-3.9	5.3	-0.5	0.7	5.5
³ J(C2,6-N) ^b	-3.9	-7.2	-0.5	-0.6	-8.3
cis-Azobenzene					
¹ J(C1-N)	+3.9	4.4	0.8	-0.5	4.7
² J(C1-N)	+10.0	6.9	0.1	0.1	7.1
² J(C2,6-N) ^b	-2.5	5.2	-0.2	-0.2	4.8
³ J(C2,6-N) ^b	-2.5	-7.3	-0.2	0.4	-7.1
Benzo[c]cinnoline					
¹ J(C1-N)	+3.4	4.0	1.8	-1.0	4.8
² J(C1-N)	+7.3	5.1	-0.1	0.9	5.9
² J(C2-N)	-9.7	-0.1	-0.4	0.8	0.3
³ J(C2-N)	-3.1	-3.5	-0.5	-1.0	-5.0
² J(C6-N)	+4.5	4.4	-0.6	0.8	4.6
³ J(C6-N)	-0.8	-6.3	-0.5	-1.2	-8.0

謝辞
50 MHz,
25 MHz ¹³C
スワクトル
を測定して
いただいた
神戸女子薬
大の杉浦真
喜子氏並
心に京大化
研の木下恭
子氏に感謝
致します。

^aFC: Fermi contact term, OB: orbital-dipole term, SD: spin-dipole term. The parameters employed were $S_N^2(0)=5.246$, $S_C^2(0)=3.012$, $\langle r^{-3} \rangle_N=2.472$, and $\langle r^{-3} \rangle_C=1.430$.

^bCalculated values are averages of those of C2 and C6. For example, each value of C2 and C6 for ²J(C2,6-N) of trans-azobenzene is as follows. C2:(FC,OB,SD)=(3.7,-0.3,0.8), C6:(FC,OB,SD)=(6.9,-0.7,0.7).

[文献]

1) たとえば Levy, G.C.; Lichter, R.L. "Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy" Wiley-Interscience: New York, 1979, Chapter 4 参照 2) 黒田, 桑江 第18回 NMR 討論会(1979) 要旨集 P.97 ; J. Phys. Chem. 1980, 84, 3417-23. 3) Jakobsen et al. Mol. Phys. 1972, 23, 197-201; J. Am. Chem. Soc. 1973, 95, 5080-1. 4) Schulman, J.M.; Venanzi, T. J. Am. Chem. Soc. 1976, 98, 4701-5. 5) Blizzard, A.C.; Santry, D.P. J. Chem. Phys. 1971, 55, 950-63; 1973, 58, 4714. 6) Wasylishen, R.E. Annu. Rep. NMR Spectrosc. 1977, 7, 245-91.

(北見工大) O 福井洋え, 三浦宏一, 辻 壮夫

Abstract: The sum-over-states calculations of the nuclear spin-spin coupling constants by Nakatsuji's formula, including doubly excited configurations, have reproduced exact finite perturbation results. In addition, a new method of separation of the coupling constants into σ - and π -electron contributions has been proposed. It has been shown that π -electron coupling constants alternate in sign with the number of bonds while their magnitudes are approximately independent of the number of bonds.

Introduction

In papers 1¹ and 2² of this series, we showed that the finite perturbation (FP) method is superior to the sum-over-states (SOS) one in the calculation of the nuclear spin-spin coupling constants. This is because FP calculations show a clear convergence to experimental values as the size of the basis set is increased. On the other hand, the SOS calculations show divergence even if the singly excited triplet configuration interaction calculation (we denote as SOS1) is invoked.³ Ditchfield et al.⁴ studied the relation between the SOS and FP methods and pointed out that the FP theory corresponds to introducing doubly excited states in a restricted way (see the following section). We thus conjectured that the doubly excited states introduced into the FP calculation brought about the convergent trend. However, no proof of this could be presented directly in our previous papers. It would therefore seem important to confirm whether the SOS calculations with double excitations (we denote as SOS2) can reproduce the FP results, and this we do in this paper. Moreover, the SOS2 method makes it possible to estimate the π -contribution to the nuclear spin-spin coupling constant, which is quite difficult in the FP method. Thus we will show the separation of the nuclear spin-spin coupling constant into the sum of the σ - and π -contributions in planar molecules.

Method

Nakatsuji⁵ showed that eq 50 of his paper is the best expression of the second-order SOS perturbation energy based on the Hartree-Fock (HF) wave function. From this expression for the second-order perturbation energy, we can write the SOS2

σ - and π -Electron Contributions to Nuclear Spin-Spin Coupling Constants.

(Kitami Inst. Tech.) H. Fukui, K. Miura, T. Tsuji

formula for the nuclear spin-spin coupling constants, $J_{NN'}$ (in Hz), in the INDO level as follows (in SI units):

$$J_{NN'} = -\frac{64}{9}\mu_B^2\hbar\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2\gamma_N\gamma_{N'}S_N(0)^2S_{N'}(0)^2 \times \sum_i \sum_j \frac{\sigma_{ij}^{oc}}{\hbar} \frac{\sigma_{ab}^{unc}}{\hbar} T_n^{-1} V_{i \rightarrow a, n} V_{j \rightarrow b, n} C_{Ni} C_{Na} C_{Nb} C_{N'j} \quad (1)$$

where T_n is the n th eigenvalue of the H matrix defined below. $V_{i \rightarrow a, n}$ is the coefficient of the triplet excitation $i \rightarrow a$ in the n th eigenvector of H. μ_0 is the magnetic permeability in vacuo. The other notations are the same as in eq 3.2 in the review by Kowalewski.⁶ The matrix H is defined as follows:

$$H_{i \rightarrow a, j \rightarrow b} = \langle {}^3\Psi_{i \rightarrow a} | H_0 | {}^3\Psi_{j \rightarrow b} \rangle + \langle {}^1\Psi_0 | H_0 | \Psi_{i \rightarrow a, j \rightarrow b} \rangle - \delta_{ij} \delta_{ab} \langle {}^1\Psi_0 | H_0 | {}^1\Psi_0 \rangle \quad (2)$$

where H_0 is the unperturbed Hamiltonian and ${}^1\Psi_0$ is the ground-state wave function approximated by the single determinant composed of doubly occupied SCF MO's. The triplet states ${}^3\Psi_{i \rightarrow a}$ are formed by promoting one electron from an occupied MO, ψ_i , to an unoccupied one, ψ_a . $\Psi_{i \rightarrow a, j \rightarrow b}$ are the doubly excited wave functions which are not the eigenfunctions of the total electronic spin operator \hat{S}^2 . They are written explicitly as $\Psi_{i \rightarrow a, j \rightarrow b} = || \dots i a j b (\alpha\beta\alpha\beta + \alpha\beta\beta\alpha + \beta\alpha\alpha\beta + \beta\alpha\beta\alpha) / 2 \dots ||$ in standard notation.

Using the SCF MO energies ϵ_i associated with ψ_i and the molecular integrals of electron repulsion, we can rewrite the matrix elements of H as

$$H_{i \rightarrow a, j \rightarrow b} = \delta_{ij} \delta_{ab} (\epsilon_a - \epsilon_i) - [ij|ab] - [ib|ja] \quad (3)$$

where $[ij|ab] = \int \psi_i(1)\psi_j(1)r_{12}^{-1}\psi_a(2)\psi_b(2) d\tau_1 d\tau_2$. The real symmetric matrix H is diagonalized to give the diagonal matrix T by the orthogonal matrix V whose n th column vector gives the coefficients $V_{i \rightarrow a, n}$ in eq 1. Thus $HV=VT$. (4)

We have to turn our attention to the fact that the form of the doubly excited terms of the second-order wave function $\Psi_{(2)}$ in the Nakatsuji's perturbation theory (on which our SOS2 formula is based) is restricted. This restriction is the same as that on the doubly excited states included in the FP theory, which Ditchfield et al.⁴ have already discussed in comparison with SOS and FP theories.⁷ The terms included in $\Psi_{(2)}$ are not free from the singly excited terms of the first-order wave function $\Psi_{(1)}$. Although there are the other doubly excited states not included in $\Psi_{(2)}$, they do not contribute to the second-order energy $E_{(2)}$ as shown in Appendix B of Nakatsuji's paper. This fact is very fortunate for our SOS2 calculation.

We can divide the possible promotions of an electron, $i \rightarrow a$, into three classes. Namely, the first category includes $\sigma \rightarrow \sigma^*$ excitations only, if we denote unoccupied MO's by *. The second one is for $\pi \rightarrow \pi^*$ excitations, and the third is for $\sigma \rightarrow \pi^*$ and $\pi \rightarrow \sigma^*$ ones. It is clearly seen in eq 3 that the promotions belonging to the third

category do not mix with the first- and second-type promotions. Therefore, we can neglect the third-type excitations in the calculation of nuclear spin-spin coupling constants because both i and a in promotions $i \rightarrow a$ have to be σ -type MO's to include valence s -type AO's in planar molecules.

It is obvious that the π -electron contribution $J_{NN'}^\pi$ to $J_{NN'}$ originates from the $H_{\sigma \rightarrow \sigma^*, \pi \rightarrow \pi^*}$ elements of H , which produce σ - π configuration interaction. So we can estimate the σ contribution $J_{NN'}^\sigma$, if we neglect the above elements, that is, configurational mixing between first- and second-type promotions. We define here $J_{NN'}^\pi$ as $J_{NN'}^\pi = J_{NN'} - J_{NN'}^\sigma$.

Results and Discussion

We calculated $J_{NN'}^\sigma$, $J_{NN'}^\pi$, and $J_{NN'}$ for the three planar unsaturated hydrocarbons, that is, ethylene, acetylene, and benzene molecules using the SOS2 formula in INDO level and compared them with the FP results of Pople et al.⁶ We used the same parameters as did Pople et al. in their FP calculations and standard molecular geometry. Our calculated results are presented and compared with Pople et al.'s FP values and experimental ones in Table I. The computational times of the two methods, SOS2 and FP ones, were not so different. For example, for C_2H_4 SOS2 took 7.2 s; FP, 8.7 s.

Table I shows that the SOS2 formula reproduces the FP values quite exactly. Therefore, now it has been proved that the convergent trend of J 's calculated by FP comes from inclusion of the double excitations. We have to include a contribution from the doubly excited configurations to get the correct excited states and energies.

The calculated π -electron coupling constants show clearly the alternation in sign with the number of intervening bonds. The odd numbers of bonds correspond to positive π couplings and the even numbers to negative ones. This result is the same as that concluded by Barfield⁹ about the J^π 's of octatetraene calculated by the SOS VB (valence-bond) method. From Table I it is concluded that J^σ is dominant in the directly bonded coupling constants, ${}^1J_{CC}$ and ${}^1J_{CH}$, and proton-proton coupling constants, J_{HH} . However, in ${}^2J_{CC}$ and ${}^2J_{CH}$ two parts equally contribute. The magnitude of J^π is approximately independent of the number of bonds while that of J^σ attenuates rapidly (as a function of the number of bonds). Therefore, in the long-range proton-proton couplings, J^π will be dominant.

Acknowledgment. The calculations were performed on a HITAC M-200H at the Hokkaido University Computing Center. It is a pleasure to express our appreciation to Dr. H. Nakatsuji for his helpful advice.

Table I. Calculated and Experimental Values of the Nuclear Spin-Spin Coupling Constants (Hz)

	J^σ (SOS2) ^a	J^π (SOS2) ^a	J (SOS2) ^a	J (FP) ^b	J (Exptl) ^b
Ethylene					
C-C	67.19	14.95	82.14	82.14	67.6
C-H	152.33	4.36	156.69	156.71	156.4
C-C-H	-7.22	-4.36	-11.58	-11.57	-2.4
H-C-H	4.51	-1.27	3.24	3.24	2.5
H-C-C-H (cis)	8.04	1.27	9.31	9.31	11.7
H-C-C-H (trans)	23.88	1.27	25.15	25.15	19.1
Acetylene					
C-C	143.66	20.07	163.73	163.75	171.5
C-H	226.91	5.71	232.62	232.65	248.7
C-C-H	8.24	-5.72	2.52	2.52	49.3
H-C-C-H	9.36	1.63	10.99	10.99	9.5
Benzene					
C-C	67.90	8.20	76.10		
C-C-C	-4.88	-6.05	-10.93		
C-C-C-C	5.48	6.19	11.67		
C-H	137.16	2.99	140.15	140.29	157.5
C-C-H	-2.70	-2.24	-4.94	-4.94	1.0
C-C-C-H	7.77	1.63	9.40	9.40	7.4
C-C-C-C-H	-0.49	-1.78	-2.27	-2.27	-1.1
H-C-C-H	7.54	0.60	8.14	8.15	7.54
H-C-C-C-H	2.56	-0.43	2.13	2.13	1.37
H-C-C-C-C-H	0.63	0.52	1.15	1.15	0.69

^a See Method. ^b Cited from ref 8.

References and Notes

- (1) Fukui, H.; Sanyoshi, A.; Miura, K. *J. Chem. Phys.* 1978, *69*, 943-944.
- (2) Fukui, H.; Miura, K.; Ishigami, N. *J. Chem. Phys.* 1979, *71*, 560-561.
- (3) Murrell, J. N.; Turpin, M. A.; Ditchfield, R. *Mol. Phys.* 1970, *18*, 271-274.
- (4) Ditchfield, R.; Ostlund, N. S.; Murrell, J. N.; Turpin, M. A. *Mol. Phys.* 1970, *18*, 433-440.
- (5) Nakatsuji, H. *J. Chem. Phys.* 1974, *61*, 3728-3736.
- (6) Kowalewski, J. *Prog. NMR Spectrosc.* 1977, *11*, 1-78.
- (7) The two restrictions stated by Nakatsuji⁵ and Ditchfield et al.,⁴ respectively, are equal ^{to} each other. This is because eq 38 of the Nakatsuji's paper is equivalent to eq 13 and 29 of the Ditchfield paper.
- (8) Pople, J. A.; Beveridge, D. L. "Approximate Molecular Orbital Theory"; McGraw-Hill: New York, 1970; pp 149-159.
- (9) Barfield, M. *J. Chem. Phys.* 1968, *49*, 2145-2153. Erratum: *Ibid.* 1969, *51*, 2291-2292.

(神戸女薬大) ○杉浦真香子 高尾極雄
(神戸大薬学) 上地真一

〈序〉

さきに我々は、アルカロイド等天然存在化合物の基本骨格の NMR 的研究の一環として、ピペリジン四級塩の ^1H 及び ^{13}C の T_1 (スピン-格子緩和時間) について検討を加え、① ^1H , ^{13}C 共との T_1 は、環の反転の有無, conformation などにはほとんど関係なく、主としてその分子量 (又は分子の大きさ) に依存していること、従ってむしろ分子全体の回転運動によって決まってくること¹⁾、又② CD_3OD 中では、アニオンの影響がほとんどないこと¹⁾、さらに③ CD_3OD 以外の溶媒中での測定から、溶媒の極性が四級塩の T_1 の値に影響を与えていること²⁾ などを明らかにした。今回は主として②、③の点をもう少し詳しく調べる目的で、いくつかの溶媒中での ^1H の T_1 を測定し、それらから得られる回転相関時間 τ_c や回転の活性化エネルギー E_a について検討を加えた。

〈実験〉

実験に用いたのは表 1 に示す 6 種のヨウ化 $N\text{-Me}$, $N\text{-Pr}$ キルピペリジン四級塩と 2 種の三級ピペリジン誘導体で、それぞれの合成については先に述べたとおりである。¹⁾ 試料はすべて 0.01 mole/l に調整し、5 mm サンプル管中、アルゴンガスを吹き込んで密封した。

T_1 の測定は Varian XL-200 (200.06 MHz) を用い、 180° - τ - 90° ノルス法により、 $N\text{-Me}$ 及び $n\text{-Bu}$ 基の Me シグナルについて行った。測定は 2 又は 3 回行い、その平均値をとった。

活性化エネルギーを求める実験では、 CD_3OD 中では $5 \sim 55^\circ \text{C}$ 間 10 点、 CD_2Cl_2 中では $5 \sim 35^\circ \text{C}$ 間 7 点の実験点を取り、温度の誤差は $\pm 0.3^\circ \text{C}$ 以内であった。

〈結果と考察〉

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{2} N \cdot \gamma^4 \cdot \hbar^2 \cdot \tau_c / r^6 \quad \dots (1)$$

$$\tau_c = \tau_0 \exp(E_a / RT) \quad \dots (2)$$

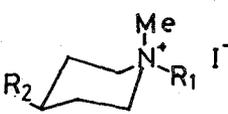
$$\tau_c = 4\pi \cdot \eta \cdot a^3 / 3kT \quad \dots (3)$$

測定して得られた T_1 の値と、(1) 式 ($N=2$, $r=1.78 \text{ \AA}$ とした) を用い、得られた T_1 から計算した τ_c の値を表 1 に、又 (2) 式によって得られた CD_3OD 中及び

¹⁾ ^1H Spin-Lattice Relaxation Time of Quarternary Salts of Piperidines

(Kobe Women's College of Pharm.) M. Sugiura, N. Takao (Kobe Univ.) S. Ueji

表1 種々の溶媒中での T_1 (sec.) 及び
 回転相関時間 (τ) 内, $\times 10^{-12}$, sec./rad.)

