

# 第22回 N M R 討論会

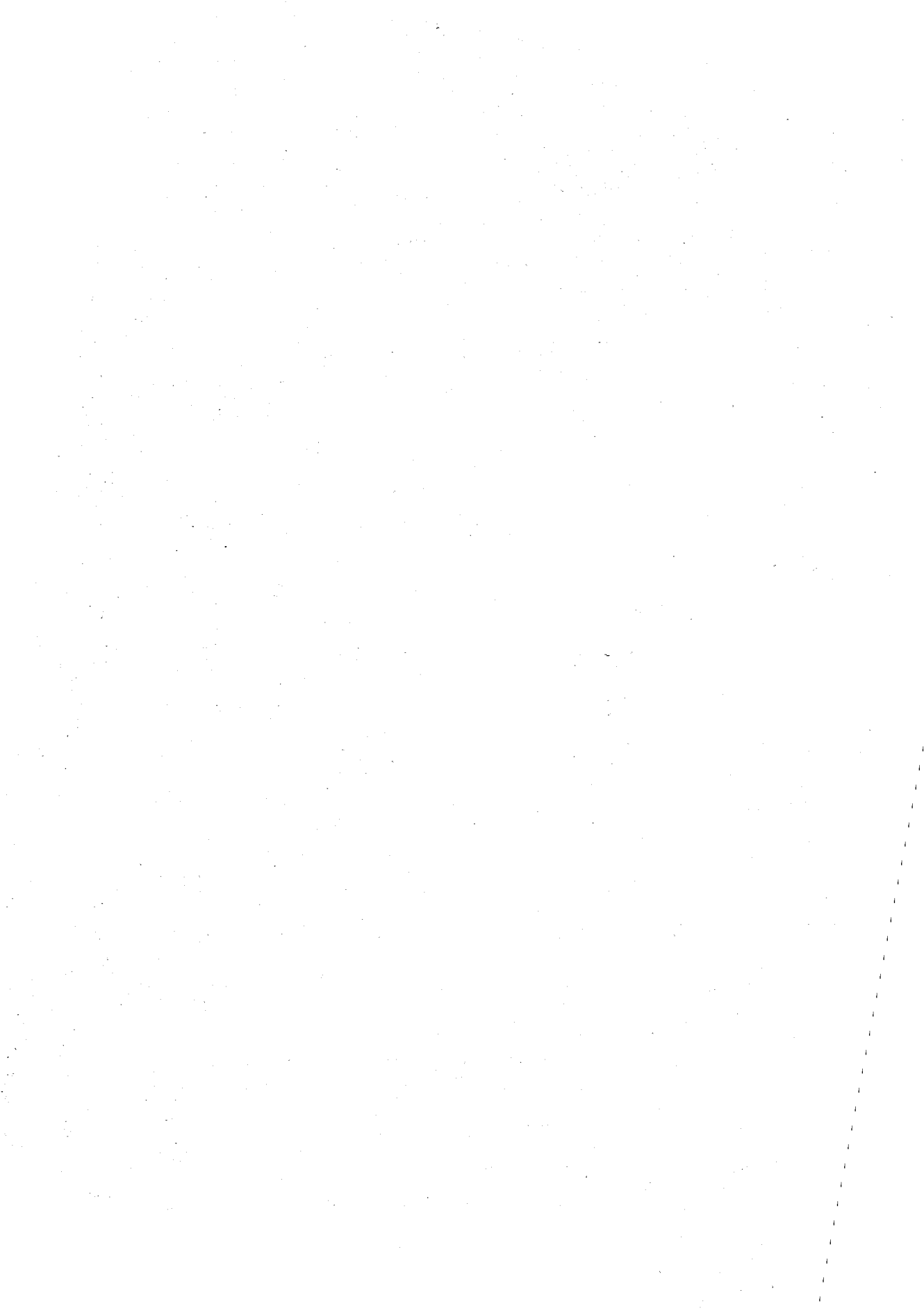
## 講演要旨集

1983年11月14日(月)・15日(火)・16日(水)

京都大学薬学部講堂

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



# 第 22 回 N M R 討 論 会

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

日 時 昭和58年11月14日(月)，15日(火)，16日(水)

会 場 京都大学薬学部講堂

## プ ロ グ ラ ム

第 1 日 (11月14日，9:00~18:04)

—(9:00~10:48)—

1. 高圧下で  $^{14}\text{N}$ -NMRを観測するための耐圧プローブの試作  
(和洋女子大，筑波大\*) ○矢野良子・伊藤聖子\* ..... 1
2. 小型温度可変MASプローブの試作  
(徳島大工短) 多木敏彦 ..... 3
3. マイクロNMRイメージング  
(電総研) ○亀井裕孟・片山義朗 ..... 7
4. 2次元NMRにおける擬フィルター  
(日本電子) ○永山国昭・百名一男・梅田雅宏 ..... 10
5. 4級炭素による水素核間の長距離相関  
(日本電子) ○永山国昭・栗原範明・鴨 修 ..... 14
6. 構造解析のためのSPT差スペクトル法の改良  
(理 研) ○鶴沢 洵・柴田俊之 ..... 18
7. Switching - angle sample spinning NMR spectroscopy による  $^{13}\text{C}$  化学シフト異方性の分離測定  
(京大理) 寺尾武彦・○小野寺尚・藤井 拓・雑賀亜幌 ..... 22

— (11:00~12:00) [特別講演 I.] —

8. 多量子NMRの基礎と応用  
(阪大薬) 藤原英明 ..... 26

— (13:30~15:30) —

9. セルロース固体のCP/DD/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR  
(京大化研) 平井諒子・堀井文敬・北丸竜三 ..... 30
10. CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMRによるポリアクリロニトリル繊維の耐炭化過程の研究

- (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. 天然鉱物の  $^{29}\text{Si}$ -MAS NMR.  $^{29}\text{Si}$  スピン格子緩和時間および線巾に及ぼす常磁性不純物の影響  
(東大理, 国立ガンセンター\*) ○渡部徳子・清水 洋  
増田彰正・斎藤 肇\*  
多部田涼子\* ..... 38
12. 銅化合物の  $^{63}\text{Cu}$  固体高分解能 NMR  
(日本電子, 三菱製紙感材研\*) ○出口健三・松下和弘・藤戸輝昭・遠藤一央\*  
山本京之介\*・井口恵介\* ..... 42
13.  $\text{Mo}(\text{CO})_6/\gamma$ -アルミナ触媒上モリブデンカルボニル化学吸着種の固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR  
(東大生研, イリノイ大\*) ○篠田純雄・M.A.Keniry\*・T.L.Brown\*  
H.S.Gutowsky\*・E.Oldfield\* ..... 46
14. Magic Angle Spinning 下での  $^{13}\text{C}$  スピン-格子緩和時間  
(ブリティッシュコロロンビア大, 京大理\*) 内藤 晶・S.ガナパティ  
○赤坂一之\*・C.A.マクダウエル ..... 50
15.  $\text{SO}_3$  ドープしたポリ(p-フェニレンサルファイド)の磁気共鳴  
(中央大理工, 日本合成ゴム\*) 風間重雄・○荒井宏一\* ..... 54  
—— (15:40~18:04) ——
16.  $\text{Mg}_2\text{NiH}_4$  における相転移と水素の運動  
(化技研) ○林 繁信・早水紀久子・山本 修 ..... 58
17. ハロゲン化 n-ブチルアンモニウム結晶の相転移と分子運動  
(名大理) 深田晋一・○池田龍一・中村大雄 ..... 62
18. 陽子共鳴による固体中のメチル回転の研究  
(阪大理) ○山本泰生・千原秀昭 ..... 66
19. 複素結合-結合分極率の複素積分表示  
(明治薬大) 溝口則幸 ..... 70
20. ポリペプチド, 蛋白質の  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR スペクトル. コンホメーション依存  $^{13}\text{C}$  シフトの理論的意義  
(東工大, 国立ガンセンター\*, 群馬大工短\*\*) ○安藤 勲・山延 健・斎藤 肇\*  
多部田涼子\*・荘司 顕\*\*・尾崎拓男\*\* ..... 74
21.  $\text{H}_3\text{O}^+$  及び  $\text{OH}^-$  イオンの化学シフトの計算  
(北見工大) ○福井洋之・三浦宏一・多田富美穂 ..... 78
22. 金属錯体の金属 NMR ケミカルシフトに関する理論的研究  
(京大工) ○諫田克哉・中辻 博・米沢貞次郎 ..... 82



第 2 日 (11月15日, 9:00~18:00)

— (9:00~10:36) —

23. クロム(Ⅲ)錯体の<sup>2</sup>H NMRスペクトル  
(奈良女理, ワシントン州立大\*) ○海崎純男・J.I.Legg\* ..... 87
24. 二, 三のπ荷電分子のNMRと電子密度分布  
(茨城大理, 名工大\*) ○平山昌甫・小祝和彦・竹村和美  
高橋憲助\* ..... 91
25. RnSi(R'O)<sub>4-n</sub>型シランの<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>29</sup>Si-ランタニドシフト——Ln(fod)<sub>3</sub>への配位構造と  
スピン密度分布  
(茨城大理) 平山昌甫・○荒井寿一 ..... 95
26. ランタニドイオンの存在下におけるアミノ糖の<sup>1</sup>H-および<sup>13</sup>C-NMRスペクトル  
(京工繊大工芸) 泉 邦彦 ..... 98
27. 縦緩和時間(T<sub>1</sub>)の構造決定への応用  
(三 共) ○春山英幸・近藤三千男 ..... 102
28. <sup>1</sup>HT<sub>1</sub>及びNOEによるLeukotriene系化合物の構造解析  
(アルバータ大, Merk-Frosst Canada\*) ○杉浦眞喜子  
H.Beierbeck・G.Kotovych・P.Belanger\* ..... 106
29. 二次元NMRによる天然物の構造解析  
(東レリサーチセンター, 曾田香料\*) ○稲垣冬彦・阿部 明  
塩谷 泉・松浦佑次\* ..... 110
30. 二次元NMRによるフラノジテルペンの構造解析  
(エーザイ) ○川上善之・永井泰志・根津征夫  
里 忠・国井敏信・影井健吾 ..... 114
- (10:50~11:50) —
31. ポルフィリンπカチオンラジカルのNMR  
(京大工) ○城 宣嗣・高向保彦・森島 績 ..... 117
32. Cd-113 NMRの錯体化学への応用  
(近畿大理工) ○宗像 恵・北川 進・八木富士夫 ..... 121
33. <sup>63</sup>Cu NMRを用いた銅(Ⅰ)錯体の研究  
(近畿大理工) ○北川 進・宗像 恵・植田恭司 ..... 125
34. Cu(Ⅰ)化合物の水溶液および固体の<sup>63</sup>Cu-nmr  
(三菱製紙, 日本電子\*, 京大工\*\*) ○山本京之介・遠藤一央・出口健三\*  
松下和弘\*・諫田克哉\*\*・中辻 博\*\* ..... 129
35. 有機ゲルマニウム化合物のNMR(Ⅱ) ゲルマン誘導体  
(東大教養, 浅井ゲルマニウム研) ○竹内敬人・友田修司・柿本紀博 ..... 133

36. NMRパラメータの計算方法  
 (京大理) 雑賀重幌 ..... 136
- (13:45 ~ 14:45) —
37. CO/H<sub>2</sub> 高压ガス下での Rh カルボニル・クラスターの動的構造変化の研究  
 (阪大教養, ケント大\*) ○江口太郎・B.T.Heaton\* ..... 142
38. 超臨界域における有機液体の核磁気緩和と自己拡散係数の測定(2) シクロヘキサン, メチルシクロヘキサン  
 (北大工) ○下川繁三・山田英二 ..... 146
39. A<sub>3</sub>A<sub>3</sub>' スピン系の液晶中の配向について  
 (名工大) ○斎藤公児・野崎宗一・服部枝実  
 吉野明広・吉田忠義・高橋憲助 ..... 150
40. リン脂質二層膜系における <sup>14</sup>N緩和時間とその周波数依存性  
 (九大薬, 日本電子\*) ○金沢洋子・古賀けい子  
 松下和弘\* ..... 154
41. New Approach to Carbon-13 Additivity Parameters  
 (Mosul大) Yousif Shahab ..... 158
- (15:00 ~ 18:00) —
42. 1,8-ビストリアゾリルナフタレン誘導体のプロトネーション  
 (化技研) ○中西洋志・名川吉信・本田皓一  
 矢部 明・山本 修 ..... 163
43. <sup>31</sup>P, <sup>1</sup>H NMRによる定量測定(N-アルキルピリジニウム塩の逆メンシュトキン反応)  
 (阪大産研) 沢田正実・○高井嘉雄・張 中  
 三角壮一・花房昭静 ..... 167
44. 溶液の構造とNMR  
 (千葉大理) ○藤原鎮男・西本右子 ..... 171
45. 分子間相互作用と<sup>1</sup>H NMR溶媒シフト  
 (電通大) ○仁木国雄・中川直哉 ..... 175
46. 置換基エントロピー定数  $\sigma_s$  とNMR化学シフト  
 (阪大薬) ○高井 均・徐 素蘭・廉 貞祿  
 佐々木喜男 ..... 179
47. 構造情報を含む<sup>13</sup>Cスペクトル・データベース新AUREOLAシステム  
 (化技研) ○山本 修・早水紀久子・柳沢 勝 ..... 182
48. タンパク質の水和(3) 凍結変性防御物質共存下での水和特性  
 (北大低温研) 花房尚史 ..... 186

49. 光CIDNP測定装置の設営と生体物質への応用  
 (阪大蛋白研) ○林 文晶・小林祐次・阿久津秀雄・京極好正 .....190
50.  $^{19}\text{F}$ -NMRによるステロイド-アルブミン相互作用の研究  
 (京府医大) ○西川弘恭・瀬尾芳輝・長谷川武史 ..... 194
51. タンパク質の重水素共鳴, SSIのヒスチジン  
 (京大理) 赤坂一之・井上智子・波多野博行 ..... 197
52. 大腸菌りん脂質極性基の特異的重水素ラベルと $^2\text{H}$ -NMRによる解析  
 (阪大蛋白研, 国立予防衛生研\*) ○吉川 渉・阿久津秀雄  
 京極好正・赤松 穰\* ..... 199
53. 高配向DNAの固体 $^{31}\text{P}$  NMRの線形解析と分子運動  
 (東京薬大, 阪大\*) ○神藤平三郎・松本 潮・藤原敏道\*  
 阿久津秀雄\* ..... 203
54. 光合成細菌クロマトホアの固体および溶液における $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル  
 (東北大非水研, 東大理\* 都立大理\*\*) ○野沢庸則・西村充司・簇野昌弘  
 林 秀則\*・嶋田敬三\*\* ..... 207

第 3 日 (11月16日, 9:00~17:00)

— (9:00~10:24) —

55. ポリペプチド, 蛋白質の $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMRスペクトル。コンホメーション依存 $^{13}\text{C}$ シフトの実験的意義  
 (国立がんセンター, 群馬大工短\*, 東工大\*\*) ○斎藤 肇・多部田涼子・荘司 顕\*  
 尾崎拓男\*・安藤 勲\*\* ..... 211
56. 絹フィブロインの $^{13}\text{C}$  NMR  
 (農工大工) 朝倉哲郎・渡辺安朗・鈴木 浩・内田あかね ..... 215
57.  $^{13}\text{C}$  NMRによるヒストンH5とH1の球状構造形成因子の比較  
 (東京薬大, 放医研\*) ○清水光弘・神藤平三郎・松本 潮  
 座間光雄\*・三田和英\* ..... 219
58.  $^{13}\text{C}$ -NMRによる蛋白質の構造研究—SSI-Subtilisin BPN' 複合体における活性部位の構造  
 (味の素中研, 都立大理\*) ○辻 尚志・甲斐荘正恒\* ..... 223
59. 制限回転拡散モデルと $^{13}\text{C}$ 磁気緩和—リゾチームの内部運動解析への応用—  
 (阪大蛋白研, 東大理\*) ○藤原敏道・永山国昭\*・中沢 隆  
 小林祐次・崎山文夫・京極好正 ..... 227

— (10:40~11:52) —

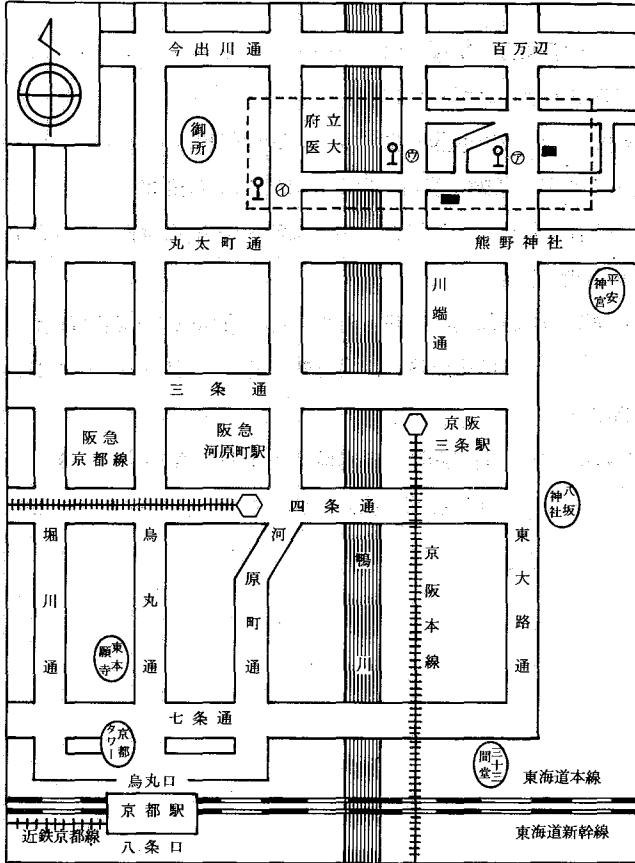
60. CCKオクタペプチドとそのアナログの二次元NMRによる構造研究

	(生理研, 東大理*) ○中沢 隆・肥塚 泉・亘 弘 志賀 潔・矢内原昇・永山昭* .....	231
61. 神経毒蛋白の構造と機能——二次元 NMR による解析——	(東レリサーチセンター) 稲垣冬彦 .....	235
62. リン脂質二重膜に結合したペプチドのコンホメーション解析: Transferred NOE の応用	(東大理) 若松 馨・東島 勉・○宮澤辰雄 .....	239
63. 400 MHz $^1\text{H}$ -NMR による抗腫瘍多糖類の高次構造	(味の素中研) ○鈴木栄一郎・安東藤江・藤川昌男 永嶋伸也 .....	243
—— (13:30 ~ 15:30) ——		
64. saturation transfer 差スペクトルと線形解析による蛋白質の $^1\text{H}$ NMR における化学交換の研究	(北大理) ○伊倉光彦・美野輪治・平沖敏文 矢沢道生・八木康一・引地邦男 .....	247
65. $^1\text{H}$ NMR による免疫グロブリンの高次構造の研究	(東大理, 母子医療センター*) 遠藤聡史・○荒田洋治 清水 章* .....	251
66. 分子内および分子間核 Overhauser 効果のクロロプロマジンとレシチン vesicle との相互作用の研究への応用	(京大薬, 京都薬大*) ○黒田義弘・北村桂介* .....	255
67. 部分測定のためのコイル形状とその特性の研究	(新潟大脳研, 日本電子*) 湯浅龍彦・桑原武雄・江口恵二* ○梅田雅宏*・小川秀次郎* .....	259
68. SSFP 法とスピネコー法とを用いたイメージング法の比較検討	(日立中研, 日立那珂*) ○山本悦治・松井 茂・黒田正夫 塩野英己・河野秀樹・津田宗孝* .....	262
69. マウスのプロトン NMR イメージング——脳梗塞の検出	(日立中研, 東北大医*) ○松井 茂・山本悦治・黒田正夫・塩野英己 河野秀樹・大友 仁*・加藤宏之*・小暮久也* ...	266
70. NMR による病態解析 (IV) 遅延型アレルギー反応巣の解析	(熊本大医) 山崎政城 .....	269
71. $^1\text{H}$ および $^{31}\text{P}$ -NMR による P5' N 欠損赤血球の解析	(熊本大医短, 熊本大医*) ○檜垣 強・鍵本 忠*・永田浩一*・柵瀬純男* 森野能昌*・高月 清* .....	273
—— (15:48 ~ 17:00) ——		
72. $^{31}\text{P}$ NMR による筋収縮の研究 —— 高エネルギー磷酸結合の収縮後分解 ——		

	(大分医大) ○山田和廣・田之倉優 .....	277
73. 植物細胞の <sup>13</sup> C, <sup>31</sup> P-NMR		
	(国立公害研) ○三森文行・伊藤 治 .....	281
74. 水溶性シフト剤を用いた <sup>1</sup> H-, <sup>23</sup> Na-NMRの生体試料への応用		
	(京府医大) ○西川弘恭・成瀬昭二・瀬尾芳輝 .....	285
75. glucocorticoid 投与条件下軟骨細胞内エネルギー代謝の環流下 <sup>31</sup> P-NMRによる研究		
	(京府医大) ○日下義章・西川弘恭・山下文治・榊田喜三郎 .....	288
76. in vivo <sup>31</sup> P-NMRによる実験 腫瘍の研究		
	(京府医大, 生理研*) ○加藤欣士郎・里見 均・成瀬昭二・堀川義治 田中忠蔵・西川弘恭・亘 弘*	292
77. 虚血脳及び無酸素脳のin vivo <sup>31</sup> P NMR		
	(京府医大, 生理研*) ○堀川義治・成瀬昭二・田中忠蔵・平川公義 西川弘恭・横野 輪・亘 弘*	296

# 京都大学薬学部への交通案内

自家用車による出席は御遠慮下さい。



## 京都駅(烏丸口)より

- 市バスA2のりば (206)  
(近衛通の下車)
- 市バスA3のりば (特17) (205)  
(荒神口の下車)

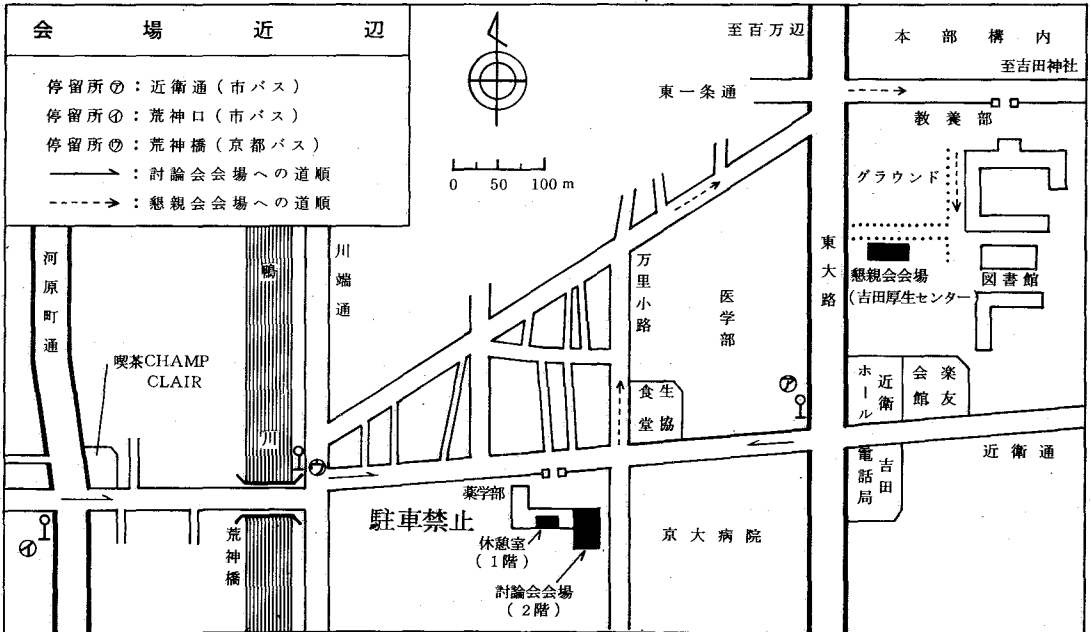
## 四条河原町より

- 市バス7のりば (31) (201)  
(近衛通の下車)
- 市バス8のりば  
(4) (14) (24) (205)  
9のりば  
(3) (17) (特17)  
(荒神口の下車)

## 京阪三条駅より

- 京都バス  
(21) (23) (24) 他多数  
(荒神橋の下車)

註 ○ はバスの系統を示す。



第 1 日

11 月 14 日 (月)



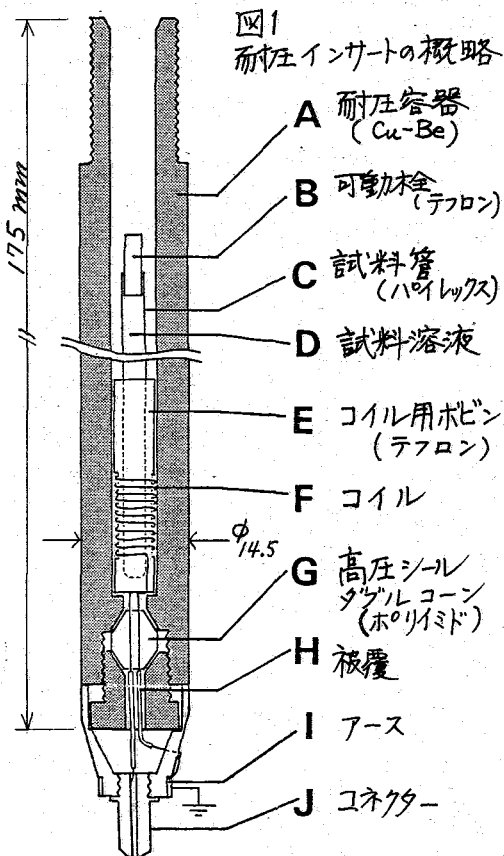


# 1. 高圧下で<sup>14</sup>N-NMRを観測するための耐圧プローブの試作

(和洋女子大, 筑波大\*) ○矢野良子, 伊藤聖子\*

1. 溶媒交換のような速い反応の速度を決定するのにNMR法が有効なことは言うまでもない。通常、速度定数の温度依存性から活性化パラメータ ( $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$ ) を求めて反応機構の議論に用いる。しかし、温度制御精度が実験温度範囲に比して低すぎるなどの理由でとくに  $\Delta S^\ddagger$  の値の信頼度が低かったり、また、みかけの  $\Delta S^\ddagger$  の値への種々の項からの寄与の見積りが難しい、などの例が少なからず見られた。そのため近年では、速度定数の圧力依存性から定めることのできる活性化体積,  $\Delta V^\ddagger$ , を用いて議論する必要から高圧下でNMRを観測することが重要になってきている。演者も、2価遷移金属上の溶媒とアセトニトリルの交換反応につき、Bruker WH-90を用いて高圧下で<sup>14</sup>N-NMRを観測しすでに報告をしている。今回は、JNM-FX 90Q FT-NMR装置のプローブが可換式のインサート部を有していることに着目し、このインサートと可換の<sup>14</sup>N観測用耐圧インサートを試作したので報告する。この方法はパルス照射・FID検出兼用コイル以外の全てのエレクトロニクスは製作する必要がないので、工作と使用法ともに簡単であって、同時に安価に製作できる点が特色である。

2. 耐圧インサートの概略を図1に示した。基本構造はベリリウム銅製の円筒であって、当初3000 kg/cm<sup>2</sup>の圧を目指したため内径/外径比が小さくなっている。(6.0/14.5)。上端は油圧系に接続する。下端部からは、ポリイミド樹脂(三井石油化学キネル5518)製の耐圧シール用ダブルコーンを通じて導線を取り出し、通常インサートに利用されているコネクターに接続している。このキネル製ダブルコーンは、予備試験において~1700気圧で破壊したので実際には1200気圧までの加圧しか行っていない。コイルはテフロン製ボビン(外径4.5 mm)に0.38φのエナメル線を29回/12 mm巻いてある。ボビンの内径は3.55 mmであって、この中に試料管を収納する。試料管は外径3.5, 内径2.5 mmのパイレックス製で、テフロン製の可



やのよしこ・いとせいこ

動栓を介して試料溶液と静水圧とが接している。

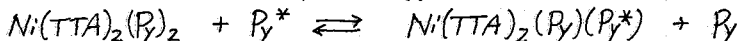
磁場調整は多核用チューナブルインサートを用いて<sup>2</sup>D 内部ロックシグナルで行った。その後耐圧インサートに入れかえ、外部ロックで加圧下での測定を行った。試料管の回転は行わない。また、高温での測定が必要とされる場合はくみこまれている温度可変装置をそのまま用いた。パルス幅の増大が予測されたので、ニトロメタンを試料として常圧下で<sup>180</sup>°パルスを求めたところ約700 μsec. であった。純ピロジン、あるいは、ピステノイルトリフルオロアセトナトニッケル(Ni(TTA)<sub>2</sub>)のピロジン溶液を試料とする、典型的な測定条件を右に示した。

<sup>14</sup>N-NMR 観測条件

OBFRQ	6.42 MHz
OBSET	54.65 KHz
PW	300 μs
PD	20 μs
ACQTM	102.4 ms
DELAY	1.0 ms
FREQU	10,000 Hz
SCANS	48,000

3. 耐圧インサートを用いて得られた純ピロジンの60°Cにおけるスペクトルを図2に示した。線幅が圧と共に増加してゆく様子がわかる。この圧力範囲では、ピロジン分子の主軸に垂直な軸のまわりの回転拡散に対する流化体積、 $\Delta V^\ddagger(DL)$ , は10~20 cm<sup>3</sup>/molと見積ることができた。なお、1気圧における半値幅を、10中試料管を用いた通常測定の場合と比較することにより、耐圧インサートを用いた場合10~20ヘルツの磁場不均一による線幅増加のあることがわかった。

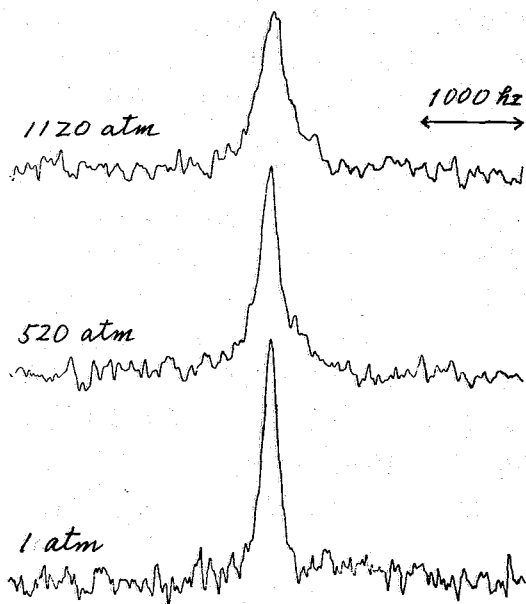
一方、Ni(TTA)<sub>2</sub>のピロジン溶液(0.098 mol/l)のバルクピロジンの線幅から次式で示されるようなピロジン(R<sub>y</sub>)の交換反応の60°Cにおける速度定数(k<sub>1</sub>)を求めた。



1100気圧におけるk<sub>1</sub>は~3×10<sup>3</sup> sec<sup>-1</sup>となり、常圧の場合よりやや減小しているように見られるが、今後実験点を増やして $\Delta V^\ddagger$ を明らかにした上で議論をする予定である。

以上のように、今回試作した耐圧インサートは基本的に動作することが判ったので、実験精度を上げるためひきつづき改善を試みている。1つには、1500気圧以下の加圧のみを想定してベリリウム銅円筒の内径を大きく(ex. 10 mm)することによりサンプルサイズの飛躍的増大をはかる方向である。他の1つは、高压シール用ダブルコーンの材質の適正な選択により3000気圧程度まで加圧領域を拡張する方向である。

図2 ピロジンの<sup>14</sup>N-NMR (60°C)



## 2. 小型温度可変MASプローブの試作

徳島大学工業短期大学部 多木 敏彦

はじめに

Magic Angle Sample Spinningに必要な高速回転( $\geq 2.5$  kHz)を得るのに二つの techniques がある: (1) ガスベアリングによって支えられたローターと(2) 軸で支えられたローターである。前者は Beams<sup>1)</sup>によって開発され、Andrew<sup>2)</sup>によって NMR に利用された。後者は Howe や Norberg<sup>3)</sup>によって開発された。最近温度可変を行った CP-MAS の実験が行なわれるようになってきた。<sup>4)</sup> (2) の type のシステムも色々な研究者によって改良が加えられ、一つは Dotty<sup>5)</sup>によって製品化されている。我々の研究室では、数年前から小型で温度可変が可能なる MAS プローブの試作を始めてきた。ほぼ完成したのでその結果を報告します。

### MAS プローブ

温度可変で  $^{13}\text{C}$  を対象にする目的のプローブであるため、材質の熱特性・高周波特性を考慮して、機械工作が容易で、精度の上げられるもので炭素核を含まないものというので結晶化ガラス(マコール)を用いた。マコールの特性は表1に示す。

FIG.1 →

表1 マコールの特性

引張り強さ	1000 kg/cm <sup>2</sup>
ヤング率	$6.7 \times 10^5$ kg/cm <sup>2</sup>
密度	2.52 g/cm <sup>3</sup>
誘電率 1MHz	5.8
誘電正接 1MHz	0.003
熱膨張係数	
R.T ~ 400°C	$94 \times 10^{-7}/^\circ\text{C}$
R.T ~ 600°C	$110 \times 10^{-7}/^\circ\text{C}$
熱伝導率	$0.004 \frac{\text{cal}}{\text{cm} \cdot \text{s} \cdot ^\circ\text{C}}$
最高使用温度	1000°C
ヒックス硬度	230
重力摩擦係数	
升がいたマコールに	0.15
対して	
吸水率	0
体積抵抗率	
25°C DC	$10^{16} \Omega\text{-cm}$
500°C DC	$10^9 \Omega\text{-cm}$

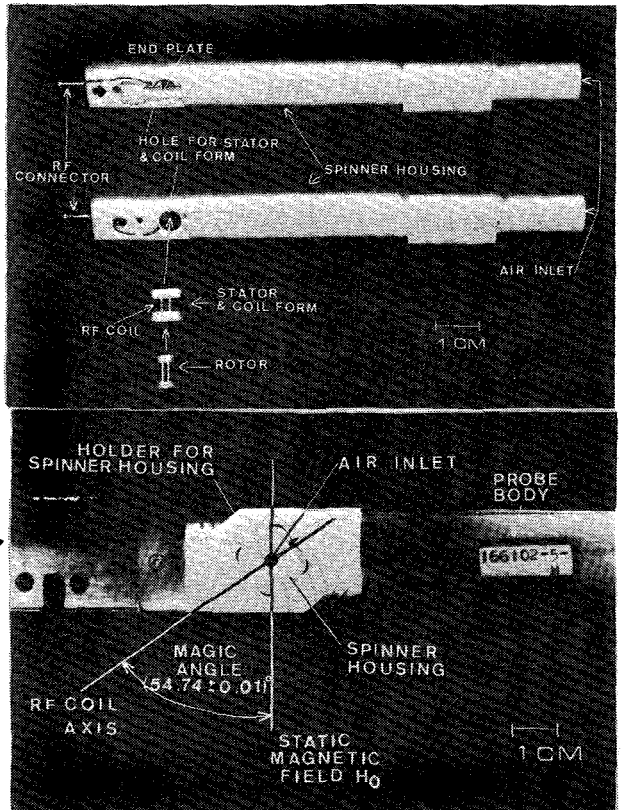


Fig. 1に我々のところで試作したプローブの写真を示してある。Fig. 1Bに示す如く spinner housing は回転軸が静磁場  $H_0$  と magic angle  $54.7^\circ$  をなし  $\pm 0.01^\circ$  の精度で固定されていて、試料交換のために magic angle の設定の毎の調整をしないでよい様に設計してある。Fig. 2には spinner system の断面図が示してある。A は rotor で マコール製 ( $4.96\text{mm}\phi \times 8\text{mm long}$ ) と Pyrex glass 製 ( $4.965\text{mm}\phi \times 8\text{mm long}$ ) を使用した。B は stator & coil form で マコール製で詳細は Fig. 3 に示す。C は ballast chamber で、D の空気取り入れ口よりの空気を、rotor に吹き付ける air jet の孔に導く。E は end plate で rotor が安定に回転するように取り着けたマコール製の長方形の断面を持つ  $2\text{mm}$  の棒である。Fig. 3 には stator & coil form の詳細図を示してある。air jet 孔方向は棒線方向と  $30^\circ$  をなして、 $0.5\text{mm}\phi$  の棒を持つ  $0.2\text{mm}\phi$  の小孔である。これは回りが回るように両側にそれぞれ8ヶつつ作られている。これらの spinner system を用いてベンチテストした spinning speed vs pressure の特性を Fig. 4 に示してある。マコール製 rotor の場合には radial clearance は  $20\mu\text{m}$  で、ガラス製の場合には  $25\mu\text{m}$  である。この radial clearance の場合が最適であった。さらに、radial clearance は非常に微妙である。Fig. 4 のガラス製の rotor の方が圧力が小さくて spinning speed が上がる。このことが、pyrex glass の方がマコールにくらべて倍くらい硬さがあるため、stator を削ることが生ずる。magic angle の設定の check は hexamethylbenzene の  $^{13}\text{C}$

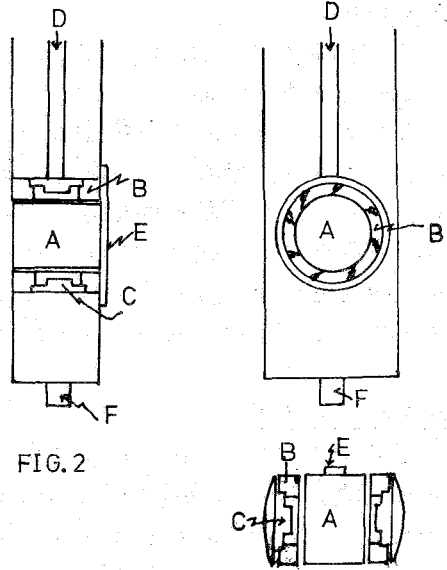


FIG. 2

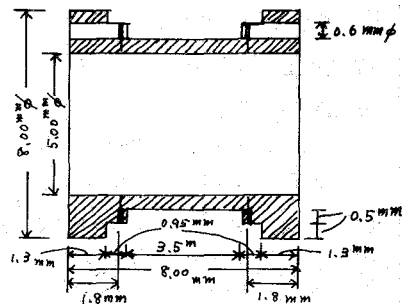
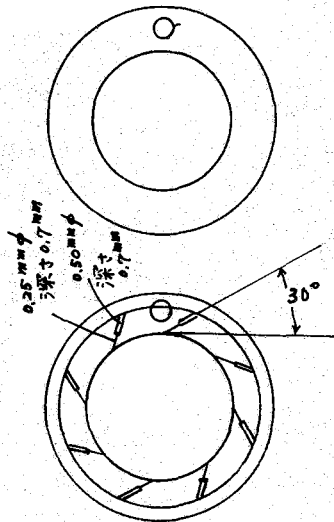


FIG. 3

signal が最大になるおどうおで決定してあるが、少なくとも  $\pm 0.5^\circ$  の範囲内に入っている。

### CP-MAS $^{13}\text{C}$ NMR スペクトルの測定

使用した Pulse NMR spectrometer は FX-60Q である。coil の径が 6 mm  $\phi$  であるため液体用の高周波増中器を用いて高周波磁場は proton で 13 Gauss,  $^{13}\text{C}$  で 50 G が得られた。Hexamethylbenzene と Hexaethylbenzene の  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR スペクトルを Fig. 5 に示す。特に Hexaethylbenzene のスペクトルから proton decoupling が充分であることがわかる。

Fig. 6 にはこれらの装置を用いた poly L-valine のスペクトルを示す。75 MHz での測定については才 20 回 NMR 討論会<sup>6)</sup>で報告したが、15 MHz での測定では  $\alpha$ -Carbon と C=O の signal が  $^{14}\text{N}$  の四重極相互作用と  $^{13}\text{C}$ - $^{14}\text{N}$  間双極子相互作用を合わせた効果により中が広がっている。

Fig. 7 には L-Norvaline と L-Norleucine の monomer の  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR が示めされている。ここでは N 核と隣り合っている  $\alpha$ -Carbon signal は 2 本に分裂している。これは poly L-valine と同様に  $^{14}\text{N}$  四重極相互作用と  $^{13}\text{C}$ - $^{14}\text{N}$  間双極子相互作用とを合わせた効果による分裂である。

この rotor の試料容積は約  $0.07 \text{ cm}^3$  である。重量としては約 30 mg である。Andrew type の JEOL 系 Bruker のものの約  $1/10$  である。

全体としての spinner system の性能は試料が約  $1/10$  であるため積算回数が多く必要となるが、試料が小さいために分解能はよくなっている。さらに、装置的には液体用の spectrometer をフローフの交換以外に何らの変更を行うことなく固体

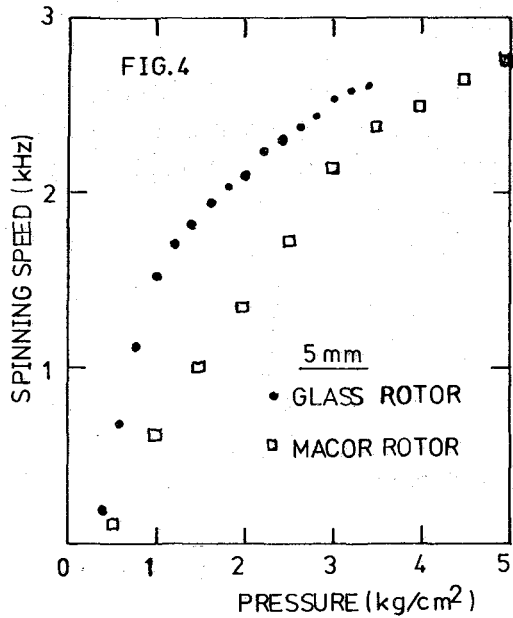
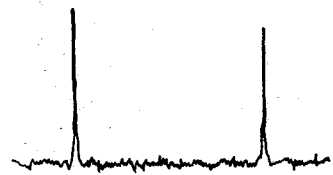
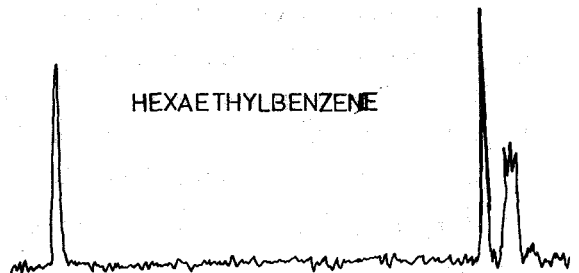


FIG. 5



HEXAMETHYLBENZENE



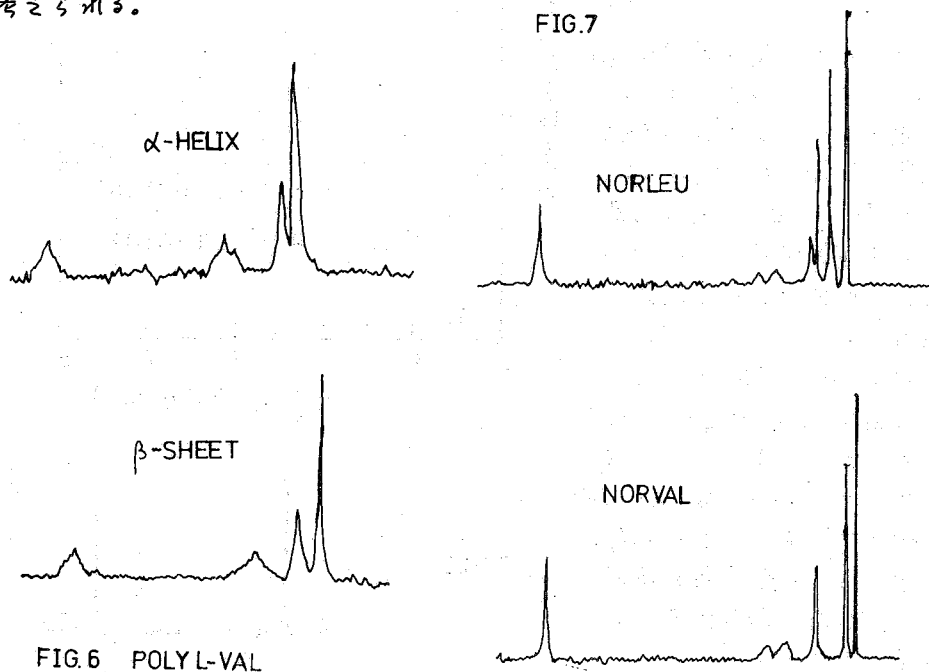
HEXAETHYLBENZENE

高分解能NMRの実験が行なえることである。又、温度可変についてはベニチテストで+100°C 近 rotor が回転することが確認されているが、NMRスペクトルは測定できていない。

現在 stator と coil form をジルコニアで製作しているので、この結果についても合わせて報告する。

## 結論

我々の試作したMASプローブは実用出来る性能を發揮することが出来、ルーチンワーク用として液体用FTNMR spectrometer と組み合わせると固体高分解能NMRの測定を可能にした。今後は感度その他の点の少しの手直しで商品化も可能と考えられる。



## 参考文献

1. J.W. Beams, Rev. Sci. Instrum. 28, 795, 1957.
2. E.R. Andrew; "Progress in NMR Spectroscopy" vol. 8, 1, 1972.
3. I.J. Lowe, Phys. Rev. Letters 2, 285, 1959.
4. V. Macho, R. Kendrick and C.S. Yannoni, J. Magn. Reson. 52, 450, 1983.
5. F.D. Doty and P.D. Ellis; Rev. Sci. Instrum. 52, 1868, 1981.
6. 多木, 山下, 柴田, 山下, 多田, 斎藤; 第20回NMR討論会講演要旨集 p.42, 1981.

### 3. マイクロNMRイメージング

(電総研) 〇 亀井 裕孟, 片山 義朗

最近, 医学, 医療の分野で, NMRイメージングが新しい断層診断技術として注目されており, 既に実用化段階に入りつつある。NMRイメージングのもつ主な特長は, ① 物理的情報とともに化学的情報も抽出可能, ② 完全に非破壊的, ③ 試料に与える障害が少ない, などである。現在, 医学, 医療への応用を目標として, NMRイメージング技術は開発されているが, NMRイメージングの特長とみれば, 広く不均一系の物性研究に適用できることは明らかであり, 今後, この分野での利用が期待される。

不均一系の物性研究手段としてのNMRイメージングでは, 医療診断用とは異なり, 小さな試料で, 高い分解能をもった測定が要求される。ここでは, 通常の高分解能NMR分光装置を用いて, 小さな試料でのNMRイメージングを試みたので, その結果について報告する。

**[装置および方式]** 装置のブロック図を図1に示す。NMR装置として, JEOL GX-270型スペクトロメータを使用した。磁場勾配の発生には, スペクトロメータの電流シムをそのまま利用した。スペクトロメータから取り出したFID信号は, デジタル・メモリーでA/D変換し, ミニコンピュータNOVA-3型によって, 各種演算処理して, 画像の構成に使用された。画像再構成はフィルタ逆投影法によって行なった。

**[分解能と測定時間]** 画像の分解能は静磁場  $B_0$  の均一度 ( $\Delta B_0 / B_0$ ), 試料の  $T_2$ , 磁場勾配  $G$ , 投影スファトルの数などに依存する。 $G$  を加えないときの夫鳴線の幅を  $1/\pi T_2^*$  とすると, 投影スファトルにおける空間分解能  $\rho_H$  は

$$\rho_H \sim 2 / T_2^* \times G \quad (1)$$

で与えられる。

線幅に比べ, 磁場勾配が十分に大きい場合には, 画像の分解能は投影スファトルの数に反比例する。試の最大径を  $D$ , 投影スファトルの数を  $n$  とすると, 画像の分解能  $\rho_S$  は

$$\rho_S \sim D / n \quad (2)$$

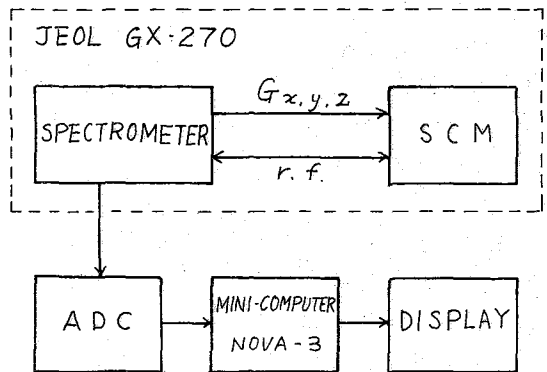


図1. 装置のブロック図。

かめい ひろたけ, かたやま よしろう

で与えられる。したがって、実際に得られる画像の分解能は  $\rho_H, \rho_S$  何れか値の大きい方によって決る。

ここで、生体試料を想定して、分解能を試算してみる。 $\Delta B_0 = 6.34 \times 10^{-8} T$  (プロトニ共鳴周波数  $270 MHz$  のとき、 $\Delta B_0 / B_0 = 10^{-8}$ )、試料のプロトニの  $T_2 = 50 ms$  とすると、観測される共鳴線幅  $1/\pi T_2^* \sim 9 Hz$  となる。最大径  $D = 3 mm$  の試料について、 $30 \mu m$  の空間分解能を得ようとするとき、 $G > 7$  ( $\mu T/mm$ ) が満たされるければならない。また、投影スペクトルの数  $n \geq 100$  でなければならぬ。

いま、円柱状の試料を想定し、動き易いプロトニについて、 $S/N = 32$  の画像を得ようとするとき、測定時間  $t$  は

$$t \sim (2.9 \times 10^{-12}) a^2 (T_1 / T_2^*) \nu^{-2/2} \Delta x^{-6} \quad (3)$$

で与えられる。<sup>2)</sup>  $a$  は試料の半径 (m)、 $\nu$  は観測周波数 (MHz)、 $\Delta x$  は体積素片の一辺の長さ (m) である。 $a = 1.5 \times 10^{-3} m$ ,  $T_1 / T_2^* = 10$ ,  $\nu = 270 MHz$ ,  $\Delta x = 1.5 \times 10^{-5} m$  とすると、 $t \sim 1.8 \times 10^4 s$  となる。この値は生体試料を測定対象とした場合、実用的ではない。もし、 $S/N = 10$  の画像を得ようとするなら、測定時間は約  $1/10$  に短縮される。

**[結果] 磁場勾配 GX-270 の電流シム**

によって得られる磁場勾配は最大  $1.84 \mu T/mm$  であった。したがって、 $T_2 = 50 ms$  の試料で期待される分解能は約  $100 \mu m$  である。

任意の方向の磁場勾配は、 $G_x, G_y, G_z$  の合成によって得ることができ、結果はほぼ満足すべきものであった。 $G_x$  と  $G_y$  の合成によってつくられる磁場勾配によるスペクトルの変化を図2に示す。試料は外径  $0.9 mm$ , 内径  $0.6 mm$  の毛管の本を並べ、両端の毛管中に水を満した

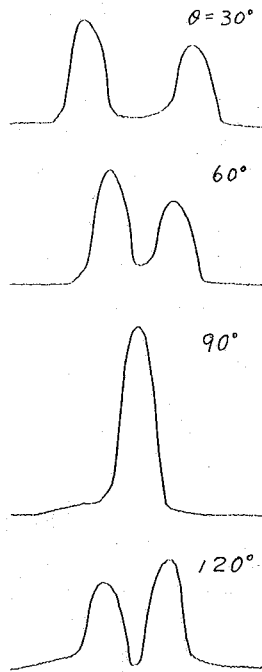


図2. 投影スペクトル

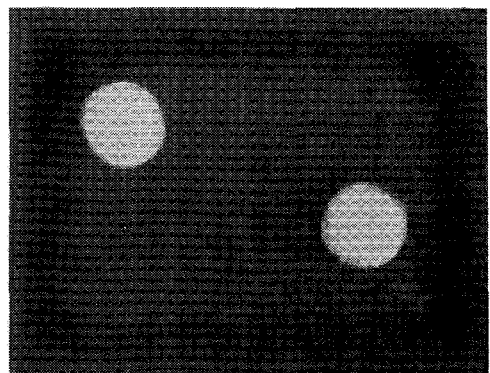
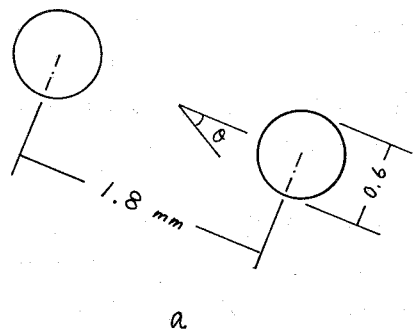


図3. a: 試料の断面図, b: プロトン密度像。



そこで、断面図を図3aに示す。毛管の中心を結ぶ線と磁場勾配の方向とのなす角を $\theta$ とする。

NMR像 水を満たした2本の毛管試料のプロトン密度像を図3bに示す。磁場勾配をできるだけ大きくし、空間分解能のより高い像を得るため、磁場勾配の方向を一定とし、試料を $180^\circ$ にわたって等間隔に回転させることにより、64の投影スポットを得、画像を再構成した。補償法により、画素は $128 \times 128$ で表示した。

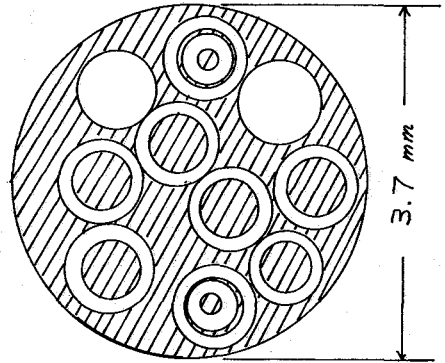
内径 $3.7\text{mm}$ のガラス管に、毛管およびガラス棒を入れ、水を満たしたファントムによるプロトン密度像を図4bに、ファントムの断面図を図4aに示す。測定、表示条件は図3と同様である。分解能は約 $100\mu\text{m}$ であるが、これは測定条件から期待される値と一致する。

図5に「しおん」の一種の茎のプロトン密度像を示す。直径は約 $3\text{mm}$ である。

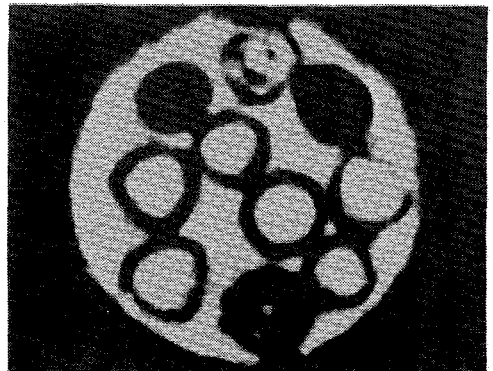
以上、市販の高分解能NMR分光装置を改造せずに、NMRイメージングの実験を行った。現在の分解能は約 $100\mu\text{m}$ であるが、磁場勾配コイルの改造によって、高分解能化は可能である。

#### 文献

- 1) 例えば、亀井：ぶんせき(1983) 96.
- 2) D.J.Hoult, P.C.Lauterbur: J. Magn. Reson. 34, 425 (1979).



a.



b.