 R_1 R_2	D_2O	CD_3OD	$DMSO-d_6$	$(CD_3)_2C=O$	CD_2Cl_2	$CDCl_3$		
	I Me H	4.59 [4.05]	4.09 [4.55]	1.38 [13.49]	3.56 [5.22]	2.27 [8.19]	1.41 [13.19]	
II Et H	3.04 [6.12]	3.15 [5.90]	1.16 [16.03]	2.72 [6.84]	2.12 [8.77]	1.33 [13.98]		
III iso-Pro. H	2.98 [6.24]	2.98 [6.24]	1.24 [15.00]	2.86 [6.50]	2.26 [8.23]	1.56 [11.92]		
IV iso-Bu. H		2.00 [9.30]				0.85 [21.91]		
V n-Bu. H	1.46 [12.74]	1.88 [9.89]	0.63 [29.66]	1.99 [9.35]	1.31 [14.20]	0.78 [23.91]		
 R_1 R_2	VI Me t-Bu. (ax.)	1.74 [10.69]	1.99 [9.35]	0.85 [21.91]	2.08 [8.94]	1.36 [13.68]	0.90 [20.78]	
		(eq.)	1.52 [12.24]	1.90 [9.79]	0.63 [29.67]	2.04 [9.12]	1.29 [14.42]	0.71 [26.05]
		(t-Bu.)	1.27 [14.65]	1.95 [9.54]	0.80 [23.40]	2.19 [8.49]	1.41 [13.19]	1.07 [17.38]
VII Me H	2.43 [7.65]	4.59 [4.05]	3.94 [4.72]	11.43 [1.63]	6.19 [3.00]	4.28 [4.35]		
VIII Me t-Bu. (N-Me)	1.12 [16.61]	2.15 [8.65]	1.61 [11.55]	4.32 [4.31]	3.06 [6.08]	2.25 [8.27]		
		(t-Bu.)	1.02 [18.24]	2.08 [8.94]	1.50 [12.40]	3.90 [4.77]	2.83 [6.57]	2.16 [8.61]

CD₂Cl₂中の活性化エネルギー E_aを表2に示した。

回転相関時間 τ_c は普通(3)式に示すように、粘度 η と関連づけられるはずである。しかし、I~VIの四級塩基においては、まったく溶媒の粘度との関係は見られない。一方 VII, VIIIの三級塩基においては、図1に示すように DMSO中以外では τ_c は溶媒の粘度 η とほぼ直線関係を示し、(3)式が成り立つことを示している。

四級塩基において、η との相関が見られないのは、溶媒の極性が関係しているように思われる。なぜなら、粘度が比較的近い CD₃OD, CD₂Cl₂, CDCl₃ 中での T₁ を比較すると、CD₃OD 中に比べ溶媒の極性の小さい CD₂Cl₂, CDCl₃ 中での T₁ がどの化合物でも著しく小さくなっている。

表2. 活性化エネルギー E_a
(KJ/mol)

Compound	(in CD ₃ OD)	(in CD ₂ Cl ₂)
I	10.87	9.03
II	11.30	9.39
III	11.37	9.21
IV	11.71	
V	12.20	9.10
VI	11.00	10.64
VIII	9.34	11.52

これは溶媒の極性が小さくなると、アニオンカチオン部分(二重部分)に近づいてきて、その差で τ_c が大きくなり、T₁ が小さくなると考えられる。このことは図2に示すように τ_c/η と溶媒の極性をあらゆる経験的尺度 E_T³⁾ との間に、

DMSO以外の溶媒では、ある程度の相関が見られることから支持される。この場合、τ_c が大きくなる理由として、アニオンに近づいて来てカチオン部分の回転運動が阻害される為か、あるいは近づいたアニオンを伴った分子全体の運動として回転運動をするようになる為か、のいずれかが考えられるか、表2で E_a の値が CD₃OD 中より CD₂Cl₂ 中の方がむしろ小さめになっていることから、後者の方の可能性が大と考えられる。(もしただ運動が阻害されているだけなら、E_a は大きくなるはずである。)

すなわち、溶媒の極性が小さくなるにつれて、(3)式

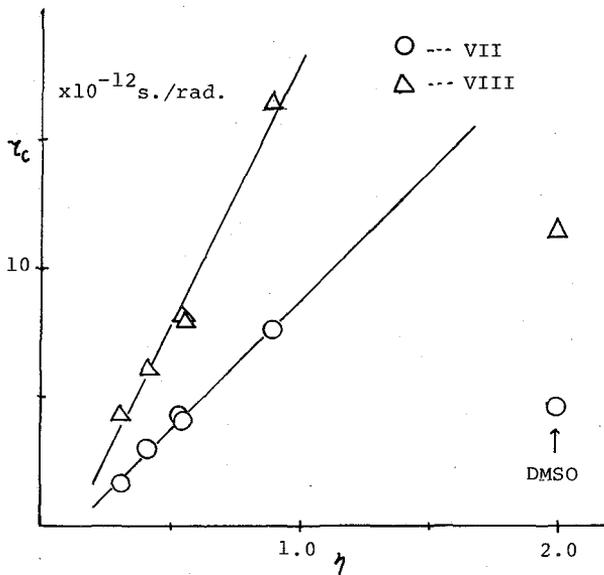


図1. 三級塩基における τ_c と粘度 η の関係

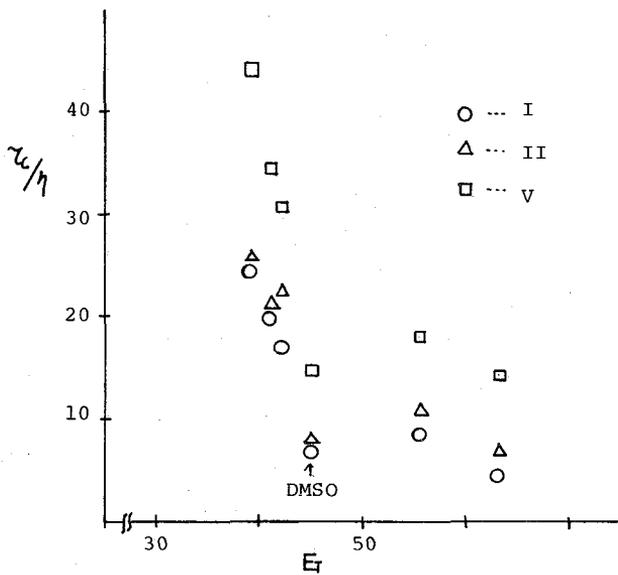


図2 ϵ_r/η と E_T の相関

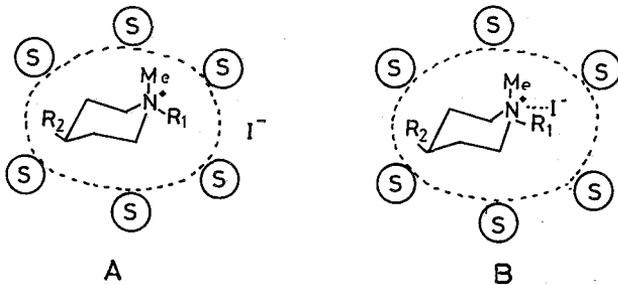


図3

つながら E_a が増大している。これは、カチオン部分の分子量又は分子の大きさも反映しているものと考えられる。一方 CD_2Cl_2 中においては、それ程の差が見られず、これは先に示したとおり、 CD_2Cl_2 中ではアニオンも伴ったイオン対として回転運動をしていることに由来していると考えられる。又 Cl^- が四級塩でありながら、他のものとは E_a の値に、 CD_3OD 、 CD_2Cl_2 中へ共違いの見られるのは、4位の *tert*-Bu 基の為に分子全体の型が I~V とは異り、従って回転運動の挙動も異っていることであろう。

(References)

- 1) 杉浦、高尾、上地 才19回NMR討論会講演要旨集 P195 (1980)
- 2) 杉浦、高尾、上地 日本薬学会才101年会講演要旨集 P199 (1981)
- 3) K. Dimroth et al. Ann. 661 1 (1963); 699 95 (1963)

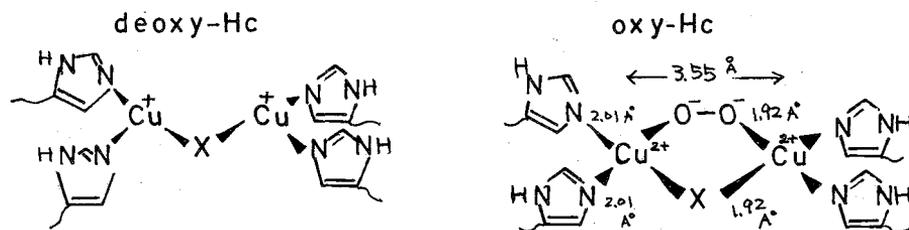
における α (溶質の分子半径) が見かけ上大きくなるとして説明出来る。以上のように、極性の大きな溶媒中では図3のAの型で、極性の小さな溶媒中ではBの型で分子運動していることを、 T_1 のデータから明らかにすることが出来る。

図1、図2共に、DM90が常に例外的な挙動を示しているが、これはDMSOが三級塩基、四級塩とも特別に強い(又は特殊な)溶媒和をする為であろうと考えられる。このことは、DMSO中ではその T_1 の値が濃度にほとんど依存しないことから示唆される。

表2の活性化エネルギー E_a は、全体にあまり大きな差が見られないが、いくらかの知見を与えてくれる。 CD_3OD 中では四級塩の I~V はおなじく

(近畿大理工)○北川 進 宗像 恵 米沢 正泰

1. Type III 銅蛋白質は生体中広く分布し、酸素の運搬、酸素を用いて基質の酸化、酸素添加等の重要な機能を有している。前者は、節足、軟体動物の血液中に存在する hemocyanin、後者の一例としては Tyrosinase (c1ccc(O)cc1 >> c1ccc(O)cc1, c1ccc(O)cc1 >> c1ccc(O)cc1) があげられる。これらはいずれも分子量 12~30 万の巨大蛋白質であり、サブユニットでさえも 6~8 万の分子量を有する。これら蛋白質の有する銅は、ESR スペクトルを呈せず、そのため Type III 型と呼ばれており、銅の状態は、一価もしくは、複数構造による Cu^I-Cu^{II} antiferromagnetic interaction を行っているものと考えられている。Hc は、種々の物理化学的研究より、Table 1 のような性質を持っていると示唆されており、活性中心の構造は最近 EXAFS⁽¹⁾ を用いて下記のようなものであると推定されている。



Tyrosinase についても Hc と同様な構造を示唆しているが、deoxy 型はいずれも銅(I)であるところから低分子銅(I)錯体を用いての $Cu(I)-O_2$ 錯体の合成が注目されている。しかしながら、銅(I)錯体は、①非常に air-sensitive であり、②容易に不均化しやすい等の困難な点が多く、 $Cu(I)-O_2$ 錯体の合成が成功した例

は無い。渡者らは、 $Cu(I)$ 錯体の Chemistry を追究している中で、 $Cu^I X$ ($X=Cl, Br, I$) / 2,2'-bipyridine (bpy) or 1,10-phenanthroline (phen) を用いて合成した銅(I)錯体が酸素と可逆的に反応、もしくは、アルコールを酸化することを見出した^{(2),(3)}。本研究では、この $Cu(I)-O_2$ 錯体を

Table 1.

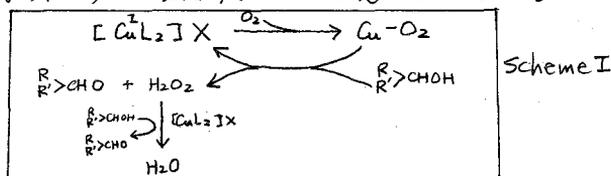
	deoxy-Hc	oxy-Hc
Absorption spectra	-	346 (ev 8000) 580 (ev 500)
ESR spectra	non-detectable	
Magnetism	diamagnetic	diamagnetic
Resonance Raman spectra	-	$\nu_{O-O} = 740 \sim 760 \text{ cm}^{-1}$ (peroxide type)
Valence (Cu)	$Cu(I)$ d^{10}	$Cu(II)-Cu(II)$ Antiferromagnetic

NMR Studies of Copper(I) Complexes as a Model of Hemocyanin

(Univ. Kinki, Faculty of Science and Technology) Susumu Kitagawa, Megumu Munakata, and Masahiro Yonezawa

NMR法を用いて観測することと試み、銅(II)と酸素との結合性についての知見を得ることと目的とする。

2. (A) Oxygen-Carrier Modelの合成と測定: 試薬は市販の Cu^2X ($X=Cl, Br, I$), bpy, phenならびにその誘導体(一部合成)と精製して用いた。高純度窒素(2J アルゴン)雰囲気下、アセトン- d_6 溶媒中、 CuX (5mM), 配位子 L (5mM) と混合し、3~4h 攪拌して、 $[CuXL]_2$ を合成した。これを NMR サンプルチューブに嫌氣的に移し、封入したものを 1H NMR 測定に用いた (Precursor)。酸素付加は、合成した Precursor 溶液に 120 ml/min の流量で O_2 ガスを 2~5 分通気して行った。この溶液を窒素雰囲気下にして NMR サンプルチューブに封入した (oxy-form)。脱酸素化は、窒素ガスを 2~3h 通気して行い、これを NMR サンプルチューブに封入した (deoxy-form)。 1H NMR 測定は、Jeol FX-200 FTNMR スパクトメータを用い、観測幅 2.5 kHz, 8K データポイント, 13us (90°) パルスにて、500~1500 回の積算を行ってスペクトルを得た。(B) アルコール酸化系の合成と測定: CuX (0.5mM) と 1.0mM 配位子メタリール- d_4 溶液に加え、窒素雰囲気下で 2h 攪拌して $[CuL_2]X$ を得た。 $[CuL_2]X$ はアルコール中、 O_2 を通気すると catalytic にアルコールをアルデヒド(またはケトン)に酸化することを見い出している (Scheme I)。(2) この反応の中間体をあ



るために O_2 を 1h 通気し、窒素雰囲気下にて NMR サンプル管に封入を行い、これを $-90^\circ C$ にて 1H NMR 測定を行った。

(C) Antiferromagnetic interaction を有する系:

$[L_2Cu^{II}-B-Cu^{II}L_2]$ ($B=O_4$) ($L=bpy, phen$) を Hendrickson らの方法(4)で合成を行い、これを Tf_2n-d_6 に溶かし、 1H NMR 測定を $25^\circ C \sim -90^\circ C$ で行った。

3 (1) $[CuL_2]X$ ならびに $[CuXL]_2$ の 1H NMR スペクトル. 1例として、bpy系の夫々のスペクトルを Fig. 1 ($[CuL_2]X$), Fig. 2 ($[CuXL]_2$) に示した。シグナルの帰属はモリテカナル法を用いて行った。Fig. 1, 2 および明らかに、単核 $Cu^2(bpy)_2$ と複核 $[Cu^2Cl(bpy)]_2$ では 6-H, 3-H のシフト位置が異っており、構造を追究する上で良いマーカーとなることが理解される。即ち、次のような反応が溶媒に依存

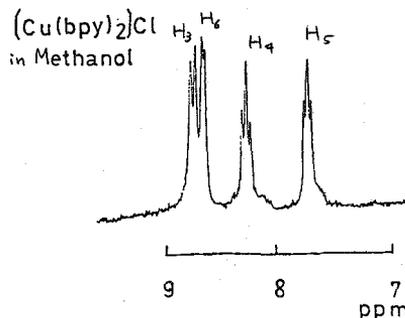


Figure 1. 200 MHz 1H NMR スペクトル (-90°) $[Cu(bpy)_2]Cl$ in MeOH- d_4 .

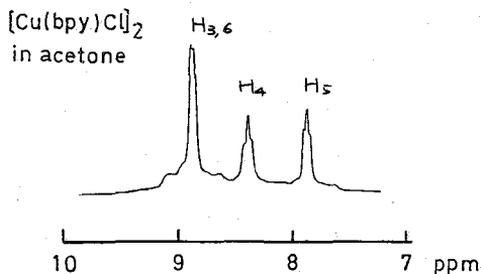
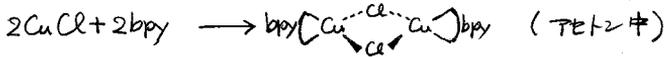
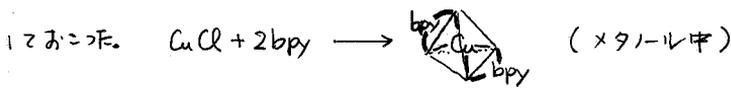
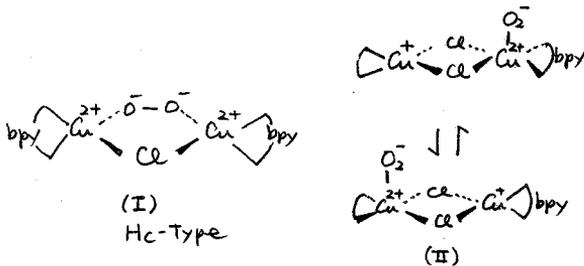


Figure 2. 200 MHz 1H NMR スペクトル (-90°) $[Cu(bpy)Cl]_2$ in Tf_2n-d_6 .



(2) $[CuXL]_2$ の O_2 との反応 Fig. 3 に $[CuCl(bpy)_2]$ を用いて, oxy-deoxy cycle を行った時の NMR スペクトルを示した。Fig. 3(A) は precursor の bpy のシグナルである。これに O_2 通気を行うと強度が著しく減少した。precursor は 440 nm ($\epsilon = 2400$) に銅(II) \rightarrow bpy への CT バンドを与え, このバンドをモニターして oxy 体の生成を調べたところ, 90% が O_2 体として生成していることがわかった。これは, 1H NMR スペクトルの強度 (Fig. 3(A), (B)) の減少から得られた生成比とよく一致した。さらに N_2 通気により deoxygenation を行ったところ, Fig. 3(C) を得た。明らかに precursor の強度が増大している。これも, 吸収スペクトルから得た deoxy 率 (~50%) とよく一致した。 O_2 体は, 7~9 ppm の領域に観測されることから, 銅は常磁性状態にあることが予想される。この $[CuCl(bpy)_2]_2$ に O_2 を付加した場合, 次の I, II のような極限構造が予想される。



ハモニアニルは, $Cu^{2+}-O-Cu^{2+}$ 型であると示唆されているが, この場合の antiferromagnetic coupling 定数は $|J| \geq 625 \text{ cm}^{-1}$ であり, かなり強い相互作用をしているものと考えられる。構造 (I) の場合は, 同じ $O-O$ bridge であるが, もし, 強い antiferromagnetic interaction があるならば, 比較的 narrow な 1H nmr シグナルが観測されるであろう。Figure 3(B) に示したとおり, 明瞭に観測できない。次の (4) 節で述べるように $O-O$ を橋かけた構造で antiferromagnetic interaction をしている場合, $|J|$ の大きさが問題となり, signal の線幅と $|J|$ との相関が重要であり, 系統的な研究が要求される。II 型構造の場合は $Cu^{2+}-O_2$ における銅は常磁性であることから, bpy signal は通常の銅(II)錯体と同様に broad out して観測される。

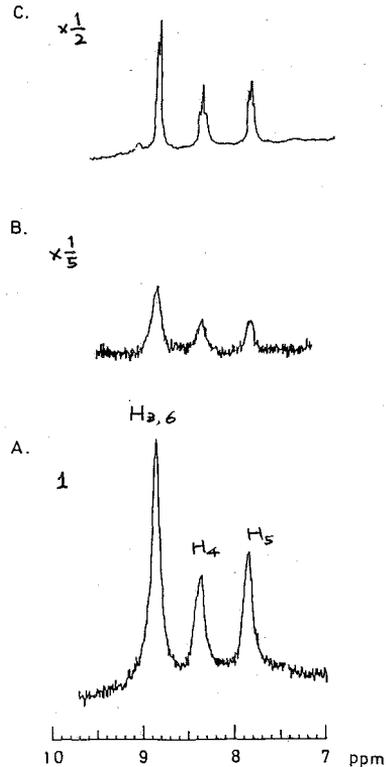


Figure 3. 200MHz 1H NMR スペクトル (90°C) (A) $[CuCl(bpy)_2]_2$ (B) O_2 通気 (C) 脱 O_2 アセトン- d_6 溶液. P-ジクロロベンゼン (5mM) を添加し, そのシグナル強度 1 に対し換算して比較した。数字は 20°C での値。

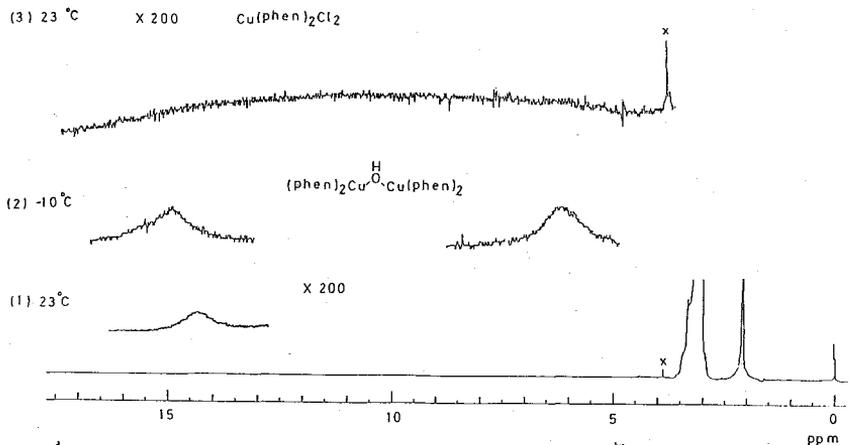


Figure 4. 200 MHz ^1H NMR スペクトル. (1)(2) $[(\text{phen})_2\text{Cu}^{\text{II}}-\text{O}-\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]\text{ClO}_4$, (3) $[\text{Cu}(\text{phen})_2]\text{Cl}_2$. x impurity. acetone- d_6 溶媒にて測定

(3) $[\text{CuL}_2]\text{X}$ を用いたアルコールの酸化: Scheme I における $\text{Cu}-\text{O}_2$ 中間体をとらえるために室温で O_2 通気した系、 ^1H NMR スペクトルを観測したところ Fig. 1 の bpy シグナルの強度が著しく減少したスペクトルを得た。この系からは、 $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{bpy})_2\text{O}_2$ type (II 型の) の square-pyramidal 構造が予想される。

(4) Antiferromagnetic interaction をもつ系の ^1H NMR スペクトル. O_2 を橋かけした複核の Cu^{II} 錯体の NMR スペクトルを観測する場合、この antiferromagnetic 系の ^1H NMR スペクトルの測定は不可欠である。 $[\text{L}_2\text{Cu}^{\text{II}}\text{CuL}_2]$ は、 $S=0$ の基底状態、 $S=1$ の最低励起状態を有し、これら states 間のエネルギー差 $[E(S=1) - E(S=0)] = 322$ (bpy), 354 cm^{-1} (phen) である。 ^1H NMR スペクトルはこれら Singlet, Triplet 状態の平衡系として観測することになり、isotropic shift (ν) は contact 項が支配的な場合、

$$\frac{\nu}{\nu_0} = -A \left(\frac{\nu_c}{\nu_N} \right) \frac{g\beta S(S+1)}{3kT[\exp(\frac{g\beta S}{kT}) + 1]} \quad (1)$$

と与えられる (ΔG は 2 つの状態の free energy 差)⁽⁵⁾。Fig. 4 に $[(\text{phen})_2\text{Cu}^{\text{II}}-\text{O}-\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]$ の ^1H NMR スペクトルを示した。6, 15 ppm に 7 σ -トの phen のシグナル (半幅幅 ~100%) が観測されている。一方、単核の銅(II)錯体では (Fig. 4(3), $[\text{Cu}(\text{phen})_2]\text{Cl}_2$) phen の吸収線は broad out して全く観測しきれない。このように antiferromagnetic interaction の強さが phen 系 ($J = -1778$ cm^{-1}) の程度であると ^1H NMR スペクトルを観測しきれないことは、oxy-form の ^1H NMR スペクトルを観測する上で非常に興味あることである (文献)

(1) M.S.Co, K.O.Hodgson, T.K.Eccles and R.Lontie, J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 984.

(2) M.Munakata, S.Nishibayashi and H.Sakamoto, J. C. S. Chem. Comm., 1980, 219.

(3) S.Kitagawa and M.Munakata, Inorg. Chem., 1981, 20, 2261.

(4) M.S.Haddad, S.R.Wilson, D.J.Hodgson and D.N.Hendrickson, J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 384.

(5) W.D.Horrocks, J. Am. Chem. Soc., 1965, 87, 3779.

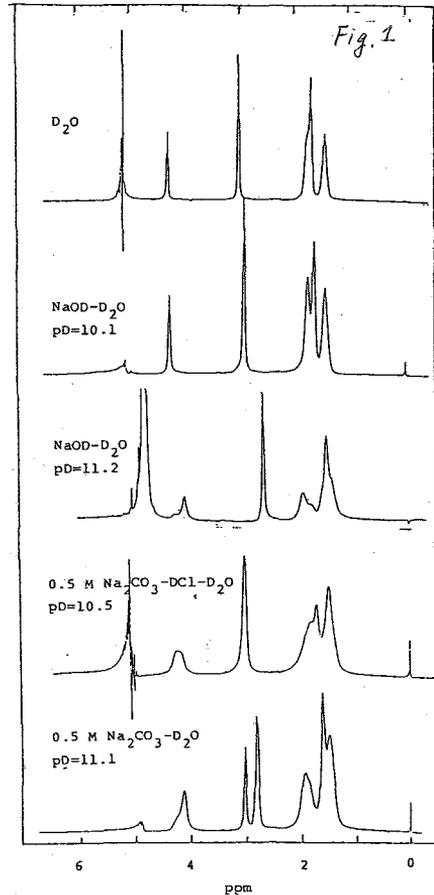
(阪大蛋白質研) 垣内欣二, 阿久津秀雄

ポリ-L-リジンは水溶性ポリペプチドとして、蛋白質の二次構造を調べる上で重要なモデル物質である。われわれは炭酸イオン存在下 (pH = 10~11) でポリ-L-リジン臭素塩 (PLL) の濃厚溶液を得た。これを50°Cに加熱すると白濁するが低温になると再び透明な溶液が可逆的に得られることを見出した。そしてこの溶液の物性をしらべるため分子量、粘度および円偏光二色性 (CD) などの測定を行った。その結果炭酸イオン存在下において高濃度のPLLは常温で二分子に会合し二次構造ではβ-構造に近い規則性構造を持つことが明らかになった。一方稀薄溶液になると二分子会合は解離しα-ヘリックス構造に変化することもわかった。

今回は¹H-および¹³C-NMR測定において炭酸イオンとリジン残基のアミノ基との相互作用とそれがPLLのコンホメーションの形成に果たす役割をしらべた。¹H-NMRはフルカ-WM 360 Wb NMRスペクトルメーター、¹³C-NMRには日本電子のPS-100PFTおよびFX-100 NMRスペクトルメーターを使用した。CDはJASCO J-500にデフューゾセンサーを組合せて使用した。

(実験および討論)

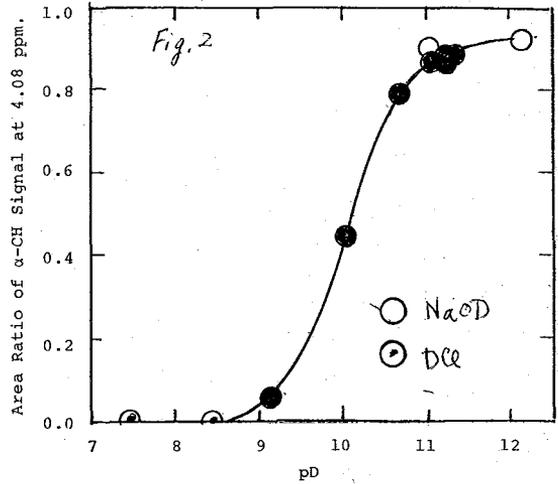
PLLの水溶液は中性でランダムコイル、アルカリ性でα-ヘリックス、50°C、10分間加熱するとβ-構造になるといわれる。²⁾ Fig. 1はそれらの条件での¹H-NMRの結果である。アルカリ側でα-CHとε-CH₂のシグナルが明らかに分裂しているのが観測される。α-CHの分裂はNaOD-D₂O系でもNa₂CO₃-DCl-D₂O系でも観測され、その面積強度比とPDは対



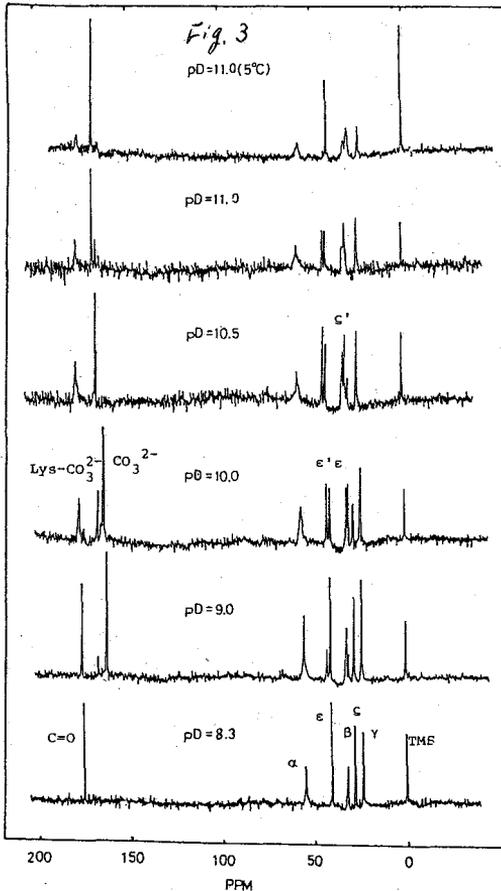
いろいろな条件でのPLLの360MHz-¹H-NMR結果

¹H- and ¹³C-NMR Studies on Poly-L-Lysine HBr in Carbonate Buffer Solutions. (Institute for Protein Research, Osaka Univ., Suita) Kinji KAKIUCHI and Hideo AKUTSU