図4. a:ファントム断面図, 斜線部分が水, b:プロトン密度像.

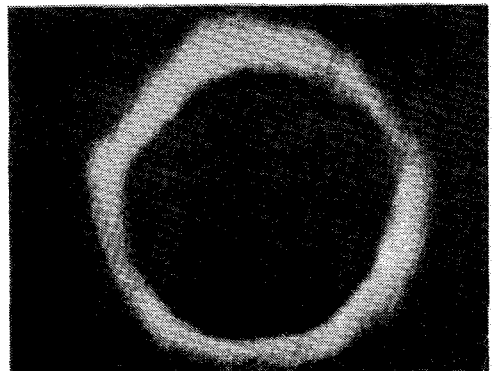


図5. しおんの一種の茎のプロトン密度像.

# 4. 2次元NMRにおける擬フイルター

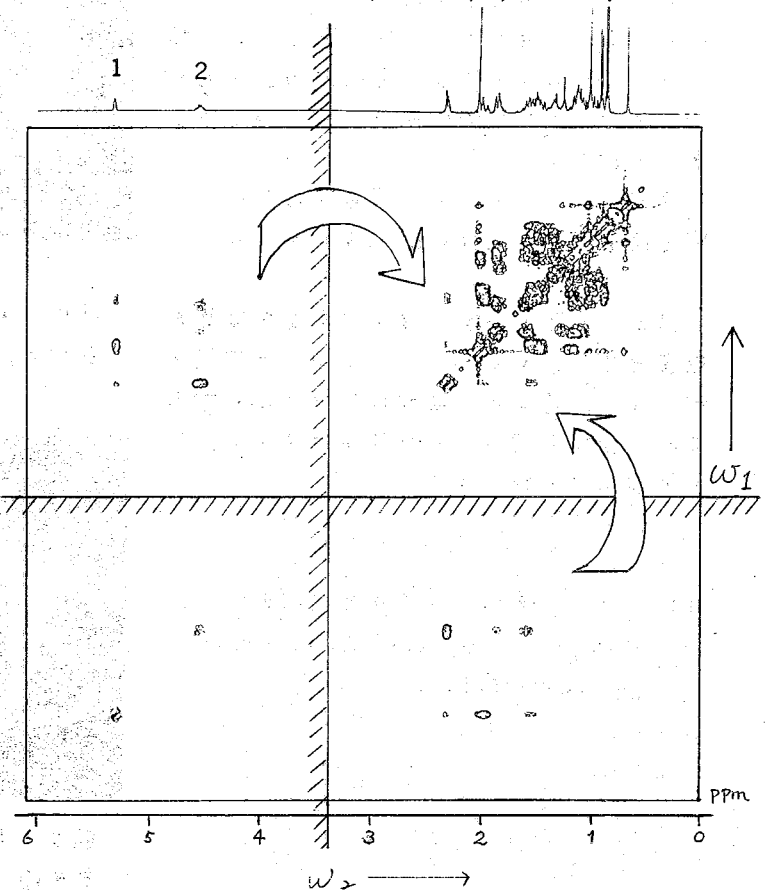
(日本電子)

永山国昭, 梅田雅宏, 百尾一男

## 1. 問題の所在

2次元NMR法においては、測定時間の流れを時分割し、2つの時間変数を発生させ、その英役周波数変数と2次元周波数域にスペクトルを表示する。実際の信号検出は時分割した時間の片方 ( $t_2$ 期) のみで行われ、もう一方の時間変数 ( $t_1$ 期) は一種のフィルターとして、対応する信号の中から選りこくのである。言い換えば実時間として  $t_2$  期のみに意味を持ち、 $t_1$  時間は仮想時間である。これは誰相検波、フイルター等の信号操作が  $t_2$  期にしか行えないのを見ても明らかであろう。では  $t_1$  変数に対応した信号の性質、別言すれば、 $t_1$  に英役の2次元周波数軸方向 ( $\omega_1$ ) のスペクトル上の性質を變える種々の操作 (フイルター等) はどのように可能であろうか。答は簡単かつエニエである。「仮想時間域での信号操作は、検出後のデータに対応する演算処理で行う。」

上記の結論は ( $\omega_1$  方向) フイルターで実現し、これが本講演の内容である。2次元NMRで得られるこの種のフイルターが必要理由は図Iで示した。2次元NMRでは非常に大きなデータを扱う。見たい領域をカット出来れば、例えば図Iのように低磁場側、2次元  $\omega_1$  の領域をカット出来れば、データの大きさは大抵縮小される (この場合約  $1/4$ )。FT法 (フーリエ変換法) では測定周波数域 ( $\omega_2$ ) 外の信号の折り返しが起こるのでこれを要フイルターでカットするのが通例である。2次元NMRでもこのことを行うが、 $\omega_1$  方向の折り返しはカット出来ず、図



図I. anoresterm. acetate の  $^1\text{H}$  相関スペクトルを折り返し。

Preudofilter in Two-Dimensional NMR Spectroscopies  
(JEOL) Kuniaki NAGAYAMA, Masahiro UMEMA & Kazuo HYAKUNA

1. a. どのように折り返して来る。ωT 方向のフイルターがなければこの折り返し信号はカットされ、望みの必要周波数域の情報を持った最小フイルターが実現出来ることになる。

## 2. 擬フイルター

フイルターを取り込んだ後、デジタルフイルターをかける。図1のローパスは消すことは可能である。しかしこの方法で最小フイルターを時間域で取り込むという希望の要求に合わない。実フイルターが持っている on-line 的性格に近い ωT 方向のフイルターを前に述べた「検出後の演算処理」とどう折り合いをつけて実現させるかが問題となる。答は「T1 時に制御工場の time jitter を意識的に加え、積算を行う。」となる。図2に示すように示した。

T1 時間に依存した高周波成分は jitter 付きの積算により位相の相殺が起り、信号強度は著しく弱くなる。1次元の信号で time jitter の影響を見てみよう。

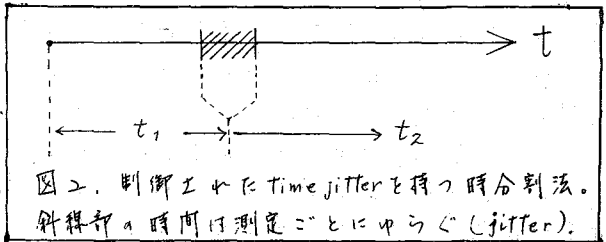


図2の方式は jitter を持つ信号の積算であるから、

$$S(t) = \sum_{i=1}^N S(t + \tau_i) \quad \tau_i; i\text{番目の信号の jitter} \quad (1)$$

となる。τ<sub>i</sub> が  $-\frac{1}{2}\Delta t < \tau_i < \frac{1}{2}\Delta t$  の範囲で等間隔であれば、(1)式は

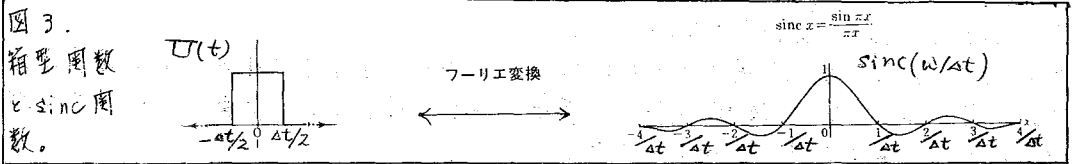
$$\overline{S(t)} = \int_{-\infty}^{\infty} S(t + \tau) \{ \Pi(t) \text{III}(\tau) \} d\tau, \quad \text{III}(\tau); \text{sampling 関数} \quad (2)$$

$$\Pi(t); \text{箱型関数}$$

FT 変換の公式を用いて (2) 式の辺々を変換すれば、

$$\overline{S(\omega)} = S(\omega) [ \text{sinc}(\omega/\Delta t) * \text{III}(N\Delta\omega/\Delta t) ], \quad *; \text{合成積} \quad (3)$$

(3) 式の右辺、かつこの中の場合フイルターの影響を与えることになる。具体的に



は図3の sinc 関数を  $\frac{1}{\Delta t}$  周波数毎に繰返したものがフイルターということになる。Δt を ωT 方向のサンプリング時間と取れば、 $1/\Delta t$  のサンプリング周波数以上の信号は著しくカットされる。完全に箱型の強度フイルターを ωT 方向にかけたい場合は、(1) 式を拡張して (+) 式のように、τ<sub>i</sub> に同期した重畳をかける必要がある。

$$\overline{S(t)} = \sum_{i=1}^N S(t + \tau_i) g_i, \quad g_i; \text{重畳関数} \quad (4)$$

g<sub>i</sub> が sinc 型の場合は図3の FT 対になるように、完全に箱型強度フイルターとなる

る。制御工としての time jitter というのはこのように jitter 間隔, 重みまでを含めて制御  
 するという意味である。以上の議論はもちろんで、各測定繰返し毎に同一の信号がく  
 る (coherent signal) 条件でのみ成立する。1/2 に関して付随して通常の積算効果のみ  
 が残る。

### 3. 応用の対象

擬フイルターは仮想時間域の filter である。従って MQT など preparation 期, C-H  
 相関などの mixing 期はこの filter をかけてもよい。似た主旨の方法が、二次元 NDE  
 で J-相関ピークを消すのに用いられている<sup>1)</sup>。"Random variation of the mixing time"  
 と呼ばれているこの方法は、今まで述べたような意味の制御が出来るので、理想  
 フイルターとして働くのが困難であると考へられる。ここでこの方法の応用可能性  
 を種々の二次元 NMR について検討しよう。

#### i) 二次元低域, 帯域及び帯域フイルター

これは図 1 に述べたように、 $\omega_1$  方向の高周波成分をカットしたり、  
 低周波成分をカットしたりする。特に  $\omega_2$  方向の低域フイルターと  $\omega_1$  方向の帯域フ  
 イルターと組み合わせれば、off-diagonal な二次元成分スピンを持つた、時間域シフ  
 トが取れる。帯域フイルターにするには、帯域中心周波数で変調工としての重み関数  
 $g(t)$  を用いなければならない。

#### ii) J-selection

二次元では<sup>13</sup>C-H シフト相関法のように、結合定数 (J) の違いの大きさのものを分け  
 て観測したい場合がある<sup>2)</sup>。この場合、特に結合定数の小さい長距離相関などを表示  
 したい時は、J の大きい結合に由来する CH 相関を押し戻してスピンがみやすい。  
 J-selection として A. Bax による 1D 系列<sup>3)</sup>が提案工されているが、擬似フイルターの  
 方が一般性がある<sup>2)</sup>。

#### iii) Homonuclear ZQT-selection

Homonuclear 二次元 MQT では、ZQT (zero quantum transition) の周波数はしばしば他の  
 MQT, SQT に較べ非常に小さい。従って擬フイルターを MQT, SQT の発展期に付どこせ  
 ば ZQT のみ観測工できる。

#### iv) Heteronuclear MQT-selection

Heteronuclear MQT の実現ではしばしば Homonuclear MQT と合わせて観測したい場合が起  
 る。片方の hetero 核の周波数 offset を適当に選べば、Hetero 結合由来の MQT を帯域擬  
 フイルターで抜き出すことも出来る。

### 4. 実験結果

実験は図 1 で示した, cholesterol acetate <sup>を用いて</sup> 行った。図 1 に示したローリ, 2 をカッ  
 トした, 小さい周波数域でスピンを展開出来るよう、time jitter の範囲を  $\Delta t = \sigma t_i$   
 と取った。jitter の点数  $N$  は  $15 = 2^4 - 1$  とし、 $\sigma t$  を 14 等分した。  $t_i = (\frac{i}{14}) \sigma t$  ( $i = 0, 1, \dots, 14$ )  
 jitter をどの順序で与えていくかは各  $t_i$  毎に自由であるが、ここでは M 系列で与えら  
 れるランダム増減が順を決め、全ての  $t_i$  の値にこの順序で jitter を与えた。結果を図 5

に擬フイルターをかけた場合(図4)と比較して図示した。

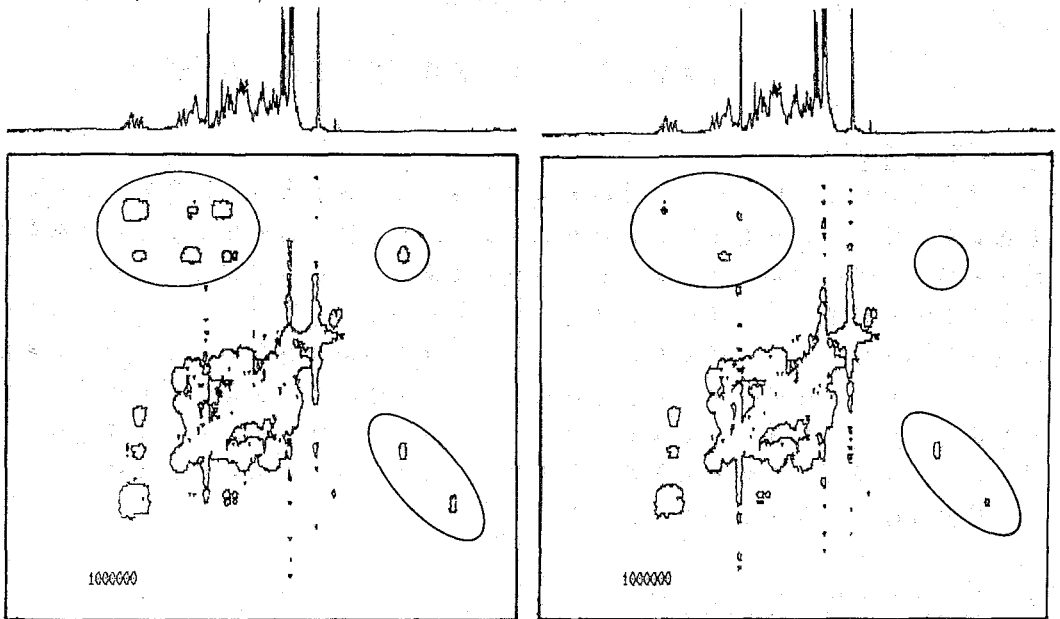


図4. 折り返しピークを持った二次元部分スワットNMR. cholesterol acetateで図4と同波数のスワットNMRを用いた。積層及び用の中は $\omega_1$ 軸の折り返し、長層の中は更フイルターによる $\omega_2$ 軸の折り返し曲線のピークである。

図5.  $\omega_1$ 軸の折り返しを押し出した擬フイルター二次元スワットNMR。図4と同じ条件で擬フイルターをかけた。積層及び用の中のピークの強度を小さにした。長層中のピークにはこのフイルターはほとんどまかさない。

擬フイルターが効果的に働いていることが明らかに見て取れる。J-selectionの例は文献(2)を参照していただきたい。図4, 5では各ピークの微細構造を示していないが、両者に差はなかった。このフイルターはあくまで高域周波数のみをカットするだけで、他に広中化等の悪影響を与えないことを強調したい。jitter中  $at$  を色々に変えてフイルター特性を理論と比較したのが図6である。擬フイルターが、予想通り働いていると言える。

### 文献

- 1) S. Macura et al., J. Magn. Reson. 43, 259 (1981).
- 2) 永山国昭 et al., 「4級炭素による水素核の長距離相関」 22回NMR討論会(1983).
- 3) A. Bax, J. Magn. Reson. 52, 370 (1983).

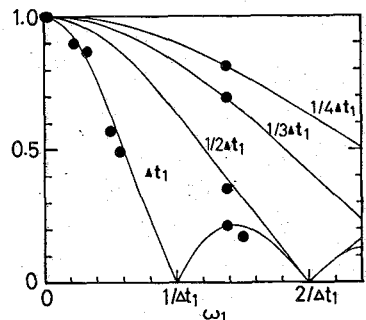


図6. jitter中  $at$  を変えて、折り返しピークの強度を理論値と比較した。

## 5. 4級炭素による水素核間の長距離相関

(日本電子) 永山国昭, 栗原範明, 鴨 修

### 1. 問題の所在

天然化合物のNMRによる解析では、しばしば4級炭素の核の骨格のつながりを推定出来ることがある(とわけていっている)。これは4級炭素をまたいで水素核同士の強いJ結合(3Hz以上)を示さなためである。これを解決するため $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ の二量子遷移を利用した1次元、2次元法が提案されている<sup>1)</sup>。しかしこの方法は $^{13}\text{C}$ の相対感度が低く、 $T_1$ が一般に長いこと、更に $^{13}\text{C}$ 同士の隣接確率が約 $3 \times 10^{-4}$ と非常に小さいことなどの理由で極めて感度が低い。感度を落し、4級炭素を介在させた水素核のつながりを調べる方法として、ここでは2次元法を中心とした可能性を検討した。基本的な予了予了は水素核と炭素核のJ結合を用いて間接的にJ結合のない水素核間の結合を復活させることである。

### 2. この2次元法を用いるのか

基本的な予了予了を実現させる2次元法は必ずしも1つではない。可能性限り予了予了実現のための2次元法を列挙して見よう。もちろんこれらの内のどれが実際的な見地からベストであるか、個々の実験にまたなければならぬ。

#### i) $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ シフト相関法の利用

この方法は直接結合した $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ 間の結合を表示する方法として提案され、利用されて来たが、もちろん4級炭素と遠くの水素核間の結合をも実験条件の選べたにより観測される。ただし後述するように一般に待ち時間が長く、水素核の緩和に伴う感度低下を招く。2次元スペクトル表現方法は、一つの4級炭素の周波数位置に2つ以上のC-H相関を示す水素核ピークが見られる場合は、長距離相関と解釈される。

#### ii) $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ スピン系MQTの利用

問題と可成りスピン系は最低2つの水素と1つの炭素核を持つ3スピン系である。従ってDQT, TQT等のMQTが利用出来る。すでに同種核DQTを利用した間接的J結合核間の相関法(remote connection)が提案されている<sup>2)</sup>。ここでは異種核TQTと $^{13}\text{C}$ -SQTに可成りMQT-SQTシフト相関と、異種核DQTと $^1\text{H}$ -SQTへ移行する方法などを考えた。感度の点からは後者が可成りであるがソフトウェアの形(形)と同じであり興味が乏しい。前者では $^{13}\text{C}$ の周波数位置に間接的に結合した2つの水素核の和のシフトを持つピークが表示される。

#### iii) リレー移動の利用

この方法は水素核のSQTを炭素核に移し次にそのSQTを異なるもう一方の水素核に移す方法である<sup>3)</sup>。炭素核は中継基地としての役割を持ち、測定表面に出現されない。ソフトウェア表現は従って通常の $^1\text{H}$ 相関法と同じになる。異種核相関法を2回つづいたこの方法は最終移動効率がかなり悪い。

Remote Proton Connection through Quarternary Carbon (RPCQC)

Kuniaki NAGAYAMA, Noriaki KURIHARA & Osamu KAMO (JEOL)

### 3. J-選択 (J-selection)

前節で述べた二次元法はいいかも知れないが、直接炭素核についた水素核が、又は4級炭素と結合した長距離結合水素核が2つを区別できない。我々の目的は4級炭素を通じた水素核間の相関であるから、この両者を区別する測定上の工夫が必要である。短距離結合と長距離結合での結合定数の大きさが1/7以上違うので、これは可能である。J結合の大きさを区別する意味でJ-選択と着付けた。方法として以下の2つが考えられる。

#### i) J-選択パルス<sup>4)</sup>

この方法は異種核結合の場合のみに適用される。パルス列は図1に示すもので、<sup>1</sup>H核に3-パルスを加え、炭素核に直接結合した<sup>1</sup>Hに180° effective pulse<sup>5)</sup> 又は0° effective pulseとして働くかを才するパルスの位相を $\pm X$ 又は $-X$ に変えることにより制御する。我々の目的は才するパルスを $90^\circ - X$ に取れば良い。ここでJ short に対しては0°パルス、J long に対しては180°パルスとして働く。短距離相関のみがキャンセルされる。このJ-選択パルスが化学シフトの符号を逆転させ(180°), T<sub>1</sub>期がこのパルス以前に設定してある場合の共鳴周波数の符号を変える。検出期の位相をわし及び、ソフトウェアの表示(P型or N型)には注意が必要である。

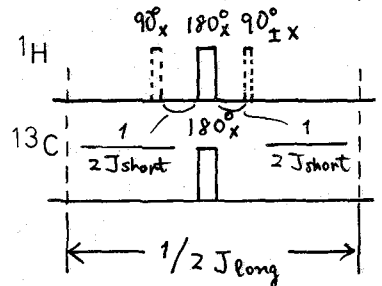


図1. J-selective pulse. <sup>1</sup>H 才するパルスが $90^\circ - X$ の時、J long を選択する<sup>4)</sup>。90°, 90±X を取り、1/2 J long の jitter を与えれば擬フィルタとなる<sup>5)</sup>。

#### ii) 擬フィルタ<sup>5)</sup>

この方法はより一般的で、同種核、異種核の結合<sup>(スピン-スピン結合)</sup>の全てでなく使える。J short をキャンセルするよう、制御された time jitter を固定待ち時間の部分に加えなければならない(図1及び前講演参照)。最大 jitter 中が J short の擬フィルタで充分であろう。J short ~ 150 Hz なら J short ~ 13 msec である。エコーパルスを180°とすれば $\omega_1$ の符号は変えない。

### 4. 実際のパルス列

前節で述べた考えをもとにパルス列を組み立てる特徴を調べてみた。

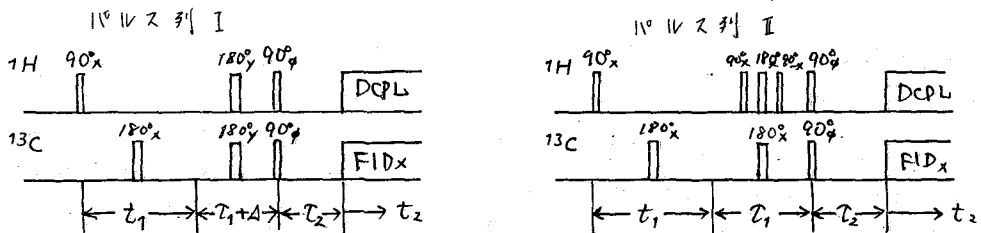


図2. J-選択 <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H シフト相関法。  $\tau = 1/2 J \text{ short}$ ,  $\tau_1 = \tau_2 = 1/2 J \text{ long}$ ,  $\phi = 0^\circ, 90^\circ, 180^\circ, 270^\circ$ ,  $\Delta$ : pseudofilter 用 jitter ( $\Delta_{\text{max}} = 1/2 J \text{ short}$ )

この方法は<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H シフト相関にJ-選択をほどこしたものであり最も簡単である。

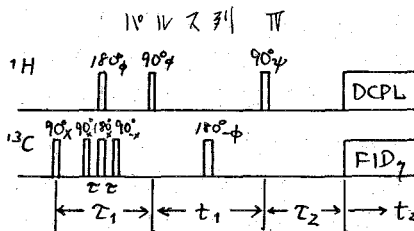
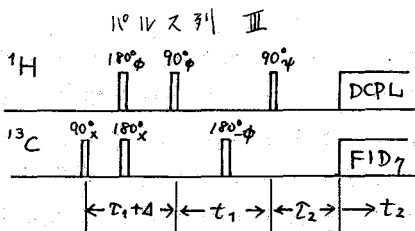


図3. J-選択 MQT-SQT シフト相関

$$\tau = \frac{1}{2} J_{\text{short}}, \quad \tau_1 = \tau_2 = \frac{1}{4} J_{\text{long}}$$

$$\phi = 0^\circ, 0^\circ, 60^\circ, 60^\circ, 120^\circ, 120^\circ, 180^\circ, 180^\circ, 240^\circ, 240^\circ, 300^\circ, 300^\circ$$

$$\psi = 0^\circ, 90^\circ, 0^\circ, 90^\circ, 0^\circ, 90^\circ, 0^\circ, 90^\circ, 0^\circ, 90^\circ, 0^\circ, 90^\circ$$

$$\gamma = 0^\circ, 90^\circ, 180^\circ, >70^\circ, 0^\circ, 90^\circ, 180^\circ, >70^\circ, 0^\circ, 90^\circ, 180^\circ, >70^\circ$$

$$\Delta: \text{pseudofilter 用 jitter } (\Delta_{\text{max}} = \frac{1}{2} J_{\text{short}})$$

この方法では、 $T_1$ 期の終りにTQTを励起し、 $t_1$ 期に $180^\circ$ パルスで $^{13}\text{C}$ のシフトを消し、 $^{1}\text{H}$  DQTの等価物を作り、これを最終的に $^{13}\text{C}$  SQTに移す。J-選択の方法を $T_1$ 期に行うのはパルスI, IIと同じである。この方法は最初に $^{13}\text{C}$ の磁化を励起し、その移動を行うので、感度は悪い。又TQT選択用位相合わせが必要となる。

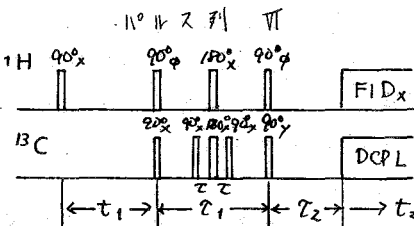
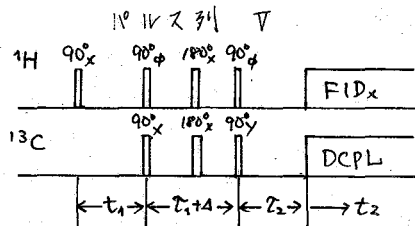


図4. J-選択リレー移動

$$\tau = \frac{1}{2} J_{\text{short}}, \quad \tau_1 = \tau_2 = \frac{1}{2} J_{\text{long}}$$

$$\phi = 0^\circ, 90^\circ, 180^\circ, >70^\circ,$$

$$\Delta = \text{pseudofilter 用 jitter } (\Delta_{\text{max}} = \frac{1}{2} J_{\text{short}})$$

この方法では $T_1$ 期の励起磁化 $^{1}\text{H}$ が、 $^{13}\text{C}$  SQTに移るか、それがさらに隣りの $^{1}\text{H}$ 核に移るか。 $T_1$ 期は固定なので、 $^{13}\text{C}$ の化学シフトは見えない。 $T_1$ 期の終りの $90^\circ$ パルスは $^{13}\text{C}$ - $^{1}\text{H}$  DQTも励起するので、これを抑える位相合わせが必要となる。

## 5. 実験結果

### i) $T_2$ 問題

長距離結合は結合定数が小さく、待ち時間 $T_1, T_2$ が長くなる。これは磁化移動の効率を高めるために必要な条件設定のためであるが、反面横方向の緩和のため磁化の絶対強度は減衰する。とくに早い $^{1}\text{H}$ の緩和のため一般に長距離結合は測定の見掛けが悪い。図5にparachlorobenzaldehyde (PCBA)の $^{13}\text{C}$ - $^{1}\text{H}$ シフト相関二次元スペクトルの待ち時間依存性を示した。待ち時間、3msでは短距離相関( $\beta-2, \delta-3$ )のみが見え、25msでは短距離の数より長距離相関( $\alpha-1, \alpha-3, \beta-1, \delta-2$ )が見えてくる。しかしS/N比は前者より悪くなる。この問題を解決する簡単な方法は、netの磁化移動を止め、同種核相関法と同じように可成り $T_1 = T_2 = 0$



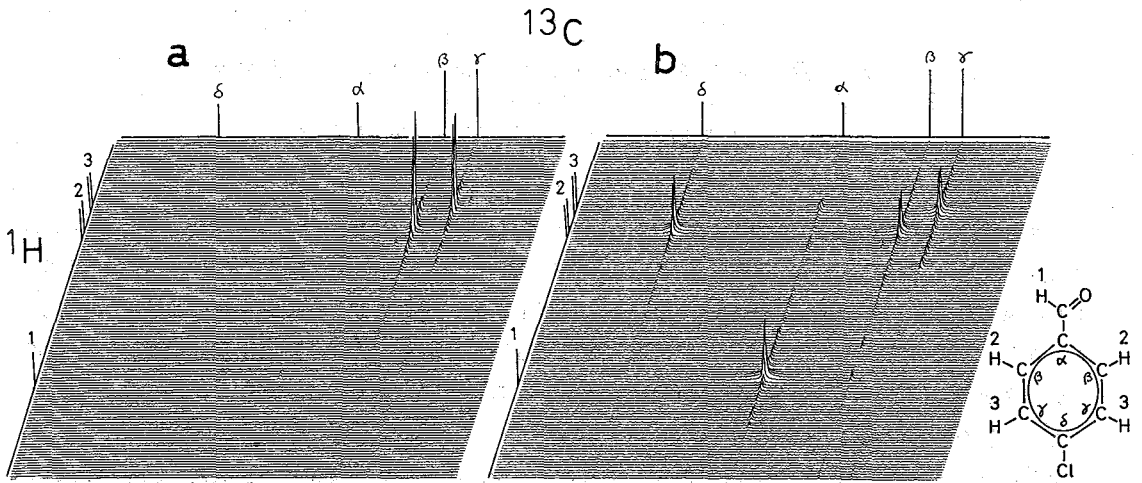


図5.  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ シフト相関法における待ち時間依存性。a:  $T_1=T_2=3\text{ms}$ , b:  $T_1=T_2=25\text{ms}$   
 parachlorobenzaldehyde /  $\text{CDCl}_3$ , 400MHz。

とし、 $T_1$ 期の $180^\circ$ パルス、検出期の $^1\text{H}$  decouplingを代めることである。Jが小さい場合は、微細構造は気にならない。結合定数は $J_{\alpha-1}=24\text{Hz}$ ,  $J_{\alpha-3}=7$ ,  $J_{\delta-2}=11\text{Hz}$ ,  
 $J_{\delta-3}=3.2\text{Hz}$ ,  $J_{\beta-1}=161\text{Hz}$ ,  $J_{\gamma-\delta}=166\text{Hz}$ であった。

ii) J-選択 $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ シフト相関

パルス列 II を図5で示したサンプル PCBA について応用した。J-選択の効果を通常スเปクトと比較した図を下に示した。

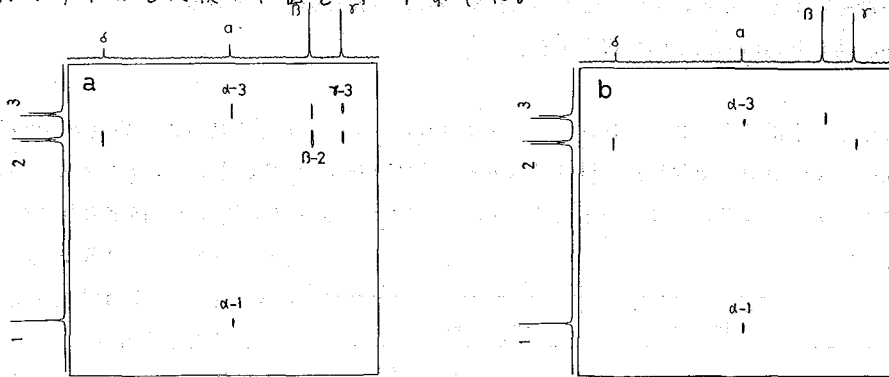


図6. J-選択の効果。a: 通常スเปクト, parachlorobenzaldehyde /  $\text{CDCl}_3$ , 270MHz。  
 b: パルス列 II による短距離相関の削除。  $T_1=T_2=35\text{ms}$ 。

図6, bで短距離相関( $\beta-2$ ,  $\gamma-3$ が弱くなり)、4級炭素  $\delta$  が水素核 1, 3 と長距離相関を持つことが示されている。 $\delta$  については  $\delta-3$  の結合が弱く(3.5Hz),  $T_1, T_2$  を充分長く、例えば 55ms 以上取らないと見えない。パルス列 I, III~VI の結果と併せて検討したい。

文献

1) A.Bax, et al. J.A.C.S. 102,4849(1980), A.Bax, et al. J.Magn.Reson. 43,478(1981).  
 2) L.Braunschweiler, et al. Mol.Phys. 48,535(1983). 3) G.Eich, et al. J.A.C.S. 104,3731(1982)  
 4) A.Bax, J.Magn.Reson. 52,330(1983) 5) 永田國昭 et al. 2次元NMRとその微細構造に関するNMR討論会(1983)

## 6. 構造解析のためのSPT差スペクトル法の改良

(理研) ○ 鷗沢 洵、柴田 俊之

### 1 序

Selective Population Transfer (SPT) 差スペクトル法 (Pseudo INDOE, Selective Population Inversion 差スペクトル法を含む) はスピン結合定数の符号を決定する手段としてまた、重なりあったスペクトルの中から特定の結合相手を捜し出す手段として知られている。(表1) 重なりあったスペクトルを分離する方法としては2次元J分解スペクトル法が出現したが、測定時間、データ処理時間、サンプル量等の各種条件を考慮してみれば、従来のデカップリング法やSPT差スペクトル法が不要になるとは思えない。

演者らは、有機化合物の構造解析を行うためのNMR測定法として2次元法と従来法を相補的に使う立場から、SPT差スペクトル法の改良を試みた。

従来のSPT差スペクトルは特定のピークに高周波磁場を照射してその遷移と関係したエネルギーレベルの占拠数を変化させ、このときのスペクトルと非照射オリジナルスペクトルの差をとっている。演者らは2スピン系の場合は二重線のそれぞれを照射したスペクトルの差をとった。その結果、従来の方法にくらべ、peak to peakで4倍近くS/Nを向上させた。3スピン系の場合は4重線の外側の共鳴をそれぞれ照射して差をとると、従来の方法よりもはっきりと結合相手が判明した。

これらの方法は $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ ばかりでなく、 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 、 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\{^13\text{C}\}$ 、 $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ 等にも応用できるが、本質的に他の方法を使った方が良い場合がある。

以上の検討結果と応用例について報告する。

### 2 実験

NMR装置は日本電子製FX-100、FX-400、GX-400を使った。測定条件は通常の条件と大差ない。基礎実験に使用した試料は日本電子製標準試料10%2、3ジブロムプロピオン酸とトランスクロトンアルデヒド、CEAの1、2C-13ラベルエタノールを使った。従来のSPTでは照

Table 1

authors	journal	$\gamma_{\text{H}_2}/2\pi$ (Hz)	$\tau$ (s)
S. Sorensen et al.	JMR, 14, 243 (1974)	[ 0.1	4
K. Kushiida et al.	13rd NMR TORONKAI (1974)	0.2	2
		7.3	0.44
K. G. R. Pachler et al.	Chem. Comm., 1038 (1974)	2.5	?
H. J. Jacobsen et al.	JMR, 15, 385 (1974)	0.45	1.1
I. D. Campbell et al.	Chem. Comm., 750 (1975)	?	0.118
S. Linde et al.	JACS, 97, 3219 (1975)	[ 0.38	4.0
		(0.1-0.5)	1-5
T. Bundgaard et al.	JMR, 18, 209 (1975)	0.42	1.2
P. L. Wessels et al.	JMR, 38, 365 (1980)	3.3	0.23
K. G. R. Pachler et al.	OMR, 13, 100 (1980)	0.94	0.53
H. J. Jakobsan et al.	OMR, 17, 290 (1981)	4.17	0.12
		0.23	2.2
		2.08	0.24
M. Barfield et al.	OMR, 20, 92 (1982)	?	0.3-1.5
F. A. M. Borremans et al.	OMR, 21, 328 (1983)	4	0.12

射パワー  $\gamma_{\text{H}_2} / 2\pi$  と照射時間  $\tau$  を第1表のように選んでいる。SPTの最適条件は照射パワーを線幅より少し強めにし、照射時間を  $\tau \ll T_1$  とし、 $\gamma_{\text{H}_2} \tau = \pi$  とすることになっている。しかし、実際には表からわかるように、この条件を完全に満たしているとは思えない。 $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$  ではS/Nよりも選択性を重視するため、照射パワーを弱めにし、照射時間を長くする条件を選んでいるようである。本実験もこれに近い条件で行った。

うざわじゅん、しばたとしゆき

図中 ↘ 印が照射位置を示す。また、×印は不純物等のピークを示す。

### 3 実験結果と考察

最初に2スピン系(実用的には二重線が他と離れてある場合)から説明する。試料としてトランスクロトンアルデヒドを使い、従来法と比較した結果、得られるスペクトルの形は従来法と同等だが、S/Nは上下それぞれ2倍となり、peak to peakで4倍程度改善された。

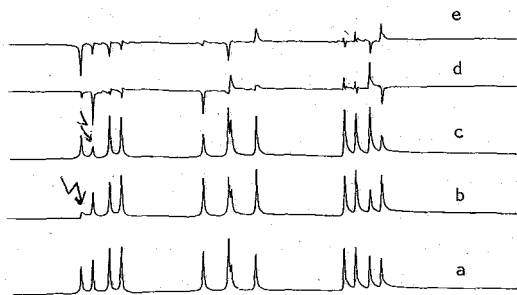


Fig.1 Old type difference SPT of 1,2-bromopropionic acid in  $CDCl_3$ .

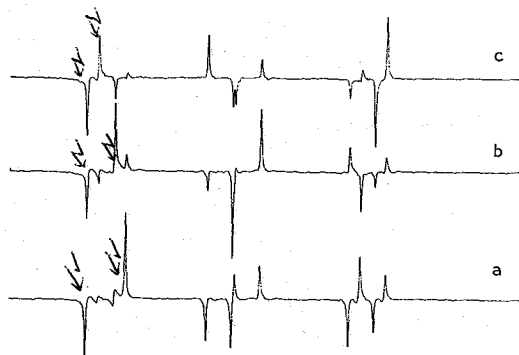


Fig.2 New type difference SPT of 1,2-dibromopropionic acid in  $CDCl_3$ .

次に、3スピン系の場合(四重線が他と離れてある場合)について説明する。

試料は古くから3スピン系でこの種の実験で使われてきた2,3ジブロムプロピオン酸を選んだ。

第1図はオリジナルスペクトルをa、一ヶ所照射した場合のスペクトルをb、cに示す。このように、照射したピークと関係する遷移のピークしか影響を受けない。スピン結合定数の符号という情報が

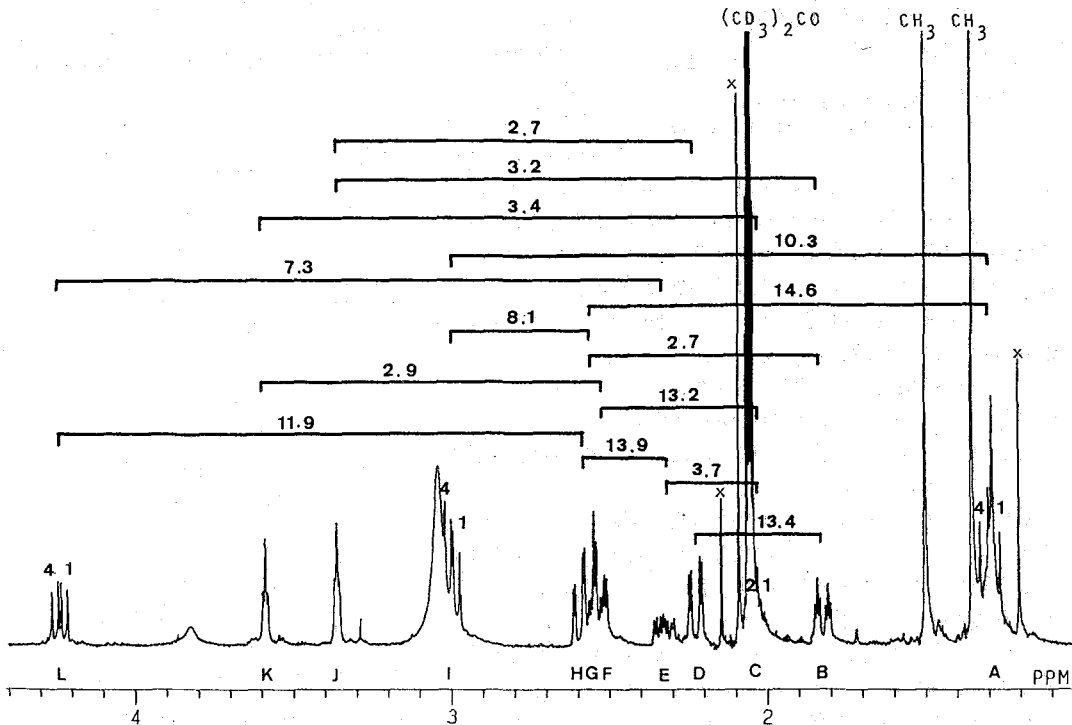


Fig.3 400 MHz  $^1H$  NMR spectrum of KH-14 in acetone- $d_6$ .

得られるものの、重なり合ったスペクトルの中から特定の結合相手を捜し出す手段としては不十分なスペクトルしか得られない。

第2図は二ヶ所を照射して、照射して得たスペクトル同士の差を示す。一見して外側同士の差をとったaがb、cよりスペクトルの解析がしやすいことがわかる。

実際に天然物の試料を使って有用性を検討した。KH-14 (仮称) は野村らにより桑の根皮から抽出された化合物の一種である。<sup>1)</sup> KH-14の構造式は未だ決っていない。この化合物の高磁場部分の

$^1\text{H}$ -NMRスペクトル (400MHz) を第3図に示す。スピン結合している $^1\text{H}$ は合計12ヶあり、高磁場からA~Lとする。Cは溶媒に隠れているがW E F TによりBと同様なスペクトルであることがわかっていて、 $^1\text{H}$ デカップリングから図に示すような関係がわかったが、2.5PPM~2.63PPMにある $^1\text{H}$ 3ヶ分の共鳴 (仮にF G Hとする) については明確な分離が得られなかった。

構造決定上は、例えばAプロトンと結合するF G H領域のプロトンが、この領域のプロトンと結合するB、C、E、I、Lのうちどれと結合しているかを定めることが必要である。

従来のS P T差スペクトルによって得たスペクトルが第4図である。aは2.48~2.63PPMを拡大した図であり、×印はW E F Tから不純物のピークと判明している。

第3図にあるA、I、Lは四重線であり、そのうちの1本のピークを照射してオリジナルとの差をとったスペクトルは第4図b、d、eの

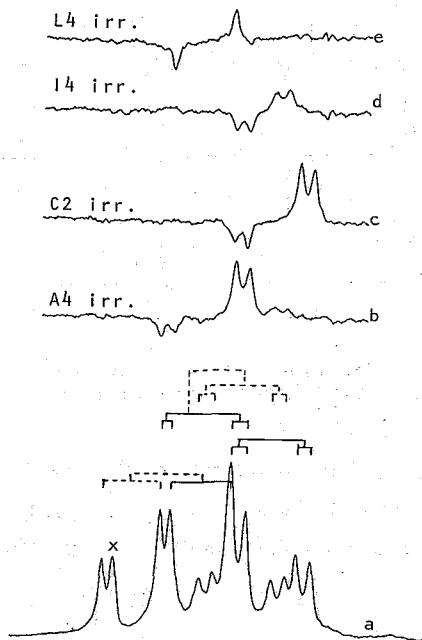


Fig. 4 Old type difference SPT of KH-14 in acetone.

ようになる。これに対し、四重線の外側のA4とA1、I4とI1、L4とL1 (第3図参照) を照射して差をとった場合は第5図のように残りのカップリングパターンがはっきりとわかり、スペクトル全体の解析が容易となる。

2スピン系の場合は第4図eと第5図cの比較からわかるとおり、S/Nが改善されている。

これらの結果とデカップリングの結果からL-H-E、I-G<math>\frac{A}{B}</math>、C-F-Kというつながりが明らかとなった。

以上の結果から、本法は二重線または四重線が離れて出れば有効と考えられる。

また、照射パワーが弱いので選択性が優れており、かつ、デカップリング差スペクトルで問題となるBSシフトが無いので近接したスペクトル同士の分離にとって有効である。<sup>2)</sup>

#### 4 異核種間のSPT差スペクトル

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ では $^1\text{H}$ スペクトルが単一線の場合、 $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ と同様なスペクトルが得られ、 $r_{\text{H}}/r_{\text{C}}$ によるS/Nの増大もあって有効と考えられる。 $^1\text{H}$ スペクトルが二重線以上になっている場合については検討中である。

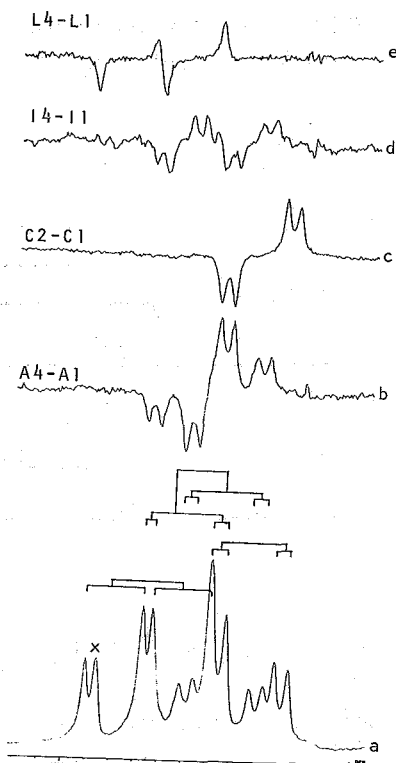


Fig. 5 New type difference SPT of KH-14 in acetone.

$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  ではヌクレオシドの SPT 差スペクトルを測定しようとしたが、 $^{15}\text{N}$  核の長い緩和時間によってか S/N が極端に悪く、実用性はあまり無いように思える。

Schumacher らは INEPT 法によってアデニンの三級窒素を測定している<sup>3)</sup>。演者らは LSPD 法の経験を活かして "Low power Selective INEPT" を試み、三級炭素の帰属法として有効であることがわかった。第 6 図はヌクレオシドのアデニン部の H-8 と H-2 を選択的に照射して INEPT のパルス系列で測定した結果を示す。

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\{^{13}\text{C}\}$  は二重標識アセタート等を出発原料にした化合物で  $^1\text{J}_{\text{C}-\text{C}}$  が同じものがあった場合等に使う。 $^1\text{H}$  ホモデカップリングと同様に、時間分割して照射と観測を行わなければならない。このため、時間分割周波数によるノイズが観測幅の中に入ってしまう。SPT 差スペクトルはこの点は優れているが、試料さえあれば、

2D INADEQUATE 法で測定すべきだろう<sup>4)</sup>。

J が大きすぎてデカップリングが不可能な X  $\{^1\text{H}\}$  等への応用も考えられる。

## 5 謝辞

貴重な試料を貸与され、構造決定途中であるにもかかわらず、データの発表を許していただいた東邦大学教授 野村太郎博士に深謝致します。

同じく、試料を貸与いただきました理研安齊謙太郎博士に深謝致します。

## Reference

- (1) 野村太郎、化学の領域、36、596 (1982)。深井俊夫 他、第 26 回天然有機化合物討論会 (京都)、1983。
- (2) J. D. Mersh et al, J. Magn. Reson., 59, 289 (1983) .
- (3) M. Schumacher et al, Chem. Ber., 116, 2001 (1983) .
- (4) Ad. Bax et al, J. Magn. Reson., 43, 478 (1981) .

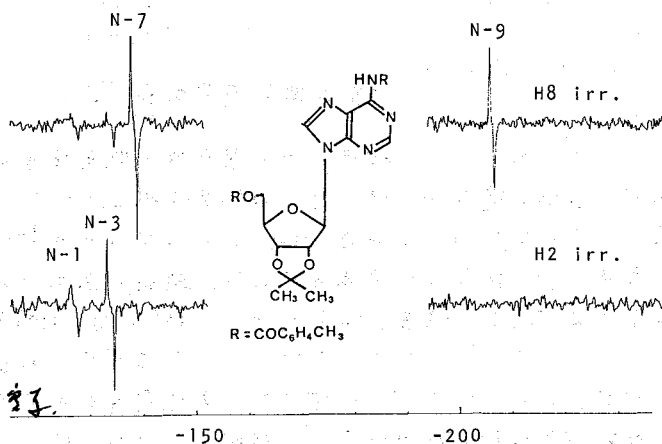


Fig. 6  $^{15}\text{N}$  low power selective INEPT spectra of nucleoside (100 mg in  $\text{CDCl}_3$ ); irradiation power 20 Hz;  $\tau=16$  ms; repetition 2.8 s x 9000. The  $\delta$  scale refers to external  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

# 7. Switching-angle sample spinning NMR spectroscopy による $^{13}\text{C}$ 化学シフト異方性の分離測定

(京大理) 寺尾武彦, 小野寺尚, 藤井 拓, 雜質重幌

《はじめに》 化学シフト異方性を測定することにより、分子の電子状態、及び、運動状態に関して、多くの知見を得ることが出来る。しかしながら、通常の静止した粉末に対する測定では、いくつかの powder pattern が、重なって現われるため、ごく簡単な化合物を除いて、解析が困難であり、何らかの手段で分離測定することが必要である。これまでに、spinning side band の解析による方法<sup>(1)</sup>、spinning に同期したパルス系列による方法<sup>(2)(3)</sup>、あるいは、試料を hop させる方法<sup>(4)</sup>等が報告されているが、いずれも、測定条件の設定や結果の解析が複雑であったり、分解能が低いなどの理由で、一般的な化合物に対して適用することは難しい。今回、我々は、 $^{13}\text{C}$  化学シフト異方性の分離測定に関して、十分実用的であると思われる手法 (Switching-Angle Sample Spinning - SAS) を考案し、予備的な結果を得たので、報告する。

《原理及び方法》 磁場と  $\theta$  の角度をなす軸のまわりに試料を高速回転させて測定を行うと、等角平均値のまわりに縮小されたスペクトルが得られる。このときの scaling factor  $S$  は、

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

で与えられる。特に、magic angle  $\theta_m$  では、 $S = 0$  となり、異方性が消失する。そこで、magic angle 以外の適当な角度  $\theta_{off}$  と、magic angle  $\theta_m$  の間で、spinning angle を switching して、2次元測定を行うことにより、化学シフトの異方性を分離することができる。そのためのパルス系列を、図1に示す。

まず、 $\theta_{off}$  において、磁化を  $z$  軸方向に励起した後、 $t_1$  だけ時間推進させる。その時の磁化の成分を、 $M_x(t_1)$ ,  $M_y(t_1)$  とする。もし、回転系における横磁化の時間推進の速さ比べて十分速く、spinning angle を  $\theta_{off}$  から  $\theta_m$  に switch することができれば、通常の2次元 NMR と同様にして、分離測定が可能になる。しかしながら、

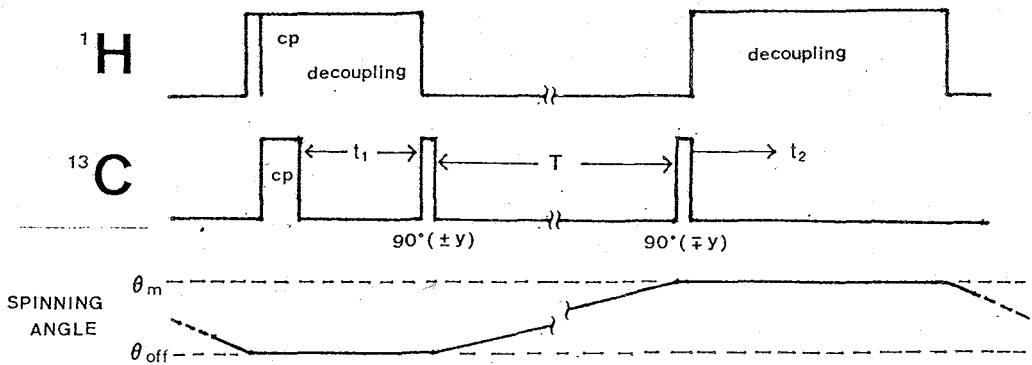


図1.  $^{13}\text{C}$  化学シフト異方性を分離測定するためのパルス系列  
てらお たけひこ、おのぞら たかし、ふじい たく、さいが あぼる

このように速い switching は不可能である。そこで、switching に要する時間  $T$  の間、 $90^\circ(+\gamma)$  パルスを用いて、横磁化を静磁場方向に保持する。このとき、 $T \ll T_1$  であれば、 $T$  の間に、 $M_z(t)$  は消失するが、 $M_x(t)$  はほとんど変化しない。したがって、 $\theta_m$  において、再び  $90^\circ(-\gamma)$  パルスによって磁化を倒すことにより、 $M_z(t)$  に対しては、時刻  $t_1$  で spinning angle を  $\theta_m$  から  $\theta_m$  まで瞬間的に switch したのと同じ状態を作ることができる。この  $90^\circ(-\gamma)$  パルスで生じた FID による MAS スペクトルを測定し、その各ピークの強度の  $t_1$  変化をさらに  $t_1$  でフーリエ変換することにより、(1) の  $S$  で scaling された異方性スペクトルが、各ピークに対して分離して得られる。

次に、縦緩和の効果が無視できない場合について考える。2回目の  $90^\circ$  パルス後の横磁化  $M_x'(t_1)$  は、

$$M_x'(t_1) = M_0 \{ 1 - \exp(-T/T_1) \} + M_x(t_1) \cdot \exp(-T/T_1) \quad (2)$$

で与えられる。第一項の存在により、 $\omega = 0$  の位置に鋭いピークが現われる。このピークを打ち消すため、2つの  $90^\circ$  パルスの位相を反転させた測定を併せて行う。すなわち、このときの  $M_x'(t_1)$  は、

$$M_x'(t_1) = -M_0 \{ 1 - \exp(-T/T_1) \} + M_x(t_1) \cdot \exp(-T/T_1) \quad (3)$$

で与えられる。これらを加えあわせると

$$M_x(t_1) = M_x(t_1) \cdot \exp(-T/T_1) \quad (4)$$

となり、上記ピークは現われなくなる。したがって、 $90^\circ$  パルスの位相を反転させながら積算することにより、縦緩和が無視できる場合と同様の分離スペクトルを得ることができる。しかし、その強度は  $\exp(-T/T_1)$  だけ scale down しているため、 $T_1$  が switching time  $T$  に比べて非常に小さい場合には、事実上測定が不可能になる。 $T_1$  が短い核に関しては、saturation recovery など他の方法を用いて分離する必要がある。しかしながら、メチル基などが、たまたま  $\omega \approx 1$  程度の運動をしている場合を除いて、固体の  $^{13}\text{C}$  の  $T_1$  は、非常に長いので、この手法は、広範な化合物に対して適用できる。

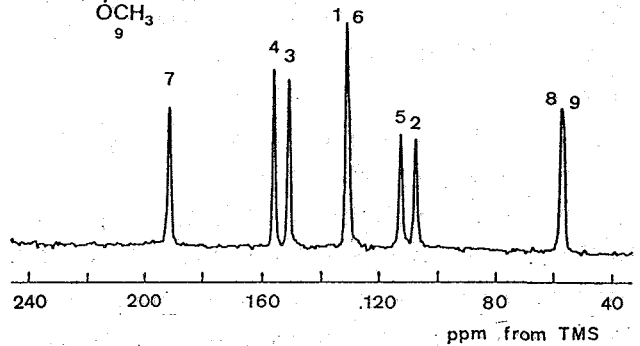
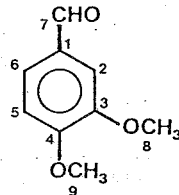


図2. CP/MAS スペクトル (5)

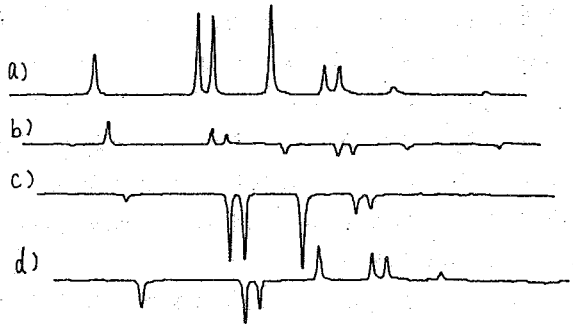


図3. a) ~ d);  $t_1 = 0, 100, 200, 300$  ( $\mu\text{sec}$ ) に対する MAS スペクトル

<実験> 実験は自作の装置を用いて行った。共振周波数及びラジオ波磁場の強さは、 $^1\text{H}$ に対してそれぞれ、90 MHz, 14 Gaussである。試料の回転には、Bullet-typeのローターを使用し、spinning angleのswitchingには、0.04°stepのギア付pulse motorを用いた。 $\theta_{\text{off}}$ は、 $\theta_m + 10^\circ$ に設定した。試料回転の速さは3 KHzである。switching time  $T$ 、及び待ち時間はともに3 secとした。sampling rateは、 $t_1, t_2$ ともに100  $\mu\text{sec}$ とし、 $t_1$ に関しては、75 pointまで測定した。測定に要した時間は、実質約20hrである。試料は3,4-ジメトキシベンズアルデヒドを用いた。

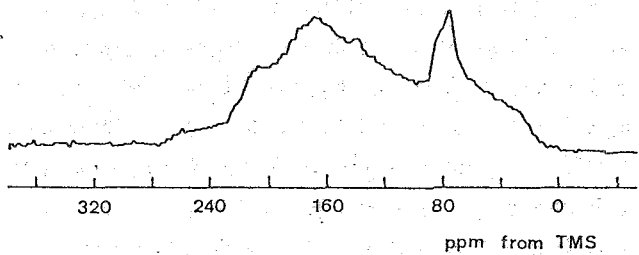


図4. 静止粉末の Powder pattern

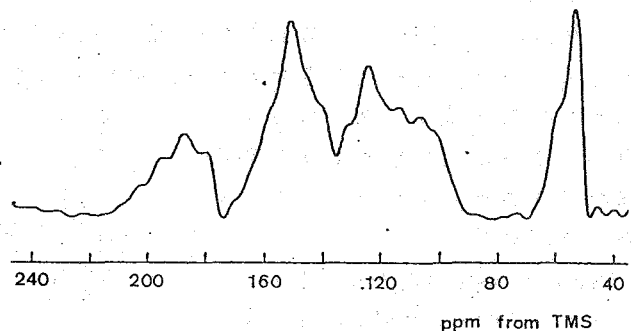


図5. spinning powder pattern

<結果及び議論>

図2にCP/MAS スペクトル、図3に、いくつかの $t_1$ に対応するMAS スペクトルを示す。図3では、

メトキシ基のピークがほとんど消失している。これは、メトキシ基の $^{13}\text{C}$ の $T_1$ が数百msecで、 $T = 3\text{sec}$ に比べて短いためである。この試料では、メトキシ基のspinning powder patternは、すでに分離しているので、問題は無い。他のピークの $T_1$ は、数min以上であり、十分長い。図4は、静止した試料の powder スペクトルである。また、図5に、 $\theta_{\text{off}} = \theta_m + 10^\circ$ における spinning powder スペクトルを示す。ここで、scaling factor  $S$ は、角になるので、各 powder patternは、それぞれの等方平均値のまわりに反転縮小されている。図6に、分離された spinning powder patternを示す。(8)は、分離したスペクトルを加え合わせたものである。これは、図5とほぼ一致している。このことから、この方法が、個々の powder patternを正しく分離していることがわかる。edgeが丸くなっているのは、 $t_1$ の point 数が少ないためである。このため、今回の結果からは、化学シフトテレンリルの主値を精度よく決めることはできないが、測定 point 数を多くすることにより、改善されることが期待される。

ここに示した結果は、予備的なものであり、測定 point 数が少ないことの他に、現在我々が使用している spinning system では、次のような問題を含んでいる。

- 1)  $|\theta_{\text{off}} - \theta_m|$  の設定値と、実際の値が異なること。
- 2) spinning angle に関して、ローターによる個体差があること。

ローターの寿命により、測定の途中で、ローターを交換する必要が生じた場合、



$\theta_m$  はかりでなく、 $|\theta_{off} - \theta_m|$  も、変化する可能性がある。

3) spinning angle の switching により、試料の位置が大きく変わるため、磁場の均一性を保てないこと。

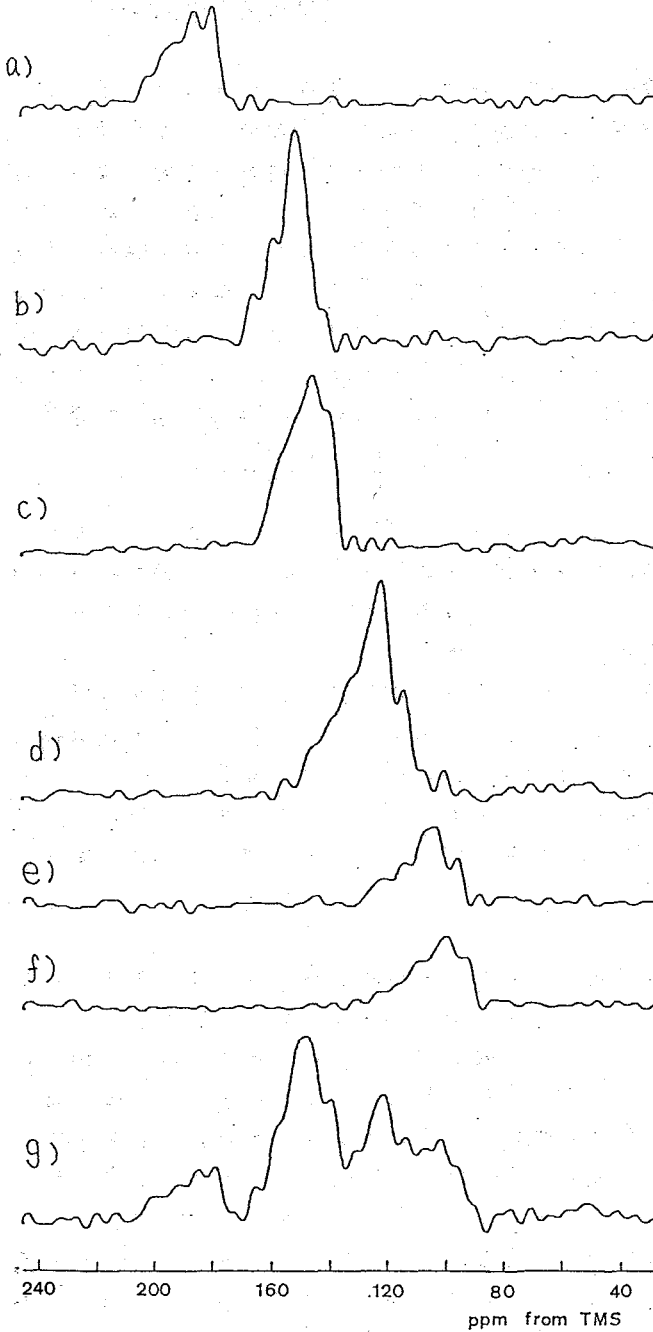


図 6. a) ~ f) ; spinning powder pattern の分離スペクトル。  
g) ; a) ~ f) の和

1) の理由により、scaling factor を(1)式から決定することができず、他の方法を用いなければならぬ。また 2) は、実験の精度を支配する問題である。今回用いたローターは Bullet-type であり、1), 2) の問題は、構造上、避け難い。円筒型のローターを用いた spinning system では、個体差もなく、spinning angle を高精度で制御できるので、 $\theta_{off}$  の設定値から、直接 scaling factor を決定することも可能であろう。3) に関しては、pulse motor の軸を試料の中心に合わせることにより、位置変化を最小におさえることができる。現在、上記の条件を満たす spinning system を製作中である。この改善によって、より信頼性の高い測定が期待できる。

今回の実験は、 $^{13}\text{C}$  の化学シフトの異方性をソリルを対象としたが、SASS 法は、他の異方量の決定にも応用できる。たとえば、 $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  dipole 相互作用の異方性や、あるいは、 $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  相関 spectroscopy により、 $^1\text{H}$  の化学シフトの異方性の測定にも、適用可能と思われる。

- (1) M. Maric et al. JCP, 70, 3300, 1979
- (2) Y. Yarim-Agaev et al. JMR, 47, 51, 1982
- (3) Ad Bax et al. JMR, 51, 400, 1983
- (4) Ad Bax et al. JMR, 52, 142, 1983
- (5) F. Imashiro et al. CPL, 99, 189, 1983

## 8. 多量子NMRの基礎と応用

(阪大薬) 藤原英明

従来よりNMRは分子構造の決定に応用されることが多かったが、そこでの分子構造とは化学的に重要な構造を指すことが多く、いわゆる回折法による各原子の座標決定とは異なっていた。近年、NMRにより座標決定を行なう研究が盛んとなりつつある。1) 固体広幅NMRにおける無機結晶水プロトンの位置の決定、2) シフト試薬を用いた有機分子の構造決定、3) 液晶自身あるいはそれに溶解した分子の構造決定、4) 固体二次元回転スピノエコー法の利用、ごく最近では5) Zero Field NMRの応用、などが挙げられる。これらでは双極子-双極子相互作用の観察が基本となっているが最も精度が高いのは3)であろう。ここでは通常のスカラー結合定数 $J$ の他に直接結合定数 $D_{ij}$  (Direct Dipole-Dipole Coupling) が測定され、それは次式で表わされる。<sup>1)</sup>

$$D_{ij} = -\frac{\hbar \gamma_i \gamma_j}{4\pi^2} \frac{1}{r_{ij}^3} \frac{3\cos^2\theta_{ij} - 1}{2}$$

現在ではこの方法により、簡単な分子-水素原子8個ぐらゐまで-について気体電子線回折と同程度あるいはそれ以上の精度が出るようになった。特に動き易い溶液状態での分子構造を正確に把握される点で特色があるが、この時間題となるのは、複雑な分子ではスペクトル解析が困難なことである。

ここで取り上げる多量子NMRは、このような複雑なスペクトルの単純化に役立つと期待される。通常の選択則 $\Delta m = \pm 1$ と異なり、 $\Delta m = \pm n$ の $n$ 量子遷移は直接観察は困難であるが、 $n$ 個の一量子遷移がコヒーレントに起こり、 $n$ 量子の吸収・放出を併存する場合、 $n$ 量子遷移と同様の効果が見られる。 $n$ が大きくなるに従って、ゼーマン準位間の可能な遷移数は急激に減少するから、 $n$ 量子スペクトルは一量子スペクトルに比べて著るしく単純化される。

### 多量子NMRの歴史

選択則 $\Delta m = \pm 1$ 以外の遷移の観察は、NMRの発展の初期の頃から一部に興味をもたれていた。<sup>2~5)</sup> 即ちCW法で $\gamma$ 出力を可成り上げることにより二量子、三量子信号が現われ、スペクトルの帰属、 $J$ 結合定数の相対符号の決定などへの応用が検討された。残念ながら、この場合、一量子信号が飽和され、しかも二・三量子信号が飽和されないように $\gamma$ 出力を微細に調節する必要があり、それでも一量子信号のバックグラウンドが大き過ぎたり、強い $\gamma$ 磁場はBloch-Siegertシフト様の効果を与えるなど種々の実験的困難のため、広く応用されるには至らなかった。その後約10年、FT法の発展により新しい角度からの検討が行われた。<sup>6~10)</sup> 熱平衡から与えた磁化にパルスを照射し、多量子コヒーレンスを生じさせ、一定時間の展開の後、一量子コヒーレンスに戻して観察するわけである。FT法では照射磁場の周波数をoffsetするが、位相をevolution時間 $t_1$ に比例して変化させる(TPPI法)

ふじわら ひであき

ことにより、次数の違うスペクトルが分離して現われるのが好都合である。  
 図1に offset 法により測定した液晶中のベンゼンクスペクトルを掲げる。

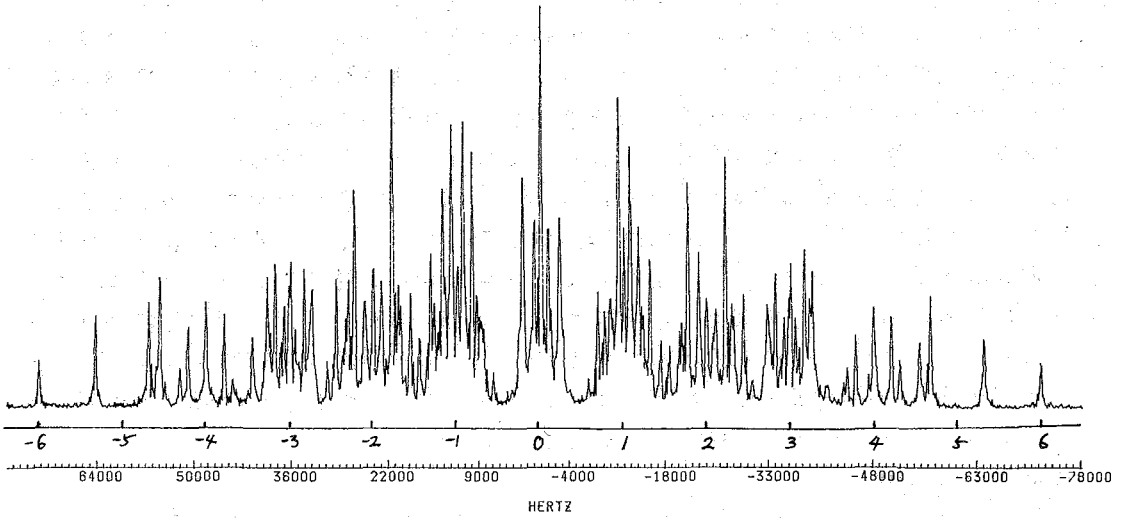


図1. ベンゼンの多量子スペクトル。(図2.bのパルス系列を使用)

Bruker AM360にて測定(阪大産研.高井氏の好意による)。

パルス系列

多量子NMR測定のためのパルス系列には、遷移周波数に"選択的"なものと非選択的なもの、および、観察される多量子の次数について選択的と非選択的の区別があるが、基本的には二次元NMRの一変形と見なすことができる。

図2a)の $\omega_1, \omega_2$ は一つの準位を共有する遷移周波数を表わす。ここでは二量子信号が観察される。<sup>6)</sup> b)は最も一般的なパルス系列である。ハミルトニアンがoffset項 $\Delta\omega I_z$ を含まないとき、オ1とオ2の $\frac{\pi}{2}$ パルスの位相が同じならば偶数次の多

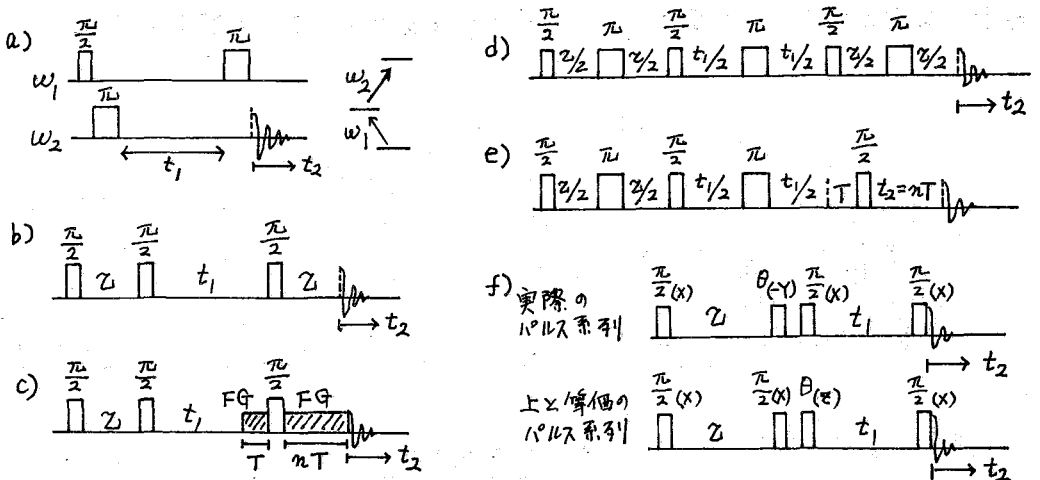


図2. 多量子信号を観察するための種々のパルス系列。

量子信号に選択的であり、 $90^\circ$  異なるときは奇数次に選択的となる。通常の高分解能装置で常法通りに測定する場合は次数の分離のために照射磁場の周波数に *offset* を与えるので偶奇の選択性は消失する。この場合、励起パルスの位相を変えて積算することにより選択性を再現できる。同様の方法で 0, 4, 8, ... あるいは 2, 6 の次数に選択的な測定が可能である。c) は、斜線の部分は磁場勾配を意味し、次数による不均一磁場の影響の受け方の違いを利用して単一次数のみを取り出すパルス系列<sup>12)</sup> である。多量子の次数の分離を TPP 工法(上述)で行う場合は b) のパルスの中向に  $\pi$  パルスを入れ、磁場の不均一性と *offset* 項を効果的に除き、偶奇の選択性を高める(図2の d)。また c) と同様に特定次数のみに選択的な実験は e) により行なわれる(CTEF法)<sup>13)</sup>。RF パルスの位相を細かい精度( $\sim 2\pi/256$ )で変化させるには装置のハード上の改良を要するが、"Composite  $\pi$  Pulse"<sup>14)</sup> を利用すれば不要となる。図2 f) の上段のパルス系列で  $\theta(-Y)\frac{\pi}{2}(+X)$  は  $\frac{\pi}{2}(+X)\frac{\pi}{2}(-X)\theta(-Y)\frac{\pi}{2}(+X)$  と等価であり、 $\pi(+X)\theta(+Z)$  となる。これは *evolution* の初めに Z 軸回りの  $\theta$  の回転を含み、結局上述の TPP 工法と同じになる。

### スペクトル解析

多量子 NMR ではスペクトル強度が *Preparation* 時間  $t$  に依存するため、強度計算をするにはスピンの運動を密度行列で表現し正確に解く必要がある。簡単に遷移周波数のみを計算し、実験値を用いて *Iteration* をする場合は、良く知られたプログラム *LADON* と同様に行なわれる。この時強度計算の代わりに固有肉数の対称性より許容遷移を求める。このプログラムとして、*MQITER*<sup>15)</sup> が作られている。スピン力学による強度計算を含むプログラム *SPEC*<sup>16)</sup> も作られているが、*Iteration* は含まれていない。

### 液晶中の構造解析への応用

8 スピンまでの系について、種々の応用例がある。<sup>17, 18)</sup> 最近では  $n$ -ヘキサンのように構造に自由度の多い分子が対象となりつつある(図3参照)。今後、一量子スペクトルがスピン数が多すぎるため、あるいは、化学交換のために広幅化され解析不可能な場合に、多量子 NMR の威力が発揮されるものと期待される。

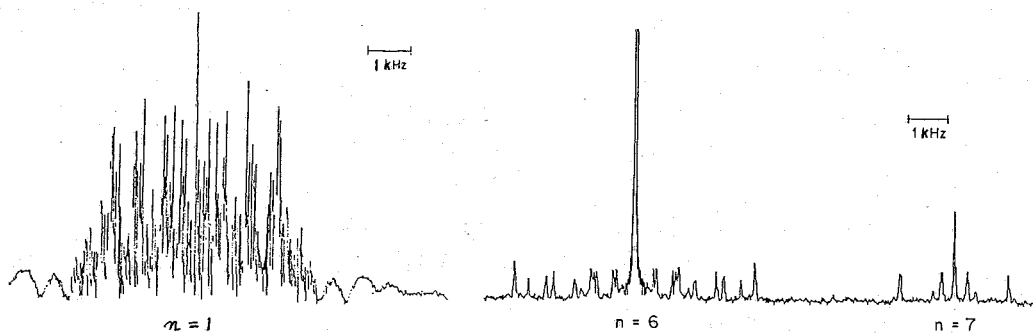
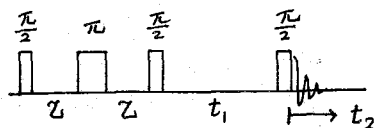


図3.  $D_3C(CH_2)_4CD_3$  の  $^1H$  多量子 NMR スペクトル(液晶中)。

$n=6 \times 7$  のスペクトルは、全ての  $D_{ij}$  に関する情報を含んでいる。

$^{13}\text{C}$ --- $^{13}\text{C}$  結合定数の測定と多量子フィルターとしての応用

二量子コヒーレンスは *Coupling* する相手核が無い場合は生じないので、天然存在比の  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  スペクトルで二量子信号のみを取り出すと  $^{13}\text{C}$  の中心ピークは消え、 $^{13}\text{C}$ --- $^{13}\text{C}$  の結合定数によるサテライトのみが観察される。この時、右のパルス系列で乙を二量子コヒーレンスが最大となるように ( $\sin 2\pi J_{\text{CC}} t_1 = 1$ )



設定し、励起パルスと検出パルスの位相を調整する(循環させる)。<sup>19)</sup>  $t_1$ ,  $t_2$  の二次元測定を行えば炭素-炭素の結合様式 (Connectivity) が分かる<sup>20)</sup> スペクトルの帰属、構造の同定に有効である。同様の測定を  $^1\text{H}$  の二次元相関スペクトルに適用すると(この場合は offset 項を消さない)ので  $\pi$  パルスは加えない。 $t_1$  を固定し、乙を  $t_1$  とする) *Coupling* する相手核を持たない単一線のピークは消える。この時、三量子信号を見るならば、一個の核と *Coupling* するピークも消失する。これは多量子フィルターと呼ばれており、<sup>21)</sup> 強いピークに隠された弱いピークを抽出するのに役立つ。

以上の他、同じ量子数  $m$  の向の遷移ではゼーマン項が消え *Coupling* のみがエネルギーに依存する。そのためゼロ量子信号の周波数には磁場の不均一度が反映されず、線幅から正確に緩和時間が求められる。

緩和時間のデータに多量子信号のそれを含めることにより情報量が増加し、スペクトル密度のより正確な決定が可能となる。このような研究は鎖状分子の構成単位としての興味から  $\text{CD}_2$  基について続けられている。<sup>22)</sup>

最後に、これまでに出版された多量子 NMR の総説を掲げておく。<sup>23~26)</sup> 筆者は文部省在外研究員としてカリフォルニア大学化学科 Pines 教授の研究室に滞在する機会を得た。ここに深謝した。

1. J. W. Emsley and J. G. Lindon, "NMR Spectroscopy Using Liquid Crystal Solvents", Pergamon (1975).
2. W. Anderson, Phys. Rev., 104, 850 (1956).
3. J. I. Kaplan and S. Meiboom, Phys. Rev., 106, 499 (1957).
4. S. Yativ, Phys. Rev., 113, 1522 (1959).
5. W. A. Anderson, R. Freeman, and C. A. Reilly, J. Chem. Phys., 39, 1518 (1963).
6. H. Hatanaka, T. Terao, and T. Hashi, J. Phys. Soc. Japan, 39, 835 (1975).
7. H. Hatanaka and T. Hashi, J. Phys. Soc. Japan, 39, 1139 (1975).
8. W. P. Aue, E. Bartholdi, and R. R. Ernst, J. Chem. Phys., 64, 2229 (1976).
9. A. Wokaun and R. R. Ernst, Chem. Phys. Lett., 52, 407 (1977).
10. S. Vega and A. Pines, J. Chem. Phys., 66, 5624 (1977).
11. G. Drobny, A. Pines, S. Sinton, D. Weitekamp, and D. Wemmer, Faraday Symp. Chem. Soc., 13, 49 (1979). G. Bodenhausen, R. R. Vold, and R. L. Vold, J. Mag. Reson., 37, 93 (1980).
12. A. Bax, P. G. de Long, A. F. Mehlkopf, and J. Smidt, Chem. Phys. Lett., 69, 567 (1980).
13. Y. S. Yen and D. P. Weitekamp, J. Mag. Reson., 47, 476 (1982).
14. R. Freeman, T. A. Frenkiel, and M. H. Levitt, J. Magn. Reson., 44, 409 (1981).
15. S. W. Sinton, Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley (1981).
16. J. B. Murdoch, Ph.D. Thesis, University of California, Berkeley (1981).
17. W. S. Warren and A. Pines, J. Am. Chem. Soc., 103, 1613 (1981).
18. S. W. Sinton and A. Pines, Chem. Phys. Lett., 76, 263 (1980).
19. A. Bax, R. Freeman, and S. P. Kempell, J. Am. Chem. Soc., 102, 4849 (1980).
20. A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, and M. H. Levitt, J. Mag. Reson., 43, 478 (1981).
21. U. Piantini, O. W. Sørensen, and R. R. Ernst, J. Am. Chem. Soc., 104, 6800 (1982).
22. R. L. Vold, R. R. Vold, R. Poupko, and G. Bodenhausen, J. Mag. Reson., 38, 141 (1980).
23. G. Bodenhausen, Prog. NMR Spectry., 14, 137 (1981).
24. A. Bax, "Two-Dimensional NMR in Liquids", Delft Univ. Press, 129 (1982).
25. M. Mehring, "High Resolution NMR in Solids", 2nd Ed., Springer (1983).
26. R. M. Baum, Chem. Eng. News, 1983, 30.

## 9. セルロース固体のCP/DD/MAS $^{13}\text{C}$ NMR

京大化研 平井 諒子・堀井 文敏・北丸 竜三

### 1. 緒言

セルロースは天然に最も多く存在する有機化合物の一つであり、これまでX線、電子顕微鏡、赤外およびラマン分光、およびNMR分光などの種々の方法で研究されてきた。しかし、なおその結晶構造の解明は不十分であり、また非晶状態についてはほとんど明らかにされていない。最近開発されたCP-MAS法による固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR法は、局所的なコンホメーションおよび分子運動に鋭敏であり、このような未解決の問題に対して極めて有効な手段と考えられる。

本報告では、 $\beta$ -1,4-グリコシド結合に関与するC1およびC4共鳴線および側鎖C6共鳴線に含まれる結晶・非晶成分の寄与をこれらのスピン-格子緩和時間 $T_1$ の違いを利用し、選択的に観測できることを示す。また、各共鳴線の結晶および非晶成分の化学シフトを決定し、これらとそれぞれに関与する化学結合のまわりの二面体角とに1対1の対応関係があることを示す。これらの結果に基づき、天然および再生セルロース試料の結晶および非晶成分の分子鎖コンホメーションを考察する。

### 2. 実験

常法により精製した木綿、ラミー、バクテリアおよびバロニアセルロースを用いた。<sup>1,2)</sup>各試料はMASロータに充てる前後で50°C、減圧下で数日間乾燥した。

CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルの測定はCP-MASユニットを付加したJEOL FX-100またはFX-200スペクトロメータにより室温で行なった。<sup>1,3)</sup>Hartmann-Hahn 条件下での回転磁場強度  $\gamma H_1/2\pi$ はそれぞれのスเปクトメータで71 kHzおよび62.5 kHzであり、MASの回転数はそれぞれ3.2 kHzおよび3.5 kHzである。化学シフトはいずれの場合も試料内に挿入したポリエチレンチップの結晶ピークの化学シフト 33.6 ppmを内部基準として決定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1. 結晶成分および非晶成分の選択的観測

図1に、ラミーの50 MHz CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルを示す(各共鳴線の破線および細い実線については後述する)。Atallaら<sup>4)</sup>およびVanderHartら<sup>5,6)</sup>が報告しているようにC4およびC6共鳴線はシャープな低磁場成分とブロードな高磁場成分に分裂する。これら各共鳴線の $T_1$ をTorchia<sup>7)</sup>の方法で測定した結果を図2に示す。縦軸に示した磁化はピーク高さより決定したため、高磁場成分と低磁場成分の分離の良いC4共鳴線の場合はいずれの成分でもほぼ単一の指数減衰曲線が得られる。一方、C6共鳴線には長短2種の $T_1$ が存在し、それぞれ低磁場成分および高磁場成分に相当する。また、C1共鳴線の $T_1$ も長短2種の $T_1$ が存在することから、C4およびC6共鳴線に見られる2成分に相当する2成分がこの共鳴線にも含有されていることは明らかである。これらの各共鳴線の2成分の $T_1$ の違いを利用し、 $T_1$ の長い成分と短い成分を選択的に観測することを試みた。図3には、Torchia<sup>7)</sup>の

$T_1$ を観測するパルス系列を用い、 $T_1$ の短い成分がほぼ消失する条件で測定した $T_1$ の長い成分のみのスペクトルを示す。一方、図4には $^{13}\text{C}$ の平衡磁化を利用したシングル $\pi/2$ パルス系列によりパルス待ち時間を短い成分の $T_1$ 程度の4Sとして得たD/D/MASスペクトルを示す。この場合、2成分の $T_1$ の差が十分でないためC4およびC6共鳴線にみられるように一部 $T_1$ の長い成分も出現しているが、 $T_1$ の短い成分の各共鳴線の特徴は明らかである。したがって、図1に示したラミーの各共鳴線にこれらの2成分が含有されていることは明らかで、各成分の特徴を参考にcurve resolverを用いてC1、C4およびC6共鳴線をLorentz曲線を仮定して2成分に分割した。その結果を図1の破線および細い実線で示す。各共鳴線の破線で示した成分( $T_1$ の長い成分)の全体に対する面積分率は、X線法で決定した結晶化度と良く対応し、この成分は結晶成分と帰属できる。また、実線で示した成分は非晶成分である。

同様な成分の選択的観測は、木綿、バロニア、バクテリア、および再生セルロースでも可能であり、また、C1、C4およびC6共鳴線を結晶・非晶2成分に分割することができた。<sup>13</sup>この結果得られた各試料の結晶成分および非晶成分の化学シフトを表1および表2にそれぞれ示す。表2には、C1、C4およびC6共鳴線の非晶成分の線巾 $\Delta\nu$ も示した。

### 3.2. $^{13}\text{C}$ 化学シフトと二面体角の関係

CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR法で得られる等方平均の $^{13}\text{C}$ 化学シフトは本来特定のコンホメーションに対してそれぞれ定義される化学シフトテンソル $\sigma$ の主値の数平均で表わされる。したがって、いわゆる水素結合やpackingの影響が著しくない系では化学シフトとコンホメーションを決める化学結合のまわりの二面体角とが一対一に対応するはずであり、複数のコンホメーションが存在する場合は複数の共鳴線が観測されるはずである。

図5には、種々のグルコース結晶、 $\beta$ -D-セロビオース結晶、 $\beta$ -メチルセロビオシド $\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ 結晶について、化学シフトに及ぼす水素結合およびpackingの影響を示す。すなわち、 $\beta$ -1,4-グリコシド結合または側鎖のC5-C6結合に直接関係せずまた帰属の容易な還元末端のC1共鳴線および非還元末端C4共鳴線について、固体状態と溶液状態の化学シフトの差をX線結晶構造解析により決定されている水素結合の酸素間距離 $\text{O}\cdots\text{O}$ に対してプロットした。データはかなりバラツキているが、この結果から通常セルロース試料でみられる $2.7\text{\AA}$ 以上の $\text{O}\cdots\text{O}$ 距離では水素結合またはpackingの影響は存在するとしても2 ppm以内といえる。

図6、7、8には、それぞれC1、C4、およびC6共鳴線の化学シフトと対応する二面体角 $\phi$ 、 $\psi$ 、 $\chi$ との関係を示す。<sup>29)</sup>いずれの場合にも良い対応関係がありC1、C4およびC6共鳴線の化学シフトが $\phi$ -一次近似でそれぞれ $\phi$ 、 $\psi$ 、 $\chi$ により決定されると結論される。

### 3.3. セルロースの分子鎖コンホメーション

表1に示した結果から明らかのように、各試料の結晶成分のC1およびC4共鳴線の少くともいずれかは2つ以上に分裂する。このことは二面体角 $\phi$ 、 $\psi$ の値が2

つ以上存在することを意味し、結晶中の分子鎖コンホメーションが従来から考えられているような単純な2回らせり構造を成るのではないと考えられる。<sup>10-14)</sup> また、これらの共鳴線の分裂の様式は従来同一の結晶構造セルローズIをもつと考えられていた天然セルローズ試料間で著しく異なり、木綿、ラミーのグループとバロニア、バクテリアセルローズのグループに分けられる。一方、再生セルローズ各試料の化学シフトおよび分裂様式はいずれの天然セルローズ試料とも異なり、こゝらがセルローズIIという別の結晶構造をもつことに対応する。

側鎖のコンホメーションはいずれの天然物でもC6の化学シフトが66.0-66.5 ppm<sup>2)</sup> であることから trans-gauche であると結論できる。このことはX線構造解析の結果とよく一致する。一方、再生物のそのは gauche-trans と結論され、 gauche-trans および trans-gauche が一対で共存するというX線解析の結果<sup>3,4)</sup> と矛盾する。もし、trans-gauche が共存すれば 66 ppm 程度の共鳴線が観測されるはずであり、X線解析は再検討される必要がある。

表2に示した結果から明らかのように、非晶成分については天然および再生物の化学シフトはいずれについてもほぼ一致する。このことは、非晶成分の平均的なコンホメーションが両試料間で大差ないことを示唆する。しかし、天然物のC1共鳴線の線巾は再生セルローズ繊維や非晶セルローズ試料のその約1/2である。このことは、天然物のφの分布がかなり狭いことを意味し、分子鎖のコンホメーションがかなり制限されているものと思われる。

文献 1) F. Horii, A. Hirai and R. Kitamaru, Polym. Bull., 8, 163(1982). 2) 平井諒子, 堀井文敬, 北丸竜三, 高分子学会誌編集, 32, 829(1983). 3) A. Hirai, F. Horii and R. Kitamaru, Bull. Magn. Reson., 5, 233(1983). 4) R.H. Atalla, J.C. Gast, D.W. Sindorf, V.J. Bartuska and G.E. Maciel, J. Am. Chem. Soc., 102, 3249(1980). 5) W.L. Earl and D.L. VanderHart, J. Am. Chem. Soc., 102, 3251(1980). 6) W.L. Earl and D.L. VanderHart, Macromolecules, 14, 570(1981). 7) D.A. Torchia, J. Magn. Reson., 30, 613(1978). 8) F. Horii, A. Hirai and R. Kitamaru, Bull. Magn. Reson., 5, 190(1983). 9) F. Horii, A. Hirai and R. Kitamaru, Polym. Bull., in press. 10) K.H. Gardner and J. Blackwell, Biopolymers, 13, 1975(1974). 11) A.D. French, Carbohydr. Res., 61, 67(1978). 12) C. Woodcock and A. Sarko, Macromolecules, 13, 1183(1980). 13) K.J. Kolpak and J. Blackwell, Macromolecules, 9, 273(1976). 14) A.J. Stipanovic and A. Sarko, Macromolecules, 9, 851(1976).

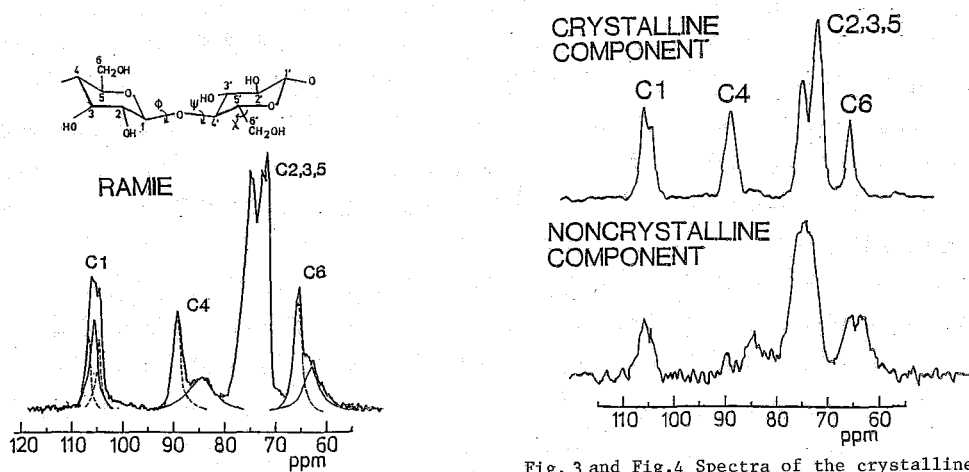


Fig.1 50MHz CP-MAS <sup>13</sup>C NMR spectrum of ramie.

Fig.3 and Fig.4 Spectra of the crystalline and noncrystalline components of ramie selectively observed by Torchia's pulse sequence and single π/2 pulse sequence, respectively.



Table I  
<sup>13</sup>C Chemical Shifts of the Crystalline Components of Native and Regenerated Cellulose

sample	chemical shift/ppm								
	C1		C4	C6	C2, 3, 5				
<b>native cellulose</b>									
valonia	107.0	106.4	105.3	91.3	90.1	66.5	75.8	73.8	72.3
bacterial	107.3	106.3	105.3	91.0	90.1	66.4	75.7	73.6	72.3
cotton	107.1	105.4		89.9		66.5	75.8	73.5	72.6
ramie	107.2	105.0		89.7		66.0	75.9	75.3	73.5
<b>regenerated cellulose</b>									
cupra rayon	108.0	106.3	89.5	88.2	64.1		75.9		
high crystalline cellulose II	108.1	106.3	89.6	88.4	63.7		77.6	75.9	73.9

Table II  
<sup>13</sup>C Chemical Shifts and Line-Widths of the Noncrystalline Components of Native and Regenerated Cellulose

sample	C1		C4		C6	
	δ/ppm	Δν/Hz	δ/ppm	Δν/Hz	δ/ppm	Δν/Hz
<b>native cellulose</b>						
valonia	106.2	114	85.2	249	63.4	185
bacterial	106.6	120	85.0	242	63.4	163
cotton	106.0	143	85.1	256	63.7	185
ramie	105.8	128	84.8	284	63.0	171
<b>regenerated cellulose</b>						
cupra rayon	105.3	284	85.1	327	62.8	185
high crystalline cellulose II	104.8	171	84.7	256	62.8	156
amorphous	105.2	284	84.8	284	62.8	284

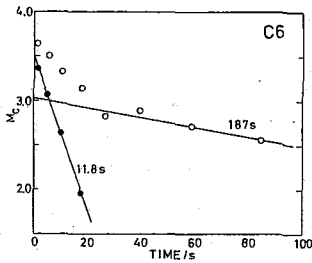
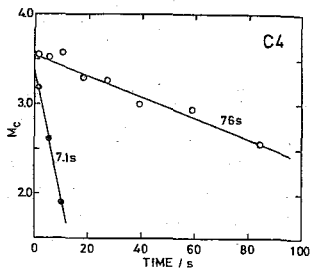
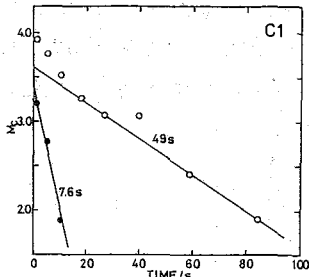


Fig. 2 <sup>13</sup>C longitudinal magnetic relaxation for C1, C4, and C6 resonance lines of ramie.

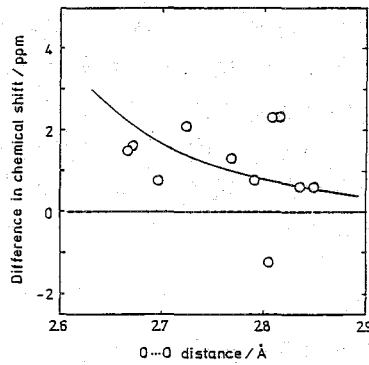


Fig. 5 Difference in <sup>13</sup>C chemical shift between the lines in the solid state and those in solution vs. distance O...O of hydrogen bonds.

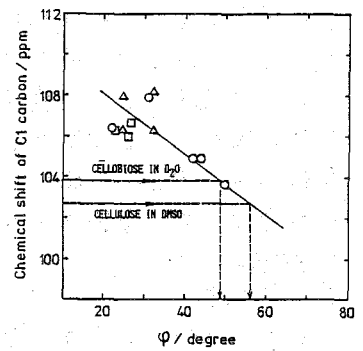


Fig. 6 <sup>13</sup>C chemical shift of C1 carbon vs. torsion angle  $\phi$ .

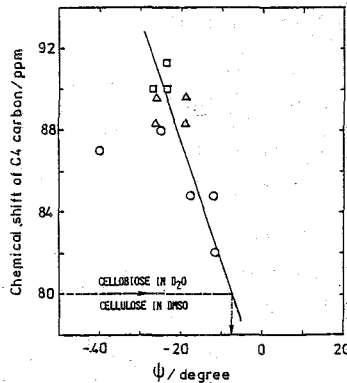


Fig. 7 <sup>13</sup>C chemical shift of C4 carbon vs. torsion angle  $\psi$ .

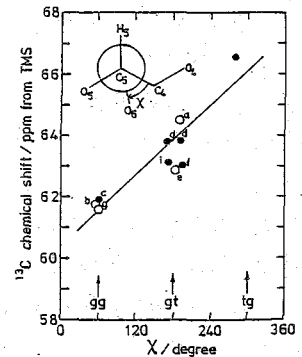


Fig. 8 <sup>13</sup>C chemical shift of C6 carbon vs. torsion angle  $\chi$ .