してプロットすると Fig. 2 ようになる。
 その転移率は PD 10.2 でありこれは
 CD で見た二次構造形成の PD
 依存性とよい一致を示す。したが
 って二本の α -CH シグナルの内高磁場
 (4.08 ppm) の方が二次構造の形成中の
 α -CH、低磁場側からランダムコイル中の
 α -CH と帰属できる。これは両者の間の
 変換は NMR のタイムスケールから見
 て充分おおい。 ϵ -CH₂ は炭酸イオン存在
 下でのみ二本に分裂するので炭酸
 イオンとアミノ基の相互作用によるものと
 考えられる。高磁場側のシグナルは
 PD と共に変化するか、低磁場側はほ
 とんど動かないので低磁場側のシ



α -CH シグナル (4.08 ppm) の面積強度比と
 PD の関係



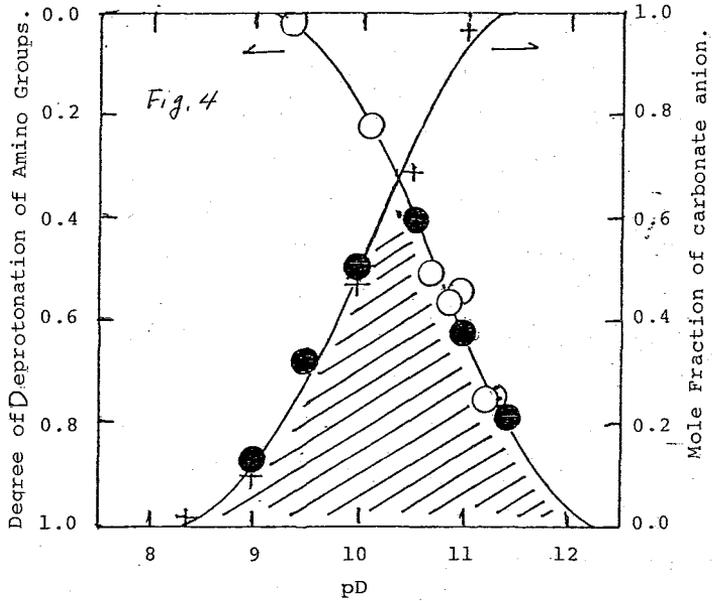
炭酸イオン存在下における PLL の ¹³C-
 NMR スペクトル

グナルが炭酸イオンと相互作用しているリジン
 残基に由来していると帰属できる。

このようにリジン残基と炭酸イオンの相互作
 用の性質を明らかにするために炭酸イオン存
 在下での PLL の ¹³C-NMR の測定を行った。

Fig. 3 は ¹³C-NMR スペクトルである。スペクトル
 の帰属は Saigo³ら, Joubert⁴の報告による。^{3,4,5}
 ϵ -と δ -CH₂ シグナルと炭酸イオンの発着
 も二つに分裂するのが確かめられた。分裂
 した炭酸イオンのシグナルの帰属は C-13
 Enriched した Na₂¹³CO₃ を用いて行っ
 た。これらの新しいシグナルに ϵ' -, δ' -
 CH_2 と名付けたが、いずれも PD による
 化学シフトの変化はあまり認められなかった。
 また PD に対する強度の変化も三者共同の
 傾向を示した。したがってこれらはリジン
 残基のアミノ基と炭酸イオンが複合体を作
 ったために生じたシグナルであると結論
 できる。複合体由来のシグナルが分裂した
 シグナルとして観測されることはこの
 複合体が NMR の Time scale (10^{-3} sec)
 に比べて充分安定に存在していることを示
 す。

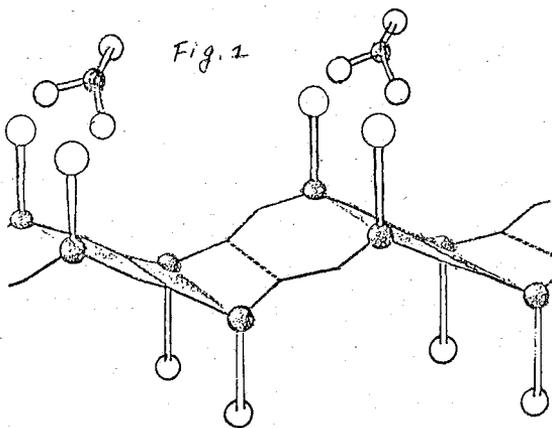
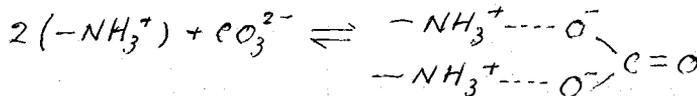
Fig. 3の ϵ' -CH₂ シグナルの相対強度と Fig. 4 にプロットした。PD=10.5 に極大がある。¹³C-NMR のスペクトルから bulk の炭酸イオンの滴定曲線を + で示し、一方 ϵ' -CH₂ の滴定曲線を ○ で表わす。後者はリジン残基のアミノ基の滴定曲線に当る。すると複合体の量の変化は低 PD では炭酸イオンのまた高 PD ではアミノ基の滴定曲線と一致する。したがってこの複合体は -NH₃⁺ と CO₃²⁻ の間でつくりとると結論できる。



●: ϵ' -CH₂ シグナルの ($\epsilon + \epsilon'$) に対する面積比
 +: bulk 炭酸イオンの化学シフト, ○: ϵ' -CH₂ の化学シフト

次に複合体の化学量論的関係を示すために 0.5M Na₂CO₃ (c-13

Enriched = 91%) 存在下での PLL 溶液の ¹³C-NMR を測定した。Bulk CO₃²⁻ イオンのシグナル以外にもう一つのシグナルが認められる。PD=10.6 で面積比は 16% であった。PLL の濃度は 2.73 g/dl であるから アミノ基の数の約 1/4 が炭酸イオンと結合していることが示唆された。ところが Fig. 4 より実際に結合に与っているアミノ基は全体の 6割であるから 2個のアミノ基が 1個の炭酸イオンと結合していると結論できる。即ち



PLL = 分子会合モデル。二つの PLL 分子が互いに Antiparallel を作り、炭酸イオンが隣り合う側鎖を架橋する。

また pH=10.5、炭酸イオン存在下で PLL 分子は β -構造型の 2 分子会合として安定に存在することかわかっているが、以上の結果を基に Fig. 5 のようなモデルを考へることが出来る。すなわち 2 分子の PLL が互いに β -構造を形成し炭酸イオンが隣り合う側鎖と橋架けしこれを安定化する。荷電が打ち消された後の側鎖間同様の疎水的相互作用もこれをより安定にするであろう。

Fig. 3 の一番上のスペクトルに見られるように低温で測定された NMR スペクトルは 25°C での測定結果と

異なった。これは低温では平衡に達するのに時間がかかったためと考之、CDを濃度、濃度、時間の影響を調べる。PLL 濃度 2.73 と 0.26 g/dl の二つの場合について CD 測定を行った。興味ある結果として 0°C 附近で試料を調製し 3.3°C で CD を測定すると 220 nm と 198 nm の極小値を持つ α-ヘリックスに特徴あるバンドを示した。しかし 7.3°C で測定すると 198 nm の極小値は小さくなり 25°C ではほとんど 198 nm の極小は認められず、一方 220 nm の極小値は余り濃度によらず変化が認められず、したがって 25°C では α-ヘリックスよりも β-構造に近しいスペクトルであると思われる。また 3.3°C で 3 日間放置すると 25°C で測定した CD と同じスペクトルを示した。0.26 g/dl の試料濃度では 3.3°C でも 25°C でも試料を十分に溶解し、この濃度では同じスペクトルが得られる。この濃度では分子量は単一成分に解離しているから α-ヘリックスがより安定な構造であると思われる。また高濃度では低温で平衡に達するのに非常に長い時間を要するが低温濃度では低温で平衡に達する時間が著しく速められ、このことがわかる。

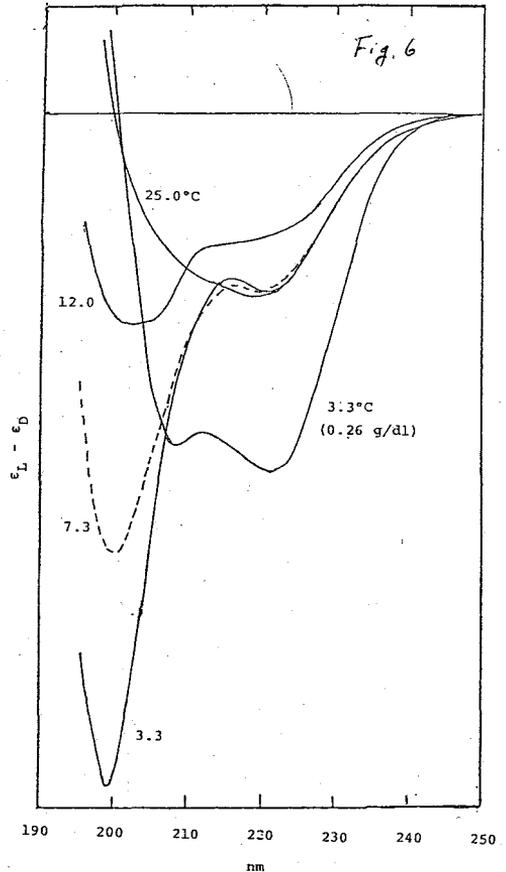


Fig. 6
0.5M Na₂CO₃ 溶液中における PLL の CD スペクトル。Concn = 2.73, 0.26 g/dl。

- 1) K. Kakiuchi and H. Akutsu, *Biopolymers*, 20, 345 (1981)
- 2) G. Holtzwarth and P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 218 (1965)
- 3) H. Saito and I. C. P. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.*, 168, 154 (1973)
- 4) F. J. Toubert, N. Lotan and H. A. Scheraga, *Physiol. Chem. and Phys.*, 1, 348 (1969)
- 5) R. J. Wittebort, A. Szebo and F. R. N. Gurd, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 5723 (1980)

^2Hmr - Some Applications in Biosynthetic and
Mechanistic Studies

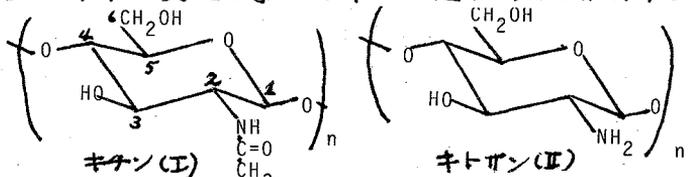
J. B. Stothers, Chemistry Department,
University of Western Ontario,
London, Ontario, Canada

Although investigations utilizing compounds isotopically enriched with deuterium are commonplace and have provided solutions for a wide variety of chemical problems, the deuterium-labelled centres are very often monitored indirectly. Direct observation and measurement of the individual sites of deuterium incorporation by high resolution deuterium magnetic resonance (^2Hmr) spectroscopy, however, has certain distinct advantages over other physical methods, particularly for systems in which deuterium is located at several different sites in a given compound. Since deuterium and protium chemical shifts are essentially the same, specific assignments for individual ^2H signals follow from the analysis of the proton spectrum. Some examples of the use of ^2Hmr techniques in biosynthetic and reaction mechanism studies will be described to illustrate the utility of the method, including examples undergoing multisite ^2H incorporation.

(国立がんセンター研・鳥取大^{*})斎藤 肇, 多部田涼子, 平野茂博^{*}

1. はじめに

キチン (I) は, N-アセチルグルコサミン (2-アセトアミド 2-デオキシ D-グルコピラノース) が β -(1 \rightarrow 4) 結合でつながったセルロース様の多糖で, バクテリア, 菌類の細胞壁, 節足動物の外皮, カニの甲羅などに見い出されている。天然のキチンは, 通常の溶媒に不溶であるのに対して, 脱アセチル化によって生成されるキトサン (II) の N-アセチル化によって作られる再生キチン, N-アセチルキトサンは弾性に高く無色のゲルになる。このように化学的性質がほぼ同一にもかかわらず, 物理的性質に大きな違いがみられることは, この多糖のコンホメーション, あるいは分子のパッキング性に帰因する可能性が大きい。ここでは, キトサンゲルのゲル化機構の解明に関連して, N-アセチルグルコサミンポリマー, オリゴマーの水溶液, ゲル, 固体の¹³C NMRスペクトル変化と手おかりに上記の向題と解明することにする²⁾。多糖のコンホメーション依存¹³C化学シフトを示すのは, グルコシド結合にある炭素, つまり C-1 および C-4 であることと, 従来は示して来たが, キチンの場合においてもそのような傾向を示すかと調べると, 本研究の目的の一つである。



2. 実験方法

キチン, N-アシルキトサン, キトサンの固体¹³C NMRスペクトルの測定は, ブルカ-CXP-300スペクトロメーターを用い, CP/MAS NMRの条件で測定した。キトサンゲルおよびキチンオリゴマーの¹³C NMRスペクトルは, 上記のスペクトロメーターにより高分解能NMRスペクトルとして得た。

3. 実験結果と考察

A. キチンオリゴマーの¹³C NMRスペクトルの帰属

固体¹³C NMRスペクトルを帰属するには, 帰属がより容易な水溶液中でのスペクトルデータが必要である。キチンの場合, 上述述べた溶媒不溶性のために, そのようなデータが得られなない。このため, 低重合度のキチンオリゴマーをこの目的のために使用する。モノマー, ダイマー, オリゴマーの¹³C NMRスペクトルを図1に示

Molecular conformation of chitin and chitosan gel. ¹³C NMR spectra of solution, gel and solid states.

(Biophysics Division, National Cancer Center Research Institute, ^{*}Dept. of Agricultural Biochemistry, Tottori University) H. Saitô, R. Tabeta and S. Hirano[†]

す。モノマーのシフトの帰属にあたり、 H_2O , D_2O 溶液と二重管に入れて同時に測定する、いわゆるシフトへの同位体効果⁷⁾を考慮した。結果を表1にまとめる。

B. キタン, キトサンの ^{13}C CP/MAS NMR スペクトル。

図2に、固体のキタンおよびキトサンの ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを示す。明らかに、後者にはアセチル基が存在しているため、 CH_3 および $C=O$ ピークが欠落していることがわかる。また10% 酢酸水溶液中での後者の ^{13}C NMR スペクトルとは、グルコシド結合部位のピーク位置が異なる。

図3に、各種キタン試料、*N*-アシルキトサンの ^{13}C CP/MAS スペクトルを示す。天然のキタンは結晶性が高いため、スペクトルピークはすばやく、溶液状態のスペクトルにくらべて選色がよい。しかし、再生キタンである*N*-アセチルキトサンや、その他の*N*-アシルキトサンの場合は溶液中より大きく、種々の少しずつ異なったコンホメーションを持つ分子鎖の重なりのためである。

興味あることに、キトサンの*N*-アシル基の種類にかかわらず、C-1, C-4 シフトはほぼ同一の値を与えることである。すでに報告した(173)- β -D-, (174)- α -D-グルコサンのいずれも、グルコシド結合にあるC-1, C-3, C-1, C-4 シグナルがそれぞれコンホメーションを反映して変化する。

したがって、この場合もコンホメーションのマーカとなるピークは、C-1, C-4 シフトである。実際、表1および表2に示すように、キタンオリゴマーのC-1, C-4 シフトにくらべて、キタン、*N*-アシルキトサンのそれは、それぞれ2.3, 4.1 ppmと低磁場にシフトしているのに対し、その他のピークは固体、液体両者間で有意な差異は

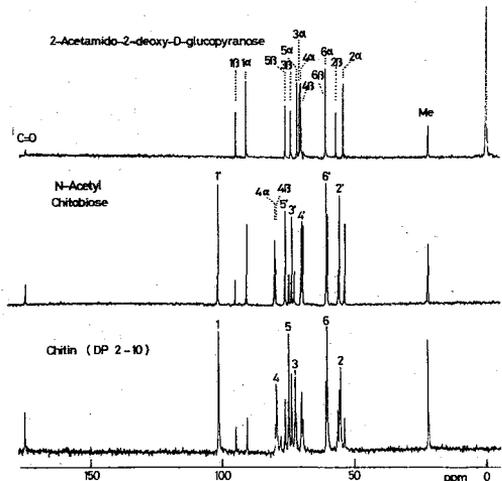


Figure 1. 75.46 MHz ^{13}C NMR spectra of 2-acetamido-2-deoxy D-glucopyranose (top), N-acetyl chitobiose (middle) and chitin oligomers (bottom). pH, 7; 20 mg/ml.