# 10. CP/MAS $^{13}\text{C}$ NMRによるポリアクリロニトリル繊維の耐炭化過程の研究

(東レリサーチセンター, \*東レ)

○横田克行, 塩谷泉, 森田健一\*

## 1. はじめに

先に我々は、炭素繊維のプレカーサーであるポリアクリロニトリル(PAN)耐炭化繊維の構造解析にCP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMRが有効であることを示した。<sup>1)</sup> 熱的耐炭化過程の構造変化および分子運動性の変化は、耐炭化の機構ないし繊維物性の変化との関連で興味深い。そこで本研究では、より単純なスペクトルを示すイオウ雰囲気での耐炭化繊維をモデル系として選び、耐炭化過程の構造変化および分子運動性変化をCP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMRおよび $^{13}\text{C}$  T<sub>ρ</sub>で検討することを目的とした。ここではまず、 $^{13}\text{C}$  スペクトル(強度)、元素分析等の結果が森田ら<sup>2)</sup>の提案する反応機構に基づく構造変化によって合理的に解釈できることを示す。つぎに、耐炭化に伴う $^{13}\text{C}$  T<sub>ρ</sub>変化の結果(最初減少後に増加)が、運動性を反映しうるか否かの議論を行う。

## 2. 実験方法

耐炭化繊維はイオウと窒素の混合気流中PAN(0.5モル%のヒドロキシエチルアクリロニトリルを含む共重合体)の熱処理によって調製した。測定には、液体窒素温度で粉碎した粉末を用いた。

CP/MAS スペクトル測定は、JEOL FX-100 スペクトロメータにより、 $^1\text{H}$  デカップリング磁場9~12G, マジック角度回転数約3.4 kHzで行った。 $^{13}\text{C}$  T<sub>ρ</sub>測定は通常のパルスシーケンスにより、スピノロッキング磁場 $H_{1c} = 49\text{G}$  ( $\nu_c = \gamma_c H_{1c} / 2\pi = 52\text{kHz}$ )を用いた。 $H_{1c}$ はHartmann-Hahn matching条件のときの $^1\text{H}$  90°パルス幅から決めた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 耐炭化過程の構造変化

イオウ雰囲気でのPANを熱処理すると $^{13}\text{C}$  スペクトルは図1に示すように反応の進行(図1 Aから1Fの順)に伴い変化す

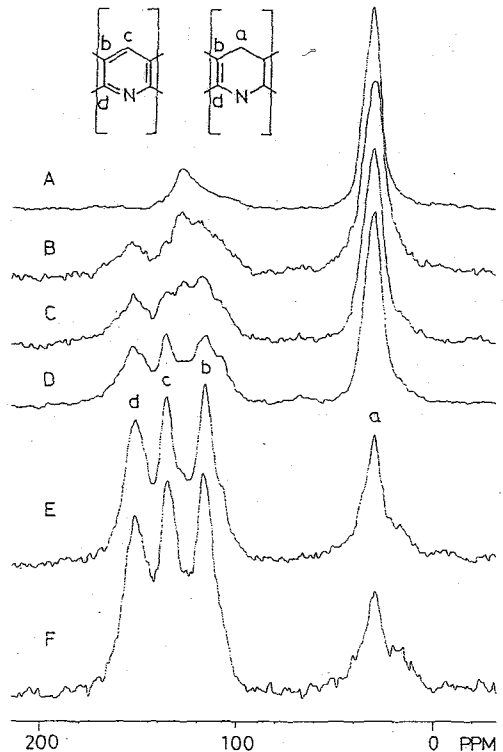


図1 イオウ耐炭化PANの $^{13}\text{C}$  NMR CPコンタクト時間は2.0ms。

(A)はPAN。熱処理条件は(B) 220°C, 4hr (C) 240°C, 4hr (D) 240°C, 10hr (E)(F)は220°C, 2hr 前処理の後 (E) 300°C, 10hr (F) 360°C, 3hr。

よこたかつゆき, しおのやいずみ, もりたけんいち

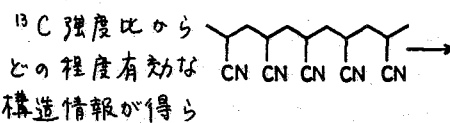
る。スペクトルの帰属から、ピーク b, c, d の強度の増加, ピーク a の減少はニトリル基の閉環および脱水素反応によるものである。図1 CからFまでは上述2つの反応は同時に進行するように思われる。しかし図1 Bでは、ピーク c の強度がピーク b, d と比べて著しく弱いので、閉環反応が主反応と考えられる。高温反応の場合、あらかじめ ~ 220°C で前処理をしておくことで繊維を燃やすことなく反応を進めることができる。これらの事実は、分子閉環構造ができることが耐炭化反応の必要条件であることを示唆しており興味深い。また図1 Bで、ピーク b の強度がピーク c 程は弱くないことは、図1中に示したエナミン構造の存在を示す。さらにまた、図1 C, D, E でピーク b の高磁場側の肩ピークは、<sup>13</sup>C ソフトから脱水素 AN 構造の二重結合炭素に帰属できる。以上のように、反応を追跡することにより IR などからは得にくい情報も得られる。

構造解析に CP/MAS スペクトルを使うには元素分析が解釈の助けとなる。表 I は耐炭化 PAN の元素分析結果を示す。H/C 比の減少の他 S/O 比が 1 で一定している点が注目される。これらは下に示す森田らの反応機構によってよく説明ができる。すなわち、構造 I を仮定すれば、適当な m, n の組み合わせにより表 I に示すように広い範囲の反応条件に渡って実測と計算の一致はかなりよい。ただし、当然ながら元素分析からはジヒドロピリジン構造と AN 構造の区別はできない。

表 I イオウ耐炭化繊維の元素組成

熱処理条件	C	H	N	S	O
220°C, 4hr obs.	67	58	22	10	1.9
240°C, 4hr obs.	37	29	12	10	1.1
calc. (m=7, n=3)	36	29	11	1	1
240°C, 10hr obs.	32	25	10	10	0.84
calc. (m=6, n=3)	33	26	10	1	1
300°C, 10hr obs.	30	17	8.5	10	1.1
calc. (m=2, n=6)	30	17	9	1	1
360°C, 3hr obs.	28	12	7.7	10	1.2
calc. (m=0, n=7)	27	12	8	1	1

CP/MAS



れるかを調べるのが本報の目的の1つである。CP/MAS <sup>13</sup>C 強度はコンタクト時間に強く依存するので組成比の知見を得るためにはこの挙動を詳しく調べる必要がある。耐炭化 PAN の場合、図2のような依存性を示す。(300°C, 10hr 熱処理試料) Garroway ら<sup>3)</sup>は、硬化エポキシにおいて、単純な熱化学像から導かれる(1)式によってクロスポーラリゼーション(CP)過程が記述できることを示した。

$$M(t) = M_0 \lambda^{-1} \{ 1 - \exp(-\lambda t / T_{CH}) \} \exp(-t / T_{1p}^H) \quad (1)$$

ここで、 $\lambda = [1 + T_{CH} / T_{1p}^C - T_{CH} / T_{1p}^H]$   
 $T_{1p}^H, T_{1p}^C$  は各々、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C の  $T_{1p}$ ,  $T_{CH}$  は CP 緩和時間,  $M_0$  は CP 条件下の平衡磁化である。ただし、<sup>13</sup>C  $T_{1p}$  は通常定義されているものとは違い  $W_{IC} + W_{IH}$  に対するものである。したがって <sup>13</sup>C 磁化は  $\lambda T_{CH}$  の速度で立ち上がり  $(T_{1p}^H)^{-1}$  で減衰する。図2の場合も、ピーク a, c は速く立ち上がり、b, d はゆっくり立ち上

がるが、 $T_{pH} = 9.0 - 9.7$  msの範囲で同一の速度で減衰する。それ故、(1)式を適用することができる。すべてのピークに対して  $T_{CH} \leq 750 \mu s$  また  $T_{pC} \geq 20 - 50$  ms (後述)であるので、例えばコンタクト時間  $\tau \geq 5$  msでは、(2)式が成り立つ。つまり、強度比は炭素数を反映する。

$$M(\tau) \approx M_0 \exp - (\tau / T_{pH}) \quad (2)$$

(2)式を保証するのは  $T_{pC} > T_{pH} \gg T_{CH}$  の条件である。

以上でピーク強度比を解釈する用意が整った。最後に残ったピークのオーバーラップの問題は、短いdelayを入れて測定したプロトン非結合炭素スペクトルがローレンツ曲線に近似できることから、便宜的にこれを仮定しピーク分割することで解決する。コンタクト時間 5 ms のスペクトルをピーク分割すると強度比  $a : b : c : d = 7.1 : 8.8 : 5.3 : 8.9$

が得られた。構造Iを基本としてイミン/エアミン混合構造、未反応AN基を仮定して突測と計算を最小自乗フィットさせてみる。環伸長部にピロリドン構造を仮定すると最大誤差 17% となるが、ピロリドン構造を仮定すると同じく 3% となる。試料調製法からみて後者の可能性はある。このとき計算から右の構造が得られる。炭素数比  $a : b : c : d = 6.9 : 8.6 : 5.5 : 9.1$  は上述したように分割強度比との一致がよい。以上から、森田らの反応機構を仮定すれば  $^{13}C$  強度比も無理なく解釈できることがわかった。環伸長部で二重結合の共役が切れているとすると共役の平均長  $n \sim 15$  となる。ESRの最大傾斜幅  $\Delta H_{mse} = 15 G$  から  $\Delta H_{mse} \propto 1/\sqrt{n}$  を使って見積もられる  $n \sim 14$  に近いことは興味深い。

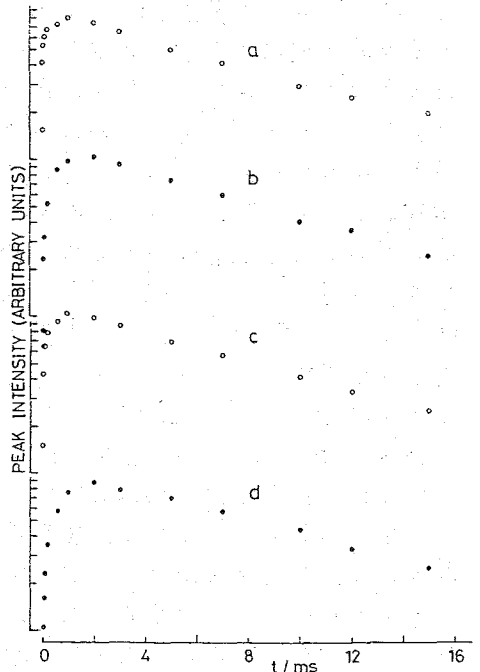
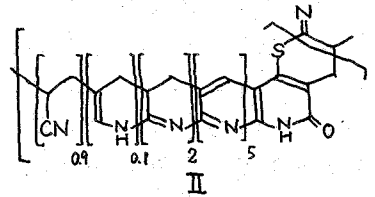


図2  $^{13}C$  ピーク強度のコンタクト時間依存性 (300°C, 10hr 熱処理試料)



### 3.2 耐炭化過程の $^{13}C$ $T_{pC}$ 変化と分子運動

固体の分子運動を研究する方法としては  $^1H$  の緩和時間が広く利用されている。しかし、耐炭化 PAN の系は  $10^{17} \sim 10^{18}$  spins/g オブザーの有機ラジカルが存在する系であるので、スピン拡散により平均化がおこなわれる  $^1H$   $T_1$   $T_{pC}$  は有効でない。ここでは、スピン拡散の問題をまぬがれている  $^{13}C$   $T_{pC}$  がこの系で分子運動の知見を得るのに有効かどうかを調べることを目的とした。

$^{13}C$   $T_{pC}$  の結果は表 II にまとめるように (測定例は III), 耐炭化の進行に伴い一度減少してから再び増加する。この系の  $^{13}C$   $T_{pC}$  の緩和機構としてはつぎの3つが考えられる。

(1) スピン格子緩和機構

(2) <sup>13</sup>Cスピンの相互のフリップフロップによる  
スピンスピン緩和機構

(3) ラジカルの電子スピン相互のフリップ  
フロップによるスピンスピン緩和機構

(1) は運動を反映するが、(2)、(3) は一般には  
反映しない。スピンスピンロッピング磁場が小さいと  
きは(2)の機構が無視できないことと赤坂ら<sup>5)</sup>  
は昨年報告した。(2)の機構は高分子の結晶  
領域で重要であり、無定形領域では寄与小であ  
る。<sup>6)</sup>耐炭化反応の初期には、結晶性のPANが無  
定形化することがX線回折<sup>7)</sup>で明らかにされている  
ので、もし(2)の機構が互配的とすれば反応の初期  
にはむしろT<sub>1ρ</sub>は増加するはずである。事実は逆で  
ある。T<sub>1ρ</sub>の増加過程も同様の議論により結局(2)  
の機構はT<sub>1ρ</sub>変化の傾向をくつかえす程の寄与はほ  
いと考えられる。(3)は不対電子と核の超微細結合によ  
るものであり、双極子結合とスカラー結合がある。  
固体では一般に前者が大きいこと、二重結合の共役  
が前述したように割と短いことから、前者のみを考  
慮する。この機構によるT<sub>1ρ</sub><sup>8)</sup>は、電子スピンのため  
緩和時間がT<sub>1<sup>s</sup></sub> >> 1/2πν<sub>ic</sub> = 3×10<sup>-6</sup> s のとき

$$T_{1\rho} = T_{1^s} \frac{1}{\sin^4 \theta} \cdot \frac{H_{ic}^2}{(\Delta H^2)^{1/2}} \quad (3)$$

ここで、θは有効磁場と静磁場のなす角度であり  
H<sub>ic</sub> = 49 G、(ΔH<sup>2</sup>)<sup>1/2</sup>は核に対する電子スピンの  
2次モーメントである。T<sub>1<sup>s</sup></sub>を300°Cで反応した炭化テキストロス<sup>9)</sup>のデー  
タからT<sub>1<sup>s</sup></sub> = 5×10<sup>-4</sup> sとし、前述した構造IIから非局在化領域を仮定して  
計算を行うと全体の80%はT<sub>1ρ</sub> > 170 msとなる。(スピン濃度は6×10<sup>18</sup> spins/g)  
実験のスペクトルでは、ピークbのT<sub>1ρ</sub>はピークaよりも2.5倍長く(図3)上述  
と矛盾しない。反応の進行に伴い単調にスピン濃度は増加し、T<sub>1<sup>s</sup></sub>は減少する<sup>9)</sup>  
のでT<sub>1<sup>s</sup></sub> > 3×10<sup>-6</sup> sが保証されれば、T<sub>1ρ</sub>増加過程は運動を反映すると考えられよ  
う。T<sub>1ρ</sub>減少過程では電子スピンの影響が一桁以上少ないので当然反映していよう。  
[謝辞]

ESR測定をして頂いた日本電子(株)吉田栄久夫氏、河野雅弘氏に感謝致します。

- (1) 横田ら、第20回NMR討論会要旨集、1981 (2) K. Morita et al., Carbon 19, 11 (1981)  
(3) A.N. Garroway et al., ACS Symposium Series, 103, 1978, Chap 4 (4) S. Ohnishi et al., J. Polymer  
Sci., 47, 503 (1960). (5) 赤坂ら、第21回NMR討論会要旨集、1982 (6) W. S. Veeman et al.,  
Macromolecules, 12, 924 (1979). (7) K. Miyachi et al., Sen-i Gakkaishi 22, 538 (1966).  
(8) A. Abragam The Principles of Nuclear Magnetism, Oxford Univ. Press, London, 1961, P565  
(9) R. C. Pastor et al., J. Chem. Phys., 32, 264 (1960).

表II イオウ耐炭化繊維の<sup>13</sup>C T<sub>1ρ</sub><sup>\*1</sup> (ms)

試料	T <sub>1ρ</sub> (ms)
PAN	17
220°C, 4hr 熱処理	13
240°C, 10hr	12
300°C, 10hr	19
360°C, 3hr	31

\*1 最初の decay (220°C, 4hr では  
0 ≤ t ≤ 2 ms, 360°C, 3hrでは 0 ≤ t ≤ 10 ms)  
から求めた T<sub>1ρ</sub> (試料全体の平均値)

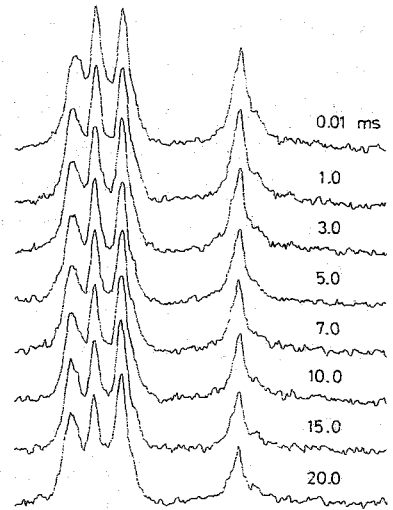


図3 ロッキング時間の関数と  
しての<sup>13</sup>C スペクトル (300°C,  
10hr 熱処理試料)

# 11. 天然鉱物の<sup>29</sup>Si-MAS NMR.

<sup>29</sup>Si スピコン格子緩和時間および線中に及ぼす常磁性不純物の影響  
(東大理・国立がんセンター\*)

○渡部徳子, 清水洋, 増田彰正, 斎藤肇, 多田涼子

I.はじめに

<sup>29</sup>Si 固体高分解能NMRは、ケイ酸塩、アルミノケイ酸塩や合成ゼオライトの構造研究に新たな局面を展開した。鉱物の場合 結晶性がよければX線回折法が構造決定に用いられるが、この手法は結晶性の悪いものまたは非晶質のものに対しては、ほとんど役に立たない。1978年、鉱物中のSiとAlの配列のしかたと化学シフトの関連が明かにされると、人工および天然ゼオライトや一部のケイ酸塩鉱物中の<sup>29</sup>Siのキャラクタリゼーションに応用され多くの成果をあげつつある。<sup>1,2)</sup><sup>29</sup>Si-MAS-NMRが鉱物研究の一般的な方法として定着することができるかどうかは、スペクトルの得易さや対象となる鉱物の範囲に係わってくると考えられる。本研究は<sup>29</sup>Si-NMRの緩和時間の観測から 鉱物の構造研究の新しい手段としての<sup>29</sup>Si-MAS-NMRを評価するために スピコン格子緩和時間や線中に影響を与える要因を検討することを目的としている。とくに天然の粘土鉱物の場合 従来の<sup>29</sup>Si-T<sub>1</sub>はきわめて長いという結果に反して、T<sub>1</sub>は10~1000 msのオーダーにあり 常磁性不純物の効果が重要であることが明らかとなった。

## II. 実験

表1に示した12種の粘土鉱物および石英。長石について Bruker CXP-300により、59.604 MHz, 23°C でMAS-NMRを測定した。標準の<sup>13</sup>C MAS 700-7"を使用し、パルスのくり返し時間は2sで 100~2000回積算された。T<sub>1</sub>は100°で90° pulse sequenceで測定された。常磁性不純物の見積りのためにESRスペクトルを、他の鉱物の混入および結晶化度を確かめるために粉末X線回折スペクトルを測定した。

表1 粘土鉱物の<sup>29</sup>Si-NMR および ESRの結果

number	sample name	chemical formula	type	$\delta^a$ ppm	$\Delta\nu_{1/2}$ Hz	T <sub>1</sub> ms	concn. of <sup>b)</sup> Fe <sup>3+</sup>
# 1	Halloysites	Al <sub>4</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>8</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1:1	-93.3	180	83	1.7
# 2	Shimmi kaolin			-93.1	200 <sup>c)</sup>		3.1
# 3	Hadong kaolin						
	Kaolinites	Al <sub>4</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>8</sub>	1:1				
# 4	Kampaku kaolin			-92.7	107		1.5
# 5	Georgia kaolin			-92.5	262	240	6.8
# 6	Gaerome clay			-92.8	232 <sup>c)</sup>		4.3
# 7	Kibushi clay			-92.9	306		9.7
# 8	Pyrophyllite	Al <sub>2</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub>	2:1	-95.7	107	910	1.1
# 9	Talc	Mg <sub>3</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub>	2:1	-97.4	260		1.5
# 10	Montmorillonite	Al <sub>2</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> · nH <sub>2</sub> O	2:1	-94.1	362	47	13.0
# 11	Chlorite	(Mg, Fe, Al) <sub>6</sub> [Si, Al] <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>8</sub>	2:1		broad		3.1
# 12	Phlogopite	KMg <sub>3</sub> [Si <sub>3</sub> Al] <sub>0</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub>	2:1		broad		8.0
# 13	Illite	KAl <sub>2</sub> [Si <sub>3</sub> Al] <sub>0</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub>	2:1		broad		3.1

a) Chemical shift from TMS. b) Arbitrary unit normalized by weight of sample and instrumental parameters. c) NMR spectra show a shoulder at about -91ppm. Linewidth was estimated after separation of two peaks.

わたり、とくに、(みず)は、また、あまた、さうじは、はじめ、たべたりょうこ

## Ⅲ. 結果および考察

1. 粘土鉱物の構造と化学シフト 表1に鉱物の化学式と<sup>29</sup>Si-NMR, ESRの結果を、図1に粘土鉱物にみられる二つの構造を示した。Si原子は4個のO原子により四面体配位されている。そのうち3個のO原子は同一平面内で別のSiと共有され、六角形の網目構造を形成する。この四面体層は silica sheet と呼ばれている。Alイオンは、OまたはOHにより6配位され、Gibbsite sheet と呼ばれる八面体層を形成している。

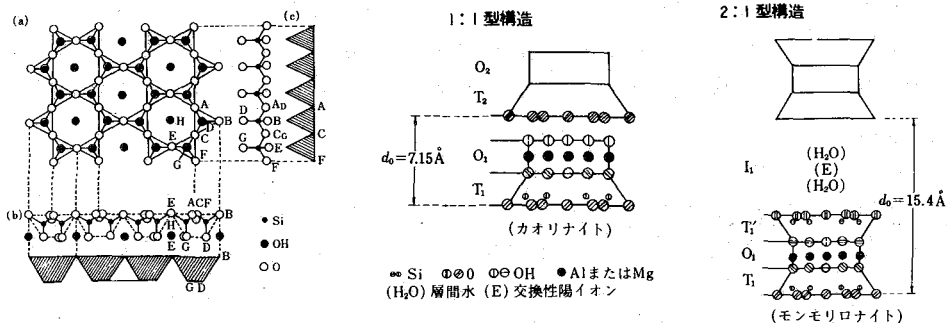


図1. 粘土鉱物における silica sheet と構造

halloysite と kaolinite (#1~6) では silica sheet と gibbsite sheet とが 1:1 に、pyrophyllite, talc, montmorillonite など (#7~12) では 2:1 に積み重なった単位構造をもつ。この単位構造がさらに積み重なって層を作っている。層間には、H<sub>2</sub>O や Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> などのイオンをほそみ込んでいるものもある。表1より 1:1 型の<sup>29</sup>Si 化学シフトは TMS から -93 ppm であり 2:1 型の場合 -94~-97 ppm である。明かに層構造のちがいが化学シフトに反映されている。試料 (#10~12) は 6~10本のピークを示し、かつ異方性が大きい。化学式から予測されるように、結合状態の異なる Si があると考えられるが、現時点でピークの帰属はできていない。

## 2. 粘土鉱物中の常磁性不純物

図2に示された ESR スペクトルの例から明かなように、数種類の常磁性種が含まれている。みかけの g 値が ~4 のシグナルは全試料にみられる。これは、rhombic crystal field (2つの6配位) にある Fe<sup>3+</sup> イオンに特徴的のシグナルであり、<sup>3)</sup> gibbsite sheet の Al<sup>3+</sup> イオンの位置に部分的に Fe<sup>3+</sup> イオンが置換していることを示している。g~2 付近の6本線は Mn<sup>2+</sup> によるもので、とくに Mg を含む鉱物 (talc など) に顕著である。ただし、sharp の6本線は、reference の Mn<sup>2+</sup>

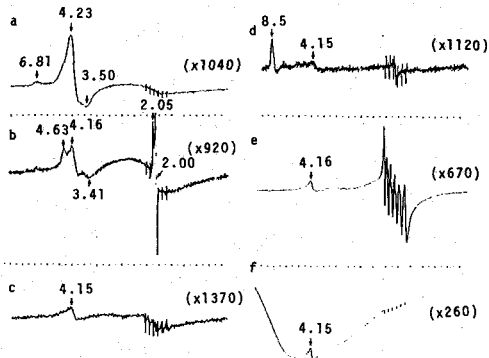


図2. 粘土鉱物の ESR スペクトル.

a) montmorillonite, b) Georgia kaolin  
c) Shimmei kaolin d) pyrophyllite,  
e) chlorite f) phlogopite  
(測定条件: マイクロ波出力 5mW, 磁場掃引 5G, 試料重量 10mg)

イオンによるものである。下にみられるような ferromagnetic material のシグナルや a, b, c にみられる, スパクトル全域に広がっている  $Fe^{2+}$  または  $Fe^{3+}$  のシグナルも見られる。これらの  $Fe$  イオンは、物理的に分離できるものもあり、目的としている粘土鉱物と共存している別の鉱物や変性の過程で出された  $Fe$  イオンが原因のものなどによると考えられる。また kaolinite には格子欠陥にできた O ラジカルの強い吸収もみられる。ここで全試料に共通な  $Fe^{3+}$  イオン、すなわち gibbsite sheet の Al を置換した  $Fe$  イオンに着目し、 $g \sim 4$  のシグナルの高さから、 $Fe^{3+}$  イオンの量を相対的に見積った(表 1 右欄参照)。この  $Fe^{3+}$  に相当するスペクトルの  $g \sim 2$  の部分が他のシグナルと重なって分離できないこと、また  $Fe^{3+}$  のまわりの異方性が試料によって異なっていることのため、見積られた値には 10~20% の誤差が見込まれる。

### 3. $^{29}Si$ -NMR 線巾と gibbsite sheet 中の $Fe^{3+}$ 濃度の相関

線巾に影響する要因として (i) 化学シフトのわずかに異なる 2 種以上の  $^{29}Si$  による inhomogeneous broadening, (ii) 近隣の Al 核、H 核による dipolar interaction (iii) 常磁性不純物との相互作用、(iv) 装置の magnetic inhomogeneity (現実験では  $\sim 40$  Hz) などがある。kaolinite の例では CP-MAS-NMR により、線巾  $\sim 40$  Hz の  $\sim 27$  Hz は付いた 2 種のシグナルが観測されている<sup>5)</sup>。脱 Al したセオサイトでは線巾が減少していることから、(i), (ii) の影響は無視できない。同じ  $^{29}Si$ -NMR シグナルの半値巾  $\Delta\nu_{1/2}$  (Hz) を、2 で求めた  $Fe^{3+}$  イオン濃度に対してプロットしたものを示す。明かに  $Fe^{3+}$  イオン濃度の増加と共に  $\Delta\nu_{1/2}$  が増加する傾向がみられる。この図から、(i), (iii), (iv) の効果は約 150 Hz であり、それに加えて  $^{29}Si$  核スピンと  $Fe^{3+}$  電子スピンの間の双極子相互作用が  $T_2$  に大きく寄与していることが明らかである。

試料 7 および 8 はこの傾向からはずれているように見える。7. にあっては図 2d にみられるように  $g \sim 2.5$  に特徴的な強い吸収があり、また 8. においては、化学式からも明かなように、主として常磁性イオンは  $Mg^{2+}$  に置換した  $Mn^{2+}$  イオンであるため、考慮している  $Fe^{3+}$  イオン以外の常磁性イオン種の効果があると思われる。

### 4. $^{29}Si$ 核のスピン格子緩和時間、 $T_1$

代表的な 4 つの鉱物に対して、standard inversion recovery 法で  $T_1$  の測定を行った

といる。47 ms ~ 910 ms であった(図 4 に測定例を示す)。 $Fe^{3+}$  イオン濃度の高いモノシリケートが一番短かく、 $Fe$  濃度の低いパイロフィライトが一番長い。

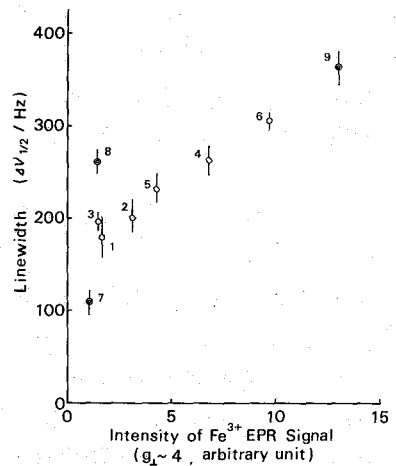


図 3. gibbsite sheet 中の  $Fe^{3+}$  イオン濃度と  $^{29}Si$ -NMR 半値巾との関係。(○は 1:1 型 ◎は 2:1 型に対応)



$Fe^{3+}$  濃度の高い試料のほうが  $T_1$  は短かい傾向があるが、4試料からでは、 $T_1$  のときのような linear の関係は今のところ見られない。

固体中の常磁性不純物による核の緩和機構として、核スピン-電子スピンの双極子相互作用(とくにC項)によるものとスピン拡散とが通常考慮される。<sup>6)</sup> スピン拡散過程に対して、Abragam の表現を用いれば、 $1/T_1 = 4\pi N b D$

である。ここで  $b$  は一個の不純物の散乱振幅と見なすような値で多くの場合核間距離  $a$  の程度である。  $N$  は単位体積あたりの不純物の数、  $D$  は拡散定数である。粘土鉱物においては、結晶構造がほとんど同じで、SiとAlの相対的位置関係は同じとみなせるので、 $b$  および  $D$  はすべての試料で一定と仮定した。Si核間距離  $a = 3.02 \text{ \AA}$ 、 $b = 3.1 \text{ \AA}$ 、電子スピンの  $\tau = 10^7 \text{ s}$ 、 $W \sim 10^3 \text{ s}^{-1}$ 、 $D = Wa^2 = 9 \times 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{s}$  とし、上式より、理論的  $T_1$  の範囲を見積もることとする。kaolinite において、 $Fe^{3+}$  の含量は、 $Fe_2O_3$  とし、0.01% ~ 0.5% の範囲にある。これらの  $Fe^{3+}$  が全て Al 位置に置換したと仮定すると、計算された  $T_1$  は 1500 ms ~ 30 ms になる。他の鉱物についても同程度の値が得られる。したがって、実測値をスピン拡散で説明することは可能であろう。ESR スペクトルからも明かのように、天然鉱物には他の鉱物が不純物として混在している事が多い。したがって元素分析で得た Fe 含量からすべての鉱物に由来するものは限らない。実測された  $T_1$  から逆に  $N$  を求めると、 $Al^{3+}$  に置換した  $Fe^{3+}$  の含量を見積もることが出来る。この点で鉱物研究の方法が開けるかもしれない。

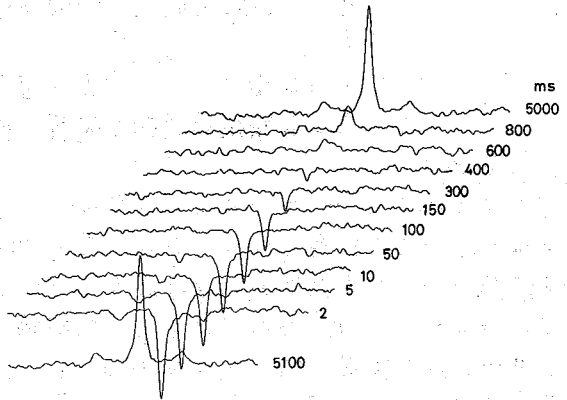


図4.  $^{29}Si$ -核スピン-格子緩和時間の測定。(試料: pyrophyllite)

#### IV 結論

一般に鉱物中の  $^{29}Si$  は孤立しており  $T_1$  は非常に長いと考えられていた。しかし天然鉱物においては、不純物として常磁性金属イオンが置入されていることはめずらしくない。これらの常磁性不純物は  $T_1$  を短かくする役割を果し、結果的に  $^{29}Si$  NMR の観測を容易にしているといえる。実際、常磁性不純物をほとんど含む石英においては、測定に極めて長い時間を必要とした。

#### 文献

- 1) E.T.Lippmaa, M.A.Alla, T.J.Pehk, and G.Engerhardt, J. Am. Chem. Soc., **100**, 1929(1978).
- 2) E.T.Lippmaa, M.Magi, A.Samson, G.Engerhardt, and A.-R.Grimmer, *ibid.*, **102**, 4889(1980).
- 3) M.I.Scullane, L.K.White, and N.D.Chasteen, J. Magn. Reson., **47**, 383(1982).
- 4) M.J.Sullivan and G.E.Maciel, Anal. Chem., **54**, 1606(1982).
- 5) P.F.Barron, R.L.Frost, J.O.Skiemstadt, and A.J.Koppi, Nature, **302**, 49(1983).
- 6) A.Abragam, "Principles of nuclear magnetism", Oxford, Clarendon press, p379(1961).

## 12. 銅化合物の<sup>63</sup>Cu固体高分解能NMR

(日本電子) 〇 出口健三, 松下和弘, 藤戸輝昭,  
(三菱製紙感材研) 遠藤一史, 山本京之介, 井口恵介

### 1. はじめに

我々はこれまで、<sup>13</sup>Cや<sup>29</sup>SiのようなI=1/2の核種について、固体高分解能NMR (CP/MAS) による研究を行ってきた。最近<sup>27</sup>Al, <sup>23</sup>Na, <sup>11</sup>BのようなI≧1のいわゆる四重極核についても研究が行なわれるようになり、これらのスペクトルの特徴が明らかになりつつある<sup>(1)</sup>。今回はこのような核種の一つであり、また感光材料として、これまで我々が研究を行ってきた<sup>63</sup>Cu化合物について、<sup>63</sup>Cu固体高分解能NMRによる測定を行い、固体<sup>63</sup>Cuスペクトルの特徴、MASによるナローイング効果、緩和時間とその機構等についての考察を行った。

### 2. 実験

#### A) 固体NMR測定.

固体NMR (MAS) の測定は、JEDL FX200 に SH200 固体測定ユニットを付属させて行った。90°パルス幅は5μsecで、CP法は使用せずゲートドデカップル法で測定した。MAS回転数はおよそ4KHzである。またNON-spinningの測定には一部FX90Q/FX200も併用した。

#### B) 測定試料の純度及び結晶状態.

Cu(II)化合物中のCu<sup>2+</sup>量の定量: Cu<sup>2+</sup>の定量は、市販のUV装置を用い、Cu<sup>2+</sup>のd-d遷移と思われる800nm付近のピークの光学濃度を測定して行った。ハロゲン化銅CuXにおいては、CuCl中のCu<sup>2+</sup>/CuClは7.4×10<sup>-4</sup>, CuBr中のCu<sup>2+</sup>/CuBrは7.3×10<sup>-4</sup>であり、CuIではCu<sup>2+</sup>の量は観測出来なかった。従ってCuXにおけるCu<sup>2+</sup>の量は無視してよいと考えられる。

結晶構造: 各試料は市販のX線回折装置で測定し、その結晶構造は文献値と一致することを確認した。

### 3. 結果及び考察

今回測定を行ったのは、(i)ハロゲン化銅CuX (X=Cl, Br, I), (ii) その他のCu(I)化合物 (Cu<sub>2</sub>O, KCu(CN)<sub>2</sub>, CuCN, CuSCN), 及び (iii) Cu(II)化合物 (CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, CuBr<sub>2</sub>) である。これらの化合物のケミカルシフト値、MASスペ

Table I. Chemical Shifts and Linewidths for <sup>63</sup>Cu Resonances in Copper Compounds in Solids

Cu compound (powder)	chemical shifts (ppm)*	non-spinning linewidth (Hz)	linewidth with magic-angle** spinning (Hz)
CuCl	331	2400	360 (3.4)
CuBr	388	3300	680 (4.0)
CuI	354	2700	600 (~4)
Cu <sub>2</sub> O	-137	7800	7800 (~4)
CuSCN	-102	8000	8000 (~4)
CuCN	-111	8300	7500 (~4)
KCu(CN) <sub>2</sub>	-143	7200	7200 (~4)
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	831	7900	7900 (~4)
CuBr <sub>2</sub>	831	8000	8000 (~4)

\*The reference sample is a 0.1 molal solution of Cu(I)(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>P in CH<sub>3</sub>CN. \*\*Spinning frequency in kHz in parentheses.

でぐちけんぞう, まつしたかずひろ, ふじとてるあき, えんどうかずなか, やまもときょうのすけ, いぐちけいすけ.

クトル幅及び NON SPINNING 時のスペクトル幅を Table I. に示した。なお吸収線型はガウス型で、ケミカルシフト値は、MAS 時のスペクトルから求めた等方平均値である。観測周波数は 52.86 MHz。

[I] 銅化合物のスペクトル幅の解釈と MAS によるナローイング効果

一般論： 強い外部磁場がかかっている場合（即ち  $\nu_Q$  が大きい場合）、NON-SPINNING 時の固体の（四重極核の）NMR スペクトル幅の原因としては、 $\nu_Q$  (Quadrupole 相互作用),  $\nu_d$  (Dipole 相互作用),  $\nu_{CSA}$  (Chemical Shift Anisotropy) が考えられる。 $^{27}\text{Al}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{23}\text{Na}$  等の化合物では、観測核が他核種によって dilute されており、 $\nu_Q$  に比べ  $\nu_d$  は小さく、MAS によって  $\nu_d \rightarrow 0$  となる。一方 MAS の回転数  $\nu_{rot}$  と、四重極周波数  $\nu_Q$ , NMR 周波数  $\nu_0$  との間に、以下の関係が成立する時には、スペクトルのセンターバンド ( $-\frac{1}{2} \leftrightarrow \frac{1}{2}$ ) はナローイングされ、SSB があらわれる。<sup>(2)</sup>

$$\nu_{rot} \geq \frac{3(e^2gQ/\hbar)^2}{16\nu_0} \cdot \frac{I(I+1) - 3/4}{I^2(2I-1)^2} = \frac{1}{16} \frac{(e^2gQ/\hbar)^2}{\nu_0} \quad \text{for } I=3/2 \quad (1)$$

たとえば 52.78 MHz での  $\text{NaNO}_3$  の  $^{23}\text{Na}$  ( $I=3/2$ ) のスペクトルでは、 $\nu_Q = e^2gQ/\hbar = 0.334 \text{ MHz}$  であるから、(1) 式の右辺 =  $132.1 \text{ Hz} < 3.5 \text{ kHz} (\nu_{rot})$  が成立し、四重極核特有の“二本つ”をもつセンターバンドと多数の SSB が観測される。しかし  $^{63}\text{Cu}$  ( $I=3/2$ ) 化合物では、Cu 間の dipole 相互作用が大きく、 $\nu_d$  は無視出来ない。また必ずしも (1) 式が成立しとはかぎらない。従って、以下いくつかの場合に分けて考えてみる。

(A) Cu(I) 化合物

CuX 系: X = Cl, Br, I である。これらの化合物の固体 NMR スペクトルを Fig. 1 に示す。NON SPINNING 時には、 $\sim 3 \text{ kHz}$  の線幅をもつものが、MAS によってかなりのナローイングを示す。この系の化合物は、いずれも立方晶系で  $\text{ZnS}$  の配置をもち、四重極カプリングは観測されない。<sup>(3)</sup> 即ち、結晶の対称性が良いために、電場勾配が小さく、従って  $\nu_Q$  が小さくて、 $\nu_d \gg \nu_Q$  であり、(1) 式を満足するため、MAS によるナローイングがおこると考えられる。またセンターバンドの分裂も見られない。 $(\nu_d \geq \nu_Q)$

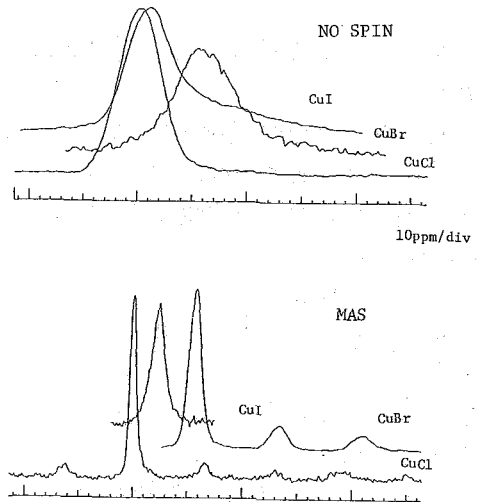


Fig. 1. Solid NMR Spectra of Cuprous Halides.

$\text{Cu}_2\text{O}$  及び  $\text{KCu}(\text{CN})_2$ : これらの化合物の固体 NMR スペクトルでは、Fig. 2 に示すように MAS によるナローイングは見られない。(不純物  $\text{NaCl}$  の  $^{23}\text{Na}$  スペクトル = 左端の折返しスペクトル = はナローイングしている。)  $\text{Cu}_2\text{O}$  の結晶構造は立方晶で、常温での  $\rho$  周波数は 26.0 MHz である<sup>(4)</sup> 一方  $\text{KCu}(\text{CN})_2$  は、単斜晶系に属し、 $e^2gQ/\hbar = 60.9 \text{ MHz}$ ,  $\eta = 0.78$  である。<sup>(5)</sup> これらの系では、 $\nu_d \geq \nu_Q$  で、

ゼーマンエネルギーと四重極相互作用が同程度になるため、両者のせめぎ合いによって静磁場方向が量子化軸にならない。従って、 $\theta = 54.7^\circ$  が Magic Angle とならない。このため、いわゆる 2nd Order Quadrupolar Broadening がおこり、MAS によっても線幅がナローに窄げられないと考えられる。

CuCN 及び CuSCN: CuCN は斜方晶系であり、CuSCN は非晶系であるため、いずれも電場の対称性は悪いと考えられる。Va は不明であるが、MAS スペクトルで見えるかぎり、Cu<sub>2</sub>O と同程度と考えられ、MAS によってもナローに窄げられない。

(B) Cu(II) 化合物

今回測定したのは CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (斜方晶系)、及び CuBr<sub>2</sub> (単斜晶系) である。これらの化合物でも MAS によるナロー効果は見られな。この原因は次のように考えられる。これらの化合物の Cu 原子中には odd electron が1ヶ存在するため、常磁性を示し、Cu 核には次のような電子による磁場が加わり、これがシフト及び緩和に寄与する。

$$\chi_e \approx -2\beta \left[ \frac{\ell}{r^3} - \frac{S}{r^3} + \frac{3r(S \cdot r)}{r^5} + \frac{8}{3}\pi S S(r) \right] \quad (2)$$

$\chi_e$  による線幅は  $\gamma_n \langle \chi_e^2 \rangle / \omega_e$  で与えられ、MAS によってもナローに窄げられない。

[II] CuX の緩和時間の解釈と計算 (T<sub>1</sub> と線幅)

ハロゲン化銅の NON-Spinning での T<sub>1</sub> 及び線幅の測定結果を Table II に示す。

(A) T<sub>1</sub> の解釈

Guenther らは、<sup>63</sup>四重極モードとフォノンとのカップリングを考えたモデルにより、T<sub>1</sub> を計算し、次の値を得た。

$$T_1(300K) = \begin{cases} 6.7 \text{ Sec (CuCl)} \\ 9.7 \text{ Sec (CuBr)} \\ 16.7 \text{ Sec (CuI)} \end{cases}$$

これによれば、T<sub>1</sub> の傾向は説明出来るが、値が3ヶも異なる。これらの化合物では共有結合性があり、

イオンモデルからずれるためと説明しているが、Cu 核はハロゲン核とも強く双極子結合しているため、ハロゲンの四重極緩和によりエネルギーがにげていくことも考えられ、今後この点を明らかにしたい。(CuBr 中の <sup>81</sup>Br の T<sub>1</sub> は 2.9ms)

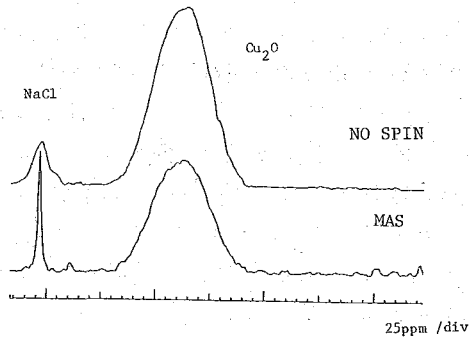


Fig. 2. Solid NMR Spectra of Cuprous oxide

Table II. Spin Lattice Relaxation Times and Line widths for <sup>63</sup>Cu Resonances in CuX at 23.71, 52.86 and 71.50 MHz.

CuX	T <sub>1</sub> (ms)			Linewidths (Hz)		
	Resonance Frequency (MHz)			Resonance Frequency (MHz)		
	23.71	52.86	71.50	23.71	52.86	71.50
CuCl	---	6.6	4.7	2300	2400	3500
CuBr	---	13.7	10.2	2700	3300	3800
CuI	---	23.2	21.5	2100	2700-	2700+

<sup>65</sup>Cu Resonance in CuX at 76.54 MHz

	T <sub>1</sub> (ms)	Linewidth (Hz)
CuCl	5.7	3900
CuBr	11.8	4100
CuI	24.8	2800

(B) 線幅の解析

Table II から、線幅に対する磁場依存性が見られ、ケミカルシフトの異方性の寄与は無視出来ない。

$\Delta\nu_{c.s.A} \propto H_0^2$  であるから、

$\Delta\nu - H_0^2$  をプロットして  $\Delta\nu_{c.s.A}$  の寄与を差引いた CuX の半値幅は Table III. のように見積られる。

線幅の計算:

これらの化合物に対して、不動格子モデルを考え、四重極結合の存在下での双極子幅の二次能率の式を、以下の場合に分けて計算を行った。(微結晶粉末の場合)

①同種スピン間の場合、

$$\overline{\Delta\nu_I^2} = F_L(I) \gamma^4 \hbar^2 \cdot \frac{6}{5} \sum_K \frac{1}{\gamma_{JK}^6}$$

$$\text{ここで } F_L(I) = \frac{4}{27} I(I+1) + \frac{2I^2(I+1)^2 + 3I(I+1) + \frac{13}{8}}{18(2I+1)} \quad (3)$$

②異種スピンによる寄与、

$$(\overline{\Delta\nu_I^2})_{IS} = \frac{4}{15} \gamma_I^2 \gamma_S^2 S(S+1) \hbar^2 \cdot \sum_{K'} \frac{1}{\gamma_{JK'}^6} \quad (4)$$

Fig. 3 の結晶構造において、注目する  $^{63}\text{Cu}$  核を原点におき、三次元空間で  $\sqrt{3}d$  以内の核との二次能率を計算した。その際に、同位体及びその天然存在比も考慮した。Table III. の結果は粗いモデルにもかかわらず、実験結果との良い一致が見られ、線幅への双極子相互作用の寄与の大きいことが分る。

即ち、この系では、 $\nu_{c.s.A} > \nu_d \geq \nu_a$  であり、MAS によって、 $\nu_d$ ,  $\nu_a$  及び  $\nu_{c.s.A}$  による一次の線幅への寄与が除かれると考えよう。

参考文献

(1) E. Oldfield et al. ; J. Magn. Res. 51 325 (1983), JACS 104 919 (1982).  
 (2) A. Samoson, E. Kundla and E. Lippmaa ; J. Magn. Res. 49 350 (1982).  
 (3) O. Lutz, H. Oehler and P. Kroneck ; Z. Physik A288 17 (1978).  
 (4) R. L. Armstrong and K. R. Jeffrey ; Cana. J. Phys. 47 309 (1969).  
 (5) G. L. McKown and J. D. Graybeal ; J. Chem. Phys. 44 610 (1966)  
 (6) B. D. Guenther and R. A. Hultsch ; J. Magn. Res. 1 609 (1969).

Table III.  $^{63}\text{Cu}$  Second Moments and Calculated Half-widths of CuX by the Rigid-lattice Model

CuX	$\Delta^2$ (second moment) (Hz) <sup>2</sup>	half-width calc (Hz)	half-width obsd (Hz)	
CuCl	$^{63}\text{Cu}-^{63}\text{Cu}$	7095	199	
	$^{63}\text{Cu}-^{65}\text{Cu}$	2698	122	
	$^{63}\text{Cu}-^{35}\text{Cl}$	5201	170	
	$^{63}\text{Cu}-^{37}\text{Cl}$	1097	78	
	total	16091	569	~2000
CuBr	$^{63}\text{Cu}-^{63}\text{Cu}$	5214	140	
	$^{63}\text{Cu}-^{65}\text{Cu}$	1983	105	
	$^{63}\text{Cu}-^{79}\text{Br}$	15641	295	
	$^{63}\text{Cu}-^{81}\text{Br}$	17770	315	
	total	40608	885	2500
CuI	$^{63}\text{Cu}-^{63}\text{Cu}$	3636	142	
	$^{63}\text{Cu}-^{65}\text{Cu}$	1383	88	
	$^{63}\text{Cu}-^{127}\text{I}$	32422	425	
	total	37448	655	~2000

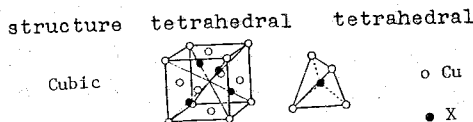


Fig. 3. Crystal Structure of Cuprous Halides.

13.  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  /  $\gamma$ -アルミナ触媒上モリブデンカルボニル  
化学吸着種の固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR

(東大生研・イリノイ大\*) ○篠田純雄・M. A. Keniry\*  
T. L. Brown\*・H. S. Gutowsky\*・E. Oldfield\*

1. はじめに

遷移金属カルボニル化合物をアルミナなどの金属酸化物に担持し、適当な処理をほどこすことにより、種々の高活性・高遷移的な固体触媒が得られる。この手法は触媒表面の *tailor-making* という観点から注目されており、この意味で表面触媒種のキャラクタリゼーションが重要である。<sup>1)</sup> 固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR 法は、触媒種の構造や動的性質を検討する上で有望な方法と思われるが、従来 *air-sensitive* な触媒物質をローターに充填する際の問題等から研究例がなかった。ここでは、オレフィンのメタセシス・水素化触媒として知られ、IR・TPD (temperature programmed desorption) その他の知見のある  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  /  $\gamma$ -アルミナを対象として、(1)  $^{13}\text{C}$ -enriched  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  を使用し、(2) 触媒を不活性ガス雰囲気下で処理後そのままガラスアンブル中に溶封する、の二点を工夫し、測定を行った。

2. 実験

触媒に対する操作は、排気・ガス置換の可能なガラス装置付きガラスアンブル(外径 8.4 mm, 高さ約 15 mm) 中で行った。He と Ar は  $\text{MnO}$ ,  $\text{MS-4A}$  カラムにより精製し、 $\text{O}_2$  は  $\text{MS-4A}$  カラムで乾燥した。 $\gamma$ -アルミナ (150 mg) を  $\text{O}_2$  気流下に  $450^\circ\text{C}$ , 1 兎または  $150^\circ\text{C}$ , 1 兎加熱し、それぞれ *partially dehydroxylated alumina* (以下 PDA と略す) または、*hydroxylated alumina* (以下 HA と略す) とした。<sup>2)</sup> 系を He 置換した後室温に戻し、Ar 雰囲気下、乾燥ペンタンに溶解した  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  (60%  $^{13}\text{C}$ -enriched,<sup>3)</sup> 18 mg) と接触させた。He 気流下に、ペンタンを蒸発後熱処理し ( $100 \sim 200^\circ\text{C}$ )、脱カルボニル反応<sup>4)</sup> を行った。液体窒素で試料部分を冷却後直ちに、ガスバーナーにより切断・溶封したガラスアンブルは、内径 8.5 mm をもつ Andrew-Beams 型ローター (高純度窒化ホロン製) に充填した。

固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR 測定は、超電導ソレノイド・Nicolet 1280 コンピュータを付属するパルス-F T NMR 装置で行った ( $37.80 \text{ MHz}$ ,  $90.54 \text{ MHz}$ ; パルス繰り返し時間 1s, MAS スピニング速度 1.5 ~ 3.0 kHz, 50000 ~ 70000 回積算)。Hartmann-Hahn マッチングはアタマンタンを用い ( $^{13}\text{C}$  磁場 4.0 mTesla,  $^1\text{H}$  デカップリング  $\sim 150 \text{ W}$ , single) のだ すみお

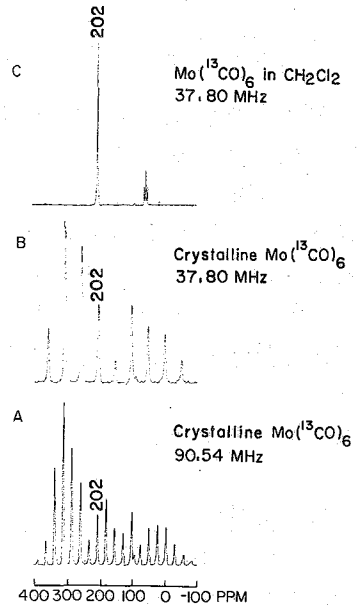


図1.  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  の固体 (MAS) および溶液中での  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (ただし、固体の繰り返し時間 100s)

contact, spin-temperature alteration), 化学シフトテンソルの主値 (TMS を 0 ppm とする  $\delta$  スケール) は Herzfeld らの方法<sup>5)</sup> により決定した。

### 3. 結果および議論

モリブデンカルボニル化学吸着種に対する予備的な検討として,  $Mo(CO)_6$  自体の  $^{13}C$  NMR を測定した。図1に溶液および固体高分解能  $^{13}C$  NMR スペクトルを示す。後者に現われた多数のスピンングサイドバンドは, 配位  $^{13}CO$  のもつ大きな化学シフト異方性 ( $\Delta\sigma = 403$  ppm, 表1)<sup>6)</sup> のためである。スピンング速度を変え, センターバンドの位置より  $\sigma_{iso}$  ( $\equiv \frac{1}{3}(\sigma_{11} + \sigma_{22} + \sigma_{33})$ ) = 202 ppm と求められた。この値は塩化メチレン溶液での値に一致している。

PDA に  $Mo(CO)_6$  を担持し, 種々の熱処理を行った後のスペクトルを図2に示す。加熱処理なしで得られる物理吸着  $Mo(CO)_6$  は, 固体および溶液と同じ  $\sigma_{iso}$  の値をもち, MA を加えなくても鋭いピークを手えたので,  $\gamma$ -アルミナ表面上で速い等方的な運動をしているものと考えられる。加熱処理により物理吸着  $Mo(CO)_6$  は消失し (図2B~D),  $\sigma_{iso}$  の値として 203 および 224 ppm をもつ二つのピークが

生じた。ピークの相対強度が処理条件により相違するので, これらは二つの異なる化学種に帰属するのが妥当である。サイドバンドが観測されるのは,  $\gamma$ -アルミナ表面上に固定されたためであり, いずれもが化学吸着種であることを示している。100 °C, 2 時間あるいは 150 °C, 1 時間処理では  $\sigma_{iso} = 203$  ppm のピークの方が大きいのに対して, 200 °C, 1 時間処理ではほとんど  $\sigma_{iso} = 224$  ppm のピークのみとなっている。

HA に  $Mo(CO)_6$  を担持した場合 (図3), 100 °C, 2 時間の処理では, サイドバンドを伴う  $\sigma_{iso} = 203$  および 224 ppm のピークも存在するが, 物理吸着  $Mo(CO)_6$  ( $\sigma_{iso} = 202$  ppm) のピークが多量に残っている。

IR の知見によれば, 物理吸着  $Mo(CO)_6$  は表面水酸基と弱い相互作用をもつ。<sup>4)</sup> PDA 表面には,

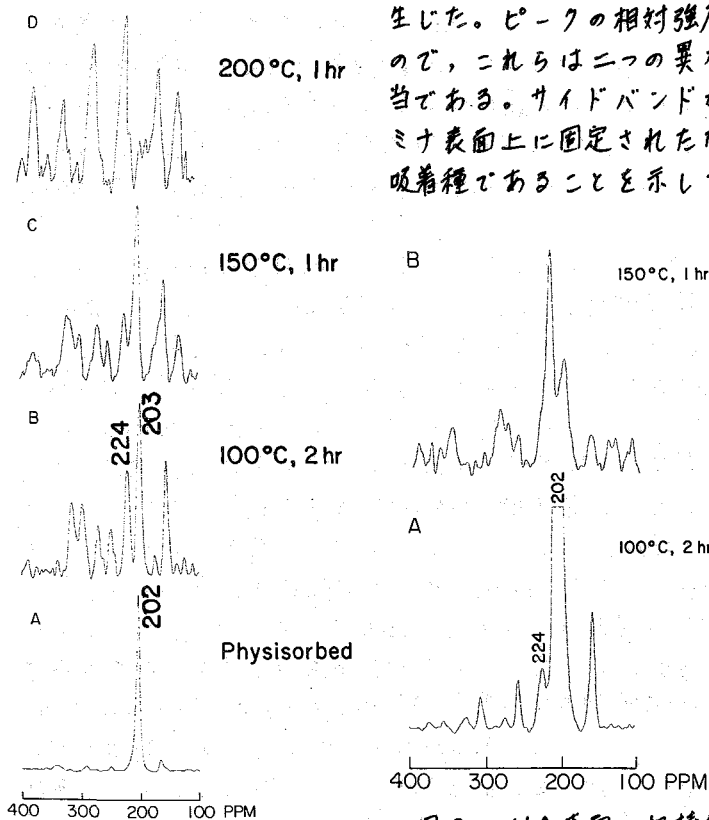


図2. PDA 表面に担持後, 種々の熱処理を行った  $Mo(CO)_6/\gamma$ -アルミナの  $^{13}C$  NMR スペクトル (MAS, 37.20 MHz)