Table 1. Assignment of ^{13}C chemical shifts of chitin oligomers (pH 7; ppm from ext. TMS)

	2-acetamido-2-deoxy D-gluco-pyranose	N-acetyl chitobiose	Chitin oligomers (DP 2-10)
C-1			101.4
C-1 α	91.0	90.6	90.6
C-1 β	95.1	95.0	95.0
C-1'		101.6	101.6
C-2			55.2
C-2 α	54.2	53.7	53.8
C-2 β	56.7	56.3	56.3
C-2'		55.8	55.7
C-3			72.3
C-3 α	70.9	69.4	69.4
C-3 β	74.0	72.6	72.6
C-3'		73.6	73.6
C-4			79.4
C-4 α	70.3	80.1	79.9
C-4 β	70.1	79.7	79.2
C-4'		69.9	69.9
C-5			74.7
C-5 α	71.7	70.1	70.1
C-5 β	76.1	74.7	74.8
C-5'		76.0	76.1
C-6			60.2
C-6 α	60.8	60.2	60.2
C-6 β	60.9	60.3	60.2
C-6'		60.8	60.7
C=O	174.7 ^a 174.8 ^b	174.7	174.7
CH ₃	22.0 ^a 22.3 ^b	22.0	22.3

^a α -anomer, ^b β -anomer.

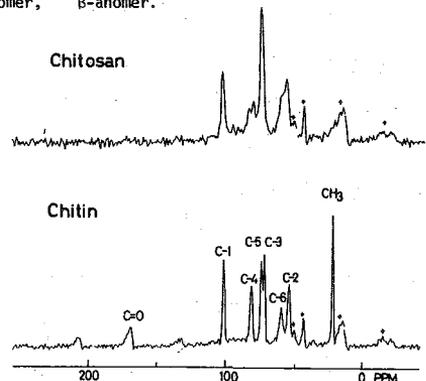


Figure 2. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of chitin and chitosan →

みられない。

これから得られる結論の第一は、天然キチンと再生キチンのN-アセチルキトサンのコンホメーションは同一である。ただし、後者の方が線中の揺れ幅が大きく、結晶としての分子鎖のパッキング状態は明らかに悪い。このように、再生キチンの分子鎖のコンホメーションが天然キチンと固相状態と同一にみえることは、ゲル状態の架橋構造はキチン分子の全長と同様のメカニズムで進むことも示唆する。ただし、再生キチンの結晶性の悪さが、水による膨潤を許し、ゲルとしての性状と与えるものと考えられる。

N-デカノイル、N-ステアロイルキトサンの主鎖のコンホメーションも、キチンの場合とほぼ同一であることが、C-1, C-4のシフト値からわかる。しかし、カルボニルのシフトから見た場合、キチン、N-アセチルキトサンにくらべて、約3 ppmの低磁場シフトが見られる。キチンの最も一般的な結晶形はαキチンとよばれ、繊維軸に対して垂直方向に分子間のNH...C=O水素結合が形成されていることが、X線回折データから明らかにされている。溶液の数多くのデータによれば、C=O基と強い水素結合が形成された場合、カルボニルCシフトは低磁場にシフトすることが知られている。このことから言えば、N-デカノイルやN-ステアロイルキトサンの方が、天然キチンにくらべてより強い分子間結合をもつように思われる。しかし、スペクトルの線中やよりバルキーな置換基が隣接していることを考えると、この考えはむしろ否定されべきである。カルボニル基のシフトの異常性については、基礎データを集積する必要があり、結論の中には、アミド基の配向状態に若干の差異があるものの、これらのキトサンのグルコシド結合に關するコンホメーションはキチンとあまり変わらない。なお、C-6ピークに若干のピーク分裂がみられるが、アミロスにみられていたように、ヒドロキシメチル基のコンホメーションのオリエンテーションの違いによるものと思われる。

C. N-アセチルキトサンゲル

キトサンのN-アセチル化によって生じるゲルは、無色透明の弾性に富む性質を示す。一般に、ゲルは架橋による三次元構造のため見かけ上固相様の性質を示すが、

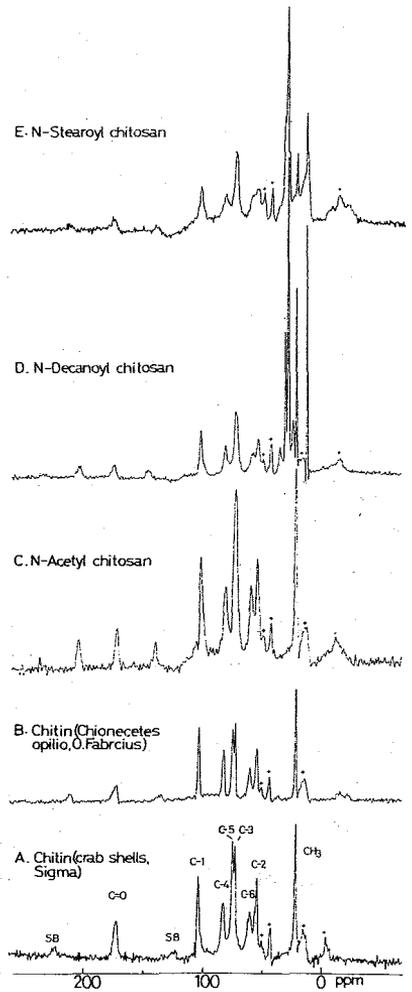


Figure 3. 75.46 MHz ^{13}C CP/MAS NMR spectra of solid chitin and N-acyl chitosans. Peaks marked by + are from the rotor and probe. Number of transients are: 850(A), 915(B), 660(C), 1213(D) and 5000(E). Sharp peaks at 0-40 ppm in D and E are from the fatty acyl moiety.

Table 2. Comparison of ^{13}C chemical shifts of chitin and N-acyl chitosans in solid state with those of aqueous solution (ppm from TMS, ± 0.5 ppm for CP/MAS data)

	Solid state					Aqueous solution
	chitin (crab shell, Sigma)	chitin (crab shell, chionectes opilio)	N-acetyl chitosan	N-decanoyl chitosan	N-stearoyl chitosan	chitin oligomers
C-1	103.7	103.9	103.3	103.4	103.8	101.4
C-2	55.2	54.6	55.2	55.2	56.8 55.2	55.2
C-3	73.2	73.2	74.5 ^a	73.7 ^a	74.8 ^a	72.3
C-4	83.5	83.0	83.1	83.2	83.2	79.4
C-5	75.6	75.4	74.5 ^a	74.9 ^a	74.8 ^a	74.7
C-6	60.6	60.7	60.5	60.7 59.3	60.8 59.3	60.2
CH ₃	22.6	22.4	22.7	-	-	22.3
C=O	173.7	172.9	173.3	176.6	176.6	174.7

^a C-3 and C-5 signals are overlapped.

希釈剤との相互作用によって液体
探の挙動を示すセグメントも存在
し、きわめて heterogeneous であ
る。わかれわかれは、これまで報告
してきた種々の系について、(1)架
橋密度が高くなく、(2)高い希釈剤
によって膨潤したゲルであること

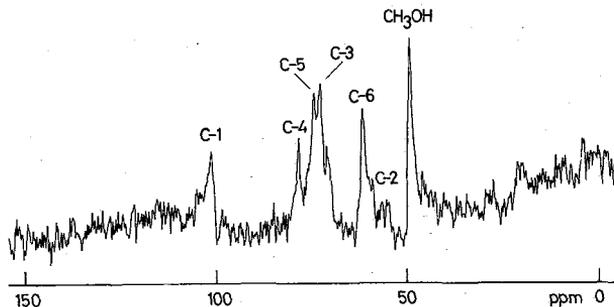


Figure 4. High resolution ^{13}C NMR spectrum of N-acetyl chitosan gel

は、通常の高分解能 NMR スペクトルの観測が可能であることを示した。実際、図4に示すように、N-アセチルキトサンゲルの ^{13}C NMR スペクトルの観測が可能で、ピーク位置から高分解能 NMR の観測可能な領域のコンホメーションは、キタンオリゴマーの場合と同様ラジカルコイルである。架橋度のコンホメーションは、高分解能 NMR により観測は不可能であるが、前節で述べたように凍結乾燥ゲルサンプルの ^{13}C CP/MAS NMR データから明らかのように、キタン糖の分子鎖の集合が重要な役割を担っていると考えられる。すなわち、ゲルの CP/MAS NMR による観測は、通常のローターを用いる場合は、水の遠心分離効果によってマジックアングル回転がスムーズにはなれない。

結論として、キトサンゲルの架橋構造はキタン糖のコンホメーションを特徴づけるセグメントの集合によって生じ、その一部は膨潤によってラジカルコイルの挙動をとることが、種々の相の NMR スペクトルの測定によって明らかにされた。

- 1) 斎藤, 多田, 平野, 水一画 キタン・キトサンシンボジウム要旨集 P. 31, 1981, 大阪
- 2) H. Saitô, in "Solution Properties of Polysaccharides", ed. by D. A. Brant, ACS Symposium Series, No. 150, pp. 125-147 (1981), American Chemical Society
- 3) H. Saitô, R. Tabeta, and T. Harada, Chem. Lett., 1981, 571.
- 4) H. Saitô, and R. Tabeta, Chem. Lett., 1981, 713.
- 5) P.E. Pfeffer, K. M. Valentine, and F. W. Parrish, J. Am. Chem. Soc., **101**, 1265 (1979)
- 6) 斎藤 肇, 化学の領域, **23** 609 (1979)

NMR緩和試薬の応用によるペプチド抗生物質 シオマイシンAの ^{13}C 化学シフトの帰属

(塩野義研, 日本電子*)

○高山陽子, 松下和弘*, 通和夫, 十倉一也, 岡部 啓

Streptomyces siوياensis から得られる含硫ペプチド抗生物質シオマイシンの主成分であるシオマイシンAの化学構造に関して, これまでわれわれは, 類似抗生物質チオストレプトンとの種々の分解反応生成物の比較, チオストレプトンの部分的X線結晶解析の結果に基づいて, 15-MHz ^{13}C NMRスペクトルの比較により, チオストレプトンととも推定し, 36.5-MHz ^{15}N および 270-MHz ^1H NMRスペクトルの解析により確認した。また, シオマイシンの微量成分であるシオマイシンB, C, D, アセチル化体, および水溶性シオマイシン誘導体についても, 同様にして構造決定した。¹⁾ この間, 同属体のチオペプチン類についても構造が明らかにされた。²⁾

これらの化合物の生合成経路の解明, あるいは, 微量成分や類似物質の構造決定のために, これらの ^{13}C NMRシグナルの全帰属を行っておく必要がある。現在までのこれらの ^{13}C シグナル帰属は, 表1に示したように, 化学シフトの文献値, および各同属体, 誘導体の測定値の比較, オフrezナンスCWデカップリング(SFORD)スペクトルの検討などで行ってきた。¹⁾ ただし, Xキルシグナルについては, 重なりが大きい部分は未帰属のまま残されている。また, 水素をもたない炭素シグナルについては, 重水素同位体シフトでCONH, および $>\text{C}=\text{N}-$ を区別し,³⁾ スピン-格子緩和時間(T_1)の測定より双極子-双極子緩和による緩和時間の実測値 T_1^{obs} と求め, これとFieserの分子模型を用いた計算値 T_1^{calc} との比較により帰属を進めてきた。²⁾ 今回は, 常磁性緩和試薬を用いて, ^{13}C T_1 , およびシグナル幅の変化を観察することにより, シオマイシンAの水素をもたない炭素シグナルの帰属を確認することを試みた。

シオマイシンAには全属が配位できると考えられる結合部位が数多くあり, ^{13}C シグナル帰属のためにランタノイドシフト試薬を用いることは適当でないと考えられる。銅錯体の緩和試薬はアミノ基に特異的に配位して, シフトを誘起せず, 緩和現象のみを生じさせるといわれているので,³⁾ ^{13}C シグナル帰属に有効であると考え, 今回は主としてビス(アセチルアセトナト)銅(II), $\text{Cu}(\text{acac})_2$ を用いることにした。シオマイシンAには, アミノ基, イミノ基のほか, 銅錯体の作用がまだ十分に解明されていないアミド基やチアゾール核が多く含まれている。そこでシオマイシンAに対しての応用に先立ち, アミド類やチアゾール類に対して $\text{Cu}(\text{acac})_2$ の錯体形成の効果を調べた。フェニル酢酸アミド, 2-ピロリドン, ジペプチド $\gamma\text{-Val-Gly-O-Me}$ に対しては, ほとんどスペクトルのシグナル幅を広げなからたので, $\text{Cu}(\text{acac})_2$ はアミド基やペプチド結合には配位しにくいと考えられる。チアゾール類(ε~ε)

^{13}C NMR Signal Assignments of Peptide Antibiotic Siomycin A. Applications of Paramagnetic Relaxation Reagents

(Shionogi Res. Lab., JEOL Ltd.*) Y. Takayama, K. Matsushita,* K. Tori, K. Tokura, and K. Okabe

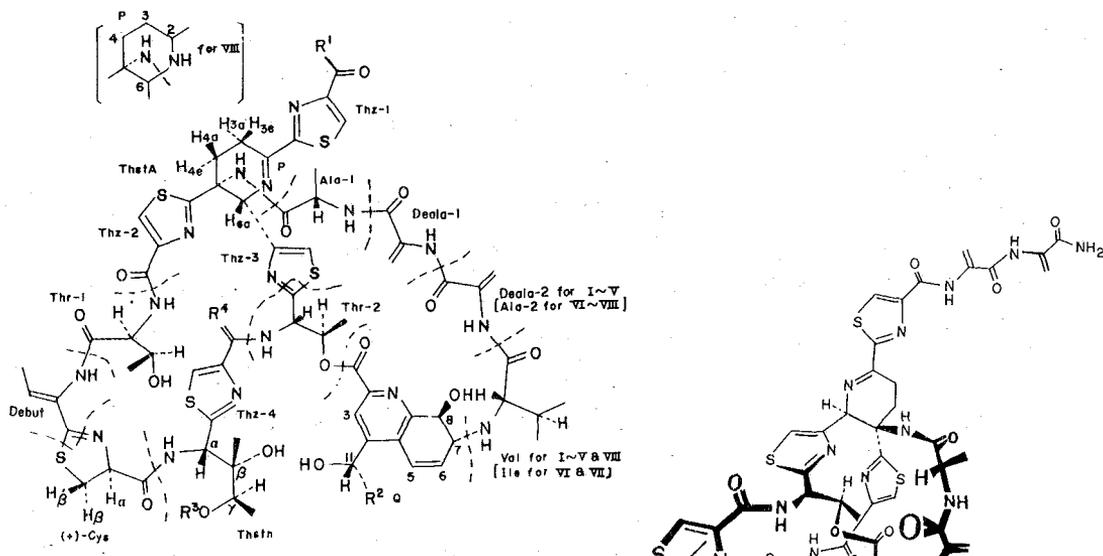
表1. シオマイシンAの¹³C NMRスペクトルデータ^a

炭素	δ_c	シグナル帰属 の根拠	T ₁ (s)	緩和速度比 ^c	線幅の 広がり ^d	
Ala	α -NCH	52.5	d, C, D	0.082		
	β -CH ₃	19.6 ^e	s	0.335		
	CONH	163.6	s, D, T	1.5		m
Deala-1	α =C	132.9	s, D, R	1.2	0.1	s
	β =CH ₂	103.0	t, R	0.037		
	CONH	162.3	s, D, T	1.9		m
Deala-2	α =C	134.9	s, C, D	1.1		
	β =CH ₂	100.7	t, C, R	0.031		
	CONH	161.3	s, C, D	1.8		s
Val	α -NCH	68.5	d, C, J	0.107		
	β -CH	31.7	d, C	0.120		
	γ -CH ₃	16.8 ^e	s, C	0.504		
	δ -CH ₃	19.3 ^e	s, C	0.306		
	CONH	173.8	s, C, D	1.6	0.2 ^h	m
Q	2=C	144.2 ^f	s, A, T	2.5		s
	3=CH	123.1	d, A, J	0.079		
	4=C	154.2	s, T	1.6		s
	5=CH	124.1	d, J	0.070		
	6=CH	130.2	d, A, J	0.060		
	7-NCH	60.0	d	0.097		
	8-OCH	67.6	d	0.096		
	9=C	155.1 ^f	s, A	1.8		
	10=C	128.1	s, A	1.4 ^h		s
	11-OCH	65.0	d, C	0.119		
	12-CH ₃	23.2	s, C	0.407		
COO	170.4 ^g	s, T	2.7	0.1		
Thr-2	α -NCH	56.5	d, C, D, J	0.083		
	β -OCH	72.5 ^e	d, J	0.084 ^h		
	γ -CH ₃	19.4 ^e	s, C	0.256 ^h		
Thstr	α -NCH	53.6	d, A, D	0.076		
	β -OC	77.8	s, A, D	0.5 ^h		
	γ -OCH	68.5	d, A, J	0.109		
	δ -CH ₃	19.1	s, A	0.307		
	ϵ -CH ₃	16.5	s, A	0.338		
Thz-4	2-SC=N	167.2	s, T	1.7		
	4-NC=	150.6	s, T	2.5		s
	5-SCH=	126.2	d, J	0.081		
	CONH	162.6	s, D	1.8 ^h		m
Cys	α -NCH	79.6	d, R	0.104		
	β -SCH ₂	35.3	t, A, R	0.059		
	CONH	172.4	s, A, D	1.4		m
Debut	α =C	129.1	s, T	1.9		s
	β =CH	133.2	d, A, J	0.107		
	γ -CH ₃	15.7 ^g	s, R	0.598		
	SC=N	170.6 ^g	s, T	3.1 ^h		
Thr-1	α -NCH	56.5	d, A, C, R	0.096		
	β -OCH	67.0 ^e	d, A, C, J, R	0.093		
	γ -CH ₃	19.3 ^e	s, A, C	0.256 ^h		
	CONH	166.1	s, A, D	1.3		s
Thst A P	2-C=N	162.8	s, C, D	3.2	0.3	l
	3-CH ₂	25.4	t, C	0.047		m
	4-CH ₂	29.8	t, C	0.041		s
	5-NC	58.1	s, C, D	1.1	0.3	l
	6-CH	64.8	d, C	0.107		m
	2-SC=N	168.9	s, D	5.5	1.0	l
Thz-1	4-N=C	157.8	s, T	2.1	0.5	l
	5-SCH=	125.5	d, J	0.077		s
	CONH	162.6	s, C, D	1.8 ^h	0.3 ^h	l

表 1. (続き)

炭素	δ_C	シグナル帰属の根拠 ^b	T ₁ (s)	緩和速度比 ^c	線幅の広がり ^d	
Thz-2	2-SC=N	170.7	s, T	3.1 ^h	0.2	l
	4-NC=	146.9	s, A	3.2		m
	5-SCH=	128.2	d, J	1.4 ^h		l
	CONH	161.3	s, D, T	2.9		
Thz-3	2-SC=N	173.9	s	1.2	0.4	l
	4-NC=	150.6	s	2.9		m
	5-SCH=	118.9	d, J	0.097		
Deala-S-1	α =C	134.9	s, C, D	1.9	0.3	l
	β =CH ₂	104.0	s, C, R	0.029		m
	CONH	160.2	s, C, D	2.9		l
Deala-S-2	α =C	133.8	s, C, D	2.9	0.5	l
	β =CH ₂	105.1	s, C, R	0.060		l
	CONH ₂	166.8	s, C, D	3.4		l

^a 測定条件: 日本電子 FX-100 NMR 分光器 (25.05 MHz) $\gamma = 2$, 50°C, CDCl₃-CD₃OH (4:1) 中, 濃度 0.15 mmol/mL, 2", 10 mm フェーズを用い, IRFT法を用いて測定した。FT条件は, スペクトル幅 5 kHz, パルス繰り返し時間 10 s, パルス幅 14 μ s (90°), データ長 8 k. δ_C 値の誤差は ± 0.1 ppm. T₁ は誤差 10~20% と考えられる。
^b シグナル多重度; s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; 略語; A, 4-アセチルシフト; C, 化学シフトの比較; D, 置換基同位体シフト; J, SFORDスペクトルにおける J_{ij} 値; R, 文献値; T, T₁ 比較。
^c Thz-A 残基の Thz-1-2 の炭素の緩和速度は 1.0 としたときの値 (0.1 以上のみ記載)。
^d 線幅の広がりの程度: l, 大きい; m, 中程度; s, 小さい。e^h 帰属交換の余地あり。シグナル重なりにより測定値不確か



- | | | |
|------|-------------------------|---|
| I | Siomycin-A | : R ¹ =NH ₂ , R ² =CH ₃ , R ³ =H, R ⁴ =O |
| II | Siomycin-B | : R ¹ =NH ₂ , R ² =CH ₃ , R ³ =H, R ⁴ =O |
| III | Siomycin-C | : R ¹ =NH ₂ , R ² =CH ₃ , R ³ =H, R ⁴ =O |
| IV | Siomycin-D ₁ | : R ¹ =NH ₂ , R ² =R ³ =H, R ⁴ =O |
| V | Siomycin-A monoacetate | : R ¹ =NH ₂ , R ² =CH ₃ , R ³ =COCH ₃ , R ⁴ =O |
| VI | Thiostrepton | : R ¹ =NH ₂ , R ² =CH ₃ , R ³ =H, R ⁴ =O |
| VII | Thiostrepton-B | : R ¹ =NH ₂ , R ² =CH ₃ , R ³ =H, R ⁴ =O |
| VIII | Thiopeptin-Ba | : R ¹ =NH ₂ , R ² =CH ₃ , R ³ =H, R ⁴ =S |

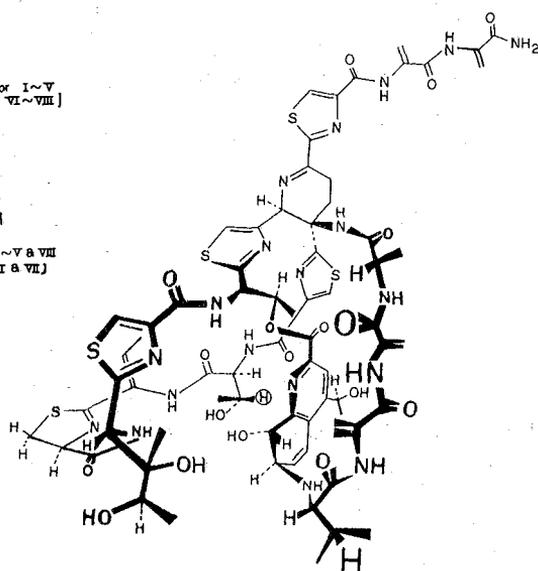
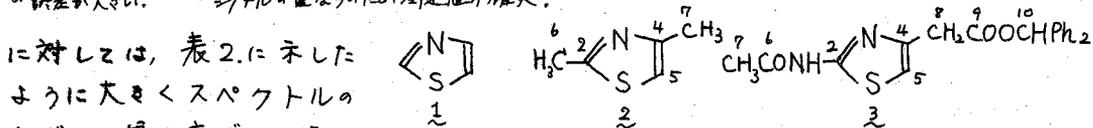


図. シオマイシン A の立体化学

表2. チアゾール類の¹³C NMRスペクトルデータ^a

化合物	炭素	δ_c	$T_1(s)$	緩和速度比 ^b	線幅の広がり ^c	化合物	炭素	δ_c	$T_1(s)$	緩和速度比 ^b	線幅の広がり ^c
1	C-2	153.2	17	1.0	m	2	C-2	158.6	6.7	1.0	m
	C-4	143.3	19	0.8	m		C-4	143.0	4.9	0.7	m
	C-5	119.1	17	0.0	l		C-5	111.0	0.4	d	l
2	C-2	165.6	75	1.0	m	3	C-6	169.8	6.5	0.4	s
	C-4	152.1	54	0.5	m		C-7	22.5	1.9	d	s
	C-5	113.1	8	0.0	l		C-8	37.2	0.2	d	s
	C-6	18.7	11	0.1	s		C-9	169.3	5.4	0.4	s
	C-7	16.7	10	0.2	s		C-10	77.7	4.1 ^e	e	
						C-11	140.1	9.5	0.0		

^a測定条件: Varian XL-100-12 NMR分光器 (25.16 MHz) にて, 30°C, CDCl₃-CD₃OH (4:1) 中, 濃度 0.5~2 mmol/L で 10mm 卵形チューブを用い, IRFT法にて測定した。FT条件はスペクトル幅 4800 Hz, 1ヘルズ掃過し時間 0.002s, T-9 実 16K。 δ_c と T_1 の誤差は表1脚註 a と同じ。 ^b C-2 の緩和速度を 1.0 としたときの値。 ^c 表1脚註 d と同じ。 ^d 誤差が大きい。 ^e シグナルの重なりのため測定値不確定。



シグナル幅の広がり, チアゾール環の炭素シグナルでは大きく, 側鎖の炭素シグナルでは小さい。Cu^{II} はチアゾールの窒素原子に配位し, そのシグナル幅の広がりにはコンタクト相互作用の寄与が大きいことが示唆される。また, これらの化合物の緩和速度比 (T_1 と Cu^{II} の濃度でプロットして得られた直線の勾配の比)^d を表2. に示したが, C-2 がもっとも大きく, C-5 はほとんど 0 であり, 側鎖の炭素の比が無視できない値を示していることは, T_1 に対して双極子-双極子相互作用の寄与が大きいことを示唆している。

Cu(acac)₂ によるシオマイシンAの¹³Cシグナルの T_1 およびシグナル幅の変化は表1. に示した。シオマイシンAのCDCl₃-CD₃OH中, 50°Cにおける¹³C T_1 は, 30ms~5.5s と幅広く, 水素をもった炭素 (特に T_1 が100ms以下のもの) は, その緩和速度比に誤差が大きく, 緩和速度比を求めることができなかったが, T_1 はほぼ変化ないとみなすこともできる。このような大きな分子 (分子量 1377) では, 水素をもった炭素は水素との双極子-双極子緩和が大きいから, 金属電子スピンによる緩和があまり影響しない⁴⁾ と考えることもできる。そこで, T_1 の変化は水素をもたない炭素シグナルについてのみ検討した。アミド類, チアゾール類の結果をもとにして, Cu(acac)₂ によるシオマイシンAの¹³C T_1 およびシグナル幅の変化を考察すると, Cu^{II} は主に Thz-1, P, Thz-3 残基の窒素原子に囲まれた部分に配位しており, また Thz-2 の窒素原子付近にも配位している確率が大きいと考えられる。これらの事実に基づいて, これまで不確定であった水素をもたない炭素シグナルの帰属をより明らかにすることができた。

[文献]

- 1) K. Tokura, et al., J. Antibiotics, 34, 800 (1981) および引用文献。
- 2) 松下・通・十倉・高山・照井・岡部・第19回NMR討論会講演要旨(1980)。
- 3) 例えは, D. Doddrell, et al., Austral. J. Chem., 28, 369 (1975)。
- 4) G. C. Levy and R. A. Komoroski, J. Am. Chem. Soc., 96, 678 (1974)。

(財サントリー-生物有機科学研) の岩下 孝, 直木秀夫,
吉岡日女子, 野本享資, (大阪薬大) 三野芳紀

[はじめに]

植物にとりて鉄は必須微量金属である。即ち鉄が欠乏した場合、葉の葉緑素含量が減少し、葉は黄色を呈し、生長は止まり、最後に枯死する。最近、我々は鉄欠乏下で栽培したイネ科植物のオオムギ (*Hordeum vulgare* L. var. *Minorimugi*) の根の浸出液より鉄キレート活性を持った新アミノ酸を単離し、ムギネ酸と名付けた。その構造はまのごとく説明した¹⁾。

その後、数種のイネ科植物から同様の活性を持つ化合物(ムギネ酸類と総称)を単離した²⁾。これらの化合物はイネ科植物の鉄の吸収・移動に重要な働きをしていると考えられる。

我々はムギネ酸-鉄錯体の性質を調べること及び、他のムギネ酸類の構造決定に役立たせることを目的に種々のムギネ酸-金属錯体について、NMRによる溶液中のコンホメーションの検討を行なった。

[実験]

試料は、重水溶液とし、無水の硫酸亜鉛及び炭酸コバルトを適宜加えた。測定にはNTC-360スペクトロメーターを用いた。

[結果]

ムギネ酸の銅(II)-錯体及びコバルト(III)-錯体に関しては、これらの錯体は結晶として得ることが出来たのでX線結晶解析を行なった。その結果はFig. 1に示すよう

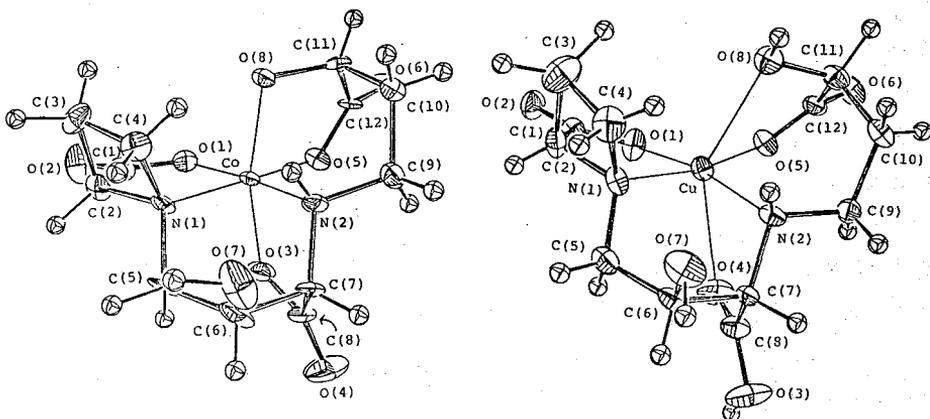
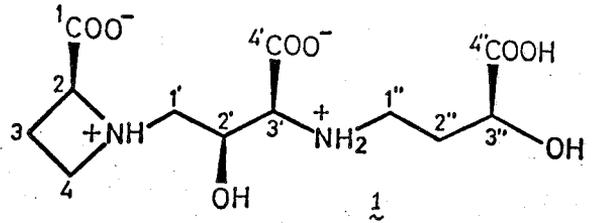