表1. 種々のモリブデンカルボニル錯体に対する  $^{13}\text{C}$  化学シフトテンソルの主値

Complex		$\sigma_{11}$	$\sigma_{22}$	$\sigma_{33}$	$\Delta\sigma$	$\sigma_{iso}$
$\text{Mo}(\text{CO})_6$		338	332	-65	403	202
$\text{Mo}(\text{benzene})(\text{CO})_3$		388	312	-42	430	222
$\text{Mo}(\text{mesitylene})(\text{CO})_3$		385	320	-38	423	223
$\text{Mo}(\text{bipyridine})(\text{CO})_4$	cis	360	302	-46	406	205
	trans	380	321	-34	414	222
$\text{Mo}(\text{phenanthroline})(\text{CO})_4$	cis	345	325	-55	400	205
	trans	383	314	-32	415	222

水酸基(37%), オキシドイオン(32%),  $\text{Al}^{3+}$ (31%) はほぼ同じ分率で露出しているのに対して, HA表面ではそれぞれの値が90%, ~5%, ~5%と水酸基量が多いため,<sup>2)</sup> HA上での  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  の分解がPDAに比べ遅いのであろう。150°C, 1h処理後のスペクトルで明らかのように, HA上にはPDA上と同一の化学シフトをもつ化学種が存在する。

90.54 MHzでのスペクトルを援用しつつ,  $\sigma_{iso} = 203$  ppmをもつ化学種の化学シフト異方性を検討したところ,  $\sigma_{11} = 304$ ,  $\sigma_{22} = 172$ ,  $\sigma_{33} = 132$  ppm ( $\Delta\sigma = 172$  ppm)と求められた。この異方性の範囲は, 表1に示す種々のモリブデンカルボニル錯体の値<sup>6)</sup> に比べて小さく, 部分的に平均化されていると考えられる。スペクトルパターンから,  $\sigma_{iso} = 224$  ppmの化学種についても, 運動による同程度の $\Delta\sigma$ の減少が認められる。

IR・TPDの知見から,  $\text{Mo}(\text{CO})_6 / \gamma$ -アルミナを加熱下に排気またはHeフラッシュすることにより, 段階的に  $\text{Mo}(\text{CO})_5 \text{ ads}$ ,  $\text{Mo}(\text{CO})_4 \text{ ads}$ ,  $\text{Mo}(\text{CO})_3 \text{ ads}$  の subcarbonyl 種が生じる。<sup>4)</sup> PDA上  $\text{Mo}(\text{CO})_5 \text{ ads}$  は45°C程度の加熱により容易に分解することを考慮すると,<sup>7)</sup> NMRスペクトルの加熱処理温度依存性(図2, 3)から,  $\sigma_{iso} = 203$  および224 ppmのピークは, それぞれ  $\text{Mo}(\text{CO})_4 \text{ ads}$ ,  $\text{Mo}(\text{CO})_3 \text{ ads}$  に帰属できる。実際,  $\text{Mo}(\text{CO})_n$  ( $n = 3 \sim 5$ ) の回転運動(図4, ただし rigid lattice の化学シフト異方性幅~15 ppmより速い)を考えると,  $\text{Mo}(\text{CO})_5$  では axial 値(a)と equatorial 値(b)が別々に観測されるはずであるが,  $\text{Mo}(\text{CO})_4$  では trans 値(c)と cis 値(d)が平均化され単一ピークとなる。数坂らはPDA上200°C, 1h処理により  $\text{Mo}(\text{CO})_3 \text{ ads}$  のみが存在するとしており,<sup>8)</sup> 図2Dの結果と一致する。一般に, カルボニル錯体のCOを $\sigma$ 供与性配位子で置換すると trans 値COは低磁場シフトする。<sup>9)</sup>  $\text{Mo}(\text{CO})_6$ ,  $\text{Mo}(\text{CO})_4 \text{ ads}$ ,  $\text{Mo}(\text{CO})_3 \text{ ads}$  における  $\sigma_{iso}$  値の序列はこのことに見合うが, シフト量については, 表面における錯体構造の歪み,  $\text{Al}^{3+}$  などとの相互作用, 表面電場などを考慮する必要がある。

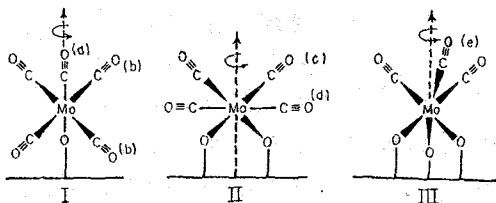


図4.  $\gamma$ -アルミナ表面上の  $\text{Mo}(\text{CO})_n$  種 ( $n = 3 \sim 5$ ) の分子内回転

( $\text{CO})_3 \text{ ads}$  における  $\sigma_{iso}$  値の序列はこのことに見合うが, シフト量については, 表面における錯体構造の歪み,  $\text{Al}^{3+}$  などとの相互作用, 表面電場などを考慮する必要がある。

CP/MA5実験により,  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  双極子相互作用を検討した(図5, 6)。



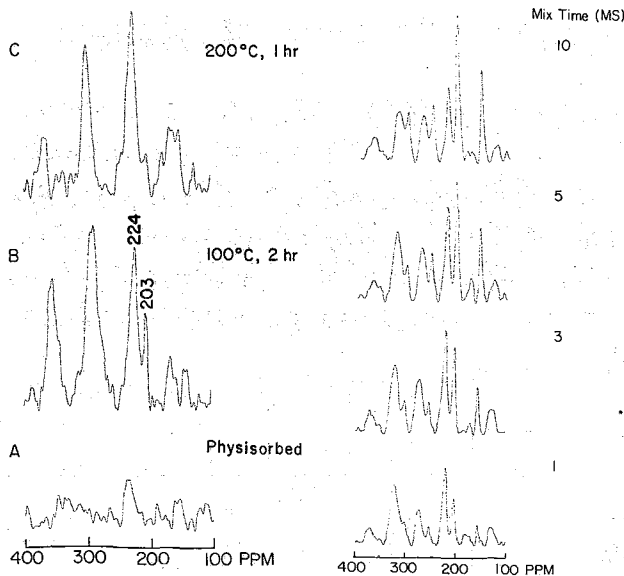


図5. PDA表面に担持後、種々の熱処理を行った  $\text{Mo}(\text{CO})_6/\gamma\text{-アルミナ}$  の CP/MAF  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (37.80 MHz, mixing time 5 ms)

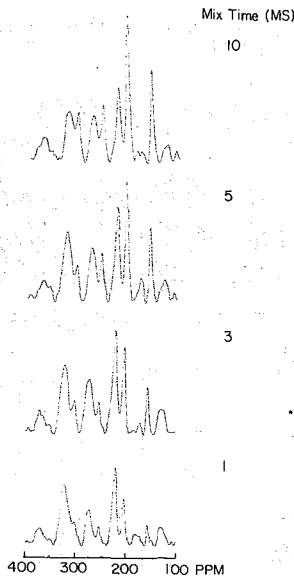


図6. HA表面に担持後、100°C, 2 hr 熱処理を行った  $\text{Mo}(\text{CO})_6/\gamma\text{-アルミナ}$  の CP/MAF  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (37.80 MHz)

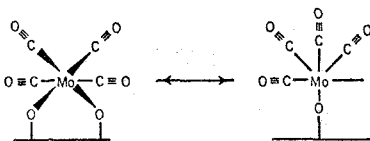


図7. 配位不飽和種を経由する  $\text{Mo}(\text{CO})_4$  ads の分子内交換反応

フィンの水素化は  $\text{Mo}(\text{CO})_6/\text{PDA}$ ,  $\text{Mo}(\text{CO})_6/\text{HA}$  のいずれでも進行するのに対して、メタセシスは前者でしか進行しないことから、この型のオレフィン付加体は水素化反応の中間体として挙動する可能性があらう。

本稿を著くにあたり御議論頂いた東京大学生産技術研究所斎藤泰和教授に感謝致します。

文献 (1) H.-P. Boehm ら, "Catalysis", Vol. 4, (chap. 2 (1983), Springer-Verlag. (2) M. Lanićević ら, J. Colloid Interf. Sci., 75, 95 (1980). (3) S. W. Kirtley ら, J. Am. Chem. Soc., 99, 7154 (1977). (4) T. L. Brown, J. Mol. Catal., 12, 41 (1981). (5) J. Herzfeld ら, J. Chem. Phys., 73, 6021 (1980). (6) 篠田ら, 投稿中. (7) R. F. Howe, Inorg. Chem., 15, 486 (1976). (8) A. Kagusaka ら, J. Mol. Catal., 9, 183 (1980). (9) M. H. Chisholm ら, Progr. Inorg. Chem., 20, 299 (1976).

図5 B では、図2 B と比べて  $\sigma_{\text{iso}} = 203 \text{ ppm}$  と  $224 \text{ ppm}$  のピーク強度比が逆転しており、 $\text{Mo}(\text{CO})_4$  ads よりも  $\text{Mo}(\text{CO})_3$  ads の  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  双極子相互作用が大きいことがわかる (なお、物理吸着  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  に対する CP の効果は相対的に小さく (図5 A), 高い運動性と調和する)。PDA よりも大きな proton spin bath をもつ HA 上の吸着種に対して mixing time 依存性を求めたところ (図6),  $\sigma_{\text{iso}} = 224 \text{ ppm}$  のピークが 5 ms 付近で最大となるのに対して、 $\sigma_{\text{iso}} = 203 \text{ ppm}$  のピークは 10 ms が最も大きかった。 $\text{Mo}(\text{CO})_3$  ads が  $\text{Mo}(\text{CO})_4$  ads よりも大きな  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  双極子相互作用をもつことを支持す

る。 $\text{Mo}(\text{CO})_n$  ads の下地には水酸基も含まれることから、これらの結果は妥当であらう。

$\text{Mo}(\text{CO})_4$  ads,  $\text{Mo}(\text{CO})_3$  ads が回転運動によって再配向する際には、 $\text{Mo}-\text{O}$  結合が切断され、配位不飽和種が生じる (図7)。空配位座に re-actant 分子が配位することにより、触媒反応の中間体を形成し得る。 $\text{Mo}(\text{CO})_n$  ads によるオレ

# 14. Magic Angle Spinning 下での $^{13}\text{C}$ スピン-格子緩和時間

(フリタリシユコントロラ大・京大理\*) 内藤 晶, S. カナバテ,  
赤坂一之\*, C.A. McDowell

固体中では、化学シフトのみならず、運動の異方性による  $T_1$  (その値も異方性をもち、外場  $H_0$  の方向によつて値が異なる) Magic Angle Spinning により化学シフトの異方性は消失しても、 $T_1$  の異方性は部分的にしか平均化されず。MAS 下での rare nuclei (例:  $^{13}\text{C}$ ) の  $T_1$  測定がなお一般下である状況にあるとき、MAS 下での  $T_1$  の表式を求めよとすることは有用であろう。

本研究では、メチル基の  $^{13}\text{C}$  核を対象に、その  $T_1$  の厳密な表式と近似式を求め、先に発表したレーアラニシの  $^{13}\text{C}$   $T_1$  の実測値と比較した。これを 70 MHz 照射下と非照射下とで行った (Fig. 1 の (W))。又、いくつかの  $\beta$ - $\gamma$  酸にも適用した。

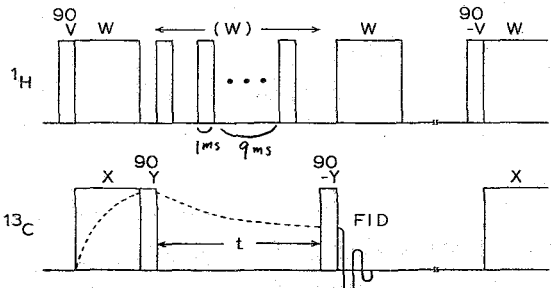


Fig. 1 Pulse sequence for  $^{13}\text{C}$   $T_1$  measurement. Proton Saturation pulse (W) may or may not be applied.

## A. Evolution $^{13}\text{C}$ magnetization, $\langle S_z \rangle$

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{d\langle I_z \rangle}{dt} &= -\frac{1}{T_1^{II}} (\langle I_z \rangle - I_0) - \frac{1}{T_1^{IS}} (\langle S_z \rangle - S_0) & [1a] \\ \frac{d\langle S_z \rangle}{dt} &= -\frac{1}{T_1^{SS}} (\langle S_z \rangle - S_0) - \frac{1}{T_1^{SI}} (\langle I_z \rangle - I_0) & [1b] \end{aligned} \right.$$

where,

$$1/T_1^{II} = [A/(100N)] \left\{ \sum_i [\gamma_i^2 \hbar^2 S(S+1)/r_{SI_i}^6] [(1/12)J_i^{(0)}(\omega_I - \omega_S) + (3/2)J_i^{(1)}(\omega_I)] \right. \\ \left. + (3/4)J_i^{(2)}(\omega_I + \omega_S) \right\} + \sum_{i \neq j} [\gamma_i^4 \hbar^2 I(I+1)/r_{I_i I_j}^6] [(3/2)J_{ij}^{(1)}(\omega_I) + (3/2)J_{ij}^{(2)}(2\omega_I)] \quad [2]$$

$$1/T_1^{IS} = [A/(100N)] \sum_i [\gamma_i^2 \hbar^2 I(I+1)/r_{SI_i}^6] [-(1/12)J_i^{(0)}(\omega_I - \omega_S) + (3/4)J_i^{(2)}(\omega_I + \omega_S)] \quad [3]$$

$$1/T_1^{SS} = \sum_i [\gamma_i^2 \hbar^2 I(I+1)/r_{SI_i}^6] [(1/12)J_i^{(0)}(\omega_S - \omega_I) + (3/2)J_i^{(1)}(\omega_S) + (3/4)J_i^{(2)}(\omega_S + \omega_I)] \quad [4]$$

$$1/T_1^{SI} = \sum_i [\gamma_i^2 \hbar^2 S(S+1)/r_{SI_i}^6] [-(1/12)J_i^{(0)}(\omega_S - \omega_I) + (3/4)J_i^{(2)}(\omega_S + \omega_I)] \quad [5]$$

N is the number of I nuclei in one molecule, and A is the percentage natural abundance of S.

(a) Proton saturation 下 ( $\langle I_z \rangle = 0$ ) での  $90^\circ(+V)$ ,  $90^\circ(-V)$  での  $\langle S_z(t) \rangle$  の差  $E$  は、

$$\frac{\langle S_z(t) \rangle_{\text{obs}}}{2S_0(1+k)} = \exp(-t/T_1^{SS}) \quad [8]$$

(b) Proton 非照射 下 での  $\langle S_z(t) \rangle_{\text{obs}}$  は [1a], [1b] の連立方程式を解いて得られる。  
(参考)

## B. MAS 下での 13C 緩和の表式

基本的な関係 (次式) が成立する。

$$\tau_c \ll \omega_r^{-1} \ll T_1^C$$

(μsec)      (μsec)      (μsec)

$\tau_c$ : MAS 軸の three-site random jump 相関時間  
 $\omega_r$ : MAS の angular frequency

以下の順序に従って計算。

- (1)  $C_3$ -axis の任意の向き (Fig. 2 では  $(\beta, \varphi)$  で規定される) について,  $J(\omega)$  を計算。
- (2) ( $\omega_r^{-1} \ll T_1^C$  を) とし注意して) 上で得た  $J(\omega)$  を  $\varphi$  に関して平均する (MAS 軸まわりの平均)。

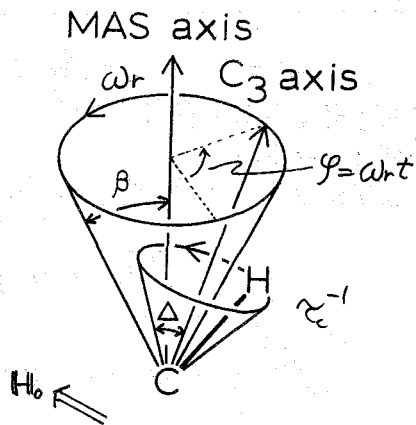


Fig. 2 The model

結果は,  $J^{(0)}(\omega) = (1/8)[4\sin^2 2\Delta(4-8\sin^2 \beta + 7\sin^4 \beta) + \sin^4 \Delta(8+8\sin^2 \beta - 7\sin^4 \beta)][\tau_c / (1+\omega^2 \tau_c^2)]$

$J^{(1)}(\omega) = (1/72)[4\sin^2 2\Delta(2+8\sin^2 \beta - 7\sin^4 \beta) + \sin^4 \Delta(16-8\sin^2 \beta + 7\sin^4 \beta)][\tau_c / (1+\omega^2 \tau_c^2)]$  [10]

$J^{(2)}(\omega) = (1/72)[4\sin^2 2\Delta(16+8\sin^2 \beta - 7\sin^4 \beta) + \sin^4 \Delta(56+8\sin^2 \beta - 7\sin^4 \beta)][\tau_c / (1+\omega^2 \tau_c^2)]$

here,  $\Delta$  is the angle between the C-H internuclear vector and the  $C_3$  axis, and  $\beta$  is the angle between the  $C_3$  axis and the MAS axis. Eqs. [4] and [10] show that the  $^{13}C$  spin-lattice relaxation times have an orientation dependence (on  $\beta$ ).

(3) 13C 緩和  $\langle S_z(t) \rangle$  を  $\beta$  について summation する。

(a)  $\gamma$  ポート = 飽和下の  $^{13}C$  の 13C 緩和 (Fig. 12' 'H-irradiation ( $\omega$ ) (E 場合)。

$$\frac{\langle S_z(t) \rangle_{\text{obs}}}{2S_0(1+k)} = (1/2) \int_0^\pi \exp[-t/T_1^{SS}(\beta)] \sin \beta d\beta \quad [11]$$

(b)  $\gamma$  ポート = 照射がない場合の  $^{13}C$  13C 緩和 (Fig. 12' ( $\omega$ ) を与えない場合)。

$$\frac{\langle S_z(t) \rangle_{\text{obs}}}{2S_0(1+k)} = (1/2) \int_0^\pi \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} \left[ \left( \frac{1}{T_1^{SS}(\beta)} - \lambda_2 \right) \exp(-\lambda_1 t) - \left( \frac{1}{T_1^{SS}(\beta)} - \lambda_1 \right) \exp(-\lambda_2 t) \right] \sin \beta d\beta. \quad [12]$$

この結果について注意することは

- (i) (a)(b) のいずれの場合も, 右辺は数値積分により求めた (存在)。
  - (ii) 明らかに緩和の時間変化は単一指数関数に従わない。
- そこで以下の式は [11] を代り  $T_1^C$  の近似式を, D には  $S$  と実測との比較を行う。

## C. MAS下での $T_1$ に対する近似式

70Kトロン飽和下の左二緩和は  $T_1$  2, 厳密性は欠けよりの簡便な  $T_1$  の解析的表現を与える近似式を求め、L-アラニンの44L炭素に  $T_1$  2の適用性を吟味した。

<近似1> (2) 2得左  $J(\omega)$  (Eq. [10]) を  $\beta$  12  $T_1$  2 Summationする。

$$\overline{J^{(n)}(\omega)} = (1/2) \int_0^\pi J^{(n)}(\omega) \sin \beta d\beta,$$

$$\overline{J^{(0)}(\omega)} = [(16/15)\sin^2 2\Delta + (9/8)\sin^4 \Delta] [\tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2)]$$

$$\overline{J^{(1)}(\omega)} = [(1/5)\sin^2 2\Delta + (1/5)\sin^4 \Delta] [\tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2)] \quad [13]$$

$$\overline{J^{(2)}(\omega)} = [(44/45)\sin^2 2\Delta + (12/15)\sin^4 \Delta] [\tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2)]$$

<近似2> (1) 2得左  $J(\omega)$  に  $T_1$  2 spherical average をとる。  
(powder average)

$$\overline{J^{(0)}(\omega)} = (6/5)(\sin^2 2\Delta + \sin^4 \Delta) [\tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2)]$$

$$\overline{J^{(1)}(\omega)} = (1/5)(\sin^2 2\Delta + \sin^4 \Delta) [\tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2)] \quad [14]$$

$$\overline{J^{(2)}(\omega)} = (4/5)(\sin^2 2\Delta + \sin^4 \Delta) [\tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2)]$$

(これは Woessner, J. Chem. Phys. 36, 1, (1962) の特殊な場合に相当する)。

[13] 又は [14] を [4] に代入すれば、これを  $T_1$  2  $T_1^c$  の解析的表式が得られる。これは [8] を用いて磁化の時間依存性がわかる。

## D. 実験値との比較 (L-アラニンの場合)

(a) 70Kトロン飽和下の緩和

$\text{CH}_3$  12  $T_1$  2の実測値 (○) は意外にも直線性 (指数関数的減衰) を示す (Fig. 3(a))。理論式 [11] に基づく曲線 C もほとんど直線に近く、この場合に  $T_1$  の異方性はたまたま相殺されることを示している。(実測値と曲線 C との傾きの違いは  $T_1$  2 内部に生じない) 又、Fig. 3(a) は近似 1, 2 に基づく直線 A, B が限りなく C に近くなることを示し、44L炭素の  $^{13}\text{C}$   $T_1$  2  $T_1$  2は [13] 又は [14] の  $T_1$  2を用いて実際にまじつかないことを示している。

(b) 70Kトロン非照射下の緩和

$\text{CH}_3$  12  $T_1$  2の実測値 (●) は明らかに直線性からずれるを示す (Fig. 3(a))。これは70Kトロン磁化の時間的変動 (transient NOE) の反映である。(かきこ  $T_1$  2の70Kトロン ( $^{13}\text{CH}_3$  当り 6321D) が共通のスピン温度をもち  $T_1$  2式 [12] により計算した曲線 F はほとんど実測に合致し、むしろ  $N=20$  程度とすればよい一致を得る (E)。

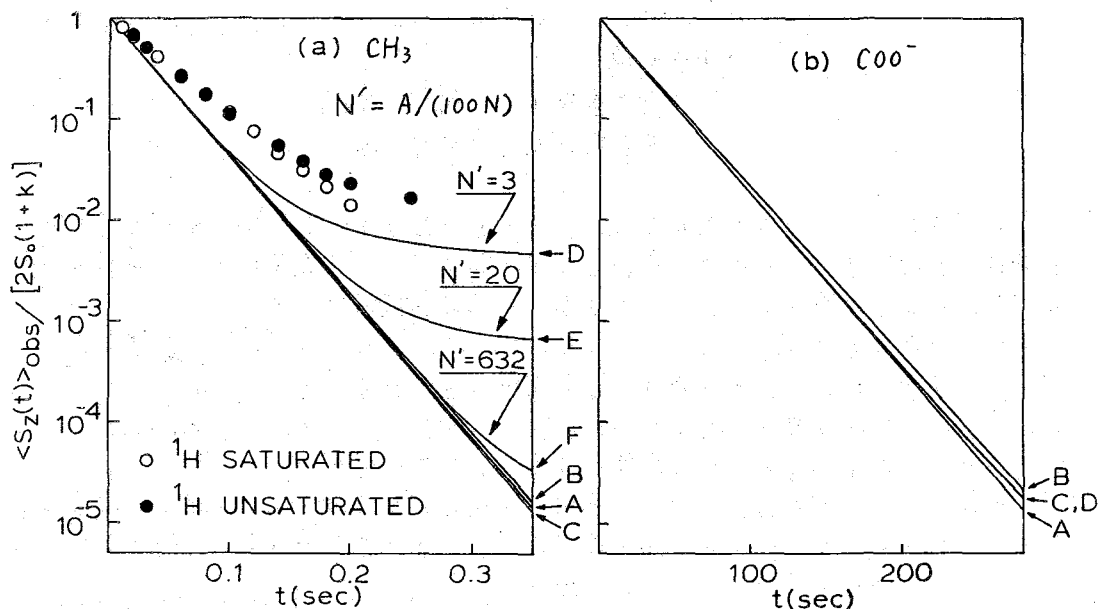


Fig. 3: Theoretical and experimental decay of the  $^{13}\text{C}$  magnetization for the  $\text{CH}_3$  (Fig. 3a) and  $\text{COO}^-$  (Fig. 3b) carbon atoms in l-alanine in the CP-MAS spin-lattice relaxation measurements. Theoretical curves (—) were calculated in the following way: A: using cylindrically powder averaging of  $(1/T_1^{\text{SS}})$  about the magic angle spinning axis with proton saturation, namely, calculated from Eq. [8] making use of Eqs. [4] and [13]; B: using spherically powder averaging of  $(1/T_1^{\text{SS}})$  with proton saturation, namely, calculated from Eq. [8] making use of Eqs. [4] and [14]; C: using cylindrically averaging of  $(1/T_1^{\text{SS}})$  about the magic angle spinning axis with proton saturation and summing up for all orientation, namely, calculated from Eq. [11] making use of Eqs. [4] and [10]; D: using cylindrically averaging of  $(1/T_1^{\text{SS}})$ ,  $(1/T_1^{\text{SI}})$  and  $(1/T_1^{\text{IS}})$  about the magic angle spinning axis together with  $T_1^{\text{II}}$  determined by proton  $T_1$  measurements (17) without proton saturation and  $N'=3$ , namely, calculated from Eq. [12] making use of Eqs. [3], [4], [5] and [10]; E: same as D but  $N'=20$ ; F: same as D but  $N'=632$ . In the calculation following parameters were used,  $\tau_c = 1.6 \times 10^{-9}$  sec,  $\Delta = 69.8^\circ$ ,  $r_{\text{CH}} = 1.096$  A and  $T_1^{\text{II}} = 0.41$  sec for the curves shown in Fig. 3a; and  $\tau_c = 1.6 \times 10^{-9}$  sec,  $\Delta = 20.8^\circ$ ,  $r_{\text{CH}} = 2.854$  A and  $T_1^{\text{II}} = 0.41$  sec for the curves shown in Fig. 3b.

1) A. Pines, M. G. Gibby, & J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **57**, 569 (1973).

2) K. Akasaka, S. Ganapathy, C. A. McDowell, & A. Naito, *J. Chem. Phys.* **78**, 3587 (1983).

# 15. SO<sub>3</sub> ドープしたポリ(p-フェニレンサルファイド)の磁気共鳴

中央大学理工 風間 重雄  
日本合成ゴム 〇荒井 宏一

1) ポリ(p-フェニレンサルファイド) (PPS) は、ポリアセチレン (PA) と同様、AsF<sub>5</sub> や SO<sub>3</sub> のような強力な酸化剤をドープする事により、電気伝導度が10桁以上も上昇する<sup>1,2</sup>。しかしながら、結晶構造解析によると、PPSではFig.1に示すように隣接するフェニレン環が同一平面上になく、PAのような共役構造をもたず、さらに縮退した基底状態が存在しないため、PAで考えられているソリトンモデルをPPSに単純にあてはめる事はできない。本研究では、種々のドープ条件で得られた試料について磁気共鳴実験を行ない、PPSのSO<sub>3</sub> ドープ物の導電性に関する知見を得る事を目的とした。

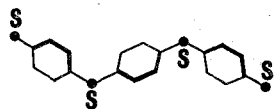


Fig.1 Conformation of PPS chain.

2) PPS試料は、フィリップス石油社製RYTON V-1をTHFで抽出精製し、さらに10<sup>-5</sup>~10<sup>-6</sup> Torrの高真空下で数時間脱気したものを以下の実験に用いた。ドープングは2通りの方法で行なった。一つはPPSの粉末あるいはそれを圧縮成型したペレットに、高真空下でSO<sub>3</sub>蒸気を触れさせる気相反応によるものであり、もう一つは、高真空封管中でPPS粉末をSO<sub>3</sub>液体中に浸す液相反応によるものである。ドープした後、前者では高真空脱気する事により未反応SO<sub>3</sub>を取除いた。一方、後者では、封管中で真空蒸留により液体部分を固体から分離した。Table 1に各試料のドープング条件を示す。プロトンスピン格子緩和時間(T<sub>1</sub>)は、ブルカー-CXP-100型パルスNMR分光器を用い、180°-τ-90°パルス法にて求めた。測定周波数は、4~83 MHzの範囲で行なった。<sup>13</sup>C-固体高分解能(CP/MAS)スペクトルは、日本電子FX-200型分光器で測定した。

Table 1. CONDITIONS OF SO<sub>3</sub> DOPING

SAMPLE CODE	ORIGINAL FORM	TEMP.	TIME
VA	powder	R.T.	2 days
VB	pellet	R.T.	3 days
VC	pellet	R.T.	2 weeks
VD	pellet	100°C	8 hours
VE	powder	100°C	1 week
LA	powder	R.T.	—
LB	powder	R.T.	1 week
		100°C	4 hours

V: doped with vapor SO<sub>3</sub>  
L: doped with liquid SO<sub>3</sub>

## 3) CP/MAS スペクトル

Fig.2に未ドープPPS及びドープ物VDのCP/MAS スペクトルを示す。PPSのCP/MAS スペクトルには、130 ppm付近に四級炭素及び不飽和メチンに基づく2本の吸収と、非晶相に基づくと思われるやや広い吸収が観測された。一方、SO<sub>3</sub> ドープ物では広い成分が増大しわずかに低磁場シフトした。しかしながら、かどま しげお・あらい こういち

芳香環へのスルホン化が生じた時に予想される10~15 ppmもの大きな化学シフトは観測されなかった。したがって、ドーピング物ではスルホン化のような副反応は生じていないと考えられる。

### プロトン磁化回復挙動

Fig. 3(a)にPPSにおけるプロトン磁化の180°パルス後の回復挙動を示す。その回復は、ほぼ2相にわたって単一の指数関数であらわされる事が明らかであり、 $T_1 = 2.1$  sと求められる。Fig. 3(b)には、ドーピング物VDの同一周波数(57 MHz)におけるプロトン磁化回復挙動を示す。PPSと異なり、回復挙動は単一指数関数で表す事が

できず、 $T_1 = 6$  msという非常に速い回復と、 $T_1 = 2.1$  sという未ドーピングPPSと同じ回復速度をもつ2つの成分が存在する。すなわち、VD試料中ではSO<sub>3</sub>ドーパント分布が不均一であり、ドーピングされない領域が残っていると考えられる。一方、ドーピングすることにより非常に速い回復が見出される事から、PPS中のドーピングされた領域には、強力なプロトン緩和中心が生み出された事がわかる。

ドーピング条件、方法を変えた時に、ドーパント分布の不均一性がどのように改善されるかを調べる為に、Table 1の試料の180°パルス後の磁化回復挙動を測定した結果をFig. 3に示す。PPSがペレット状であるVC、VDでは、ドーピング温度を室温から100°Cに上げる事により、短い $T_1$ 成分が増え、ドーピングがかなり進行した事がわかる。しかし、両者ともに未ドーピングPPSに由来する遅い回復が残っている。PPSの形状を粉末とし、SO<sub>3</sub>気相ドーピングすると(VE)、未ドーピング領域に基づく遅い回復はなくなった。すなわち、PPSを粉末状とする事で、より内部まで

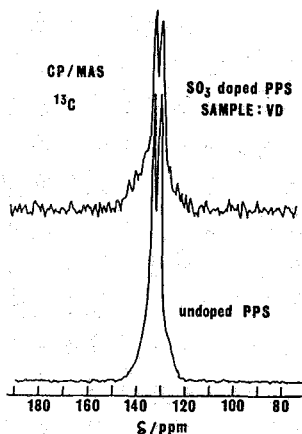


Fig. 2 <sup>13</sup>C CP/MAS spectra of SO<sub>3</sub> doped and undoped PPS.

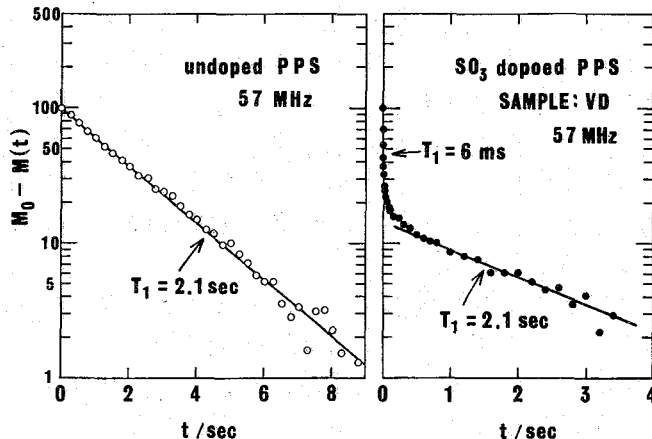


Fig. 3 Typical recovery curves of longitudinal magnetization of protons in undoped and SO<sub>3</sub> doped PPS.

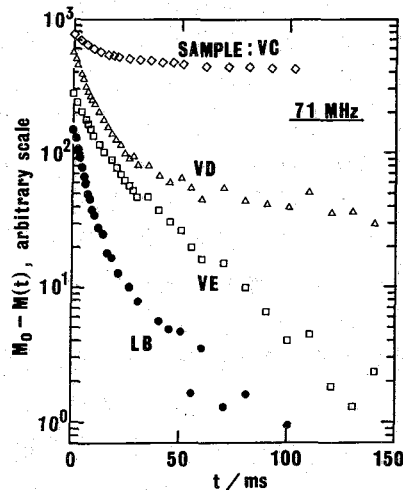


Fig. 4 Recovery curves in samples doped with SO<sub>3</sub> in various ways.

ドーピングが進行したと考えられる。さらに、PPS粉末を $SO_3$ 液相ドーピングした試料LBでは、VD, VEと比べ速い回復成分の $T_1$ はさらに短くなったうえ、未ドーピング領域に基づく回復も全く見られない。この事は、液相ドーピングが極めて効果的であることを示している。なお、液相ドーピングでは、ドーピング温度を $100^\circ C$ に上げて、その酸化回復挙動にはほとんど差異が認められなかった。したがって、LBではドーピングレベルがほぼ飽和点に達していると考えられる。LBの酸化回復挙動は、異なる $T_1$ をもつ指数関数の重ねあわせであると考え、2成分に分解する事ができる。最小自乗法を用いて得られた2つの $T_1$ 値のうち、短い方の $T_1$ 値(85%以上の成分量に相当する)をドーピング物の $T_1$ として以下の解析に用いた。

### $T_1$ の周波数依存性

PPS及びLBの $T_1$ の周波数依存性をFig. 5に示す。Jurgaら<sup>3</sup>によるPPSのプロトン $T_1$ の温度依存性の測定結果から、PPSのプロトンスピン格子緩和機構は、主として分子運動によるプロトン間の双極子相互作用のゆらぎに基づくと考えられる。一方、ドーピング物の $T_1$ はPPSと比べ必ずしも短くなるうえ、周波数依存性も異なるため、PPS未ドーピング物とは違ったスピン格子緩和機構が支配的であると考えられる。

スピン格子緩和機構として、一次元拡散運動をしている電子スピンの寄与が支配的である場合、核スピンの $T_1$ は周波数の $\frac{1}{2}$ 乗に比例する事が知られている<sup>4</sup>。Fig. 6に試料LBの4.3~27 MHzにおける $T_1^{-1}$  vs.  $\nu^{-1/2}$  ( $\nu$ : 測定周波数)プロットを示す。測定誤差の範囲で良く $\frac{1}{2}$ 乗則を満足している事がわかる。図には示していないが、PPS未ドーピング物の $T_1$ は、 $T_1^{-1}$  vs.  $\nu^{-1/2}$ プロットを行なうと明らかに曲線となり、 $\frac{1}{2}$ 乗則を満足しなかった。

以上の結果から次の事が言える。PPSに $SO_3$ をドーピングすると、強力な緩和中心が生まれ、 $T_1$ は極めて短くなる。そして $T_1$ の周波数依存性は、この緩和中心が一次元拡散運動を行なう常磁性中心であることを示している。したがって、PPSではPAの場合とは異なり、イオウ原子の位置で共役鎖が切れているにもかかわらず、 $SO_3$ ドーピングにより、主鎖に沿った一次元拡散運動が生じた事にな

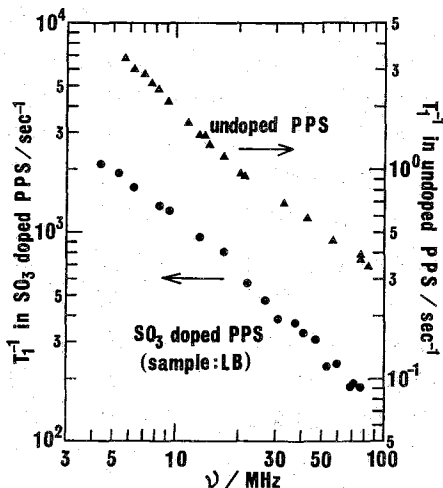


Fig. 5 Frequency dependence of  $T_1^{-1}$  in undoped and  $SO_3$  doped PPS.

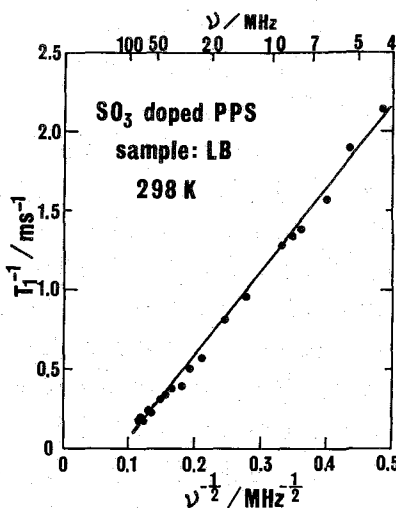


Fig. 6  $T_1^{-1}$  in the most heavily doped sample plotted as a function of  $\nu^{-1/2}$ .



る。

### ドーパ物の構造と導電性

Fig. 7に液相ドーパ試料LAの90°パルス後のプロトンFIDを示す。試料LAは、ドーピング後もSO<sub>3</sub>を留去せず、ドーパ物黒色固体とSO<sub>3</sub>液体部分が共にNMR管中に封入されたものである。FIDには、1.9msという長いスピンスピンの緩和時間(T<sub>2</sub>)と短いT<sub>2</sub>(=0.1ms)の二成分が共存している事がわかった。長いT<sub>2</sub>は、*motional narrowing*をおこなっている液体の信号であり、短いT<sub>2</sub>は固体によるものであった。各々のT<sub>2</sub>をもった成分量をFID解析する事により求めると、ほぼ1:1と等しい事がわかった。

この結果は、PPSにSO<sub>3</sub>をドーパする事により、PPS中のプロトンの半数が液体中に脱離した事を示している。これは、AsF<sub>5</sub>ドーパ物でSchackletteら<sup>2</sup>が提唱している構造(Fig. 8(a))が、SO<sub>3</sub>ドーピングの場合にも形成される事を支持している。この構造はポリ(p-フェニレン)(PPP)を骨格にもつ平面構造であり、主鎖に沿って延びた共役構造をもつ。したがって、T<sub>1</sub>の周波数依存性が示すところの常磁性中心の一次元拡散運動は、ドーピングにより形成されたPP骨格を介して行なわれると考えられる。この緩和中心は、ソリトンのような非線型励起と類似のものと考える事ができるが、PPPではポーラロン、バイポーロン(Fig. 8(b))がより適切なモデルとして提案されている<sup>5</sup>。したがって、PPSのSO<sub>3</sub>ドーパ物は、ポーラロン、バイポーロンモデルで議論しうる一次元導電体であると考えられる。

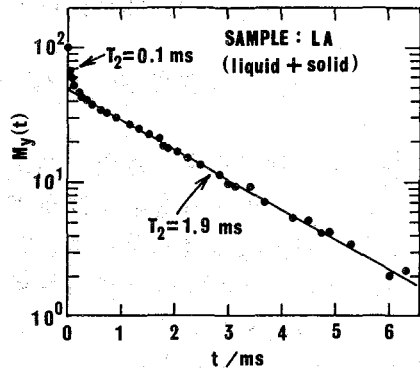


Fig. 7 FID of protons in sample LA.

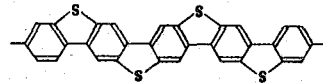


Fig. 8(a) A possible conjugated chain structure of doped PPS<sup>1</sup>.

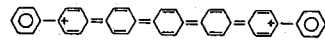


Fig. 8(b) Bipolaron on PPP chain<sup>5</sup>.

### [REFERENCES]

1. L. W. Schacklette et al., J. Chem. Phys. **75**, 1919 (1981).
2. K. Maeda et al., Polym. Prepr. Japan **31**, 735 (1982).
3. J. Jurga et al., Z. Naturforsch. **34a**, 1216 (1979).
4. M. Nechtschein et al., Phys. Rev. Lett. **44**, 356 (1980).
5. J. L. Brédas et al., Phys. Rev. B **26**, 5843 (1982).

### [謝辞]

PPSを提供していただいたフィリップス石油(株)の楢垣氏、及びCP/MAS測定に協力いただいた日本電子(株)の出口氏、大木氏に感謝いたします。

## 16. $Mg_2NiH_4$ における相転移と水素の運動

(化技研) ○ 林 繁信, 早水紀久子, 山本 修

金属水素化物は水素の貯蔵・輸送物質として注目されているが、その中でもマグネシウム-ニッケル系合金は軽量で水素を多量に吸蔵するため輸送用物質として有望である。 $Mg-Ni$ 系は金属間化合物  $Mg_2Ni$  を作り、水素を吸収して  $Mg_2NiH_4$  ( $\beta$ 相) となる。 $\beta$ 相は 500 K 付近で相転移を起こし結晶構造が変化する。高温相は立方晶系で  $CaF_2$  型構造をとっているが、低温相は単斜晶系で高温相が少し歪んだような構造をとっていることが最近になってわかってきた。相転移の原因についてはまだわかっていない。 $Va$  族遷移金属 ( $V, Nb, Ta$ ) の水素化物の  $\beta$ 相との類推から、 $Mg_2NiH_4$  でも水素の規則-不規則相転移が起こっているのではないかとされているが、実験的な証拠は何も得られていない。

$Mg_2NiH_4$  中の水素のサイトは高温相において中性子回折によって決められている (図 1)。<sup>1)</sup>  $Mg$  原子の作る単純格子に 1 つおきに  $Ni$  原子がはいっている。水素は  $Ni$  原子を中心とした正八面体の頂点に位置している。6 つの頂点のうち 4 つを水素が占めるが、その配置は不明である。低温相における水素のサイトについては何ら報告されていないが、高温相と類似のサイトを占めていると考えられている。

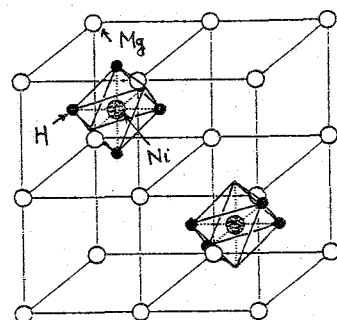


図 1. 高温相の構造

我々は既に、低温相において水素がある空間内に閉じ込められた再配向運動をしていることを示した。<sup>2)</sup>

本研究では、低温相と高温相の相転移温度付近における水素の運動を  $^1H$  NMR を用いて調べた。その結果、相転移による水素の運動の変化が明らかになり、結晶構造の変化との良い相関が得られた。

<実験> 1. 試料  $Mg_2Ni$  と  $H_2$  との直接反応により合成した。組成は  $Mg_2NiH_{3.85}$  である。室温において結晶構造が単斜晶系であることを粉末 X 線回折によって確認した。NMR 測定用試料はガラス製アンプルに封じて水素の脱離を防いだ。

2. 測定 NMR 測定はブルカー CXP-100 を用いた。スペクトルは、ソリッドエコー法を用いエコーの後半分をフーリエ変換して得た。スピン-格子緩和時間  $T_1$  は  $180^\circ-\tau-90^\circ$  法を用いて測定した。

示差熱分析 (DTA) は理学サーモフレックス 8002/D を用いて行なった。

<結果および考察> 1. NMR 測定 図 2 に転移温度付近の  $^1H$  NMR スペクトルを示した。相転移は 510~520 K で起こっており、高温側において線幅の減少が見

はやししげのぶ, はやみずきくこ, やまもと おさむ

られる。低温側では線型、線幅共温度にほとんど依存しない。ただし、340K以下ではさらに広幅になる。非常に線幅の狭い成分が頂上付近に重なっているが、線幅などから考えて、 $\alpha$ 相 ( $Mg_2NiH_x$ ,  $x < 0.3$ ) の水素と帰属される。

図3に  $T_1$  の温度依存性を示した。転移温度以下では緩和曲線は指数関数的に減衰し  $T_1$  は1成分で

あるが、転移温度以上では非指数関数的減衰を示し

$T_1$  に2~3成分ある。一番短い  $T_1$  成分は低温相に帰属され、相転移の完了と共に消失する。一方、他の成分は相転移と共にあらわれ高温相に帰属される。

緩和曲線の解析によって得た低温相の存在比の温度変化を図4に示した。温度の上昇と共に低温相の割合が減少するが、その減少の仕方は試料の履歴に依存する。図中の数字は実験の順序を示し、各実験ごとに試料を室温まで放冷している。転移をくり返すほど転移温度が低くなっている。run No.3の転移温度がDTAの結果(後述)とよく一致しており、それ以上の転移温度の降下は観測されなかった。

図2のスペクトルは run No.3の結果であるが、518Kのスペクトルには高温相と低温相が混在している。このように転移領域においては2相のスペクトルが重なっている。それを  $T_1$  の違いを利用して分離した。図5に512Kにおけるスペクトルを示した。Aは2相共充分緩和させて測定したスペクトルである。Bは高温相の  $T_1$  より短い時間間隔でパルスをくり返し照射して得たスペクトルで低温相のスペクトルに相当する。差スペクトル  $A-B$  は高温相のスペクトルに相当する。このようにして各相のスペクトルを決め、その線幅を図6にプロットした。2つの相の  $T_1$  の差が無限ではないため、上述の方法だけでは2相を完全に分離できない場合もあるが、各相の  $T_1$  の値から混在の

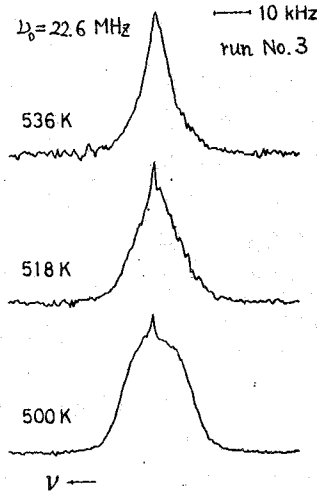


図2.  $^1H$  NMR スペクトル

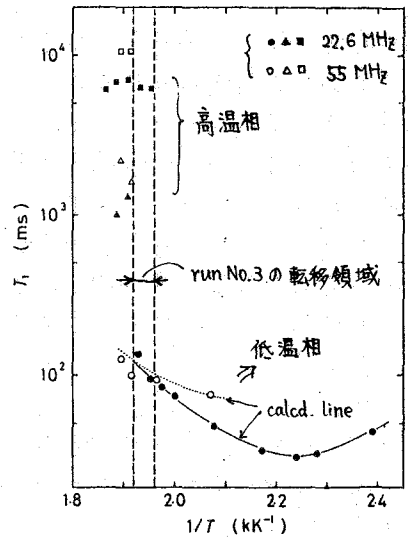


図3.  $T_1$  の温度依存性

各相の  $T_1$  の値から混在の

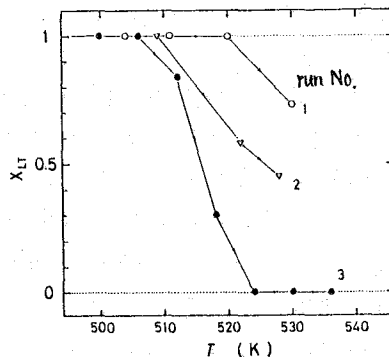


図4. 低温相の割合の温度変化

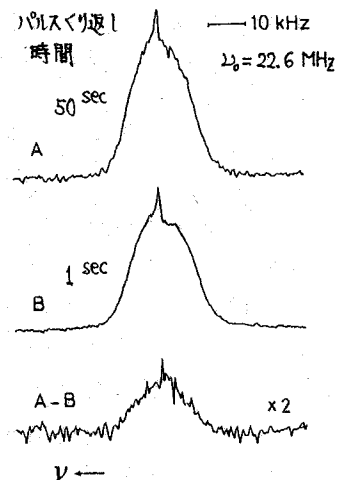


図5. 512 K の  $^1H$  NMR スペクトル

程度を見積って補正を行なった。

低温相の線幅は転移温度以下では温度や磁場に依らずほぼ一定である。このことから低温相の線幅が $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 双極子相互作用に依るものであると言える。二次モーメント $M_2$ は $3.3 \pm 0.2 \text{ Oe}^2$ である。転移領域では線幅の減少が観測される。高温相の線幅は温度の上昇と共に減少し、線型がガウス型からローレンツ型に変化する。

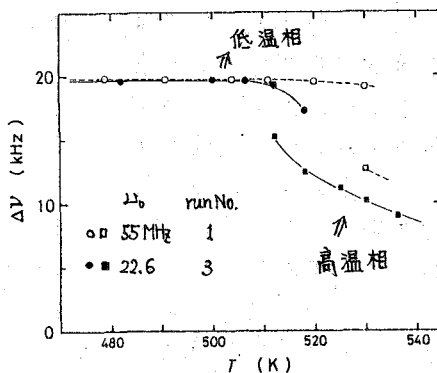


図6. 半値全幅の温度依存性。

## 2. DTA 測定

$\text{N}_2$ 雰囲気においては水素の解離に伴う吸熱ピークが470 K付近からあらわれ相転移は観測されなかった。空气中、則ち $\text{O}_2$ 存在下で昇温すると、510~520 Kに相転移に伴う吸熱ピークが観測され、530 K以上において水素の解離が観測された。転移温度は、転移をくり返すことにより2~3度低下した。

## 3. 低温相における水素の運動

低温相において $^1\text{H}$ スペクトルは270~340 Kの範囲で motional narrowing を起こす。<sup>2)</sup> 線幅は低温側で50 kHz、高温側で21 kHzである。 $M_2$ 値はそれぞれ17,  $3.5 \text{ Oe}^2$ である。高温側の値は、転移温度付近まではほぼ一定である。

低温相において $^1\text{H}$ スペクトルは270~340 Kの範囲で motional narrowing を起こす。<sup>2)</sup> 線幅は低温側で50 kHz、高温側で21 kHzである。

表1に $M_2$ の計算値を示した。組成 $\text{Mg}_2\text{NiH}_4$ 、高温相の結晶構造を仮定した。Niを中心とした正八面体の6つの頂点のうち4つを水素原子が占めるが、その配置に二種類考えられる。則ち、 $\text{NiH}_4$ 平面を作る配置とランダムな配置である。しかし、実験値 $17 \text{ Oe}^2$ からその2つを判別することはできない。

表1.  $\text{Mg}_2\text{NiH}_4$  の  $M_2$  の計算値。

Motion		Second moment ( $\text{Oe}^2$ )			$\Delta\nu$ (kHz)
		intra-	inter-	total	
rigid lattice	XY-XY	8.6	6.3	14.9	39
	XY-YZ	8.6	8.9	17.5	42
	random	10.0	6.9	16.9	41
in-plane rotation		2.2	2.2	4.4	21
isotropic rotation		0	2.2	2.2	15
translational diffusion		0	0	0	0

(注) XYは $\text{NiH}_4$ 平面がXY面に平行であるという意味。

narrowing を起こした後も $M_2$ が $3.3 \pm 0.2 \text{ Oe}^2$ という値を示すこと

から、水素が並進拡散をしないで、 $\text{Mg}$ 格子内に閉じこめられた運動をしていることがわかる。 $M_2$ の実験値は $\text{NiH}_4$ 平面の等方回転と面内回転(回転軸が面に垂直)の中間の値をとっており、回転に異方性があることを示している。正八面体の頂点にランダムに水素が配置し、ランダムに動いている場合の $M_2$ 値は $\text{NiH}_4$ 平面の等方回転と同じ値となり実験値と合わない。 $\text{NiH}_4$ 平面が面内回転以外の回転をしている場合の $M_2$ 値は、面内回転の値より大きくなる。従って、水素原子はNi原子のまわりに平面的に配置し、主に面内回転をしていると考えられる。

回転の速さは $T_1$ の温度変化を解析して得られる。低温相の $T_1$ は回転運動に依るも

のであり、BPP式によく合っている。図3の中の実線および点線は 12 kcal/mol の活性化エネルギーを仮定してフィットさせたものであり実測値をよく再現している。図7に相関周波数をプロットした。図7には 420 K 以上の値しか示していないが、290 K まで良い直線関係が成立している。転移領域において回転速度の増加が見られるが、これは回転が少し等方的になったためと考えられる。それに対応する変化が線幅の減少となってあらわれている。単斜晶系から立方晶系への相転移の中間状態のようなものが存在しているのかもしれない。

低温相における水素の並進拡散は<sup>1</sup>H NMRでは観測されない。

4. 高温相における水素の運動 高温相の $T_1$ 値は図3に示すように2種類存在する。 $T_1$ の値は温度にほとんど依存しないが、磁場依存性があり、常磁性不純物に依る緩和と考えられる。同じような緩和現象が低温相の低温領域(300 K以下)でも観測されている。低温相との類推から、 $T_1$ 値は2種類存在しているように見えるが、水素としては一種類と考えられる。

$T_1$ に水素の運動の寄与が観測されないこと、線幅がNiH<sub>4</sub>の等方回転に対する値(15 kHz)より狭いことから、NiH<sub>4</sub>平面が非常に速く等方回転していると考えられる。回転の相関周波数は $1 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$ より高い。

高温相の線幅は、NiH<sub>4</sub>の等方回転と水素の並進拡散との間の値をとり、温度の上昇と共に減少する。これは、等方回転しているNiH<sub>4</sub>間での水素の移動が起こり始めたことを示している。線幅の変化から得られた水素の並進拡散の相関周波数を図8に示した。アレニウスプロットの傾きから活性化エネルギーは 20 kcal/mol である。

以上のように、低温相ではNiH<sub>4</sub>平面の面内回転が主に起こっており、高温相ではNiH<sub>4</sub>の等方回転と水素の並進拡散が起こっていることがわかった。

水素化合物の合成について有益な御助言をいただいた小野修一郎博士、秋葉悦男博士に深く感謝いたします。

文献 1) K. Yvon, J. Schefer, F. Stucki, Inorg. Chem., 20, 2776 (1981).

2) 林, 早水, 山本, 日本化学会 第47春季年会 (1983): J. Chem. Phys. in press.

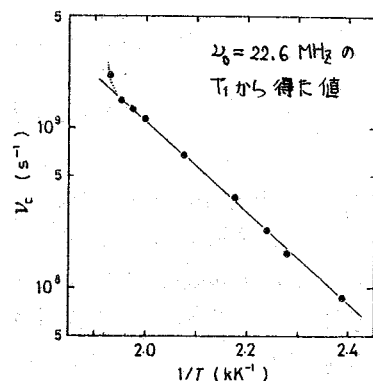


図7. 低温相のNiH<sub>4</sub>回転運動。

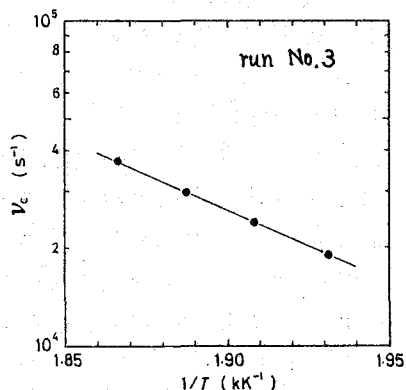


図8. 高温相のHの並進拡散。

# 17. ハロゲン化 n-ブチルアンモニウム結晶の相転移と分子運動

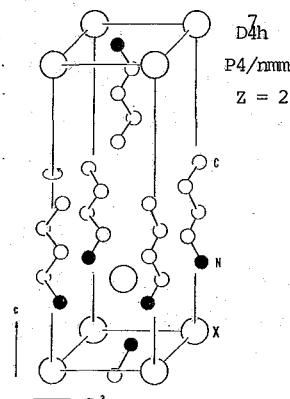
(名大理) 深田 晋一 ○池田 龍一 中村 大雄

[序] n-alkylammonium halides ( $n-C_nH_{2n+1}NH_3X$ ) の結晶は、ハロゲンイオンが層状構造を作り、棒状の陽イオンが層間をうめている。これらの化合物では、通常、室温以下にアルキル鎖の運動と深く関係した結晶の相転移があり、炭素鎖が短い化合物は室温で正交晶系の結晶構造を採るものが多い (Fig 1)。アルキル鎖の分子軸が結晶の4回軸と一致することから、陽イオンは分子軸のまわりに回転の自由度をもつと考えられる。低温では、陽イオンの運動が束縛されて、陰イオン層と陽イオン軸が  $90^\circ$  からずれた角度をなす結晶相へ転移すると推定されている。最近、生体膜中の脂質が、これら alkylammonium 塩とよく似た二重層膜を作成し、類似の相転移を起すことが明らかにされた。alkylammonium 塩は生体膜の動的構造を理解するために、都合のよいモデル化合物と考えられる。本研究では、最も単純化した系として、ハロゲン化 n-ブチルアンモニウムを選び、 $^1H$ NMR, 熱測定 (DTA, DSC) の手段を用い、相転移と分子運動の関係を広い温度範囲 (77K-融点) において調べた。

[実験] n-ブチルアミン塩酸塩 (baCl), 臭化水素酸塩 (baBr), ヨウ化水素酸塩 (baI) はアミンを対応する酸で中和して得た。結晶はエタノール、又はエタノール・エーテル混合溶媒から2回再結晶した。zone melting 法による精製も行なった。NH<sub>3</sub>基を重水素化した試料 (baX-d<sub>3</sub>) は、重水および重エタノールからの再結晶により得た。

$^1H$  広幅 NMR は日本電子 JNM-MW-40S 型分光器を用い 40MHz で測定した。T<sub>1</sub> の測定は自作パルス分光器 (20MHz), および MATEC 5100 系を用いて製作した分光器を用いた。測定は  $180^\circ$  から  $90^\circ$  まで行なった。DTA は自作の装置, DSC は Parkin-Elmer 1B 型熱量計を用いた。

FIG 1 Cryst. Struct. of baX



	a <sub>0</sub> /Å	c <sub>0</sub> /Å
baCl	5.02	14.85
baBr	5.02	15.23
baI	5.18	15.30

(Hendricks, 1928)

[結果と考察] DTA の測定を室温 ~ 100K の範囲で繰り返して行ない、相転移とその熱履歴の有無、準安定相の混在を調べた。測定した相転移点、融解点を Tab I に示す。baCl, baCl-d<sub>3</sub> は 2~5 個の相転移による DTA ピークを与えたが、結晶の精製法、熱履歴などの違いによって、転移の数、転移温度、ピークの形が異なる場合があった。これらの異常は、種々の温度で結晶を長時間 anneal することにより、ある程度減少するため、準安定相が混在すると推定される。baBr は 2 個の相転移を与え、これらは

TAB I Phase Transition Points (T<sub>tr</sub>) and Melting Points (T<sub>m</sub>) Determined by DTA

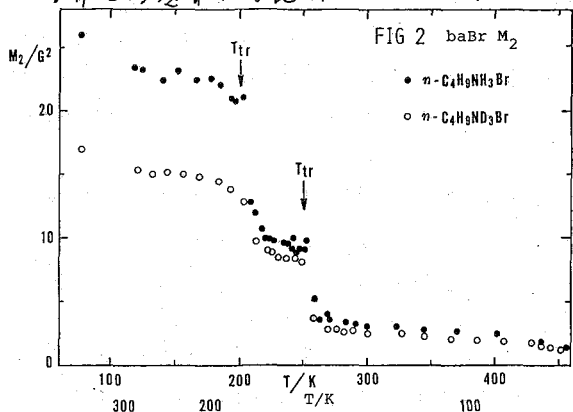
	T <sub>tr</sub> /K	T <sub>m</sub> /K	
baCl	(165, 214, 231), 244	487	*( ) 内の温度は準安定相が混在すると思われる相転移点。
baBr	200, 249	477	
baI	(218), 268	442	

小かだ しんいち, いけだ りゅういち, なかむら だいゆう

試料の精製方法や熱履歴に影響を受けなかったため、安定相のみが得られたと考えられる。baIでは2個の相転移がDTAにより観測された。しかし、高温の相転移点(268K)直下で結晶を2時間annealすると、低温(218K)の転移が消失した。これは高温の転移が完結するのに長時間を要するため、DTAの掃引速度(>1K/分)では完全に安定相に転移していい状態を含んだまま冷却されて、それが低温で更に転移することがわかった。以下、baBrの結果を中心に報告する。

(a) 臭化水素酸塩(baBr) 測定した<sup>1</sup>H NMR 共鳴線の2次モーメント(M<sub>2</sub>)とT<sub>1</sub>の温度変化をFig 2~4に示す。いずれも温度上昇時の測定値である。ba<sup>+</sup>イオンの予測される種々の運動モードに対するM<sub>2</sub>計算値をTab IIに示す。イオン間のM<sub>2</sub>はFig 1の構造を用いて見積った。

低温相(200Kの転移点以下)では、baBr, baBr-d<sub>3</sub>ともにほぼ一定したM<sub>2</sub>(それぞれ23, 15 ± 2 G<sup>2</sup>)を与え、これは、末端のCH<sub>3</sub>基がc-c軸まわりに無秩序に再配向(120°)しているとして計算した値にほぼ一致した。T<sub>1</sub>はこの相で深い極小を与え、これはCH<sub>3</sub>基再配向運動に帰属できるが、baBr, baBr-d<sub>3</sub>ともにT<sub>1</sub>極小値(20 MHzでそれぞれ55, 44 ms)が計算値(45, 34 ms)よりかなり大きい。また、T<sub>1</sub>曲線が極小の両側で非対称である。さらに、T<sub>1</sub>極小値が測定周波数に比例していない。これらの結果は、いずれも単一の相関時間(τ)を仮定するBPP理論に合致せず、τの分布を考慮すれば説明できる。Cole-Davidson型のτ分布を仮定すると、分布関



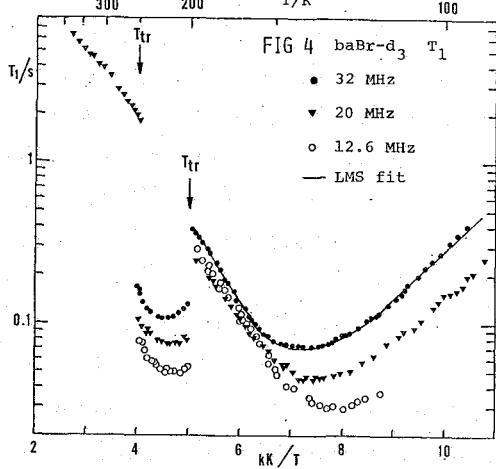
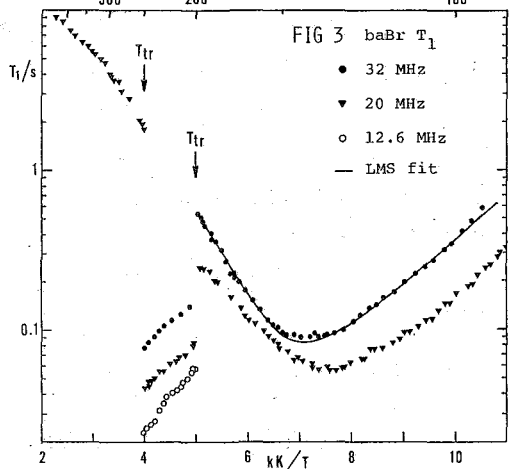
数  $g(\tau)$  は

$$g(\tau) = \sin \beta \pi / \pi [ \tau / (\tau_0 - \tau) ]^{\beta} \quad \tau < \tau_0$$

$$g(\tau) = 0 \quad \tau \geq \tau_0$$

TAB II Calculated M<sub>2</sub>(G<sup>2</sup>)

	baBr	baBr-d <sub>3</sub>
rigid	26.9	21.2
CH <sub>3</sub> -rot	21.3	14.2
(CH <sub>3</sub> +NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) rot	14.3	14.2
(CH <sub>3</sub> +NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) rot (+chain)	4.3	3.6



ここで $\beta$ は $\tau$ の分布幅( $0 < \beta \leq 1$ ),  $\tau_0$ は $\tau$ 分布の上限値を示す。測定周波数32 MHzの $T_1$ 値について、最小二乗法により求めた最適理論曲線をFig. 3, 4に示す。どちらの化合物についても、最適の $\beta$ は0.51,  $T_0$  Arrhenius型温度変化を仮定して求めた活性化エネルギー,  $E_0 \approx 11 \text{ kJ mol}^{-1}$ となった。 $\tau$ に分布があるということは、種々の異った結晶場の中に置かれた $\text{CH}_3$ 基の存在を示唆し、得られた低温相がまだ完全に秩序状態になっていないことも考えられる。そこで、室温相を徐冷し、中間相で数日間 anneal し、さらに低温の転移点の下で種々の anneal を試みたが、 $T_1$ の値は anneal しない場合の値と実験誤差内で一致した。従って、低温相は一種の無秩序相と推定される。

200~249 Kの中間相では、baBrの $T_1$ は大きな減少を示すが、baBr-d<sub>3</sub>にはこの減少がないため、 $\text{NH}_3$ 基の $120^\circ$ 再配向運動がこの相では小さくなることがわかった。このことから、 $\text{NH}_3$ 末端は比較的強く陰イオン層に固定されているのに対し、 $\text{CH}_3$ 末端は束縛が小さく動きやすいことを意味している。 $M_2$ の値も中間相では大きく減少し、新しい運動の助起を示しているが、実測の $M_2$ は $\text{CH}_3$ と $\text{NH}_3$ 基の再配向のみの計算値より小さく、更に別の運動が $M_2$ 減少に寄与している。実際baBr-d<sub>3</sub>において別の運動によると思われる浅い $T_1$ 極小が観測された。予測されるアルキル鎖の運動としては、陽イオン全体のflip, 末端 $\text{C}_2\text{H}_5$ 基の再配向(trans  $\leftrightarrow$  gauche)などがある。180° flipと $\text{C}_2\text{H}_5$ 基再配向について計算した $M_2$ はどちらも約10 G<sup>2</sup>で実測値とほぼ一致した。DSC実験から求めた転移のエントロピー変化 $\Delta S_m$  (Tab III)は、中間相において、イオンが2~3個の配向の自由度を得たことを示しており、上のモデルと矛盾しない。どちらのモデルがより適しているかは決められないが、中間相は動的無秩序状態と考えられる。

249 Kの相転移点以上の室温相では、 $T_1$ は増大し、運動が大きくなり変化することを示している。 $M_2$ の値も減少し、陽イオン全体のアルキル鎖回りの回転が始まっており、X線構造解析の結果と一致している。温度上昇とともに $M_2$ 値は徐々に減少し(3.5  $\rightarrow$  1.7 G<sup>2</sup>)鎖回転のみでは説明できない。これらの運動の他に陽イオンの軸方向への併進(局所的拡散)を考慮しても(2.5~2.7 G<sup>2</sup>)室温以上の実測値は更に小さい。従って、室温相では、陽イオンの一軸回転、アルキル鎖の conformation のみでなく、陽イオンの部分的拡散などが温度上昇とともに徐々に助起されていると推定される。中間相から室温相への $\Delta S_m$ は融解のエントロピー変化 $\Delta S_m$ より大きく、plastic転移の値に近い。アルカリハライドの $\Delta S_m$ は25  $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ 程度で、棒状イオンを含むKSCN, KN<sub>3</sub>などは30~40  $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ である。baBrの $\Delta S_m$ はこれよりかなり小さい。以上のことより、室温相の陽イオンは、NMRのtime scaleでは、一次限液体に近い状態になっていると考えられる。

(b) ヨウ化水素酸塩(baI) 安定相の相転移は1ヶ所であるが、 $M_2, T_1$ の温度変化はbaBrによく似ている。baBrの場合よりやや低温側に $\text{CH}_3$ 基再配向による $T_1$ 極

TAB III Enthalpies ( $\Delta H$ ) and Entropies ( $\Delta S$ ) of Transitions.

	$T_{tr}/K$	$\Delta H/\text{J mol}^{-1}$	$\Delta S/\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
baCl	244	6360	26.1
	487	8570	17.6 (melt)
baBr	200	1530	7.6
	249	5740	23.0
	477	8300	17.4 (melt)

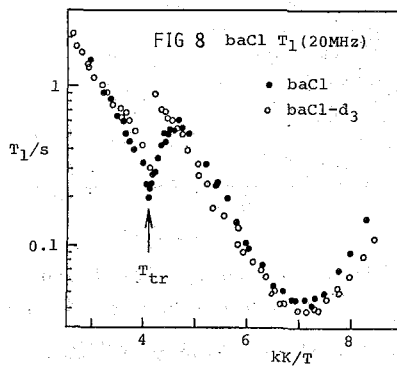
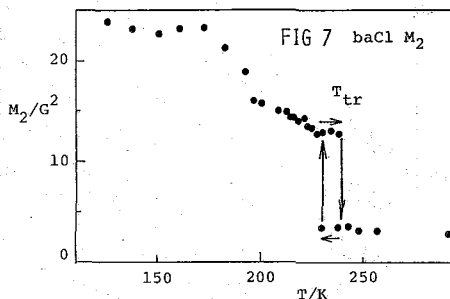
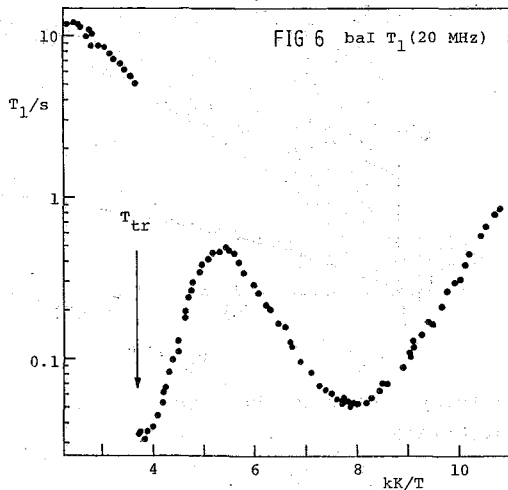
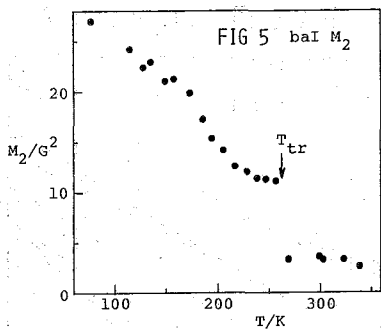


小が観測された。このT<sub>1</sub>曲線はほぼ単一のBPP曲線で再現でき、baBrの場合のようなT<sub>1</sub>の分布はbaIの低温相には存在しないと思われる。転移点近くのもう一つのT<sub>1</sub>極小は、baI-d<sub>3</sub>では消失したためNH<sub>3</sub>基の再配向運動に帰属した。運動の活性化エネルギーを求めTab IVに示す。268Kの相転移はbaBrの高温側の転移とよく似ており、大きな運動の変化を伴っている。この転移は冷却時には、転移がほぼ二段階で起っていることがFIDの経時変化の測定で明らかになった。即ち、転移直後に、温度を260Kに固定すると、最初FIDは短い時定数(~10分)で変化し、転移が進行していることを示すが、途中から変化が遅くなり最終平衡値(低温安定相でのFIDの高さ)に達するのに数時間を要した。急冷した試料のT<sub>1</sub>を低温で測定すると、ほぼ2成分のT<sub>1</sub>が得られ、一方のT<sub>1</sub>は安定相の値に一致し、他方のT<sub>1</sub>は幅広い極小を与えた。後者は格子のみだれの存在を示唆しており、急冷のための二段階目の転移が終了しなかった部分が準安定相として残っていると推定される。この予測はDTAの結果とよく一致する。

(C) 塩酸塩 (baCl) 準安定相が混在しやすく、まだ完全に均一な試料は得られていない。精製法の改良および試料をannealすることによって得られた比較的均一と思われる試料についてのM<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>の温度変化をFig 7, 8に示す。baIとよく似た振舞いを示し、CH<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub>基の再配向運動の受ける束縛はほぼbaIの場合と同程度であるが、T<sub>1</sub>極小の温度はbaIより高温側に移動している。

TAB IV Activation Energies for Reorientations

	baCl	baBr	baI
CH <sub>3</sub>	9.9 kJmol <sup>-1</sup>	~11 kJmol <sup>-1</sup>	9.3 kJmol <sup>-1</sup>
NH <sub>3</sub>	~22	~23	23.5



# 18. 陽子共鳴による固体中のメチル回転の研究

(阪大・理)

○山本泰生・千原秀昭

**§1. 序** メチル基の分子内回転は他の分光学的手段に対して不活性であるため、NMRは中性子非弾性散乱と並んで有力なその研究手段となっている。固体中のメチル基は一自由度の回転子として記述できる場合が多く、多自由度の分子運動に比較して著しい単純さを持っているため、陽子共鳴により内部回転並びに緩和の素過程を詳細に調べるのにふさわしい対象となる。

この研究では、束縛ポテンシャルの形と強さに依存するメチル基の回転状態の特徴を述べ、それらが陽子共鳴の吸収線形並びにスピン-格子緩和に及ぼす効果について議論する。更に、温度変化に伴って、低温でのトンネル回転から中温領域でのホッピング回転を経て、高温での力学的コヒーレンスを持つ回転へと移行する過程について概観する。

**§2. メチル基の回転または回転振動固有状態** 束縛ポテンシャル  $V(\varphi)$  の中に置かれたメチル基に対するハミルトニアンは、 $H_r = -B\hat{J}^2 + V(\varphi)$  で表わされる。  $\hat{J}$  は角運動量、 $B = \hbar^2/2I_r \approx 7.4 \text{ K}$  は回転定数、 $I_r$  は慣性モーメントである。  $V(\varphi) = V_3(1 - \cos 3\varphi)/2$  について、固有関数を  $\Psi_r^{\nu, \lambda}(\varphi) = \sum_k A_{\nu, \lambda, k}^{\nu} \exp[i(3k + \lambda)\varphi]$ 、 $\nu$  は回転振動準位、 $\lambda$  は  $C_3$  群の既約表現  $A(\lambda=0)$  と  $E(\lambda=\pm 1)$ 、としてエネルギー固有値  $E^{\nu, \lambda}$  を得た。結果を図1(a)に示した。

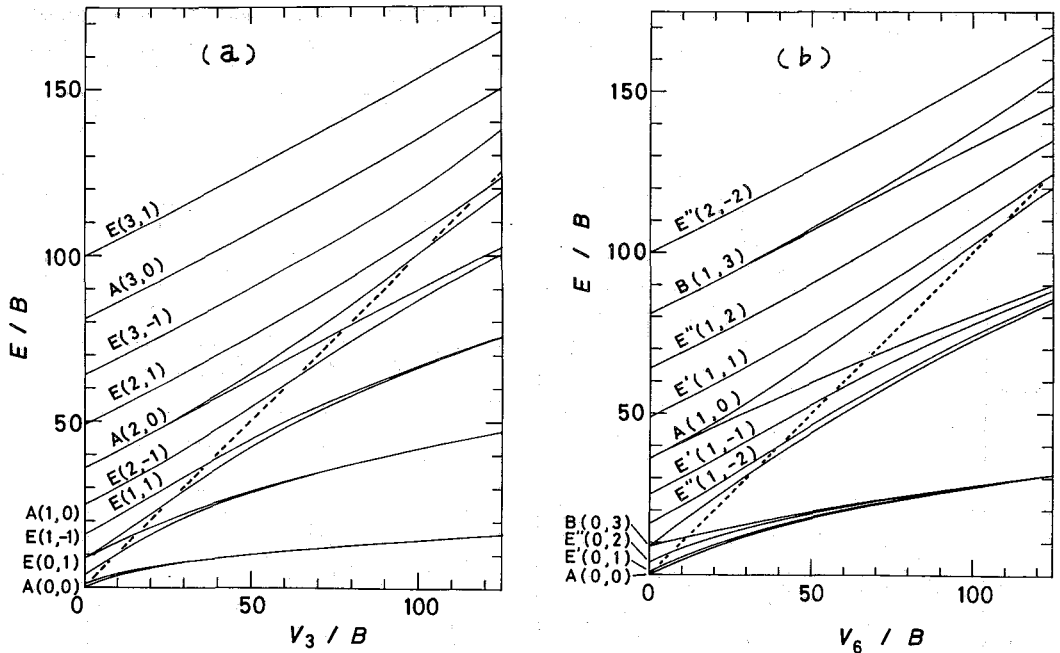


Fig.1 The energy level scheme of a methyl rotor in the three-fold (a) and six-fold (b) potentials.

やまもとたいせい・ちはらひであき

図1(b)には、 $V(\varphi) = V_6(1 - \cos 6\varphi)/2$  について得た結果を示した。図1より  $V_3$  または  $V_6$  がゼロの自由な平面回転子から、 $V_3$  または  $V_6$  の増大につれて回転振動子へと移行する様子を見ることが出来る。  $V_3$  が大きいとき、回転振動準位の分裂巾  $\omega_{\pm}^{\nu, A} = (E^{\nu, A} - E^{\nu, A})/\hbar$  がトンネル回転周波数を与える。

**§3. 回転-スピン固有状態** 3つの陽子が正三角形の頂点に配置されている場合、 $C_3$ 群の既約表現に対応して、全核スピンIは  $\frac{3}{2}$  (A対称) と  $\frac{1}{2}$  (E対称) をとり得る。Iのz成分をmで表わすと、3つの陽子がヒる固有状態は  $\phi_m^{\lambda}$  ( $\lambda = A$  のとき  $m = \pm\frac{3}{2}, \pm\frac{1}{2}$ ,  $\lambda = E$  のとき  $m = \pm\frac{1}{2}$ ) と書ける。パウリ原理の要請により許される回転-スピン固有状態は、 $\Psi_m^{\nu, A} = \Psi_R^{\nu, A} \phi_m^A$  および  $\Psi_m^{\nu, E} = \Psi_R^{\nu, E} \phi_m^E$  となり、AメチルとEメチルが存在することになる。

**§4. 吸収線形 一般論** 固体の陽子共鳴吸収線形を決める要因は、陽子間双極子相互作用  $H_d$  である。メチル基内の  $H_d^{intra}$  の大きさを  $\Gamma = \gamma^2 \hbar^2 r^{-3} \approx 21/kHz \approx 4.9 G$  で表わす。温度が十分に低い時は基底状態 ( $\nu=0$ ) だけを考慮すればよい。 $\hbar\omega_{\pm} \ll \Gamma$  ならば低温での吸収線形は固定格子のもので2次モーメントは  $M_2^{rigid} = \frac{9}{10}\Gamma^2$  で与えられ、 $\hbar\omega_{\pm} \approx \Gamma$  ならば特有のサテライトを持つ吸収線形となり、更に、 $\hbar\omega_{\pm} \gg \Gamma$  ならば線幅は狭まり  $M_2 = \frac{9}{40}\Gamma^2$  となることはよく知られている。最後の場合 ( $\hbar\omega_{\pm} \gg \Gamma$ ) はメチル基内の  $H_d^{intra}$  に関する限り古典的なホッピング回転または回転拡散の場合と同じ  $M_2$  を与える。

**実験例** 図2に5.6~206.7Kで実測したヨウ化メチルの線幅を示した。12~16Kで線幅が狭くなり、 $M_2$ は7.5  $G^2$  から7.0  $G^2$  へ減少した。  $T < 12 K$  における  $M_2$  は  $\frac{1}{4} M_2^{rigid}$  に近く、メチル基のトンネル回転 ( $\hbar\omega_{\pm} \gg \Gamma$ ) を示している。  $T > 16 K$  では融点まで線幅は一定で、メチル基の古典的な回転だけが起きている。12~

16Kでの線幅のわずかな狭まりは  $H_d^{intra}$  では説明できない。このことは、メチル基間の  $H_d^{inter}$  の大きさについてトンネル回転の場合の方が古典的な回転の場合よりも大きいことを示唆している。その定量的な議論は今後の課題である。

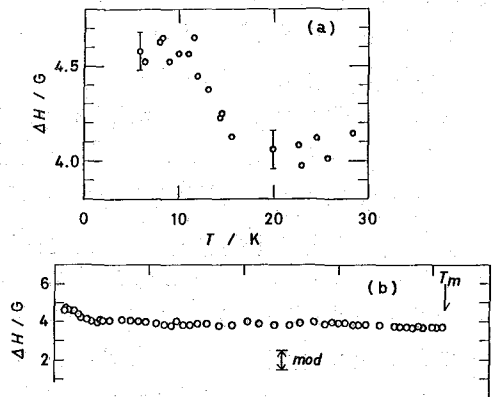


Fig.2 Temperature dependence of PMR line width of solid  $CH_3I$ .

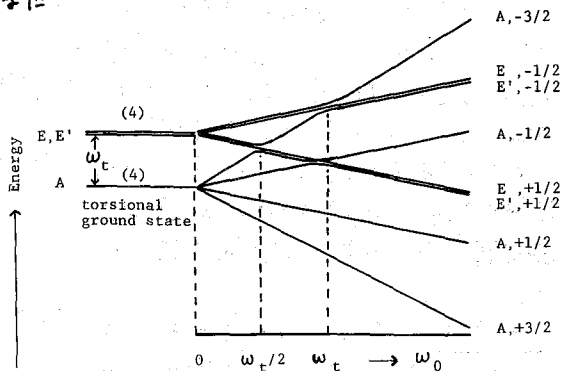


Fig.3 The scheme of rotation-Zeeman energy levels of a methyl group.

レベル交叉と吸収線形

回転振動基底状態のトンネル分裂が  $\omega_t \gg \Gamma$  の場合でも、ラーモア周波数  $\omega_0$  が  $\omega_t/2$  または  $\omega_t$  に極めて近づけると、次のように特異な吸収線形を予想することができる。

図3に示すように、外部磁場  $H_0$  を変化させて  $\omega_0 (= \gamma H_0)$  を  $\omega_t/2$  に近づけると、 $\Psi_{-3/2}^{0,A}$  と  $\Psi_{1/2}^{0,E}$  間に交叉現象が起こり

エネルギー準位にひずみを生じる。これにより非対称な吸収線形が観測される筈である。図4にメチル回転軸と  $H_0$  のなす角が  $90^\circ$  の場合のスペクトルを示した。 $\omega_0$  を  $\omega_t$  に近づけると、 $\Psi_{-3/2}^{0,A}$  と  $\Psi_{-1/2}^{0,E}$  間および  $\Psi_{-1/2}^{0,A}$  と  $\Psi_{1/2}^{0,E}$  間に交叉が起こり、再び非対称な吸収線形を与えるであろう。実測例はない。

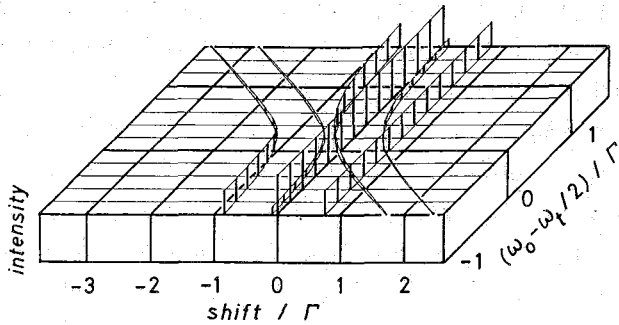


Fig.4 Calculated PMR spectra in the cross-over region " $\omega_0 \sim \omega_t/2$ ".  $H_0 \perp C_3$  axis.

§5. スピン-格子緩和 一般論

古典的なBPP理論は  $\omega_t \geq \omega_0$  の場合には成立しなくなり、Haupt理論(1971年)やそれを拡張したZweersとBromの理論(1977年)によって置き換えられる。その要点は、フォノンがひき起こす回転準位間の遷移が  $H_d$  を変調し、スピン-格子緩和を誘起することである。このとき、スピン-格子緩和時間  $T_1$  は次のように表わされる： $T_1^{-1} = T_1^{-1}{}_{intra} + T_1^{-1}{}_{inter}$

$$T_1^{-1}{}_{intra} = \frac{9}{40} \frac{\Gamma^2}{k^2} \sum_{g=\pm 1, \pm 2} \frac{g^2 \tau_c}{1 + (\omega_0 + g\omega_t)^2 \tau_c^2}$$

$$T_1^{-1}{}_{inter} = \frac{2}{3} \gamma^2 \Delta M_2 \sum_{g=1,2}^{inter} \frac{g^2 \tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2}$$

$$\tau_c^{-1} = \tau_H^{-1} + \tau_L^{-1}, \quad \tau_H = \tau_{H_0} \exp(E_H/RT)$$

$\tau_L = \tau_{L_0} \exp(E_L/RT)$ 。ここで  $E_H$  はポテンシャルの山を跳び越えるときの活性化エネルギー、 $E_L$  は回転振動基底状態 ( $v=0$ ) と第一励起状態の間のエネルギー差に対応する。

実験例

図6にヨウ化メチルについて  $13.7 \sim 206.7$  K で測定した結果を示した。 $T_{1min}$  の高温側より  $E_H = 2.8$  kcal/mol、低温側より  $E_L = 1.1$  kcal/mol を得た。この

メチル回転は図1(a)において  $V_3 = 50$  B にあたり、 $\omega_t = 1.5$  GHz を得た。

実測の  $T_1$  は本質的には上のモデルでよく説明できる。即ち、メチル回転は低温でのトンネル回転から高温でのホッピング回転へ移行すると考えられる。

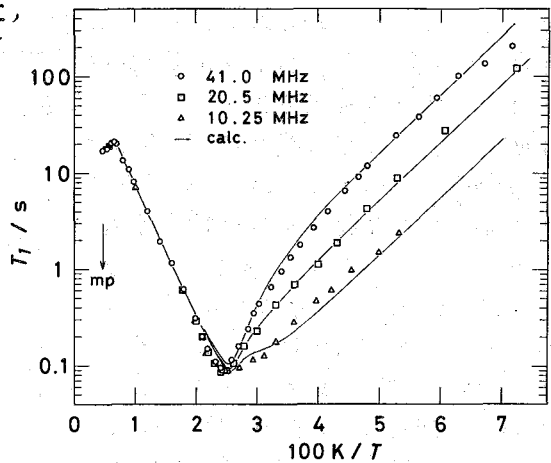


Fig.5 Temperature and frequency dependences of proton spin-lattice relaxation time,  $T_1$ , of solid  $CH_3I$ . Solid lines were calculated.

§6. 力学的にコヒーレントなメチル回転 一般論 束縛ポテンシャルの小さい物質では、高温になるとメチル基は大きい角運動量Jをもつ状態を占めるようになる。

Jの相関関数は  $\langle J(0)J(t) \rangle = \langle J^2 \rangle \exp[-\Delta^2 \tau_c \{t - \tau_c(1 - e^{-t/\tau_c})\}]$  与えられる： $\langle J^2 \rangle = I_r kT$ ,  $\Delta^2 = kT/I_r$ ,  $\tau_c$  は J の寿命。トルクの大きさ  $\Delta$  に比べて  $\tau_c$  が大きい ( $\Delta \tau_c \gg 1$ ) と、 $\langle J(0)J(t) \rangle = \langle J^2 \rangle \exp[-\frac{\Delta^2}{2} t^2]$  となり、メチル回転は力学的コヒーレンスをもつ。

スピン-格子緩和 温度が十分に高くなると、 $H_d$  に代って、スピン-回転相互作用  $H_{SR}$  が緩和機構となる： $H_{SR} = C_{SR} I_z J$ 。ここで、 $I_z$ , J は共にメチル回転軸を Z 軸とする座標系で表わしたものである。静磁場も Z 軸とする座標系で核磁化  $\langle I_z^2 \rangle$  は、2次摂動の範囲で、単一の時定数  $T_1$  で変化する： $T_1^{-1} = C_{SR}^2 (1 + \cos^2 \theta) \frac{\langle I_z^2 \rangle}{\Delta^2} \times \langle J^2 \rangle \exp(-\omega^2/2\Delta^2)$

$\theta$  はメチル回転軸と  $H_0$  のなす角。100 K では  $\Delta \sim 10^{12}$  Hz  $\gg \omega$ 。だから、 $T_1^{-1} = C_{SR}^2 (1 + \cos^2 \theta) \times \sqrt{\pi} I_r^{3/2} (kT)^{1/2}$ 。即ち、緩和速度  $T_1^{-1}$  は絶対温度の平方根に比例し、 $\omega$  には依存しない。

実験例

ヨウ化メチルの  $T > 140$  K における  $T_1$  (図6)

および Allen と Branson (1978年) が測定した酢酸リチウム二重水化物の  $T > 20$  K における  $T_1$  (図7) は上に述べた温度並に周波数特性をもっている。それらの温度領域でメチル基は力学的コヒーレンスをもって回転していると言てよいであろう。

§7. まとめ 以上に述べたメチル基の回転とスピン緩和の特徴をまとめる以下の表 I のようになる。

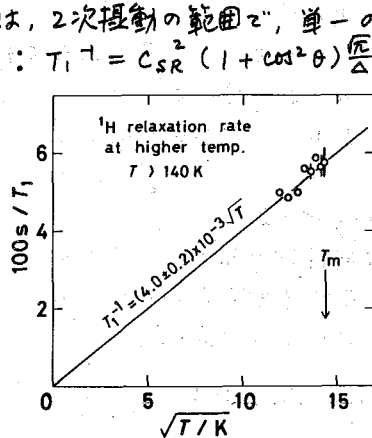


Fig.6 Proton spin-lattice relaxation rate in solid  $CH_3I$ .

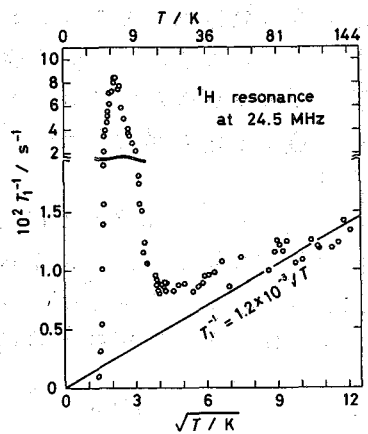


Fig.7 Proton spin-lattice relaxation rate in solid  $CH_3COOLi \cdot 2D_2O$  measured by P.S.Allen and P.Branson(1978).

Table I. Pictures of Methyl Rotation — Low Barrier Case —

Temperature	Low	Medium	High
Picture	Tunneling Rotation	Hopping Rotation	Nearly-free Rotation with Dynamic Coherence
Characteristic Time-constant	life time of a tunneling state	residence time at a valley	life time of a rotational state
Time-correlation Function	$\exp(-t/\tau_T)$	$\exp(-t/\tau_R)$	$\exp(-\frac{\Delta^2}{2} t^2)$ with $\Delta^2 = kT/I_r$ , $\Delta \tau_c \gg 1$
Spectral Density	Debye	Debye	Gaussian

# 19. 複素結合-結合分極率の複素積分表示

明治薬大 溝口則幸

芳香族化合物のプロトンのNMRケミカルシフトは外部磁場により誘導されたπ電子の骨格に沿った流れ、環電流により説明することができる。<sup>1)</sup> この環電流のヒュッケル近似にもとづく理論は、London近似<sup>2)</sup>を用いてMcWeeny<sup>3)</sup>とPople<sup>4)</sup>により完成された。先に我々は前者の理論の基礎である複素結合-結合分極率と結合次数の間の5つの一般的関係を証明し<sup>5)</sup>、それらを用いてこの理論における環電流が電流保存則を満たすことを証明した。<sup>6)</sup>

ところでヒュッケル分子軌道法における多くの量(結合次数<sup>7)</sup>、局在化エネルギー<sup>8)</sup>等)が複素積分表示され、その有用性が指摘されてきた。ここでは複素結合-結合分極率を複素積分表示し、これを用いて共役化合物における環電流の性質を議論する。

## 1 London近似とMcWeeny理論

分子面に垂直に、一様な外部磁場Hが作用している平面共役化合物を考える。Londonはいわゆるゲージ不変な原子軌道を基底に用い、分子軌道をLCAO近似し、磁場下の共鳴積分 $\beta_{rs}$ を次のように近似した。<sup>2)</sup>

$$\beta_{rs} = \beta \exp(i\alpha S_{rs} \cdot H) \quad (1)$$

ここで $\beta$ は磁場がない時の共鳴積分であり、 $\alpha$ は微細構造定数であり、

$$S_{rs} = (A_r - A_s) \cdot (R_r + R_s) / (2H) \quad (2)$$

で与えられる $S_{rs}$ は原点と結合 $r-s$ がつくる三角形の面積であり符号を持つ。ベクターポテンシャルAは $A = (H \times r) / 2$ で与えられる。

McWeenyは差 $\beta_{rs} - \beta$ を磁場Hによる摂動とみなしπ電子のエネルギー変化 $\Delta E_J$ を次のように求めた。<sup>3)</sup>

$$\Delta E_J = -\beta \alpha^2 \left\{ \sum_{(rs)} P_{J,rs} S_{rs}^2 + \sum_{(rs)(tu)} \beta \bar{\pi}_{J,(rs)(tu)} S_{rs} \cdot S_{tu} \right\} H^2 \quad (3)$$

ここで $\sum_{(rs)}$ はすべての結合に対して和をとる。 $P_{J,rs}$ はクールソンの部分結合次数、 $\bar{\pi}_{J,(rs)(tu)}$ は部分複素結合-結合分極率であり

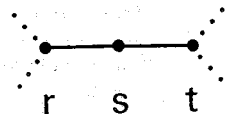
$$\bar{\pi}_{J,(rs)(tu)} = \sum_{k(\neq J)} \frac{(C_{rT} C_{sk} - C_{sT} C_{rk}) (C_{tk} C_{uj} - C_{uj} C_{tk})}{\epsilon_T - \epsilon_k} \quad (4)$$

で与えられる。ここで $C_{rT}, \epsilon_T$ はそれぞれ無摂動系の分子軌道Tの原子rの係数エネルギーである。 $P_{J,rs}$ と $\bar{\pi}_{J,(rs)(tu)}$ の間に次の5つの式が成立する。<sup>5)</sup>

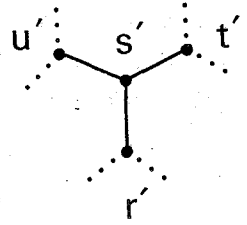
A  $\bar{\pi}_{J,(vw)(rs)} = \bar{\pi}_{J,(vw)(st)}$

B  $P_{J,rs} + \beta \bar{\pi}_{J,(rs)(rs)} = P_{J,st} + \beta \bar{\pi}_{J,(st)(st)}$

みぞぐちのりゆき



$$\begin{aligned}
 C \quad P_{J,rs} &= \beta \bar{\pi}_{J,(rs)}(s^*) - \beta \bar{\pi}_{J,(rs)}(rs) \\
 D \quad \bar{\pi}_{J,(vw)}(r's') &= \bar{\pi}_{J,(vw)}(s's') + \bar{\pi}_{J,(vw)}(s'u') \\
 E \quad P_{J,r's'} &= \beta \bar{\pi}_{J,(r's)}(s's') + \beta \bar{\pi}_{J,(r's)}(u's') \\
 &\quad - \beta \bar{\pi}_{J,(r's)}(r's')
 \end{aligned}$$



ここで結合  $V-W$  は、AとDにおいて  $\bar{\pi}_{J,(rs)}(vw)$  等が相互的である限り任意である。これらの式を用いると、形式的に磁場の影響を各環につき一つの結合に集約でき、 $SE_J$  は

$$SE_J = -\beta \alpha^2 \left\{ \sum_i (P_{J,r_i s_i} + \beta \bar{\pi}_{J,(r_i s_i)}(r_i s_i)) S_{R_i}^2 + 2 \sum_i \sum_j \beta \bar{\pi}_{J,(r_i s_i)}(r_j s_j) S_{R_i} S_{R_j} \right\} H^2 \quad (5)$$

と書き直おせる。ここで結合  $r_i-s_i$  は環  $R_i$  の任意の周辺結合であり、 $\sum_i$  は分子内のすべての環につき和をとる。 $S_{R_i}$  は環  $R_i$  の符号を携った面積である。

(5)式より環  $R_i$  の環電流  $J_{R_i}$  は、 $\beta \alpha^2 H$  を単位として

$$J_{T,R_i} = (P_{J,r_i s_i} + \beta \bar{\pi}_{J,(r_i s_i)}(r_i s_i)) S_{R_i} + \sum_{j(i \neq j)} \beta \bar{\pi}_{J,(r_j s_j)}(r_j s_j) S_{R_j} \quad (6)$$

で与えられる。この式は Mallion<sup>9)</sup> が McWeeny のユニタリ変換を用いて導出した式と同じである。 $J_{T,R_i}$  は関係 A-D を用いて電流保存則をみたすことを証明できる<sup>6)</sup>

## 2 Pople の理論とグラフ理論的定式化

Pople<sup>4)</sup> は London 近似(1)を用いて磁場  $H$  の下における共役化合物  $\mathcal{G}$  のヒュッケル特性多項式  $P_{\mathcal{G}}(X, H)$  から環電流を定式化した。さらに Aihara はそれをグラフ理論的に考察し環電流の由来を明らかにした<sup>10)</sup>。以後  $\mathcal{G}$  は考えている分子の骨格の形状を表わすグラフとする。 $P_{\mathcal{G}}(X, H)$  は次式で与えられる。

$$P_{\mathcal{G}}(X, H) = |\omega_{rs} - X S_{rs}| = \sum_{n=0}^N a_n(\mathcal{G}, H) X^{N-n} \quad (7)$$

ここで、 $\omega_{rs} = \exp(i\alpha S_{rs} H)$  であり、 $N$  は  $\mathcal{G}$  の頂点(炭素原子)の数である。係数  $a_n(\mathcal{G}, H)$  は Sachs グラフを用いると<sup>11)</sup>

$$a_n(\mathcal{G}, H) = (-1)^N \sum_{s \in S_n} (-1)^{n(s)} \prod_C [2 \cos(\alpha H S_C)] \quad (8)$$

と書ける。ここで  $n(s)$  は Sachs グラフ  $s$  の成分の数、 $C$  は Sachs グラフ内すべてのサイクルについて和をとる。 $S_C$  はサイクル  $C$  の面積である。 $\cos(\alpha H S_C)$  を展開し、まとめると

$$P_{\mathcal{G}}(X, H) \doteq P_{\mathcal{G}}(X, 0) + \alpha^2 H^2 \sum_j P_{\mathcal{G} \ominus C_j}(X, 0) S_{C_j}^2 \quad (9)$$

が得られる。ここで  $\mathcal{G} \ominus C_j$  は  $\mathcal{G}$  からサイクル  $C_j$  とそれに連結するすべての結合を除いたグラフを表わす。 $P_{\mathcal{G}}(X, H) = 0$  の根  $X$  はニュートン法を用いると

$$X = X^0 - \alpha^2 H^2 \sum_j (P_{\mathcal{G} \ominus C_j}(X^0, 0) / P'_{\mathcal{G}}(X^0, 0)) S_{C_j}^2 \quad (10)$$

ここで  $X^0$  は  $P_G(X, 0) = 0$  の根であり、縮退してはいないものとする。 $\sum_j$  はグラフ  $G$  内のすべてのサイクルについて和をとり、 $P'_G(X, 0) = \frac{d}{dX} P_G(X, 0)$  である。(10)式より磁化率  $\chi$  は各サイクルに対する  $\chi_{C_j}$  の和として次のように書ける。<sup>10)</sup>

$$\chi = \sum_j \chi_{C_j} \quad (11)$$

$$\chi_{C_j} = 2\beta\alpha^2 \sum_j \lambda_j (P_{G \ominus C_j}(X_j^0, 0) / P'_G(X_j^0, 0)) S_{C_j}^2 \quad (12)$$

### 3 複素結合-結合分極率の複素積分表示

(10)式の  $S_C$  を  $S_{R_i}$  の和で表わし、(5)式の  $S_{R_i}$  の係数を比較すると

$$P_{T,rs} + \beta \bar{\pi}_{T,(rs)(rs)} = \sum_j^{e_{rs} C_j} P_{G \ominus C_j}(X_j^0, 0) / P'_G(X_j^0, 0) \quad (13)$$

$$\beta \bar{\pi}_{T,(rs)(tu)} = (-1)^n \sum_j^{e_{rs}, e_{tu} C_j} P_{G \ominus C_j}(X_j^0, 0) / P'_G(X_j^0, 0) \quad (14)$$

が得られる。 $\sum_j^{e_{rs} C_j}$  と  $\sum_j^{e_{rs}, e_{tu} C_j}$  はそれぞれ結合 (edge)  $r-s$  を含むサイクル、結合  $r-s$  と  $t-u$  を共に含むすべてのサイクルについて和をとる。 $n$  は  $r \rightarrow s, t \rightarrow u$  が考えているサイクルにおいて同一方向である時には 0、そうでない時は 1 である。

さらに糸矢によれば、 $P_{T,rs}$  は次のように書ける。<sup>12)</sup>

$$P_{T,rs} = (P_{G \ominus e_{rs}}(X_j^0, 0) + \sum_j^{e_{rs} C_j} P_{G \ominus C_j}(X_j^0, 0)) / P'_G(X_j^0, 0) \quad (15)$$

上式を用いると、部分複素自己結合-結合分極率  $\bar{\pi}_{T,(rs)(rs)}$  は次のように書ける。

$$\beta \bar{\pi}_{T,(rs)(rs)} = - P_{G \ominus e_{rs}}(X_j^0, 0) / P'_G(X_j^0, 0) \quad (16)$$

Coulson と Longuet-Higgins の手続を用いると、閉殻分子に対しては、

$$P_{rs} + \beta \bar{\pi}(rs)(rs) = - \frac{1}{i\pi} \oint_{\gamma} \left( \sum_j^{e_{rs} C_j} P_{G \ominus C_j}(z, 0) / P_G(z, 0) \right) dz \quad (17)$$

$$\beta \bar{\pi}(rs)(tu) = - \frac{1}{i\pi} (-1)^n \oint_{\gamma} \left( \sum_j^{e_{rs}, e_{tu} C_j} P_{G \ominus C_j}(z, 0) / P_G(z, 0) \right) dz \quad (17')$$

$$\beta \bar{\pi}(rs)(rs) = \frac{1}{i\pi} \oint_{\gamma} \left( P_{G \ominus e_{rs}}(z, 0) / P_G(z, 0) \right) dz \quad (19)$$

が得られる。ここで積分路  $\gamma$  は虚数軸に沿って  $\infty i$  から  $-\infty i$  までと虚数軸の右半面における無限大の半径を持つ半円である。これらの式は次のように書ける。

$$P_{rs} + \beta \bar{\pi}(rs)(rs) = \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \left( \sum_j^{e_{rs} C_j} P_{G \ominus C_j}(iy, 0) / P_G(iy, 0) \right) dy \quad (20)$$

$$\beta \bar{\pi}(rs)(tu) = \frac{(-1)^n}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \left( \sum_j^{e_{rs}, e_{tu} C_j} P_{G \ominus C_j}(iy, 0) / P_G(iy, 0) \right) dy \quad (21)$$

$$\beta \bar{\pi}(rs)(rs) = - \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \left( P_{G \ominus e_{rs}}(iy, 0) / P_G(iy, 0) \right) dy \quad (22)$$