Fig. 1. Perspective drawings of mugineic acid-Co(III) and -Cu(II) complexes

Studies on Structures of the Metal Complexes of Mugineic Acids
(Suntory Institute for Bioorganic Research) of T. Iwashita, H. Naoki, H. Yoshioka, K. Nomoto
(Osaka College of Pharmacy) Y. Mino

な立体構造で示されることわかった。注目すべきことは、コバルト(III)-錯体の場合、結合距離と結合角度の若干異なる2種類の錯体が交互に並んで結晶を作っていることである。(ここではその一つを示した。)

我々はムギネ酸類及び、その反磁性金属との錯体の溶液中の構造を詳しく解析するために2次元J分解法を用いて検討した。しかし、通常の2次元J分解法では水のピークのような大きなシグナルがあると、それが強調され全領域にわたって影響を及ぼしてしまふ。そこで水(H₂O)のピークをデカップラーで飽和させながら2次元J分解法を

用いることにより、この困難を克服することが出来た。

(Fig. 2参照)

はじめに、2価の金属として亜鉛を選び、実験を行った。まず、ムギネ酸に対して1当量の

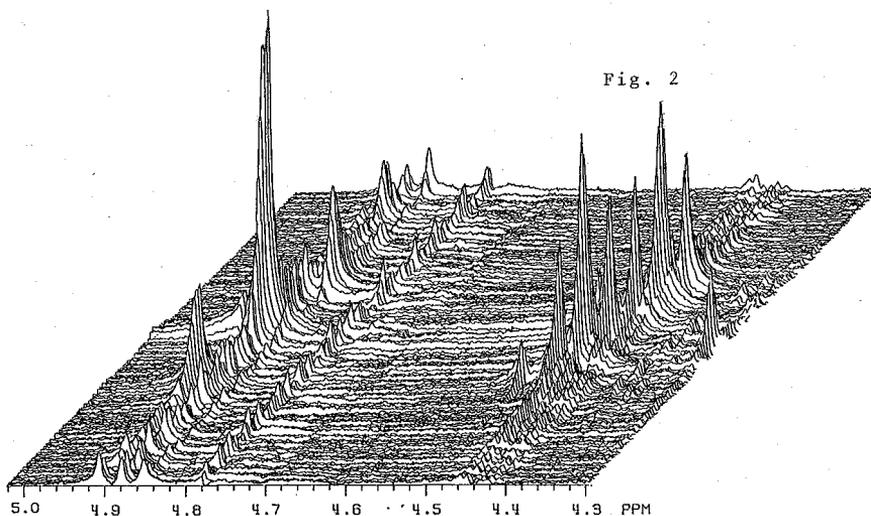


Fig. 2

硫酸亜鉛を加えたところ、

Fig. 3 b)に示すようなシフトが見られた。

さらに、ムギネ酸に対して0.5当量の硫酸亜鉛しか加えなかった場合、ムギネ酸自身のスペクトルと上記のムギネ酸-亜鉛錯体のスペクトルの重ね合せとなった。

(Fig. 3 c)) このことは、ムギネ酸-亜鉛錯体は溶液中でrigidな構造を持つことを示している。またC-1'位のプロトンとC-3'位のプロトンとの間にW型のロングレンジカップリングが見られること、及び

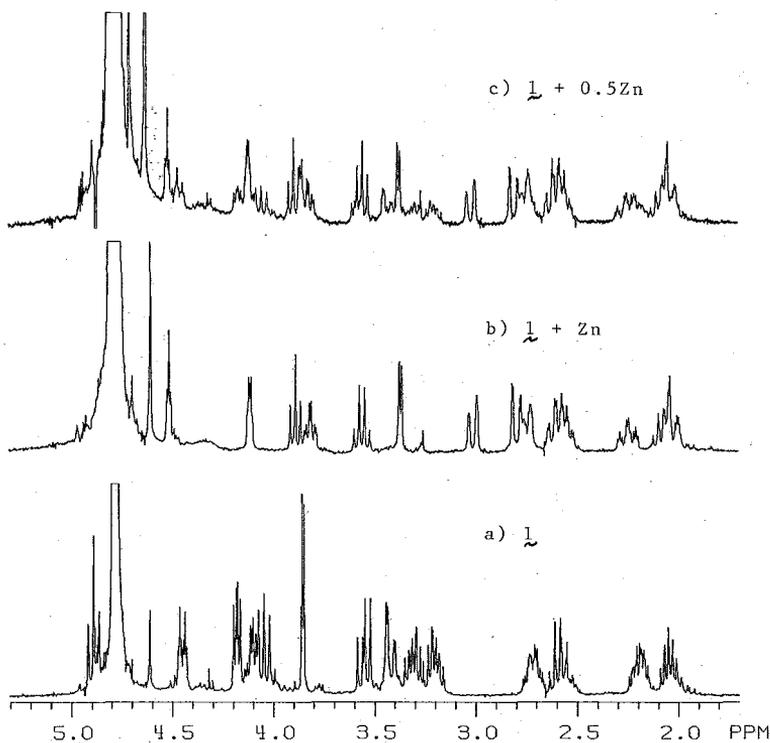


Fig. 3

c-3'位のプロトンがトリプレットとして表われることから、亜鉛錯体は銅錯体の場合と同じコンホメーションを取っているものと考えられる。一方コバルト(II)を用いて合成したムギネ酸-コバルト錯体について検討した。Fig. 4に示すようにコバルト錯体では亜鉛錯体とはやや異なるシフトの仕方をしていいるプロトンがある

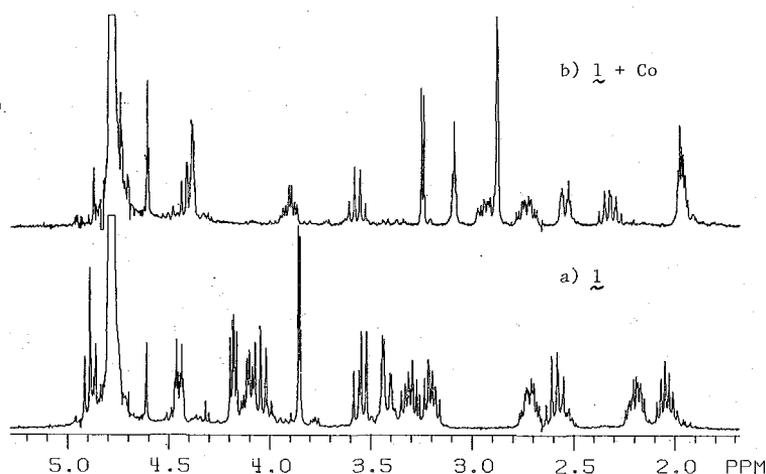
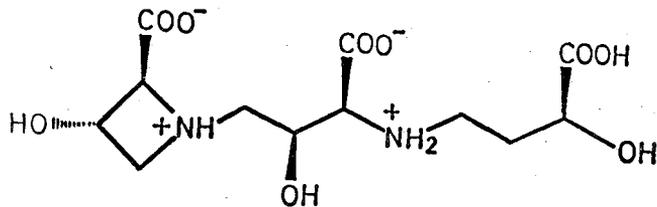
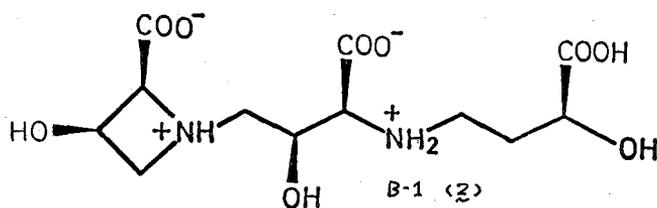


Fig. 4

がc-3'位のプロトンは亜鉛の場合と同様トリプレットとして観測され、ほぼ同様の



コンホメーションをとっているものと考えられる。ただし、結晶状態と異なり、溶液中では一種類の錯体のみ存在している。

次にビール麦 (*Hordeum vulgare* L. var. *distichum*)

の根の分泌液から得たB-1と仮称している化合物の構造決定を試みた。B-1(2)はFD-MSで親イオンが検出にくかったことであって、その分子式が決定される。またそのものの360MHzの

¹H-NMR スペクトルにおいてピアセチチン環の存在がはっきりせず、その構造が決定出来なかった。しかしB-1及び、先に構造決定されている3-ヒドロキシムギネ酸(2)、ムギネ酸(1)について亜鉛錯体とmetal freeの場合のシフトを比較してみた

Table 1. Shift Value of Metal Complexes of Mugineic Acids

Carbon No.	2	3 α	3 β	4 α	4 β	1' α	1' β	2'	3'	1''	2''	3''
1 + Zn	1.00	0.50	0.16	0.47	0.28	0.54	0.62	0.34	0.48	0.61, 0.56	0.02, -0.04	-0.34
2 + Zn	1.01	0.49	-	0.48	0.24	0.62	0.58	0.32	0.50	0.64, 0.59	0.07, 0	-0.16
3 + Zn	0.96			0.52	0.24	0.51	0.60	0.53	0.49	0.65, 0.57	0.09, 0	-0.12
1 + Co	0.48	0.26	-0.02	0.46	0.20	0.67	0.54	0.07	0.61	0.67, 0.37	0.08, 0.24	1.08

This table shows differences between mugineic acids and their metal complexes(ppm).

ニろ、Table 1に示すように、アセチレン環部分以外は、まったく同じシフトの仕方
 している。また、アセチレン環部分についても大筋では同じシフトパターンを示
 している。そこでB-1についてはアセチレン環のC-3位に水酸基のついた化合物と
 考えると合理的であり、しかも3-ヒドロキシニムギネ酸とその水酸基の立体配置が逆
 であるときわめてよく説明できる。ことがわかり、その構造を決定することが出来た。
 (Fig. 5)

〔考察〕

以上、NMRによる検討の結果
 ムギネ酸の亜鉛錯体、ユビルト
 (Ⅲ)錯体及び他のムギネ酸類と亜
 鉛との錯体は溶液中でも一部
 のものの結晶構造と同様の四面
 体構造を持っているものと考え
 られ、鉄(Ⅱ及びⅢ)でも同様の構
 造を取っていることが示唆され
 る。またムギネ酸類の構造解析
 において、半磁性金属との錯体
 をつくる方法が非常に有用であ
 ることがわかった。

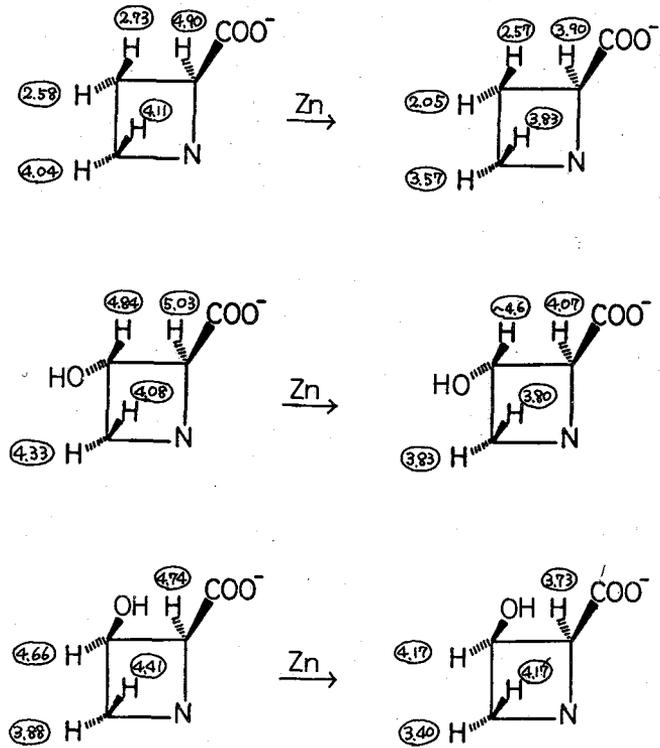


Fig. 5

〔文献〕

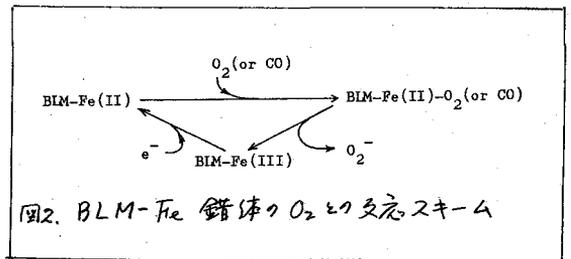
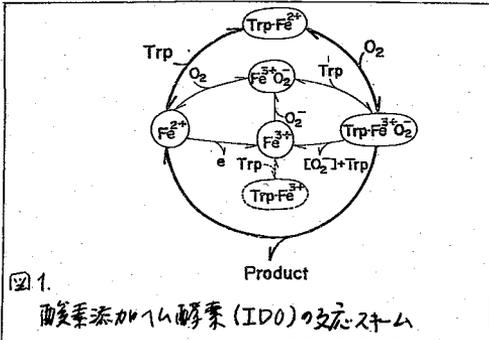
- 1) T. Takemoto, K. Nomoto, S. Fushiya, R. Ouchi, G. Kusano, H. Hikino, S. Takagi, Y. Matsuura, and M. Kakudo, Proc. Japan Acad., 54, B, 469 (1978)
- 2) a) 野本享資, 吉岡日女子, 竹本常松, 伏谷真二, 野副重男, 高城成一
 第22回天然有機化合物討論会講演要旨集 pp 619-626 (1979)
 b) S. Fushiya, Y. Sato, S. Nozoe, K. Nomoto, T. Takemoto, and S. Takagi,
 Tetrahedron Letters, 21, 3071 (1980)
 c) 野本享資, 吉岡日女子, 竹本常松, 高城成一, 日本薬学会101年会講演要
 旨集 p 518 (1981)
- 3) a) K. Nomoto, Y. Mino, T. Ishida, H. Yoshioka, N. Ota, M. Inoue, S. Takagi,
 and T. Takemoto, J.C.S. Chem. Commun., 338 (1981)
 b) 野本享資, 吉岡日女子, 竹本常松, 三野芳紀, 石田寿品, 太田長世,
 井上正敏, 杉浦幸雄, 田中久, 第24回天然有機化合物討論会発表(1981)

(京大・工) 森島 績

(微化研) 滝田 智久, 梅沢 栄夫

1. 序

制がん作用を有するブレオマイシン(BLM)は銅錯体として単離されるが、生理活性発現にはFe(II)イオンとO₂が必要で、BLMの脱銅体とFe(II)とが錯体を形成し、これにO₂が配位してこれを活性化し、この活性化した酸素種がDNAの切断を行うとされる。このBLM-Fe(II)錯体の酸素活性化機能は、酸素添加酵素とよばれ、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)などの酵素と類似点があり、その活性中心であるヘム近傍の構造の特殊性との関連において、BLM-鉄錯体構造



を議論することは極めて興味あると考えられる。森島らは一連の酸素添加酵素の活性部位近傍の構造をNMRを用いて研究しているが、今回上述の興味からBLM-Fe錯体の構造とくに鉄イオンの配位子の結合の特徴について知見を得るために、BLMおよびその誘導体の鉄錯体(Fe(II)およびFe(III)錯体)のNMRの研究を行った。

BLM-Fe錯体の構造については形浦らのESRの研究から図4のモデルが、OppenheimerらはNMRから、軸配位子としてmannoseのカルバモイル基酸素が配位して

NMR Studies of Bleomycin-Iron Complexes(Kyoto Univ.)

I. Morishima

T. Takita and H. Umezawa

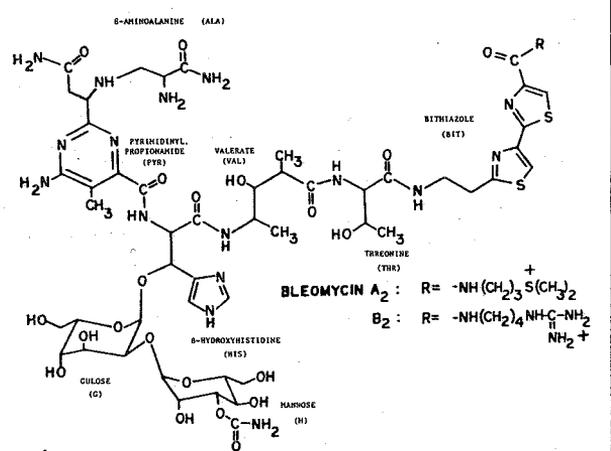
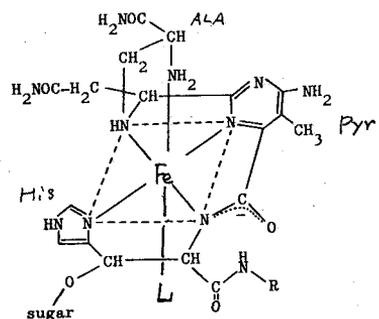


図3. ブレオマイシンの構造

図4 → ブレオマイシン-鉄錯体のモデル構造



1) とし、GlicksonらのNMRの結果もこれを支持している。³⁾ 一方Guptaらは、⁴⁾ BLM- Mn^{2+} の¹H NMR緩和時間の測定から図5に示すように、ピコゾール環の窒素が配位している構造を提案しており、不一致点が多い。本研究では種々のフェロマイン誘導体を用いたものの鉄(II)および鉄(III)錯体の常磁性NMRスペクトルの比較からこれらの構造を検討した。またヘム酵素との比較の意味で、ヘム鉄の軸配位子として通常用いられる CN^- 、アミン、イミダゾールなどのBLM-Fe錯体への配位状態を検討した。

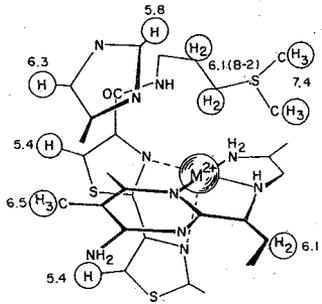


図5. GuptaらのBLM- Mn^{2+} 錯体の構造

2. 実験

1:1 BLM-Fe(II)錯体は O_2 -free条件下でBLM溶液(H_2O 又は D_2O)に $FeSO_4$ を加えて調製した。BLM-Fe(III)錯体はBLM溶液に $Fe(III)$ イオンを加えることにより得た。他の誘導体のFe錯体についても同様に行った。¹H NMR測定にはVarian HR-220 (又はNicolet NT-300 (300MHz))を用い、 H_2O 溶液ではlow-power presaturation法を用いた。

3. 結果および考察

(A) BLM-Fe(II,III)錯体への外部配位子の効果

図6(A)はBLM-Fe(II)錯体の¹Hスペクトルで、鉄(II)の高スピン($S=2$)状態の常磁性により大きな常磁性シフトが観測される。軽水中では67ppmにHisのNHプロトンシグナルが現われ、これはヘムのprox. His N-Hシフトと同じ位置である。

6(B)は(A)に CN^- イオンを添加したときのスペクトルで、同じFe(II)高スピン状態にあると考えられ、ヘムではFe(II)状態に CN^- が配位しないことを比べて極めて特徴的である。⁵⁾ これらの錯体はCO添加によるdiamagnetic Fe(II)低スピン($S=0$)体になることから CN^- が軸配位子(図4のALA-MH)と置きかえられたと考えられる。

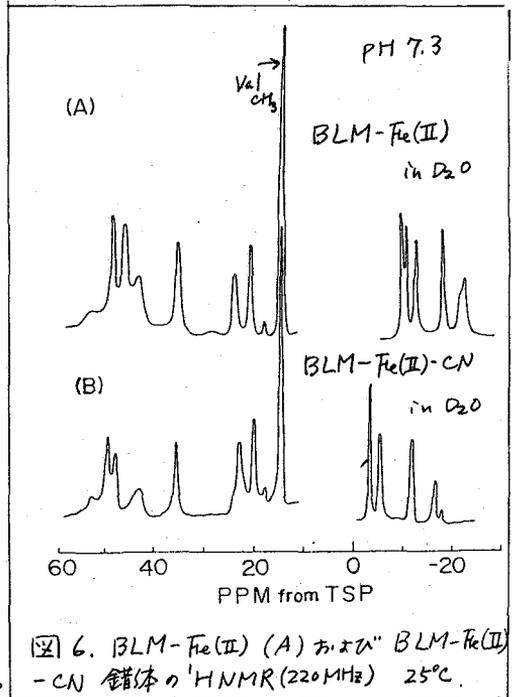


図6. BLM-Fe(II) (A)およびBLM-Fe(II)- CN^- 錯体の¹H NMR (220MHz) 25°C.

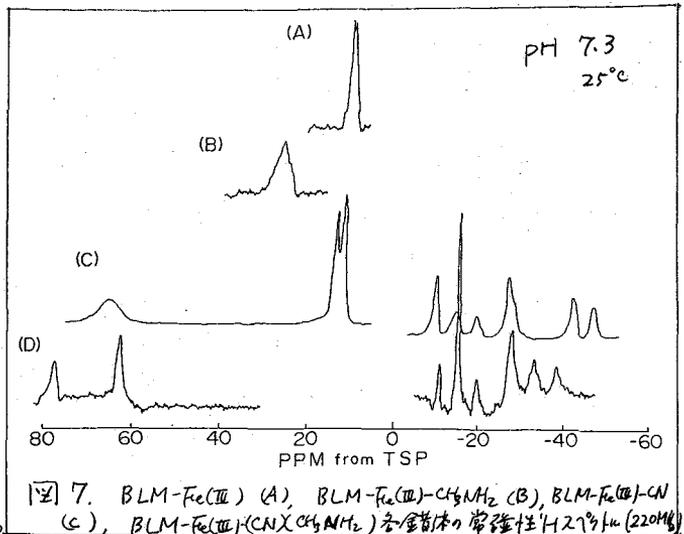


図7. BLM-Fe(III) (A), BLM-Fe(III)- CH_3NH_2 (B), BLM-Fe(III)- CN^- (C), BLM-Fe(III)- $(CN)CH_3NH_2$ 各錯体の常磁性¹H NMR (220MHz)

一方 BLM-Fe(II) は α 存在下 CN 添加により D N A 切断が促進されること最近に
 明らかにされた。この事実も上述の N M R による BLM-Fe(II)-CN 錯体形成の確
 認から妥当だと考えられる。酸素添加酵素 4 トロム p-450 の軸配位子が 4 オールア
 ニオン (RS⁻) であることと考えると酸素活性化には電子供与能の高いアニオンが塩基性
 の残リリガンドが軸配位子として有効であろうと思われ。鉄(II) 高スピン状態は E
 S R 法では検出できないので、N M R 法がこのような実験に役立つ有用な手段となる
 。 図 7 は BLM-Fe(III) 錯体の N M R スペクトルを示す。

pH 7.3 では BLM-Fe(III), BLM-Fe(III)-M₂CH₂ とともに小まな
 常磁性シフトを示し低スピン ($S=1/2$) 体を形成する (E S R
 から確認された) が、BLM-Fe(III)-CN では高スピン
 体 ($S=5/2$) に特徴ある大きな常磁性シフトを示し、前述
 の BLM-Fe(III)-CN と同様、CN⁻ が内部配位子と置換した
 ものと考えられる。この CN 錯体は CH₂M₂ を配位させ
 ても (図 7(D)) 高スピン体のスペクトルを示し μ 錯体
 とは著しく異なる。

BLM-Fe(III) 錯体の N M R スペクトルは著しい pH 依存
 性を示し (図 8), pH 6 以下では 50 ppm 付近にシグナル
 があるが、中性、アルカリ領域では消失する。即ち酸
 性側では高スピン体、中性、アルカリ性では低スピン体
 あるいは低スピン体とわずかな量の高スピン体の混合
 物となることと推定される。この酸-アルカリ転移は、
 N M R スペクトル変化が属し交換に基づくものであること
 から、軸配位子の交換に由来しているものと解釈される。

図 9, 10 は BLM-Fe(III)-CN 錯体の ¹H N M R スペクトルの pH 依存性を示す。軽水中
 での測定から図 9(A) の矢印のピークが exchangeable proton によるもので、低磁場側
 136 ppm のピークは His N₁-H によるものと推定される (Fe(III) 高スピン状態の μ
 蛋白質の
 prox. His の
 NH 70 以上は
 90~100 ppm
 にありわかれ
 る)。この
 BLM-Fe(III)-CN
 錯体の N M R
 スペクトルの
 pH 依存性の
 特徴は、BLM
 -Fe(III) 錯体の
 変化は要す

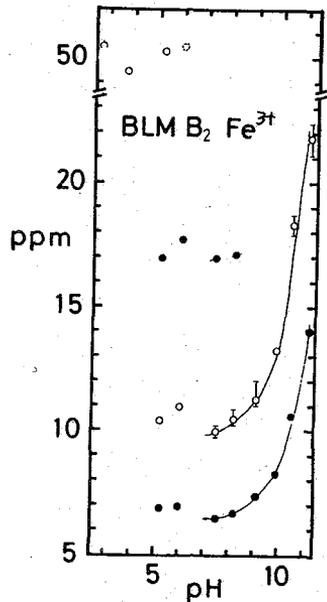


図 8. BLM-Fe(III) N M R
 スペクトルの pH 依存性

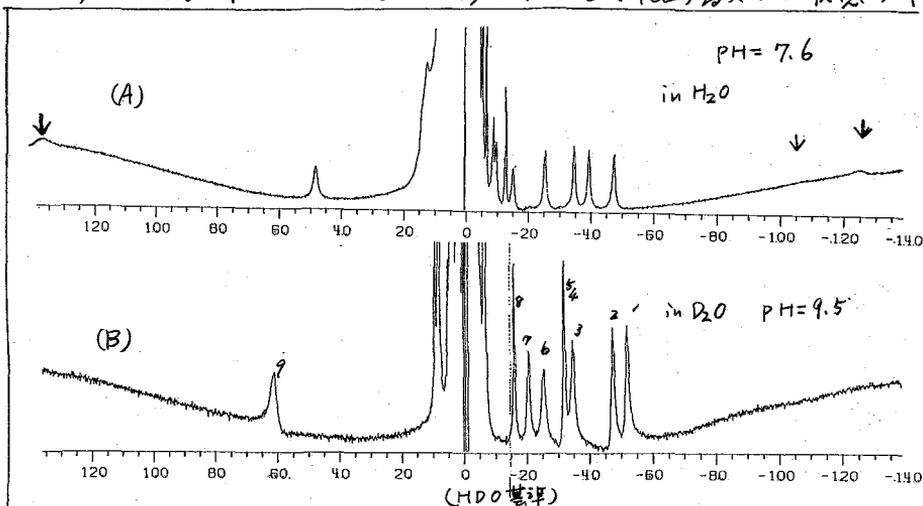


図 9. BLM-Fe(III)-CN 錯体の ¹H N M R スペクトル (300 MHz).
 (A) in H₂O, pH 7.6 (B) in D₂O, pH 9.5. ↑印は軽水中で中和した β - γ .

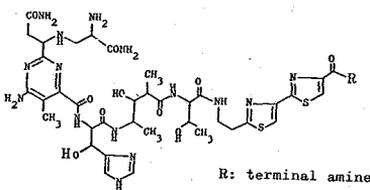
り、連続的に3つとしていいる点がある。従って
 NMR時間スケールより速い配位子交換を考
 えるが、*aqua met Mb* には、 $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ の酸-
 アルカリ転移 $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+} \xrightleftharpoons[\text{+H}^+]{\text{-H}^+} \text{Fe}(\text{OH})_5^{2+}$
 と類似している。図10から得られる $\text{pK} \sim 8.9$
 は *met Mb* のそれ ($\text{pK} \sim 9.1$) と極めて類似
 しており、

$\text{BLM-Fe}^{3+}(\text{CNX}\text{H}_2\text{O}) \rightleftharpoons \text{BLM-Fe}^{2+}(\text{CNX}\text{OH})$
 の酸-アルカリ平衡が起ることを解釈さ
 れる。

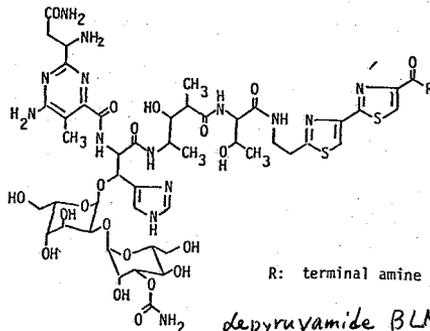
以上の結果を3つに於ける ESR の結果を
 総合すると、軸配位子としてカルボキシル基の
 酸素の極力弱い配位子が鉄に結合している可能
 性が少なく、図4のモデルが妥当を考へる。

(B) 糖々の BLM 誘導体と鉄イオンとの錯体

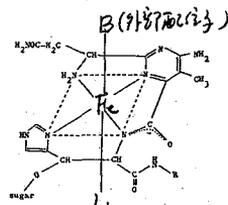
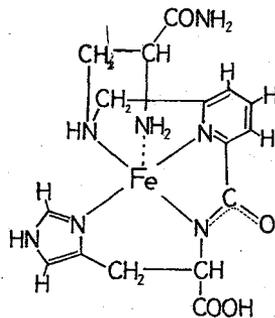
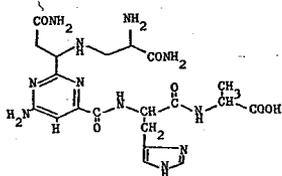
BLM-Fe 錯体の配位構造をさらに確かめる
 ために糖部のない Aglycon BLM, depyruvamide
 BLM (dep BLM) (BLM の ALA の部分のないもの)、
 P3A と呼ばれる誘導体、それぞれ下記のモデ
 ルに示すように



Aglycon Bleomycin (aglycon BLM)

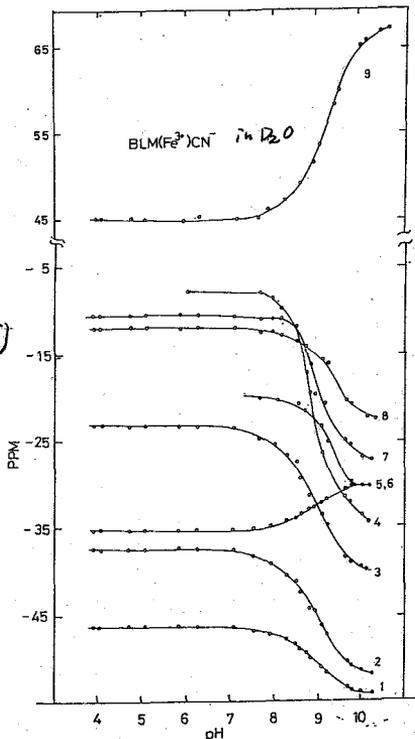


depyruvamide BLM (dep BLM)



dep BLM-Fe 錯体

図10. BLM-Fe(II)-CN 錯体のH 常磁性
 への対外的 pH 依存性。



に示すように
 この鉄-錯
 体の常磁性
 H スペクト
 ルを測定し、
 3つのモデ
 ルのうち
 図4の
 モデルの
 妥当性を
 検討した。

[付記] 本研究の一部(京大薬)杉
 浦氏との共同研究によるもので
 ある。

[文献]

- 1) Y. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5208 (1980).
- 2) N. J. Oppenheimer, L. O. Rodriguez, S. M. Hecht, *P. M. A. S.*, **71**, 5-616 (1979)
- 3) B. B. R. c., **96**, 341 (1980); 4) J. B. c., **256**, 1242 (1981); 5) Y. Sugiyama, S. Ogawa, I. Morishima, *JACS* **102**, 7764 (1980)