### 4 交互炭化水素における環電流

以後は奇数員環を含まない交互炭化水素  $G$  のみを考える。  $b_{2n}(G) = (-1)^{nrn} a_{2n}(G)$



で与えられる  $b_{2n}(G)$  を係数に持つ多項式  $Q_G(X)$  を次のように定義する。

$$Q_G(X) = \sum_{n=0}^{\lfloor N/2 \rfloor} b_{2n}(G) X^{N-2n} \quad (23)$$

すべての  $n$  に対して  $b_{2n}(G)$  は正である。<sup>13)</sup> この  $Q_G(X)$  を用いると  $P_G(\lambda, X)$  は

$$P_G(\lambda, X) = (\lambda)^N Q_G(X) \quad (24)$$

と書ける。この関係を用い、 $Q_{G \ominus e_{rs}}(X)/Q_G(X)$  及び  $Q_{G \ominus C_j}(X)/Q_G(X)$  は  $X$  の偶関数であることを用いると、(20)-(22)式は次のように書ける。

$$P_{rs} + \beta \bar{\pi}(rs)(rs) = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \left\{ \left( \sum_j^{c_{rs} c_j} Q_{G \ominus C_j}(y) - \sum_j^{c_{rs} c_j'} Q_{G \ominus C_j'}(y) \right) / Q_G(y) \right\} dy \quad (25)$$

$$\beta \bar{\pi}(rs)(\lambda u) = \frac{2(-1)^n}{\pi} \int_0^{\infty} \left\{ \left( \sum_j^{c_{rs} c_j} Q_{G \ominus C_j}(y) - \sum_j^{c_{rs} c_j'} Q_{G \ominus C_j'}(y) \right) / Q_G(y) \right\} dy \quad (26)$$

$$\beta \bar{\pi}(rs)(rs) = -\frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} (Q_{G \ominus e_{rs}}(y) / Q_G(y)) dy \quad (27)$$

ここで  $C_j$  をその頂点(炭素原子)の数が  $4n+2$  のものと  $4n$  のものに分けた。 $\sum_j$  及び  $\sum_j'$  はそれぞれ前者のサイクルの和、後者のサイクルの和を意味する。(25) 及び (26) 式において  $(4n+2)$ -サイクルは正(反磁性的)に、 $(4n)$ -サイクルは負(常磁性的)に作用することがわかる。また(27)式から  $\beta \bar{\pi}(rs)(rs) < 0$  であることがわかる。<sup>5)</sup>

それゆえ次の重要な結論が得られる。

(A) すべての  $C_j$  の頂点の数が  $4n+2$  のみのものである。カク縮合芳香族化合物などの各環の環電流  $J_{C_j}$  はすべて反磁性的である。

(B) 式(2)における  $\chi_{C_j}$  は  $C_j$  の頂点の数が  $4n+2$  であれば反磁性、 $4n$  であれば常磁性である。

#### 文献

- 1) L. Pauling, J. Chem. Phys., 4, 673 (1936).
- 2) F. London, J. Phys. Rad., 8, 397 (1937).
- 3) R. McWeeny, Mol. Phys., 1, 311 (1958).
- 4) J. A. Pople, Mol. Phys., 1, 175 (1958).
- 5) N. Mizoguchi, Bull. Chem. Soc. Jpn., 56, 1588 (1983).
- 6) 溝口, 日本化学会第48秋季年会予編集(3C11).
- 7) C. A. Coulson and H. C. Longuet-Higgins, Proc. Roy. Soc. (London) A191, 39 (1947); A192, 16 (1947).
- 8) K. Fukui, T. Yonezawa and C. Nagata, J. Chem. Phys., J. Chem. Phys., 1, 550 (64).
- 9) R. B. Mallion, Proc. Roy. Soc. (London) A341, 429 (1975).
- 10) J. Aihara, J. Am. Chem. Soc., 101, 558 (1979).
- 11) H. Sachs, Publ. Math. (Debrecen) 11, 119 (1964).
- 12) H. Hosoya and K. Hosoi, J. Chem. Phys., 64, 1065 (1976).
- 13) 溝口, 1983, 分子構造総合討論会要旨集 2D13

20. ポリペプチド, 蛋白質の<sup>13</sup>C CP-MAS NMRスペクトル. コンホメーション依存性シフトの理論的意義  
 (東工大, 国立がんセンター研<sup>†</sup>, 群馬大工短<sup>‡</sup>)  
 安藤 勲, 山延 健, 斎藤 肇<sup>†</sup>, 多部田 涼子<sup>†</sup>, 庄司 顕<sup>‡</sup>, 尾崎 拓男<sup>‡</sup>

最近, 固体高分解能NMRが開発され, 固体ペプチド, 蛋白質の<sup>13</sup>C NMRの観測が可能となった。固体状態ではポリペプチド, 蛋白質のコンホメーションは固定されているために, 測定した<sup>13</sup>C化学シフトは直接そのコンホメーションに関連している。我々はすでにいくつかのポリペプチド, 蛋白質の固体高分解能スペクトルを測定し $\alpha$ -ヘリックス,  $\omega$ -ヘリックス,  $\beta$ -シート特有の<sup>13</sup>C化学シフトを見出し, シフト値からコンホメーションに関する知見を得ることに可能であることを示した。<sup>1)</sup> このような化学シフトの挙動はポリペプチド, 蛋白質の電子構造を通してコンホメーションに関連すると考えられ, それらの関連性の起因を明らかにするには量子化学的アプローチが有用になる。本研究はそのような量子化学的アプローチを確立しポリペプチド, 蛋白質のコンホメーション依存性<sup>13</sup>C化学シフトの起因を解明し, このアプローチをいくつかのポリペプチドに適用し, その有用性を議論する。

<研究方法>

ポリペプチドの電子構造を評価し, それに基づいて<sup>13</sup>C化学シフトを計算する量子化学的アプローチとして2通りある。

アプローチ(i): ポリペプチドの局所的構造のモデルとなる2量体, 3量体などのモデル化合物を用い, それについて量子化学的計算を行う方法である。取極少電子数がそれほど大きくなるために厳密な量子化学的計算が容易である。しかし,  $\alpha$ -ヘリックスなどのような水素結合を直接考慮することはできないので, その寄与が<sup>13</sup>C化学シフトに大きいとき(例えば, カルボニル, C $\alpha$ 炭素), その寄与を考慮できるように $\alpha$ 2の分子とモデル化合物が水素結合しているモデルを考える必要がある。(本研究では $\alpha$ 2の分子としてホルムアルデヒドを用いた。)炭素核の化学シフト $\sigma$ は反磁性項 $\sigma_d$ と常磁性項 $\sigma_p$ の和として評価される。アプローチ(i)では, 数多くの化合物の<sup>13</sup>C化学シフトを合理的に評価する finite perturbation theory (FPT)-INDO法を用いた。<sup>2)</sup> FPT-INDO法によると核Aの $\sigma_d^A$ と $\sigma_p^A$ は次式で表わせる。

$$\sigma_d^A = \frac{1}{3} \frac{e^2}{2mc} \sum_{\beta} \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu}(0) \langle x_{\nu} | \frac{r_{\nu} r_A - r_{\nu\alpha} r_{A\alpha}}{|r_A^3|} | x_{\nu} \rangle$$

$$\sigma_p^A = -\frac{1}{3} \frac{eh}{mc} i \sum_{\mu} \sum_{\nu} \left( \frac{\partial P_{\mu\nu}(H_{\alpha})}{\partial H_{\alpha}} \right)_{H=0}$$

$$\times \sum_{\beta} \langle x_{\mu} | \frac{r_{\mu\nu}}{|r_A^3|} | x_{\nu} \rangle$$

( $\alpha, \beta = x, y, z$ )

ここで,  $r_{\nu}$ はAO $x_{\nu}$ と電子の距離,  $r_A$ は核Aと電子の距離である。  $P_{\mu\nu}(H_{\alpha})$ は磁場がかかっているときの密度行列の要素であり,  $P_{\mu\nu}(0)$ は磁場がかかっていないときの要素である。他の記号はよく知られている意味をもつ定数である。これら

の項はINDO近似レベルで計算される。以上の手順により、ポリペプチドのコンホメーションを決めるアミノ酸残基の二面体角(φ, ψ)の関数として<sup>13</sup>C化学シフトを評価し、<sup>13</sup>C化学シフトのマッピングを作成することによりコンホメーション依存化学シフトを議論する。

アプローチ(ii) : モデル化合物を用いず、ポリペプチド鎖そのものの電子構造を評価し、それに基づいて量子化学的計算を行う方法である。この方法を用いればα-ヘリックスなどのような水素結合を直接考慮することが出来る。固体物理でよく用いられているバンド理論を応用したTight-binding MOを用いて導いた化学シフトの理論により無限長の構造に規則性のあるポリペプチドの<sup>13</sup>C化学シフトの計算を行う。Tight-binding 近似においてはポリペプチド鎖中の電子の波動関数は次の様に表わせる。

$$\psi_n(k, r) = \frac{1}{N} \sum_{\nu} \sum_j \exp(ikj) C_{\nu n}(k) \phi_{\nu}(r - ja)$$

ここでkは波数、νはアミノ酸残基内のν番目の軌道、jはj番目のアミノ酸残基、nはn番目のバンド、Nはアミノ酸残基数、C<sub>νn</sub>はn番目のバンドのν番目の軌道係数、φ<sub>ν</sub>(r - ja)はj番目のアミノ酸残基内のν番目の波動関数を示している。この波動関数を用いて、sum-over-state法による化学シフトの理論を展開し、これに基づいて<sup>13</sup>C化学シフトの計算を行うコンホメーション依存化学シフトを議論する。このアプローチでは振動ヘルフェル近似レベルで計算を行った。<sup>3)</sup>

計算は分子科学研究所及び東京工業大学のM200HとM280コンピュータを用いて行った。

〈 結果及び考察 〉

アプローチ(i) モデル化合物としてN-アセチル-N'-メチル-L-アラニンアミドの1分子(モデルI)(Fig.1)及び2分子のホルムアルヒドをN-アセチル-N'-メチル-L-アラニンアミドに水素結合させたモデルIIを用いた。Fig.2にモデルIのFPT-INDOによるC<sub>β</sub>炭素の<sup>13</sup>C化学シフトの計算値をφ-ψマップにしたものを示した。ここで示した値はαヘリックス数なので負の値が大きいほど化学シフトは低磁場になることを意味している。α-ヘリックス及

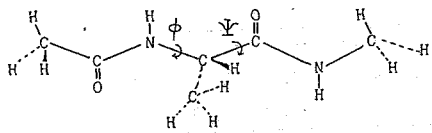


Fig. 1 The molecular structure of N-acetyl-N'-methyl-L-alanine amide (φ = ψ = 180°)

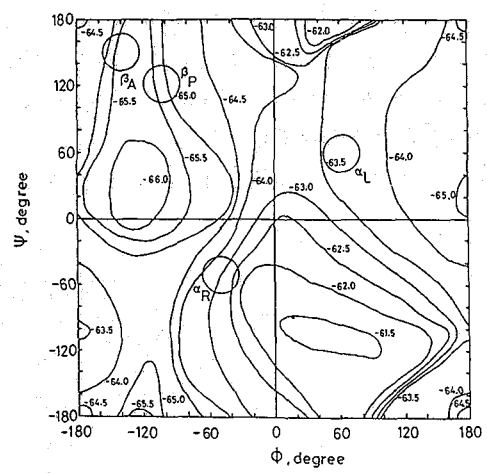


Fig. 2 <sup>13</sup>C chemical shift map for C<sub>β</sub> carbon in N-acetyl-N'-methyl-L-alanine amide. The methyl end groups were held as shown in Fig. 1. The chemical shifts were calculated at 15° intervals in φ and ψ (in ppm). β<sub>A</sub>: antiparallel β-sheet, β<sub>P</sub>: parallel β-sheet, α<sub>R</sub>: right-handed α-helix, α<sub>L</sub>: left-handed α-helix.

Table 1 <sup>13</sup>C chemical shifts of alanine-peptides characteristic of α-helix, β-sheet and random coil forms ( in ppm )

	Observed <sup>a)</sup> (Poly(L-alanine))			Model	Calculated <sup>b)</sup>				
	α-helix	β-sheet	random coil <sup>c)</sup>		α-helix		β-sheet		random coil
					α <sub>R</sub>	α <sub>L</sub>	β <sub>A</sub>	β <sub>P</sub>	
C <sub>β</sub>	14.9	19.9	15.7	I	-63.0	-63.7	-65.6	-65.3	-64.3
				II	-63.1	-63.6	-64.7	-65.4	-63.2 <sup>d)</sup>
C <sub>α</sub>	52.4	48.2	51.1	I	-88.5	-88.1	-89.2	-88.2	-87.7
				II	-87.8	-86.4	-86.2	-85.5	-86.9 <sup>d)</sup>
CO	176.4	171.8	176.1	I	-184.2	-182.2	-185.7	-185.1	-185.2
				II	-183.1	-181.7	-181.0	-185.6	-182.3 <sup>d)</sup>

a) from TMS. ref. 1b

b) shielding constant for N-acetyl-N-methyl-L-alanine amide

c) in CF<sub>3</sub>COOD solution

d) averaged over α<sub>R</sub>, α<sub>L</sub>, β<sub>A</sub> and β<sub>P</sub> forms

β-シートの領域を丸でかこんで示した。詳しい数値を Table 1 に示した。実測値とよく一致していることがわかる。C<sub>α</sub>, CO は実測と一致していない。水素結合を考慮したモデル II の結果を同じ表に示した。すべての炭素の計算値は実測値とよく一致している。また、C<sub>β</sub> は水素結合の影響を殆んど受けないことがわかる。ランダムコイルに対応した化学シフトの実測を Table 1 に示した。シフト値は α-ヘリックスと β-シートの値の中間にあることがわかる。計算を同じ表に示したが実測値とよく一致している。(計算値は INDO 法で計算したコンホメーションエネルギーを用いて種々のコンホメーションについて平均したものである。) 以上のように計算は実測の傾向をよく再現しており、このことからポリ(L-アラニン)で観測した化学シフトがコンホメーション依存化学シフトであることを理論的に裏付けていることを示している。Fig. 2 の化学シフトマップの応用については 55 で斎藤が報告する。)

アプローチ(ii) I, II 構造をとったポリグリシン及び α-ヘリックス, β-シートをとったポリ(L-アラニン)の観測した固体<sup>13</sup>C 化学シフトとアプローチ(ii)により計算した化学シフトの値を Table 2 に示した。計算値は 4π 定数である。計算の傾向は実測の傾向とよく一致している。次に、右巻, 左巻 α-ヘリックス, ω-ヘリックス, β-シートの構造をとるポリ(β-ベンジル-L-アスパルテート)について調べてみ

Table 2 Observed and calculated <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of solid polyglycine and poly(L-alanine) ( in ppm )

	Polyglycine				Poly(L-alanine)			
	obs. <sup>a)</sup>		calc.		obs. <sup>a)</sup>		calc.	
	I	II	I	II	α	β	α	β
C <sub>α</sub>	43.5	43.5	-127.2	-124.4	C <sub>β</sub> 14.9	19.9	-94.8	-98.3
CO	168.4	172.3	-236.7	-248.1	C <sub>α</sub> 52.4	48.2	-151.5	-143.0
					CO 176.4	171.8	-278.1	-245.8

a) from TMS

Table 3 Observed and calculated  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of solid poly( $\beta$ -benzyl-L-aspartate)

	$\delta_{\text{obs.}}^{(a)}$				$\sigma_{\text{calc.}}^{(b)}$			
	$\alpha_{\text{R}}$	$\alpha_{\text{L}}$	$\omega$	$\beta$	$\alpha_{\text{R}}^{c(1)}$	$\alpha_{\text{L}}^{c(2)}$	$\text{I}^{c(3)}$	$\text{II}^{c(4)}$
$\text{C}_{\alpha}$	53.4	50.9	50.5	49.2	-215.6	-199.5	-202.3	-215.0
$\text{C}_{\beta}$	33.8	33.8	32.9	38.2	-134.3	-122.4	-125.4	-121.2
CO(amide)	174.9	171.1	171.3	169.6	-293.0	-283.3	-243.5	-284.1

a) from TMS. The positive sign means deshielding.

b) shielding constant. The negative sign means deshielding.

c) ( $\phi, \psi$ ) 1(-56.4°, -50.3°); 2(50.3°, 56.4°); 3(63.6°, 62.9°);

4(58.6°, 57.9°)

よう。Table 3に実測値と計算値を示した。計算に用いた(中, 正)の値及び側鎖のコンホメーションについてはMcGuire<sup>5)</sup>の半経験的ポテンシャルエネルギー計算から決定したものを採用した。但し、 $\omega$ -ヘリックスの計算については中, 正と $\alpha$ -ヘリックスの(中, 正)の方向に5°ずらした値(II)のものも用いた。 $\omega$ -ヘリックスの計算にIIを用いた結果は実験結果とよく一致していることがわかる。全電子エネルギーはIよりIIが0.725 eV安定であることからIIの構造が妥当であるといえる。右巻と左巻 $\alpha$ -ヘリックスのシフト値を比較すると右巻ヘリックスの方が低磁場に現われ、両者の正則は化学シフトを通してごまかすことを示している。 $\omega$ -ヘリックスにおいてカルボニル炭素の化学シフトがIとIIで著しく差があり、 $\alpha$ -ヘリックスの値と比べてもIの結果は過小評価されたように考えられる。この原因の一つとして水素結合の形成がIでは十分でないことがあげられる。以上の結果からアロロ-4(i)と同様に観測した化学シフトがコンホメーション依存化学シフトであることを理論的に裏付けていることが結論できる。また、Tight-binding MO理論で評価したポリ(アミ)酸の電子構造及び電子状態が妥当なものであると結論できる。

#### References

- 1) a. T. Taki et al., Chem. Lett., 1803(1981); b. H. Saito et al., Macromolecules, 16, 1050(1983); c. H. Saito et al., Chem. Lett., 1437(1983); d. I. Ando, Macromolecules, in press
- 2) I. Ando & G. A. Webb, Theory of NMR Parameter, Academic Press, 1983
- 3) T. Yamanobe, Mol. Phys., in press
- 4) 斎藤 肇ら, 本要旨集 55
- 5) R. H. McGuire et al., Macromolecules, 4, 112(1971)

## 21. $H_3O^+$ 及び $OH^-$ イオンの化学シフトの計算

(北見工大) ○福井洋え, 三浦宏一, 多田富美穂

### I. INTRODUCTION

Thirty years ago, Gutowsky and Saika<sup>1</sup> first observed the nuclear magnetic resonance (NMR) of protons in aqueous solutions containing acids or bases. They observed the single-line proton NMR signals of aqueous solutions, whose positions are different from the signal of pure water. This observation has been interpreted on the basis of rapid proton exchange between water and  $H_3O^+$  or  $OH^-$ . Rapid exchange produces a single line whose position is the weighted average of the positions of the water and ion signals. Important parameters for this work are the chemical shifts of the protons in the hydrolyzed forms, i.e.,  $H_3O^+$  and  $OH^-$ , relative to the proton shift in water. These parameters were determined as the ratio of change of chemical shift to change of acid or base concentration in the limit of zero concentration.

Gutowsky and Saika found that both the hydronium ion and the hydroxide ion have their resonances shifted about 10 ppm to low field from the resonance in pure water. In the twenty years subsequent to the first observation by Gutowsky and Saika, there were several advances in experimental determination of the proton chemical shifts in the  $H_3O^+$  and  $OH^-$  ions.<sup>2-5</sup> Details of these experimental results are given and compared with our calculated shifts later.

Gutowsky and Saika tried to explain in their paper only the low field shift of  $H_3O^+$  ion. They suggested that  $H_3O^+$  should have a shift equal to one-third of the shift for a bare proton whose shift was found to be about -30 ppm. However, this explanation would predict a shift of opposite sign for the  $OH^-$  ion. Eight years after the work of Gutowsky and Saika, another explanation was proposed by Musher.<sup>6</sup> Musher started from the assumption that in  $H_3O^+$  and  $OH^-$  ions, the lack or excess of electron charge relative to water should be located at the oxygen atom. In this model,  $H_3O^+$  and  $OH^-$  protons are reduced to the protons of the hydrogen atoms suffering the electrostatic field produced by a point charge at the oxygen atom. The hydrogen atom chemical shift in this case is always moved downfield owing to the electrostatic field and the direction of the shielding change is independent of the sign of the point charge. With this assumption Musher explained the observed shifts for both

ふくい ひろゆき, みうら こういち, ただ ふみお

$\text{H}_3\text{O}^+$  and  $\text{OH}^-$  ions, without considering covalent character in oxygen-hydrogen chemical bonds.

After the work by Musher, calculations of the chemical shift of hydronium ion or hydroxyl ion are quite scarce. To our knowledge, there is just one calculation of the hydroxyl ion shielding by Grahn<sup>7</sup>. Using a simple molecular orbital wave function Grahn obtained an upfield shift of 7 ppm for the free  $\text{OH}^-$  proton relative to the free water protons. Surprisingly, we cannot find any experimental or theoretical study of hydronium or hydroxyl ion shifts in the last ten years. In view of the importance of this study we have therefore performed *ab initio* molecular orbital calculations of the chemical shifts of hydronium and hydroxyl ions. We report the calculated results for the proton and oxygen chemical shifts in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ , and  $\text{OH}^-$ .

## II. CALCULATED RESULTS AND DISCUSSION

We have used two methods for the calculation of the chemical shifts; the coupled Hartree-Fock (CHF) method<sup>8</sup> and the self-consistent-field configuration-interaction (SCF-CI) method.<sup>9</sup>

Using these computational schemes we have calculated the chemical shifts for the hydrogens and the oxygens in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ , and  $\text{OH}^-$ . In these calculations we have used the 4-31G<sup>10</sup> and <5,3/3><sup>11</sup> basis sets for the CHF method and the 4-31G set for the SCF-CI method. For the  $\text{H}_2\text{O}$  molecular geometry we have used the experimental bond length and bond angle,<sup>12</sup> i.e.,  $r_{\text{OH}}=0.957 \text{ \AA}$  and  $\angle\text{HOH}=104.5^\circ$ . For the  $\text{H}_3\text{O}^+$  ion, the equilibrium geometrical structure calculated by Diercksen *et al.*<sup>13</sup> was used, i.e.,  $r_{\text{OH}}=0.972 \text{ \AA}$  and  $\angle\text{HOH}=111.6^\circ$ . For the  $\text{OH}^-$  ion an experimental bond length,<sup>14</sup>  $r_{\text{OH}}=0.984 \text{ \AA}$ , was used.

For the calculation of magnetic properties in molecules the choice of the gauge origin is quite a cumbersome problem. Chan and Das<sup>15</sup> preferred the electric centroid (e.c) for the gauge origin. However, for the sake of simplicity we have used the center of mass (c.m.) for the gauge origin. The difference between e.c. and c.m. is small.

In Table I we summarize the theoretical shielding constants,  $\sigma$  of the protons and the oxygens in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ , and  $\text{OH}^-$  with their relative values,  $\Delta\sigma$ , to the  $\text{H}_2\text{O}$  shieldings.  $\Delta\sigma$  is the difference from the shielding of  $\text{H}_2\text{O}$ . Thus defined  $\Delta\sigma$  is compared with the experimental chemical shift measured from the free or gaseous water absorption. However, a comparison with experiments is not easy because complete experimental values for free  $\text{H}_3\text{O}^+$  and  $\text{OH}^-$  ions

shifts are not available. There are two main causes of ambiguity in experimental determination. One of them is the contribution of counter ions to experimental shifts. The other is the shift due to  $\text{H}_3\text{O}^+$ -solvent or  $\text{OH}^-$ -solvent interaction.

Akitt<sup>5</sup> pointed out that earlier values by Gutowsky and Saika is incorrect because the counter ion effect, i.e., an anionic structure-breaking effect is neglected. Akitt has estimated anion effects in acid-water mixtures and obtained -14.4 ppm as the corrected shift of  $\text{H}_3\text{O}^+$  relative to liquid water. This shift corresponds to about -18.5 ppm from free water. Direct measurements of the shift due to  $\text{H}_3\text{O}^+$ -water interaction are not available. Akitt<sup>5</sup> assumed that the chemical shift of free hydronium ion would be 4 ppm upfield of the  $\text{H}_3\text{O}^+$  in water solvent by the loss of  $\text{H}_3\text{O}^+$ - $\text{H}_2\text{O}$  hydrogen bonding. If we were to adopt this assumption, the relative shift of free  $\text{H}_3\text{O}^+$  ion to free  $\text{H}_2\text{O}$  molecule would be -14.5 ppm.

Fortunately, for the  $\text{OH}^-$  chemical shift the direct measurement has been performed by Sheldrick<sup>2,3</sup> who used tetramethylammonium hydroxide dissolved in liquid ammonia solvent. Sheldrick observed that the  $\text{OH}^-$  signal is a sharp line in this system and that its position is shifted by 3 ppm to high field from that of the liquid water signal. This shift corresponds to a downfield shift of 1.8 ppm from water in gas phase. Furthermore, Sheldrick showed that neither the counter ion effect nor the  $\text{OH}^-$ -solvent interaction effect exceeds 0.2 ppm in this system. Therefore, the relative shift of free  $\text{OH}^-$  ion to free water molecule may be -1.8 ppm. Thus estimated experimental proton shifts of  $\text{H}_3\text{O}^+$  and  $\text{OH}^-$  ions are also shown in the last row of Table I. However, there are no studies, to our knowledge, that would allow us to determine the experimental chemical shifts of oxygens in hydronium and hydroxyl ions.

Table I shows that the calculated values for the relative proton shieldings,  $\Delta\sigma(\text{H})$ , are higher than the experimentally determined ones by 6 and 15 ppm's for  $\text{H}_3\text{O}^+$  and  $\text{OH}^-$ , respectively. A large upfield shift of  $\text{OH}^-$  ion was obtained in our theoretical calculations. The theoretical calculations for the oxygen shieldings give us notable results; the  $^{17}\text{O}$  NMR absorption in  $\text{H}_3\text{O}^+$  would be shifted upfield from the water oxygen absorption and the absorption in  $\text{OH}^-$  would be displaced downfield. These results for the direction of the oxygen shielding changes are opposite to the theoretical predictions for the protons.



TABLE I. Calculated and experimental magnetic shielding constants for H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, and OH<sup>-</sup> (ppm).

	Nucleus	H <sub>2</sub> O		H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>		OH <sup>-</sup>	
		σ	σ	Δσ <sup>a</sup>	σ	Δσ <sup>a</sup>	
4-31G CHF	H	29.2	20.5	-8.7	44.5	15.3	
	O	265.5	307.8	42.3	146.6	-118.9	
<5,3/3> CHF	H	28.1	19.8	-8.2	39.3	11.3	
	O	266.2	293.8	27.6	219.4	-46.8	
4-31G SCF-CI	H	29.3	20.7	-8.5	41.4	12.2	
	O	295.8	330.4	34.6	231.1	-64.7	
Experimental	H			-14.5 <sup>b</sup>		-1.8 <sup>c</sup>	

<sup>a</sup> Δσ = σ - σ(H<sub>2</sub>O).

<sup>b</sup> Ref. 5.

<sup>c</sup> Ref. 2.

#### References

1. H. S. Gutowsky and A. Saika, *J. Chem. Phys.* **21**, 1688 (1953).
2. G. M. Sheldrick, *Chem. Commun.* **1966**, 673.
3. G. M. Sheldrick, *Trans. Faraday Soc.* **63**, 1065 (1967).
4. J. W. Akitt, A. K. Covington, J. G. Freeman, and T. H. Lilley, *Trans. Faraday Soc.* **65**, 2701 (1969).
5. J. W. Akitt, *J. Chem. Soc. Dalton* **1973**, 49.
6. J. I. Musher, *J. Chem. Phys.* **35**, 1989 (1961).
7. R. Grahn, *Acta Chem. Scand.* **19**, 153 (1965).
8. R. M. Stevens, R. M. Pitzer, and W. N. Lipscomb, *J. Chem. Phys.* **38**, 550 (1963).
9. H. Fukui, *Int. J. Quantum Chem.* **23**, 633 (1983).
10. R. Ditchfield, W. J. Hehre, and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **54**, 724 (1971).
11. T. H. Dunning, Jr., *J. Chem. Phys.* **53**, 2823 (1970).
12. K. Kuchitsu and Y. Morino, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **38**, 814 (1965).
13. G. H. F. Dierksen, W. P. Kraemer, and B. O. Roos, *Theor. Chim. Acta* **36**, 249 (1975).
14. "Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions" (The Chemical Society, London, 1965).
15. S. I. Chan and T. P. Das, *J. Chem. Phys.* **37**, 1527 (1962).

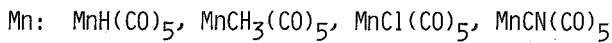
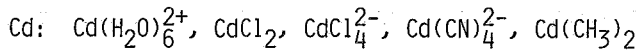
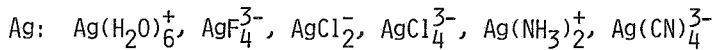
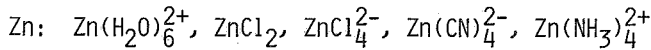
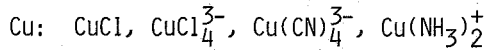
## 22. 金属錯体の金属NMRケミカルシフトに関する理論的研究

(京大 工)

○ 諫田克哉、中辻 博、米澤貞次郎

<序> 近年、金属原子を含む錯体や分子について、その磁性やNMRなど、磁場下での性質に関する実験が行なわれている。これらは、金属を含む化学結合の本質を理解する上で重要な情報を与えるものと期待される。本研究では *ab initio* 分子軌道法の立場からその理解を試みる。Cu, Zn, Ag, Cd, Mnの錯体について報告する。計算した化合物は次のとおりである。

### Molecules



<理論> NMRのケミカルシフトは次式で与えられる。

$$\sigma_{tu} = -\sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu}^{(0)} (H_{A\mu\nu}^{(1,i)})_{tu} - \sum_{\mu\nu} \left\{ \partial/\partial H_u [P_{\mu\nu}^{\text{Im}}(H_u)] \right\}_{H=0} \cdot (H_{A\mu\nu}^{(0,i)})_t \quad t, u = x, y, z \quad (1)$$

ここで  $(H_{A\mu\nu}^{(1,i)})_{tu} = (e^2/4mc^2) \langle \phi_{\mu} | (r_{\mu} \delta_{tu} - r_{\mu}^2 \delta_{\mu\nu}) r_{\mu}^{-3} | \phi_{\nu} \rangle$

$$(H_{A\mu\nu}^{(0,i)})_t = (eh/2mc) \langle \phi_{\mu} | (r_{\mu} \times \nabla)_t r_{\mu}^{-3} | \phi_{\nu} \rangle$$

$P^{(0)}$  は 磁場のない場での電子密度行列、 $P^{\text{Im}}(H_u)$  は 磁場Hをu方向にかけた場での電子密度行列を表す。(1)式の第1項を反磁性項、第2項を常磁性項という。

特に常磁性項は角運動量演算子を含んでいるため、中心原子では *p, d* 軌道の電子、特に *d* 電子が大きくシフトに関係する。そのため他の物性と異なった面から化学結合をとらえられると期待される。

<方法> 計算は *closed-shell RHF* 法を用いた。basis setは中心金属原子に対しては、館脇、藤永による *MIDI-1 set* を用い、さらに2個の1*G*型 *p* 軌道を加えた。他の配位子については、Cu, Zn, Ag, Cdの錯体では

*MIDI-1 set*, Mnの錯体では *MINI-1 set* を用いた。 $P^{\text{Im}}(H_u)$  の計算には、

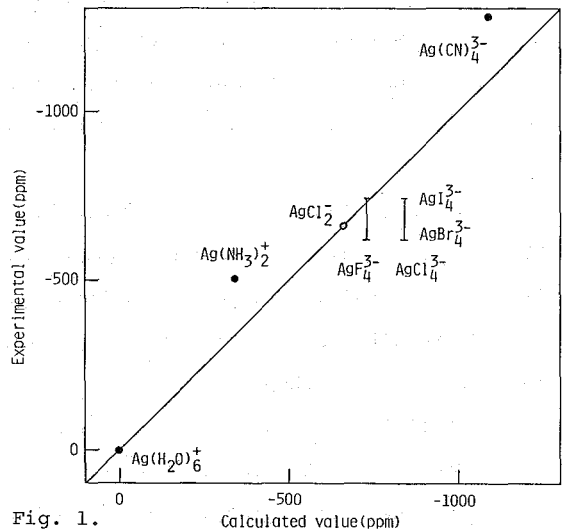


Fig. 1.

Comparison between experimental and calculated values for magnetic shieldings in silver complexes.

かんた かつや、すかつじ ひろし、ふねざわ ていじろう

Finite perturbation 法を用いた。 Table 1. Contributions to  $\sigma^{dia}$  from the core MO's.

<結果>

(1) Cu, Zn, Ag, Cd の錯体

最初に  $d^{10}$  の金属である Cu, Zn, Ag, Cd の錯体について述べる。 Fig. 1 に Ag の錯体について計算値と実験値の対応を示す。実験値は速藤らによった。計算値は

Molecule	$\sigma^{dia}$			
	core	valence	total	shift
Ag (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	4514	361	4875	0
Ag (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4484	239	4722	-153
AgCl <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4549	241	4790	-85
AgF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	4504	328	4832	-43
AgCl <sub>4</sub> <sup>-</sup>	4631	307	4938	63
Ag (CN) <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4521	308	4829	-46

水分子が6配位したものを基準とした。

Table 2. Contributions to  $\sigma^{para}$  from the core and valence MO's.

ハロゲン4配位については、F, Cl の実験値は得られず、Br, I のものを対応させている。

AgCl<sub>2</sub><sup>-</sup> は実験値が得られていない。これに

Molecule	$\sigma^{para}$			$\sigma$	
	core	valence	total	total	shift
Ag (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	-41	-431	-472	0	4403
Ag (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-33	-628	-661	-189	4062
AgCl <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-46	-1001	-1047	-575	3742
AgF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	-75	-1083	-1158	-686	3673
AgCl <sub>4</sub> <sup>-</sup>	-76	-1296	-1372	-900	3566
Ag (CN) <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-96	-1416	-1512	-1040	3318

よるとハロゲン錯体を含めて実験値とよい対応を示していることがわかる。 Table 1, 2 はそれぞれ、Ag の錯体について反磁性項、常磁性項を core, valence MO からの寄与に分けたも

Table 3. Contributions to  $\sigma^{para}$  from the metal p, d AO's.

Ligand	Cu		Zn		Ag		Cd	
	p	d	p	d	p	d	p	d
(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	---	---	-195	-54	-240	-171	-291	-124
F <sub>4</sub>	---	---	---	---	-633	-489	---	---
Cl	-210	-4486	---	---	---	---	---	---
Cl <sub>2</sub>	---	---	-316	-128	-494	-540	-604	-52
Cl <sub>4</sub>	-305	-553	-373	-101	-851	-491	-723	-166
(CN) <sub>4</sub>	-290	-1360	-343	-335	-538	-925	-864	-687
(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-165	-2475	---	---	-248	-390	---	---
(NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	---	---	-420	-309	---	---	---	---
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	---	---	---	---	---	---	-816	-81

のである。予想されるとおり、反磁性項は core MO の寄与が大きく、常磁性項は valence MO の寄与が大きい。ケミカルシフトとしては、常磁性項が支配的である。この常磁性項に対する valence MO の効き方は Fig. 2 に示した動径分布関数のうち、核に近い領域の電子が大きな寄与をすることがわかっている。 Table 3 は常磁性項のうち 5 metal AO からの寄与を、 Table 4 は配位子からの寄与を示す。

Table 4. Contributions to  $\sigma^{para}$  from the ligands.

Ligand	Cu	Zn	Ag	Cd
(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	---	-67	-62	-60
F <sub>4</sub>	---	---	-37	---
Cl	-1	---	---	---
Cl <sub>2</sub>	---	-13	-13	-12
Cl <sub>4</sub>	-24	-27	-30	-27
(CN) <sub>4</sub>	-41	-50	-49	-53
(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-15	---	-23	---
(NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	---	-57	---	---
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	---	---	---	-24

まず常磁性項に対する配位子の寄与は小さく、圧倒的に metal の寄与で決まっていることがわかる。これらの金属は形式荷電からは  $s^0 p^0 d^{10}$  であるから、p 軌道の寄与は配位子からの  $\sigma$ -donation を、d 軌道の寄与は配位子への  $\pi$ -backdonation を表わしていると考えられる。Cl<sup>-</sup> に比べて  $\pi^*$  軌道に電子を受け入れやすい CN<sup>-</sup> ではどの金属でも d 軌道の寄与が大きくなっている。Zn, Cd では  $\sigma$ -donation の効果が  $\pi$ -backdonation より

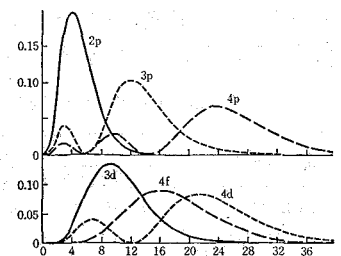


Fig. 2. 水素原子の動径関数の形。横軸は  $r$  (a.u.) (藤永 "分子軌道法" より)

大きいが Ag では配位子によって大小が入れ換わっている。さらに Cu では d 電子が重要であるため、 $\pi$ -backdonation の効果が支配的で、北川らの NMR の実験結果ともよく対応している。Scheme 1 にこれらの結論をまとめた。

Table 5 は反磁性項の metal AO からの寄与を表わしたものである。配位子による変化はほとんどなく、全錯体を通じて数 ppm ほどの違いしか見られない。Table 6 は反磁性項の配位子からの寄与を表わしたものである。こゝでは金属が変わってもほとんど変化していないことがわかる。

さらに  $CCl_4$  配位の値は 2 配位の値のほぼ 2 倍の値を持っている。

Table 5, 6 から反磁性項に対して次式が成立することがわかる。

$$\sigma^{dia} = \sigma^{dia}(s) + \sigma^{dia}(p) + \sigma^{dia}(d) + m \cdot \sigma^{dia}(L) \quad (2)$$

m は配位子の数、 $\sigma^{dia}(L)$  は Table 7 で与えられる配位子ごとの値である。最初の 3 つの項は、金属について一定であり  $\sigma^{dia}(M)$  とまとめることができる。

Table 5. Contributions to  $\sigma^{dia}$  from the metal AO's.

Contribution	Cu	Zn	Ag	Cd
$\sigma^{dia}(s)$	1295-1298	1341-1344	2194-2197	2244-2249
$\sigma^{dia}(p)$	841-846	878-881	1654-1659	1699-1704
$\sigma^{dia}(d)$	235-243	268-271	792-796	826-829

Table 6. Contributions to  $\sigma^{dia}$  from the ligands.

Ligand	Cu	Zn	Ag	Cd
(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	---	261	231	231
F <sub>4</sub>	---	---	185	---
Cl	70	---	---	---
Cl <sub>2</sub>	---	143	145	133
Cl <sub>4</sub>	285	289	291	269
(CN) <sub>4</sub>	200	203	185	209
(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	87	---	80	---
(NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	---	177	---	---
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	---	---	---	74

Table 7. Contributions to  $\sigma^{dia}$  from the single ligand.

Ligand	$\sigma^{dia}(L)$
H	7
CH <sub>3</sub>	37
CN	50
CO	57
NH <sub>3</sub>	43
H <sub>2</sub> O	40
F	46
Cl	71

## (2) $M_n$ の錯体

次に IVb 族に属する  $d^5$  の  $M_n$  錯体について述べる。Fig. 3 に計算値と実験値の対応を示す。  $M_n CN(CO)_5$  については実験値が得られなかった。実験では、  $M_n O_4^- ag$  が基準であるが、ここでは  $M_n H(CO)_5$  を基準にとって比較した。計算値の方がより大きくシフトしているが、ほぼよい対応と云えよう。

Table 8. Contributions to  $\sigma^{dia}$  and  $\sigma^{para}$  from MO's. (In ppm)

Molecules	$\sigma^{dia}$				$\sigma^{para}$				$\sigma$	
	core	valence	total	shift	core	valence	total	shift	total	shift
MnH(CO) <sub>5</sub>	1889	318	2207	0	-141	-12927	-13068	0	-10861	0
MnCN(CO) <sub>5</sub>	1905	345	2249	42	-123	-13059	-13182	-114	-10933	-72
MnCH <sub>3</sub> (CO) <sub>5</sub>	1898	339	2237	30	-130	-14327	-14457	-1389	-12220	-1359
MnCl(CO) <sub>5</sub>	1929	339	2267	60	-91	-16149	-16240	-3172	-13973	-3112

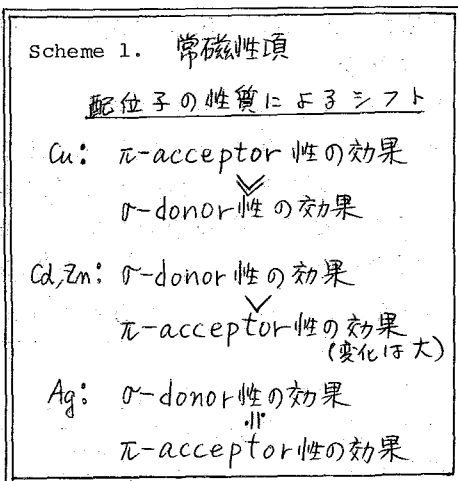


Table 8 は反磁性項、常磁性項を MO からの寄与に分けたものを示している。Ib, IIb 族の金属と同様に反磁性項は core MO が、常磁性項は valence MO が支配的であることがわかる。特に常磁性項の valence MO からの寄与が大きい。これをよく見るために、常磁性項を metal AO 及び配位子の寄与に分けたものを Table 9 に示した。metal の d 軌道からの寄与が支配的であり、 $d^0$  の金属錯体と比較して際立った特徴が見られる。これは、d 軌道が近似的に closed-

shell であった Cu~Cd に比べ、 $Mn^{2+}$  は  $d^5$  であり d 軌道が大きく結合に関与しているためである。また、配位子からの寄与はいずれの場合も小さい。Table 10 に反磁性項を metal AO 及び配位子の寄与に分けたものを示す。先の  $d^0$  の金属と同様に metal s, p, d からの寄与は一定である。valence

AO であり、変化を受けやすい d 軌道においてもコンスタントである。これは 4 つの錯体で金属付近の d 電子密度が、ほぼ一定であるためと考えられる。配位子のうちでは、CO ligand からの寄与は、axial, equatorial 共に 1 配位子当り 57 ppm と一定である。axial ligand の CN, CH<sub>3</sub>, Cl の寄与は、 $d^0$  金属の場合とほぼ同じであり、反磁性項自体は先の図式によって、かなりよい近似で求まることができる。(Table 7 は Mn 錯体も考慮に入れて作成したものである。)

### 参考文献

- 1) 遠藤 et. al. 才 21 回 NMR 討論会講演要旨集。
- 2) Calderazzo, Luchen, Williams, J. Chem. Soc. (A) 1967, 154.

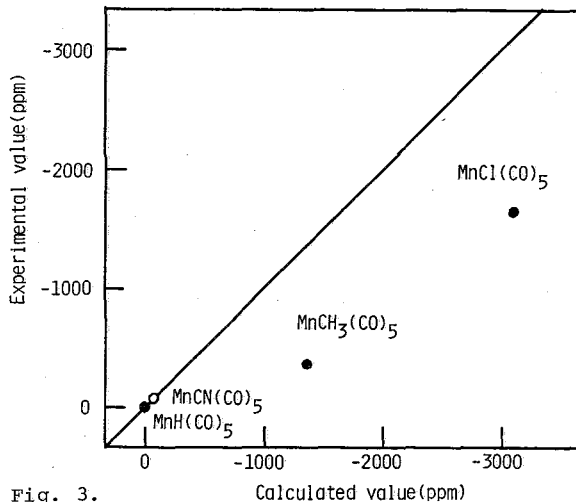


Fig. 3. Comparison between experimental and calculated values for magnetic shieldings in manganese complexes.

Table 9. Contributions to  $\sigma^{para}$  from AO's. (In ppm)

Molecules	p	d	CO <sub>ax</sub>	4×CO <sub>eq</sub>	L
MnH(CO) <sub>5</sub>	-129	-12983	10	30	4
MnCN(CO) <sub>5</sub>	-75	-13138	7	24	3
MnCH <sub>3</sub> (CO) <sub>5</sub>	-106	-14385	9	27	-2
MnCl(CO) <sub>5</sub>	1	-16276	8	24	3

Table 10. Contributions to  $\sigma^{dia}$  from AO's. (In ppm)

Molecules	s	p	d	CO <sub>ax</sub>	4×CO <sub>eq</sub>	L
MnH(CO) <sub>5</sub>	1107	708	100	57	228	7
MnCN(CO) <sub>5</sub>	1106	706	101	57	227	52
MnCH <sub>3</sub> (CO) <sub>5</sub>	1106	707	100	57	227	39
MnCl(CO) <sub>5</sub>	1106	707	101	57	227	69



第 2 日

11 月 15 日 (火)





## 23. クロム(Ⅳ)錯体の<sup>2</sup>H NMRスペクトル

(奈良女大・理, ワシントン州立大)

○海崎純男, J. I. Legg

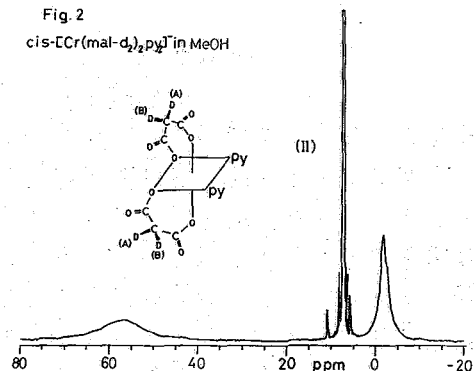
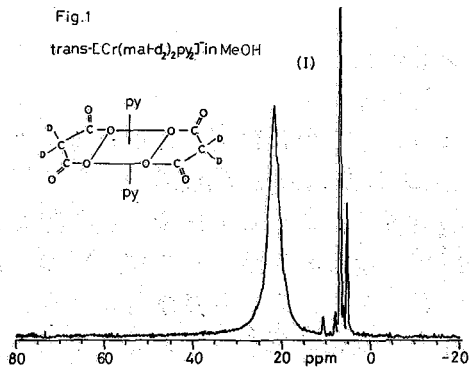
<序> 近年, 生体内の $\text{Cr}^{\text{III}}$ イオンの役割について活発な研究が行われるようになり<sup>1)</sup>, グルコース代謝を保護する物質 (Glucose Tolerance Factor, GTF) と考えられるニコチン酸を含むクロム(Ⅳ)アミノ酸錯体が見出されて以来,  $\text{Cr}^{\text{III}}$ 錯体の立体構造の研究の重要性が増してきた。 $\text{Cr}^{\text{III}}$ 錯体の構造研究法としては, 配位子場理論に基づく $d-d$ 吸収帯の解析が最も一般的であるが, これには限界があり, 反磁性 $\text{Co}^{\text{III}}$ 錯体の<sup>1</sup>H NMRのような簡便でより確実な構造決定手段が必要とされる。しかし,  $d^3$ 電子配置の $\text{Cr}^{\text{III}}$ 錯体の<sup>1</sup>H NMRスペクトルでは, 常磁性によるシグナル線幅の広がりや起るため, 立体構造の研究には適さない。そこで, 常磁性化合物の<sup>2</sup>H NMRシグナルの線幅が<sup>1</sup>H NMRより狭くなることに着目して,  $\text{Cr}^{\text{III}}$ 錯体の構造研究法として<sup>2</sup>H NMRスペクトルの利用を試みた。

常磁性化合物の<sup>2</sup>H NMRシグナルの線幅は理論的には<sup>2</sup>Hの磁気回転比 $\gamma$ の2乗に比例すると考えられ, <sup>1</sup>H NMRと比較して $\gamma$ の比の2乗 ( $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{H}}$ )<sup>2</sup> 即ち  $1/4$  の線幅の縮小が予想される。<sup>2)</sup> このことは, すでにJohnsonらによって実験的に *tris-acetylacetonato*  $\text{Cr}^{\text{III}}$ 錯体などで立証されている。<sup>3)</sup> この場合, 分解能は全体として<sup>1</sup>H NMRより6.5倍になるが, その時点では, 立体構造の違いに基づく非等価な<sup>2</sup>H核の化学シフトの差は観測されず, <sup>2</sup>H NMRの構造研究法としての有用性が示唆されるに留まっていた。最近, 演者らは $\text{Cr}^{\text{III}}$ 錯体の高分解能<sup>2</sup>H NMRスペクトルをはじめ観測し, <sup>2</sup>H NMRが $\text{Cr}^{\text{III}}$ 錯体の有力な構造決定手段となることを明らかにした。<sup>4)</sup> ここでは, ビリジンを配位した $\text{Cr}^{\text{III}}$ 錯体を中心に, <sup>2</sup>H NMRの構造プローブとしての有用性について検討した。

<実験> 本研究で用いた錯体のうち, マロン酸錯体,  $[\text{Cr}(\text{mal})_2\text{py}_2]^-$  ( $\text{mal} = \text{OOCCH}_2\text{COO}^-$ ;  $\text{py} = \text{ピリジン}$ ), を除いては, 全て文献の方法に従って合成した。新mal錯体は元素分析によって同定した。マロン酸の $-\text{CH}_2-$ を重水素化した錯体は, 室温で4~5時間錯体の重水溶液を放置後, アセトンを加えて結晶化することによって得られた。<sup>31</sup>MHz <sup>2</sup>H NMRスペクトルは Nicolet NT-200 を用いて, 4.7 T の磁場で室温で測定した。30~100 mM のサンプル溶液 5 ml を含む 12 mm  $\phi$  の試料管を用いた。化学シフトの基準には,  $\text{CDCl}_3$  を外部標準 (7.24 ppm) として用いた。

<結果と考察> <sup>2</sup>H-<sup>2</sup>Hの核スピン結合定数が小さいため, <sup>2</sup>H NMRは電次スペクトルとなり, 1個の<sup>2</sup>H核に対して1本のシグナルが観測される。<sup>2</sup>H NMRシグナルの実測線幅は<sup>1</sup>H NMRの約 $1/30$ で, 100 Hz 前後の半値幅を示し, 反磁性物質の<sup>1</sup>H NMRシグナルの線幅よりはるかに広がり, 大きい常磁性シフトを期待できるので, 高分解能スペクトルが得られる可能性がある。これに基づき, 以下の様に各錯体の構造を<sup>2</sup>H NMRから推定することができる。

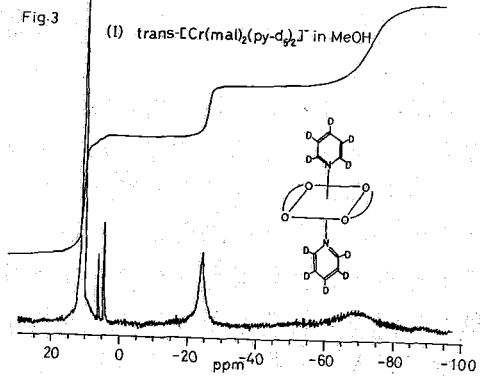
かいざき・すみお, J. I. Legg



1) 立体構造の帰属

a) mal 錯体.  $[Cr(mal)_2py_2]^-$  の組成を持つ幾何異性体カラムクロマトグラフィー(RAE-sephadex)によつて分離され,  $Na[Cr(mal)_2py_2] \cdot 2H_2O$  (I; 先に溶融するバンドから) と  $Li[Cr(mal)_2py_2] \cdot 3.5H_2O$  (II; 後から溶融するバンドから) として単離できた。I, II 異性体の可視吸収スペクトルには特徴的な差は見られないので, 配位子場理論に基づく幾何構造の推定は困難である。ところが, これらの mal の  $-CH_2-$  基を重水素化した錯体の  $^2HNMR$  スペクトルには明瞭な差が見られる。すなわち, 図1, 2に示すように, I 異性体では唯一本のシグナル(21 ppm)が観測されるのに対して, II 異性体では同じ面積強度を持つ2本のシグナル(56 ppm と -2 ppm)を示した。mal 以外の配位子カシス配位している  $[Cr(mal-d_2)_2(bpy)]^-$ ,  $[Cr(mal-d_2)_2(en)]^-$  ( $bpy = 2,2'$ -bipyridyle;  $en = ethylenediamine$ ) の  $^2HNMR$  スペクトルは II 異性体と同様の2本のシグナルを示す。従つて, II 異性体は2つの非等価な  $^2H$  核(図2 (A), (B))を持つシス構造をとり, I 異性体は2つの  $-CD_2-$  基の  $^2H$  が全て等価なトランス構造をとっている結論できる。 $[Cr(mal)_2(H_2O)_2]^-$  の場合も<sup>5)</sup>、吸収スペクトルからの構造の帰属は困難であるが, 2つの幾何異性体のうち, 比較的難溶性の  $K[Cr(mal-d_2)_2(D_2O)_2] \cdot 3D_2O$  は1本の  $^2HNMR$  シグナルを示し, 易溶性の  $K[Cr(mal-d_2)_2(D_2O)_2] \cdot 3D_2O$  では2本のシグナルが観測されることから, 従来の帰属が正しいことが確認された。

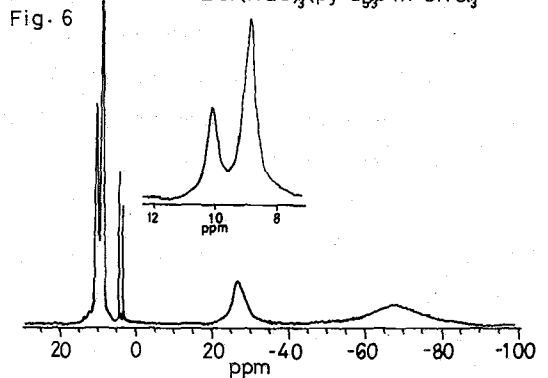
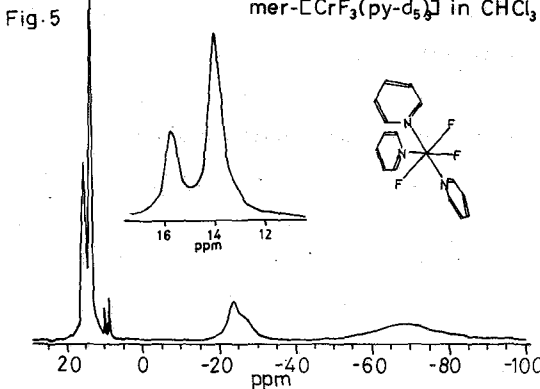
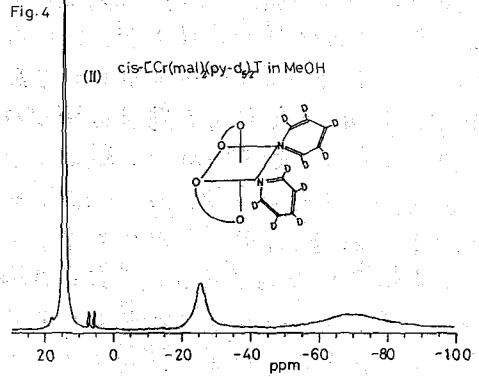
Py の代わりに  $py-d_5$  (99 atom %  $^2H$ ) を配位した  $[Cr(mal)_2(py-d_5)_2]^-$  の  $^2HNMR$  は両異性体とも  $py-d_5$  の  $\alpha$  (ortho),  $\beta$  (meta),  $\gamma$  (para) の  $^2H$  によるシグナルをそれぞれ1本ずつ示す。(図3, 4) シス異性体で,  $py$  環の  $Cr-N$  軸まわりの回転が固定されていれば,  $N_2O_2$  面の上下で,  $\alpha$ -および  $\beta$ -のそれぞれ2つの  $^2H$  が等価でなったり, 5本の  $^2HNMR$  シグナルが予想される。しかし,



この錯体の実測 $^2\text{H}$ NMRスペクトル(図4)からは、Cr-N軸でPYが自由回転しているか、あるいはPYの回転異性に伴う $\alpha$ および $\beta$ のそれぞれ2 $\gamma$ の $^2\text{H}$ の環境の違いによる化学シフトの差がほとんどないものと考えられる。

b)  $[\text{CrX}_3(\text{PY-d}_5)_3]$

この型の錯体の $^2\text{H}$ NMRからは、*fac* (*cis-cis*)と*mer* (*cis-trans*)異性体の区別が期待できる。ここでは、 $\text{X} = \text{F}^-$ ,  $\text{NCS}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ の錯体の $^2\text{H}$ NMRスペクトルを測定した。 $[\text{CrF}_3(\text{PY-d}_5)_3]$ の $^2\text{H}$ NMRでは、図5のように15 ppmと-25 ppm付近にそれぞれ2:1の面積強度を持つ2本のシグナルが観測された。このことから、 $[\text{CrF}_3\text{PY}_3]$ は*mer*型であると推定される。 $[\text{Cr}(\text{NCS})_3\text{PY}_3]$ では*mer*-, *fac*-異性体の存在が報告されている<sup>6)</sup>。しかし、*fac*型錯体の合成法で得られた $[\text{Cr}(\text{NCS})_3(\text{PY-d}_5)_3]$ の $^2\text{H}$ NMRスペクトルは図6のように $[\text{CrF}_3(\text{PY-d}_5)_3]$ とよく似ているので、この錯体は*mer*構造をとると考えられる。一方、*mer*型錯体の合成法で得られたPY-d<sub>5</sub>錯体では、その10 ppm付近の $^2\text{H}$ NMRシグナルの解析や元素分析から、 $(\text{PY-d}_5\text{H})[\text{Cr}(\text{NCS})_4(\text{PY-d}_5)_2]$ であると結論できる。 $[\text{CrCl}_3(\text{PY-d}_5)_3]$ の $^2\text{H}$ NMRスペクトルはPY-d<sub>5</sub>の $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - $^2\text{H}$ に対しそれぞれ1本のシグナルを示すことから、この錯体は*fac*構造をとると考えられるが、最近の $[\text{CrCl}_3\text{PY}_3]$ のX線構造解析の結果では<sup>7)</sup> *mer*構造であることが判明した。このような $^2\text{H}$ NMRシグナルの偶然縮重の原因は明らかでない。今後、 $^2\text{H}$ NMRによるCr<sup>III</sup>錯体の構造決定に際しては、この点を留意する必要がある。



## 2) $^2\text{H}$ NMRシグナルの帰属と常磁性シフト

$\text{trans-}[\text{Cr}(\text{mal})_2(\text{py-d}_5)_2]^-$ の $^2\text{H}$ NMRシグナルは図3に示すように、2:1:2の面積強度比を持っているので、中央の $-24$  ppmのシグナルは $\text{py-d}_5$ の $\gamma$ (para) $^2\text{H}$ によるものである。pyの $\alpha$ (ortho)の $^1\text{H}$ を $^2\text{H}$ に置換した $\text{py-2-d}$ が配位した錯体の $^2\text{H}$ NMRスペクトルでは最も幅広い $-71$  ppmのシグナルだけが観測された。従って、 $\text{py-d}_5$ 錯体の3本の $^2\text{H}$ NMRシグナル、 $11$  ppm,  $-24$  ppm,  $-71$  ppmはそれぞれ $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  $^2\text{H}$ によるものと結論できる。他の $\text{py-d}_5$ 錯体の $^2\text{H}$ NMRスペクトルも同様に帰属できる。

基底状態が $^4\text{A}_{2g}$ である $\text{Cr}^{\text{III}}$ 錯体の磁気異方性は小さいので、その常磁性シフトは擬コンタクトシフトからの寄与が少なく、コンタクトシフトが支配的と考えられる。このことは先の $\text{py-d}_5$ 錯体の $^2\text{H}$ NMRシグナルの帰属とよく対応している。常磁性シフトの大きさの $\text{Cr}^{\text{III}}$ と $^2\text{H}$ の距離によるattenuationが見られず、シフト方向のalternationがあるなど $\pi$  spin delocalizationの特徴を示している。

$[\text{CrX}_3(\text{py-d}_5)_3]$ の常磁性シフトと配位子場パラメーターの関係について検討した結果、配位子Xによるd電子間及撓エネルギーの減少即ち電子雲拡大効果と $\text{py-d}_5$ の $\gamma$ - $^2\text{H}$ の常磁性シフトの間に相関関係があることが見出された。電子雲拡大効果は金属-配位子間の共有結合性の増加を反映しているのど、 $[\text{CrX}_3\text{py}_3]$ の場合、pyの $\gamma$ 位のスピン密度の増大が $\text{Cr-X}$ の共有結合性と関連していると考えられる。

## References

- 1) W. Mertz et al., Fed. Proc., 33, 2275(1974).
- 2) R. H. Holm and C. J. Hawkins. In "NMR of Paramagnetic Molecules"; G. N. La Mar et al eds; Academic Press: New York and London, 1973, Chap. 7.
- 3) A. Johnson and G. W. Everett, Jr., J. Am. Chem. Soc., 94, 1419(1972);  
G. W. Everett, Jr., and A. Johnson, ibid. 94, 6397(1972).
- 4) W. D. Wheeler, J. I. Legg, and S. Kaizaki, Inorg. Chem., 21, 3248(1982).
- 5) J. C. Chang, J. Inorg. Nucl. Chem., 30, 945(1968).
- 6) S. DasSarma et al., Inorg. Chem., 18, 3618(1979).
- 7) W. Cordes, et al., to be published.
- 8) C. K. Jørgensen, "Modern Aspects of Ligand Field Theory", North-Holland, 1970, Chap. 23.

## 24. 二、三のπ荷電分子のNMRと電子密度分布

(茨城大理; 名工大\*) ○平山昌甫, 小祝和彦, 竹村和美,  
高橋憲助\*

[序]

荷電分子のNMRシフトは、古くから経験的に用いられている化学シフトと電子密度との関係をチェックする意味でも、出来るだけ多くのデータが要求されるところであるが、今回は多縮合環炭化水素として、ペリレン(1), テトラセン(2), 又テトラフェニルシクロペンタジエン(3)についても、それぞれπ-ジアニオンに同定出来るスペクトルを得たので報告する。(1, 2についてはLawler等<sup>1)</sup>により<sup>1</sup>Hスペクトルが観測されているので、ここでは<sup>13</sup>Cスペクトルのみを述べる)

[実験]

K-Na合金にて十分脱水乾燥したTHF-d<sub>6</sub>に試料を溶解し(0.1~0.2M), 脱ガスした後Naと接触させ、測定した。電子スピン交換をさけるため、極力、微量のアニオンラジカルが存在しない様に、しかもジアニオンの生成濃度を大きくしなければならぬが、そのためには、接触時間、温度等の条件を最良に選ぶなければならぬ。ここでは接触時間40~60時間、温度0~15°Cで行なった。装置は、<sup>13</sup>CはバリアンCFI-20, 日本電子FX-90Q, <sup>1</sup>HはバリアンXL-200で、分子軌道計算は日立M-200H(東大)を用いた。

[結果と考察]

[1] ペリレンジアニオン

<sup>13</sup>Cスペクトルを、Fig. 1に示す。帰属は、C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>は<sup>1</sup>H(Lawler等)のスペクトルに基づきSelective Decouplingにより行ない

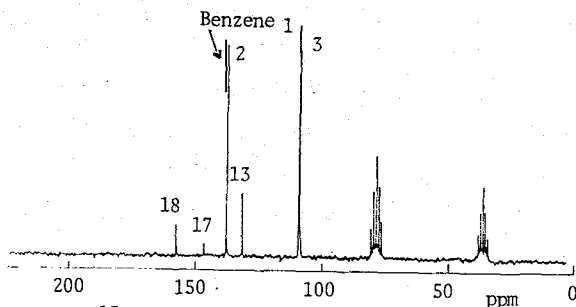
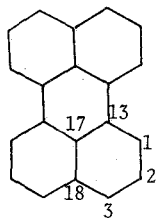


Fig. 1. <sup>13</sup>C NMR of Perylene dianion

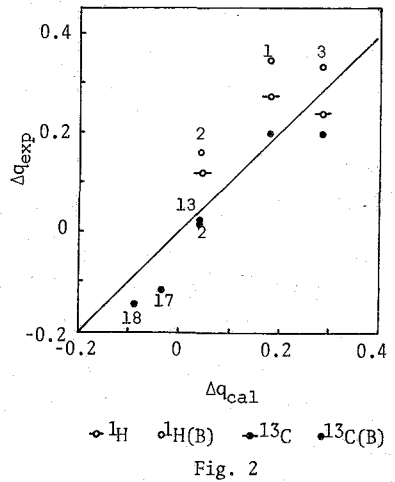
C<sub>13</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>18</sub>は、

T<sub>1</sub>の差および電子密度計算(Δρ)との対応により行なった。一般に<sup>13</sup>Cについて用いられている(1)より過剰電荷密度(Δρ<sub>exp</sub>)を算出した。この時、溶解度不足のため中

$$\Delta\delta = k_c \cdot \Delta\rho, \quad k_c \sim 160 \text{ ppm/electron} \quad (1)$$

性分子の4級炭素が満足に観測出来なかつたので、ジアニオンのシフト(Δδ)はベンゼンを基準とした。(環電流補正はJohnson-Boveyの式を用いた)次にppp法により過剰電荷密度(Δρ<sub>calc</sub>)を計算し(中性分子のX線結晶データを用いる)Fig. 2と比較する。k<sub>H</sub> ~ 10.7 ppm/electronとして得られた<sup>1</sup>Hデータも同時にのせてある。一般に云われているuniformityの増加は特に目立たない。<sup>1</sup>Hに比べて<sup>13</sup>Cの方がゆるやかで、こゝろのゆるみ、たけむらゆるみ、たかほしけんすけ

が相関がよく、 $^1\text{H}$ の場合、環電流補正を必要としない中性分子基準の方がいい結果を與える。これは、環電流補正として外周型常磁性環電流効果等詳細な考慮がなされていないためと思われる。 $\text{Na}^+$ の吸収線の線巾は約50Hzで、freeの $\text{Na}^+$  ( $\text{NaClO}_4$ 水溶液)の20Hzに比べてかなりなりこことからイオン対生成が考えられ、この場合これによる電子密度分布の多寡の変化が $\Delta q_{\text{cal}}$ との相関に少なからず影響していると思われる。なお、空気の導入により、ほとんどの分子が完全に復活する。



[2] テトラセンジアニオン

$^{13}\text{C}$ スペクトルを Fig. 3 に示す。帰属は  $\text{C}_1, \text{C}_2, \text{C}_9$  は  $^1\text{H}$  スペクトルにもとづき Selective decoupling により、 $\text{C}_3, \text{C}_7$  は  $\Delta q_{\text{cal}}$  との対応により行なった。 $\Delta q$  の相関図 (Fig. 4) より、[1]と同様、一般に  $^{13}\text{C}$  の方がよい対応を示し、4級炭素では環電流補正をしないタイプの方が(中性分子基準)が良好で、他の炭素では逆に悪くなり、又  $^1\text{H}$  では、[1]と同様、すべて中性分子基準の方がやっ良好である。

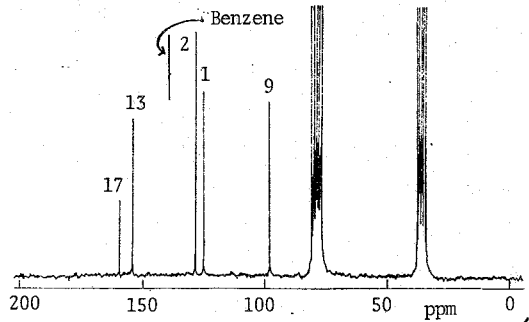
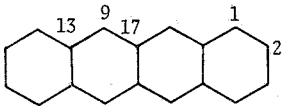
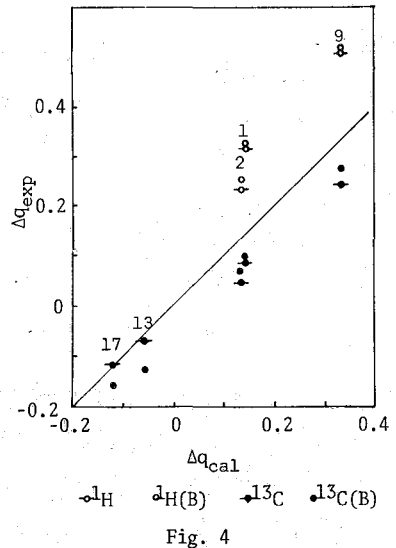


Fig. 3.  $^{13}\text{C}$  NMR of Tetracene dianion

$\text{Na}^+$ の線巾は180Hzでかなり強く、かなり強いイオン対の結合が予想される。空気の導入により、中性分子が復活し、 $\text{H}_2\text{O}$ との反応により9,10ジヒドはテトラセンが生成した。



[3] テトラフルエニルペンタジエンジアニオン  $\text{Na}^+$ 塩. Fig. 5 に  $^{13}\text{C}$  スペクトル, Fig. 6 に  $^1\text{H}$  スペクトル (Aromatic regionのみ), Fig. 7 に 2つの Simulation との比較 (2つの  $\text{AA}'\text{BB}'\text{C}$ ) を示す. 先ず、 $^{13}\text{C}$  スペクトルで詳細な帰属は別として、全体としての高磁場レフト、個々の吸収線の分裂パターン、又  $^1\text{H}$  スペクトルでの変化の特徴を考え合わせると、単純なモノマーアニオンが生成していると結論される。



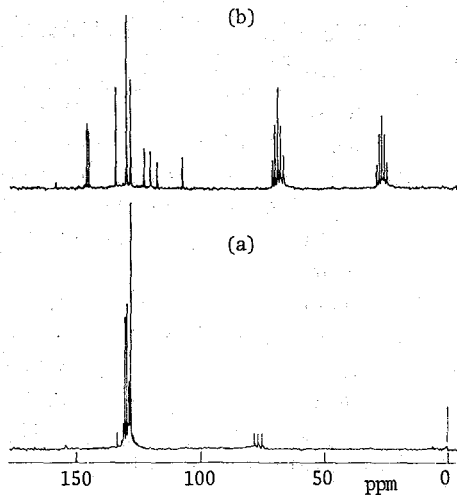
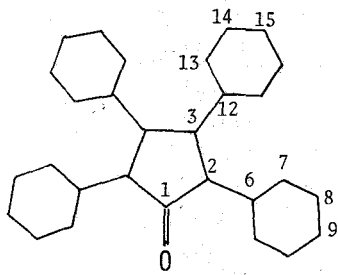


Fig. 5.  $^{13}\text{C}$  NMR of Tetracyclopentadienone  
a) Neutral b) Dianion THF

これは他の $\pi$ 分子を還元しそのアニオンラジカルを生成させることより裏付けられるが、又特に $\text{C}_1$ は aliphatic region まで高磁場シフトしてはいないと、

THF(H) 中で生成する $\text{H}^+$ アニオンスペクトルに aliphatic proton が無いこと等より、グイマーアニオンの可能性や、溶媒よりの水素の引き抜きは否定される。

帰属は、先ず4級炭素では、強度と、シフト量の  $\Delta\delta_{\text{cal}}$  との比較より  $\text{C}_1$ , ( $\text{C}_2, \text{C}_3$ ), ( $\text{C}_6, \text{C}_{12}$ ) の区別をしたが、 $\text{C}_2$  と  $\text{C}_3$ , および  $\text{C}_6$  と  $\text{C}_{12}$  の区別は公平でない。4級以外では、先ず  $\text{C}_9, \text{C}_{15}$  は強度により他から区別される。 $(7, 8, 9)$  と  $(13, 14, 15)$  の区別は、200 MHz  $^1\text{H}$  スペクトルの simulation と  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  と  $\Delta\delta_{\text{cal}}$  との対比より行なわれアニオンの $^1\text{H}$ の試行的帰属にもとずいた selective decoupling により行なった。

$\Delta\delta_{\text{cal}}$  の PPP 法での計算では tetraphenyl-1-bromocyclopentadiene の結晶データを基にして  $\text{C}=\text{O}$  を  $1.15 \text{ \AA}$ , phenyl のねじれ角度に付たして  $\text{C}_2-\text{C}_5$  を  $1.50 \text{ \AA}$  とした。

$^{13}\text{C}$  について  $\Delta\delta$  の実測値と計算値 ( $\Delta\delta_{\text{cal}} \times 160$ ) との比較を Table 1 に示す。これは中性分子基準である。なお  $^1\text{H}$  の中性分子の詳細な解析をまだ行っていないので、 $\Delta\delta$  の比較は今のところ公平でない。先ず、6, 12位で電子密度が逆に大きく減少している(低磁場シフト)炭素で、 $\Delta\delta_{\text{obs}}$  と  $\Delta\delta_{\text{cal}}$  は一致している。どちらの帰属を違えても、 $\Delta\delta_{\text{cal}}$  に比べて  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  は、 $\text{C}_1$  と  $\text{C}_3$  で大きく高磁場へ、 $\text{C}_2$  で大きく低磁場へ、 $\text{C}_6, \text{C}_{12}$  と  $\text{C}_9, \text{C}_{15}$  はいずれもそのシフトの絶対値がかなり小さい。又、残りの  $\text{C}_7, \text{C}_8, \text{C}_{13}, \text{C}_{14}$  も同じく  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  の値がかなり小さい。これはカルボ

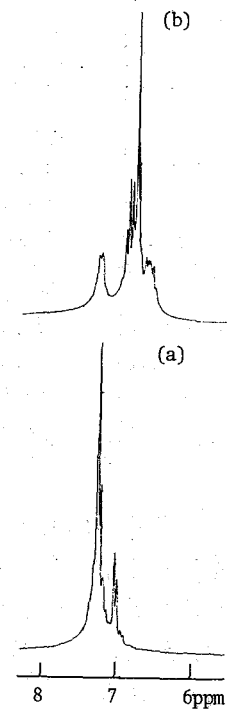


Fig. 6 a) Neutral b) Dianion

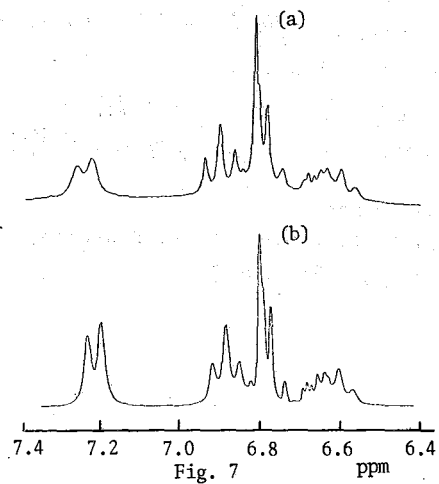


Fig. 7 a) Observed b) Simulation

Table 1. Calculated and observed  $^{13}\text{C}$  shifts

	Neutral <sup>a)</sup>	Dianion <sup>a)</sup>	$\Delta\delta$	$160 \cdot \Delta q_{\text{cal}}$
1	132.1	90.42	-51.68	-4.54
2	57.2	48.76 or 38.57	-8.44 or -18.63	-56.70
3	86.7	38.57 or 48.76	-48.13 or -37.94	-27.66
6	62.8	76.98 or 76.28	14.18 or 13.48	22.72
7	61.1	60.73	-0.37	-8.03
8	----	60.62	----	-6.99
9	59.5	51.14	-8.36	-23.07
12	64.9	76.28 or 76.98	11.38 or 12.08	25.46
13	62.1	65.12	3.02	-12.99
14	60.0	59.27	-0.37	-5.76
15	61.1	53.69	-7.41	-29.44

a) In ppm from low field peak of THF

ニル炭素に結合した  $\text{Na}^+$  による電子密度分布の大きな変化にはおると見られる。 $\text{Na}^+$  の効果を酸素原子の  $\pi$ -軌道成分パラメータ ( $\delta_0$ ) の増加として表現して、Hückel MO による  $\Delta q_{\text{cal}}$  への影響を見てみると、Fig. 8 に示すように、1, 3 で大きく増加、2 で大きく減少する。C13, C15 の多少の増加はかろうすし  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  と合致するが、全体としての傾向からは、 $\text{Na}^+$  のカンチオン酸への結合(イオン性)によるものと思われる。

なお、 $^{13}\text{C}$  スペクトルを測定していただいた筑波大学分析センターの鈴木秀登氏に深謝致します。

#### References

- 1) R. G. Lawler, C. V. Ristagno, J. Amer. Chem. Soc., 91, 1534 (1969).

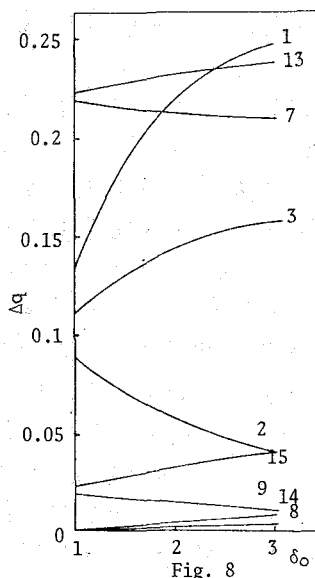


Fig. 8



25.  $R_nSi(R'O)_{4-n}$  型 シランの  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{29}Si$  —ランタニドシフト —  
 $L_n(fod)_3$  への配位構造とスピン密度分布  
 (茨城大・理) 平山昌甫 ○新井寿一

[1] 序

$R_nSi(R'O)_{4-n}$  型シランにおいて、 $^{29}Si$ シフトにおよぼされる置換基効果は、対応する炭素化合物の中心の $^{13}C$ シフトにおけるそれと全く逆の傾向がみられ、また、他のSi化合物においても $^{29}Si$ シフトと置換基の電気陰性度との相関関係には異常な現象がみられる<sup>1)</sup>。これに対する説明としてこれまで、しばしば、Siとその結合原子との間の(d-p) $\pi$ 結合の寄与が考えられているが、いまだに実験事実に基づいた明確な解釈がなされていない。我々は、この結合性に関し、ランタニド誘起シフト(LIS)に含まれるコンタクトシフト(CS)からのアプローチを企て、昨年、本討論会において、 $R_nSi(R'O)_{4-n} \sim L_n(fod)_3$ の溶液内平衡を中心に、LISのCSと擬コンタクトシフト(PCS)への分離について報告した<sup>2)</sup>。

今回、 $Gd(fod)_3$ により誘起するシフトを用いてA(hyperfine splitting constant)を決定し、これよりTriethoxyethylsilane (TEOESi)と1,1-Triethoxypropane (TEOP)について、Aの分子内比の比較を中心に考察する。また、他の一連のLISの解析から得られるPCSと計算される幾何学因子(GF)の分子内比とのfittingより、シラン分子の $L_n(fod)_3$ への配位時の諸立体パラメーターの決定を試みる。

[2] 実験

TEOESi, TEOP, Diethoxydimethylsilane (DEODMSi) —市販品。  $L_n(fod)_3$  ( $L_n = La \sim Yb$ ) —合成品。溶媒 —  $CDCl_3$ 。方法 —  $R_nSi(R'O)_{4-n}$ の濃度 $[S_0]$ を一定とし、 $L_n(fod)_3$ の濃度 $[L_0]$ を連続的に変化させ $\delta \sim \rho$  plot ( $\delta = LIS, \rho = [L_0]/[S_0]$ )をとる。 $Gd(fod)_3$ の場合、 $\rho = 0 \sim 0.03$ 、その他の場合 $\rho$ の上限は $0.1 \sim 3$ 。また、 $Gd(fod)_3$ 以外の場合、必要に応じて少量( $\sim 0.01M$ )の $Cr(acac)_3$ を加える。 $^{13}C, ^{29}Si$ は、ベリアンCFT-20 (Broad Band accessory付、 $\nu(Si) = 15.801 MHz, PD = 0 \sim 6 sec.$ )、 $^1H$ は、日立R-20Aにより測定。

[3] 結果と考察

(i)配位構造 昨年度報告したように、1:1アタクトLSの限界シフト $\Delta\epsilon_s$ は、この場合 $\delta \sim \rho$  plotの初期勾配で近似できる。また、LSについて分子内の運動による平均化等により、事実上effectiveな軸対称性が存在すると考えられるので、CFSとして反磁性 $La(fod)_3$ のシフトを補正したLIS( $\Delta\epsilon_s$ )は、(1)で表わされる。

$$\Delta\epsilon_s = CS + PCS = A \cdot \langle S_z \rangle + G \cdot D \quad (1)$$

ここで、 $\langle S_z \rangle$ はGoldring<sup>3)</sup>による値で、DはBleaney<sup>4)</sup>の式(2)における第三項であり、

$$PCS = (0^3/60k^2T^2) \cdot (2A^2 \langle r^2 \rangle) \cdot (g^2 J(J+1)(2J-1)(2J+3) \langle J_1 \alpha | J \rangle) \cdot ((3 \cos^2 \theta - 1)/r^3) \quad (2)$$

Aは $a/g\mu_N$ である。一連の $L_n(fod)_3$ での $\Delta\epsilon_s$ をTable. 1に示す。(1)は、A、Dが $L_n$ の種類に依らないとして、(3)と変形される。

$$\Delta\epsilon_s / \langle S_z \rangle = A + G \cdot (D / \langle S_z \rangle) \quad (3)$$

この式に基づいた $\Delta\epsilon_s / \langle S_z \rangle \sim D / \langle S_z \rangle$  plotの一例をTEOESi, TEOPについてFig. 1に示

ひらやま まさとし あらい じゅいち

Table 1  $\Delta_{LS}^a$  for TEOESi

	Si	$\underline{CH}_2(O)$	$\underline{CH}_3(O)$	$\underline{CH}_2$	$\underline{CH}_3$	$\underline{CH}_2(O)$	$\underline{CH}_3(O)$	$\underline{CH}_2$	$\underline{CH}_3$
Pr	-78.9	-28.3	-11.8	-15.2	-7.25	-15.8	-8.9	-13.3	-4.3
Nd	-37.3	-13.2	-5.2	-7.13	-4.83	-6.10	-3.14	-6.26	-3.0
Sm	2.1	0.92	-1.1	-1.4	-1.2	-0.64	-0.19	----	-0.48
Eu	75.7	19.8	3.67	9.50	6.25	4.20	2.05	8.30	4.0
Tb	-20	-13	-6.8	-9.6	-4.8	-85.	-36	----	----
Ho	-125	-55.5	-21.2	-56.8	-27.0	-33.2	-14.2	----	----
Er	66.7	23.8	9.25	22.5	15.7	10.0	4.88	----	----
Dy	-235	-110	-52.9	-93.6	-42.9	-72.8	-38.8	----	----
Tm	-85.0	-27.9	-12.1	-21.2	-9.69	-45.0	-20.0	----	----
Yb	14.0	8.90	3.32	8.18	4.55	3.14	1.57	----	----
La	5.3	2.1	-0.69	-0.43	-0.04	0	0	0	0

a) Positive sign denotes low field shift. In ppm.

す。Ln Series前半では、直線性が良い( $S_{in}$ は、 $\langle S_{in} \rangle$ の値が他より極端に小さいので、信頼性が薄い)が、後半ではかなり悪い(この場合、前半・後半に分けたのは  $Ln^{3+}$  の電子状態、磁化率から云って合理的である<sup>5)</sup>)。この傾向は、すべての核について同様にみられ、後半ではAあるいはGのLnに依るバラつきが大きいことに起因すると思われる。

そこで、前半から得られる勾配Gの分子内比に対して、立体因子(GF)を計算しfittingを行う。基本的にはオルトケイ酸メチルのX線のデータを用い(TEOPでは、

C-C=1.54Å, C-O=1.42Åとした)、 $\theta_1(\angle OSiO, 90^\circ \sim 115^\circ)$ ,  $R_{in=0}$  (2.2~6.5Å),  $\theta_2, \theta_3$  をパラメータとした (Fig. 2)。

$\theta_2, \theta_3$  については、立体障害のない様な範囲でGFの平均化を行う予定であるが、今のところ、TEOESiについて代表的な組合せ ( $\theta_2 = 95^\circ, \theta_3 = -135^\circ$ ) を用いて、ある程度良い結果を得ており、 $R = 3.4 \sim 3.8 \text{Å}$ ,  $\theta_1 = 108^\circ \sim 110^\circ$  で、 $Q = 1.4 \sim 1.5 \times 10^{-2}$  ( $Q = \sum_i [(G_i - GF_c) / (G_i / G_c)]^2$ ) となっている。しかし、TEOPでは、上記の  $\theta_2, \theta_3$  にfixし同様な計算を行ったところ、十分小さなQを与えるR,  $\theta_1$  の組合せは存在するか、予想されるアクトの化学構造からみて妥当な結果ではない。なお、酸素2個で配位するモデルについて角度パラメータを1つ増やしfittingを試みたが、立体障害の大きな方向にQが減

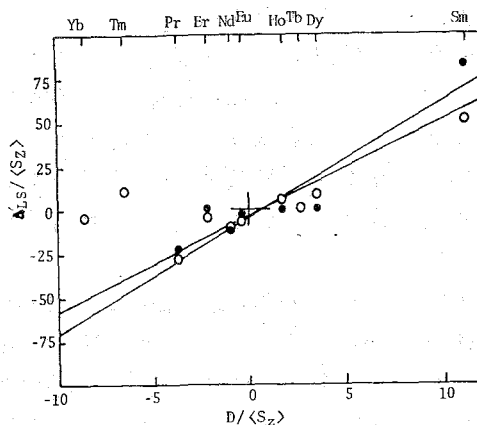


Fig. 1.  $\Delta_{LS} / \langle S_2 \rangle$  vs  $D / \langle S_2 \rangle$  plots  
○ Si in TEOESi, ● Central C in TEOP

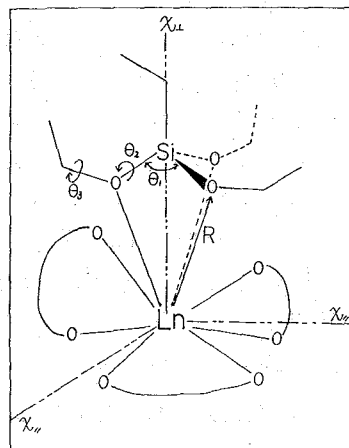


Fig. 2

少してゆき、このモデルは不適当とされる。これは、酸素の増加に伴い平衡定数が増加すること(昨年度発表<sup>2)</sup>)と矛盾しない。

(ii) Hyperfine Coupling Constants, A

(3)で一連の  $\Delta'_{LS}$  より得られる  $\Delta'_{LS}/\langle S_z \rangle \sim D/\langle S_z \rangle$  plot における切片より理論上 A が求まるわけであるが、一例を Fig. 1 に示したように、Ln series 全体としての直線性は極めて悪く、Series 前半だけとれば直線性が良い。(1)で述べたように勾配の値には比較的良い精度を与えるが、グラフ上で求められる切片の値は、この場合誤差が大き過ぎて実用にならない。

一方、free の Gd イオンは異方性がなく、Gd(fod)<sub>3</sub>-induced shift は等方性であると期待されるが、この場合 LS 状態の灯線性が必ずしも良くなく、配位子の影響も考えられ、実際 Gd(fod)<sub>3</sub>-induced shift には pos の寄与が多少含まれているとの指摘もある。しかし、ここでは一応、CS のみであるとして  $\Delta'_{LS}(Gd)$  を実測して、(4)より A (Gauss) を

$$\Delta'_{LS}(Gd)/\langle S_z \rangle_{Gd} = (\Delta H \times 10^6 / H_0) / \langle S_z \rangle_{Gd} = A \times (10^6 / H_0) \quad (4)$$

算出し TEOESi, TEOP, DEODMSi について、分子内の A の分布を Table. 2 で比較する。

Table 2  $\Delta'_{LS}(Gd)^a$  and A

	TEOESi		TEOP		DEODMSi	
	$\Delta'_{LS}(Gd)$	$A \times 10^3(G)$	$\Delta'_{LS}(Gd)$	$A \times 10^3(G)$	$\Delta'_{LS}(Gd)$	$A \times 10^3(G)$
Si(C)	48	-27	8.9	-5.1	102	-58
CH <sub>2</sub> (O)	5.9	-3.4	2.3	-1.3	17	-9.7
CH <sub>3</sub> (O)	0.6	-0.3	2.6	-1.5	1.7	-1.0
CH <sub>2</sub>	-5.0	2.9	-7.9	4.5		
CH <sub>3</sub>	1.0	-0.6	1.8	-1.0	-3.7	2.1

a) In ppm. Positive sign denotes low field shift.

共に小さな値を示す CH<sub>2</sub>(O) の負号を除けば、全体としては、スピン密度の符号の交代が見られ、スピンが Gd から酸素を経由して主にスピン分極により伝達されていると思われる<sup>2)</sup>。ここで、a の総体値の比が Si と C ではほぼ等しい ( $|a(Si)/a(C)| = 1.09$ ) ことを考えれば、TEOESi の A(Si) が TEOP の A(中心) のほぼ 5 倍であることより、明らかに Si に別のスピン伝達機構が加算されていると思われる。DEODMSi は、酸素の数が少ないのにむしろ TEOESi より全体として大きな A を持っているか、これは、平衡定数から予期される傾向に反した結果である。

これらのデータと Si-O 間の (d-p) $\pi$  結合との関係については、なお、適当なモデルラジカルについて Si の d 軌道を考慮したスピン密度計算の試みが必要である。

References

- 1) E. A. Williams and J. D. Cargioli, in "Annual Reports in NMR Spectroscopy Vol. 9", G. A. Webb (ed.), Academic Press, New York, 1979, pp 221-318.
- 2) 第 21 回 NMR 討論会 講演要旨集, 169 (1982).
- 3) R. M. Golding and M. P. Halton, Aust. J. Chem., 25, 2577 (1972).
- 4) B. Bleaney, J. Magn. Resonance, 8, 91 (1972).
- 5) B. A. Levine, J. M. Thornton, and R. J. P. Williams, J.C.S. Chem. Commun., 1974, 669.
- 6) M. Hirayama, K. Akutsu, and K. Fukuzawa, Bull. Chem. Soc. Jpn., 55, 704 (1982).
- 7) M. Hirayama, Y. Kawamata, Y. Fujii, Y. Nakano, Bull. Chem. Soc. Jpn., 55, 1798 (1982); M. Hirayama and K. Kitami, J.C.S., Chem. Commun., 1980, 1030; M. Hirayama and Y. Kawamata, Chem. Lett., 1980, 1295.

## 26. ランタニドイオンの存在下におけるアミノ糖の<sup>1</sup>H- および<sup>13</sup>C-NMRスペクトル

(京工織大・工学・化学) 泉 邦彦

アミノ糖、とくにN-アセチル-D-グルコサミン(D-GlcNAc)とN-アセチル-D-ガラクトサミン(D-GalNAc)は、多糖や糖たんぱく質の構成成分として天然に広く分布している。演者はこれまでにこれらのアミノ糖の完全アセチル化誘導体について<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを解析し、とくにそれらとランタニドシフト試薬の間に形成される複合体の特徴を明らかにした。<sup>1)</sup> そこで今回はさらに遊離のアミノ糖(メチルグリコシド)について<sup>1</sup>H- および<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを測定し、各シグナルの化学シフト、スピン格子緩和時間(T<sub>1</sub>)、およびそれらのランタニドイオンによる変化の特徴を調べたので結果を報告する。

### 〔方法〕

<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、バリアン社製XL-200(200MHz)を用い、5mm試料管中の1.5M重水溶液について22°Cで測定した。通常、パルス幅は3.5μ秒、くりかえし時間は3秒、積算回数は約60に設定し、標準試料は内部基準として4,4'-ジメチル-4-シラペンタン-1-スルホン酸ナトリウム(δ=0.02)を用いた。一方、<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは、バリアン社製FT-80(20MHz)を用い、やはり5mm試料管中の1.5M重水溶液について35°Cで測定した。通常、パルス幅は10μ秒、くりかえし時間は7秒、積算回数は1500に設定し、標準試料は内部基準として1,4-ジオキサン(δ=67.28)を用いた。T<sub>1</sub>は180°-α-90°パルス法によってカルボニル炭素とその他の炭素について別個に測定し、6個以上の値に対するデータから最小自乗法によって求めた。誤差はカルボニル炭素については約10%であったが、その他の炭素については多くが5%前後に留まった。

### 〔結果と考察〕

1. Pr<sup>3+</sup>による<sup>1</sup>H-化学シフトの変化—

〔表1〕アミノ糖(メチルグリコシド)の<sup>1</sup>H-化学シフト(δ, ppm)およびPr<sup>3+</sup>(0.4M/1.5M糖)の添加によるその変化量(Δδ, ppm)

—表1にD-GlcNAcとD-GalNAcのメチルグリコシド(αおよびβ-アノマー)について、<sup>1</sup>H-化学シフト(δ)および1.5Mの糖溶液に0.4MのPr<sup>3+</sup>(硝酸塩)を加えたときのδの変化量(Δδ)を示す。Δδはこの濃度までは加

	Me-α-D-GlcNAc		Me-β-D-GlcNAc		Me-α-D-GalNAc		Me-β-D-GalNAc	
	δ	Δδ	δ	Δδ	δ	Δδ	δ	Δδ
H-1	4.76	0.13	4.45	0.12	4.80	0.13	4.39	0.11
H-2	3.92	0.49	3.69	0.35	4.17	0.41	3.90	0.31
H-3	3.71	0.20	3.54	0.16	3.89	0.13	3.72	0.11
H-4	3.49	0.01	~3.45	~0	3.99	-0.08	3.94	-0.08
H-5	3.67	0.06	~3.46	~0.05	3.91	0.03	3.69	0.02
H-6A	3.88	0.02	3.94	0.01	3.78	-0.02	~3.80	~-0.03
H-6B	3.78	0.03	3.76	0.01	3.78	-0.02	~3.79	~-0.03
OMe	3.39	0.07	3.51	0.02	3.40	0.05	3.52	0
NAc	2.05	0.63	2.04	0.65	2.06	0.68	2.05	0.72

いずみ くにひこ

えた  $Pr^{3+}$  の量に比例した。これらの帰属は主としてシグナルの多重度の解析とスピ  
ンデカップリング実験の結果にもとづいて行なった。まず、 $\delta$  については *GlcNAc*  
系の H-6A と H-6B がたがいに明確に異なるのに対して *GalNAc* 系ではそれらがほ  
んど同じ値を示すのが興味深い。これは両者のヒドロキシメチル基のコンホメー  
ションが著しく相違することを意味する。次に  $\Delta\delta$  は、いずれの糖についてもアセチ  
ルプロトンが最高であり、ついで H-2 と H-3 (または H-1) がこれに続くことが分かる。  
この誘起シフトパターンは  $Pr^{3+}$  の結合部位がアセトアミド基の近傍であることを示  
唆する。また、 $\alpha$ -アノマーと  $\beta$ -アノマーの間では、前者の H-2 と O-メチルプロトン  
の  $\Delta\delta$  が後者のそれらより大きく、一方、*GlcNAc* 系と *GalNAc* 系の間では、前者  
の H-3 と H-5 の  $\Delta\delta$  が後者のそれらよりわずかながら大きいことが注目される。

2. ランタニドイオン ( $Ln$ ) による  $^{13}C$ -化学シフトの変化——表2に前記の4種  
のアミノ糖について、 $^{13}C$ -化学シフト ( $\delta$ ) および 1.5M の糖溶液に 0.2M の  $Pr^{3+}$  (硝  
酸塩) を加えたときの  $\delta$  の変化量 ( $\Delta\delta$ ) を示す。これらの帰属は遊離糖に関する文献  
値<sup>2)</sup>を参考にして行なった。 $\Delta\delta$  は、 $^1H$ -NMR の場合と同様に 0.4M までは  $Pr^{3+}$  の  
濃度に比例したが、いずれの糖についてもカルボニル炭素の値が格段に高く、つい  
でアセチル基のメチル炭素と C-2 がこれに続くことが分かる。このパターンも  $^1H$ -  
NMR の場合と同様に  $Pr^{3+}$  の結合部位がアセトアミド基の近傍であることを示唆す  
る。次に  $\alpha$ -D-*GlcNAc* のメチルグリコシドについては、 $La^{3+}$ 、 $Eu^{3+}$  および  $Nd^{3+}$  (い  
ずれも硝酸塩) を加えたときの  $\Delta\delta$  値をも測定し、Reilley ら<sup>3)</sup> の方法にしたがっ  
て擬コンタクトシフトを表す幾何因子  $G_i$  を算出した。表2にはこれらの測定値と  
 $G_i$  の値も記されているが、後者は、カルボニル炭素に属する値の相対的な違いを  
別にすれば、大局的には  $Pr^{3+}$  を加えたときの  $\Delta\delta$  と同じ傾向を示す (少なくとも C-  
2 とアセチル基のメチル炭素について) ことが分かる。

[表2] アミノ糖 (メチルグリコシド) の  $^{13}C$ -化学シフト ( $\delta$ , ppm) およびランタニド  
イオン (0.2M/1.5M 糖) の添加によるその変化量 ( $\Delta\delta$ , ppm)

	Me- $\alpha$ -D- <i>GlcNAc</i>						Me- $\beta$ -D- <i>GlcNAc</i>	Me- $\alpha$ -D- <i>GalNAc</i>	Me- $\beta$ -D- <i>GalNAc</i>			
	$\delta$	$\Delta\delta$				$G_i^*$ (比)	$\delta$	$\Delta\delta$ ( $Pr^{3+}$ )	$\delta$	$\Delta\delta$ ( $Pr^{3+}$ )	$\delta$	$\Delta\delta$ ( $Pr^{3+}$ )
		$La^{3+}$	$Eu^{3+}$	$Nd^{3+}$	$Pr^{3+}$							
C-1	98.78	-0.05	0	-0.03	0.04	0.06	102.59	0.03	98.87	0.03	103.12	-0.04
C-2	54.39	-0.06	-0.14	0.07	0.16	0.12	56.21	0.19	50.62	0.16	53.02	0.16
C-3	71.92	0	0.09	0.01	0.04	0.04	74.72	0.01	68.54	-0.01	71.90	-0.12
C-4	70.86	-0.12	-0.06	-0.09	-0.06	0.05	70.79	-0.03	69.26	-0.04	68.62	-0.12
C-5	72.45	-0.11	-0.09	-0.06	-0.04	0.05	76.61	-0.02	71.44	0.01	75.82	-0.05
C-6	61.45	-0.11	-0.06	-0.07	-0.07	0.04	61.59	-0.05	61.99	0.01	61.74	-0.02
OMe	55.86	-0.05	-0.04	-0.01	0.03	0.05	57.63	0.15	55.85	0.02	57.69	0.08
C=O	174.94	0.12	-4.58	3.12	2.99	1.00	175.13	3.70	175.18	2.84	175.42	4.25
(C)Me	22.70	-0.06	0.16	-0.04	0.26	0.23	22.97	0.27	22.75	0.25	23.02	0.29

\* 幾何因子 (擬コンタクトシフトの大きさを示す)

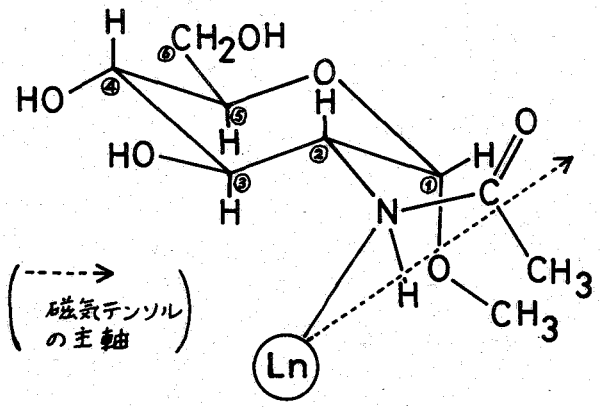
3.  $Gd^{3+}$ による $^{13}C$ -スピニング緩和時間の変化——表3にD-GlcNAc系の糖(1.5 M)に含まれる炭素原子の $T_1$ および $Gd^{3+}$ (0.3 mM)を加えたときのそれらの変化を示す。この表から両アノマー共に、 $Gd^{3+}$ の添加がカルボニル炭素の $T_1$ に最大の変化(減少)をもたらし、さらにアセチル基のメチル炭素やC-2などの $T_1$ もこの条件で確実に一定量減少することが分かる。そこでこれらの変化を、Barryら<sup>4)</sup>の方法にしたがって、 $Gd^{3+}$ が結合した分子の緩和速度(比)として表したのち、その6乗根の逆数を求めて $Gd^{3+}$ と各炭素原子の間の距離(比)を算出した。表3にはこの値

[表3] アミノ糖(メチルグリコシド)の $^{13}C$ -スピニング緩和時間( $T_1$ )および $Gd^{3+}$ の添加によるその変化

	1.5 M Me- $\alpha$ -D-GlcNAc			1.5 M Me- $\beta$ -D-GlcNAc		
	$T_1$		$Gd^{3+}$ との距離(比)	$T_1$		$Gd^{3+}$ との距離(比)
	無添加	+0.3 mM $Gd^{3+}$		無添加	+0.3 mM $Gd^{3+}$	
C-1	0.56	0.55	>1.4	0.61	0.58	1.4
C-2	0.60	0.50	1.24	0.59	0.50	1.24
C-3	0.51	0.47	>1.4	0.56	0.56	1.4
C-4	0.56	0.51	>1.4	0.56	0.51	1.4
C-5	0.54	0.51	>1.4	0.59	0.59	1.4
C-6	0.33	0.33	>1.4	0.33	0.33	1.4
OMe	1.87	1.44	1.44	1.93	1.64	1.65
C=O	10.80	0.85	1.00	9.77	0.92	1.00
(C)Me	1.92	0.93	1.12	1.81	0.99	1.15

を記されているが、これは前記の $^1H$ -および $^{13}C$ -化学シフトの変化に見られた傾向と同様に、カルボニル炭素が $Gd^{3+}$ にもっとも近い位置を占め、ついでアセチル基のメチル炭素とC-2がこのイオンに近接していることを示す。また、O-メチル炭素と $Gd^{3+}$ の間の距離がアノマー間で相対的に異なることも注目される。

4.  $Ln$ の結合部位——以上の実測データにもとづいて $Ln$ の結合部位をまず $\alpha$ -D-GlcNAcのメチルグリコシドについて求めると図1のようなになる。この結合部位は、まずアセトアミド基のコンホメーションについて、いくつかの文献<sup>5-7)</sup>を参照して、H-2-C-2-N-HおよびC-2-N-C-Oのねじれ角をそれぞれ $-160^\circ$ および $10^\circ$ に固定したのち、窒素またはカルボニル酸素との結合が可能な範囲内で、 $Ln$ とC-2、カルボニル炭素およびアセチル基のメチル炭素の間の距離を表3の値(比)に見合うように求めた結果得られたものである。これらの距離は表4に記されているが、 $Ln$ は窒素原子の非共有電子対が分布する側の近くからこれと結合し、その結合距離は約 $2.8 \text{ \AA}$ であると推定される。次にこの結合部位に関して、



[図1] Me- $\alpha$ -D-GlcNAc へのランタニドイオン( $Ln$ )の結合部位

磁気テンソルの主軸を、カルボニル炭素とNHプロトンの間のある位置(やや前者寄り)を $L_n$ と結ぶ方向に設定し、いくつかの炭素および水素原子( $L_n$ による誘起シフトが比較的大きいもの)の幾何因子を計算すると表4に記す値が得られたが、これらは表2の $G_i$ の実測値や、表1の $\Delta\delta$ 値の比にかなりよく一致し、図1の推定構造が妥当であることを示している。なお、 $\beta$ -D-GlcNAcやD-GalNAc系のメタルグリコシドについても、表1~表3に示したデータから見る限り、 $L_n$ は基本的には図1とほぼ同じ型でこれらと結合するものと思われるが、このようなアミノ糖と金属イオンの結合は生体内でのそれらの機能とのかかわりにおいて非常に興味深い。

[文献]

- 1) K. Izumi, *J. Biochem.*, 76, 535 (1974)
- 2) D. R. Bundle, H. J. Jennings, and I. C. P. Smith, *Canad. J. Chem.*, 51, 3812 (1973)
- 3) C. N. Reilley, B. W. Good, and J. F. Desreux, *Anal. Chem.*, 47, 2110 (1975)
- 4) C. D. Barry, J. A. Glasel, R. J. P. Williams, and A. V. Xavier, *J. Mol. Biol.*, 84, 471 (1974)
- 5) T. J. Schamper, *Carbohydr. Res.*, 36, 233 (1974)
- 6) R. D. Gilardi and J. L. Flippen, *Acta Crystallogr.*, B30, 2931 (1974)
- 7) F. Mo and L. H. Jensen, *Acta Crystallogr.*, B31, 2867 (1975)

(表4) Me- $\alpha$ -D-GlcNAc に結合するランタニドイオン( $L_n$ )といくつかの炭素および水素原子の間の距離( $r_i$ )と幾何因子( $G_i$ )

		$r_i$ (Å)	$\theta_i^*$ (度)	$G_i^{**}$ (比)
炭素	C-2	3.7	45	0.14
	C=O	3.0	10	1.00
	(C)Me	3.4	40	0.27
水素	H-2	3.7	45	0.85
	H-3	3.8	50	0.38
	NAc	3.5	45	1.00

\*  $\theta_i$ :  $L_n$ と各原子を結ぶ方向と磁気テンソルの主軸の方向がなす角度

\*\*  $G_i = (3 \cos^2 \theta_i - 1) / r_i^3$

## 27. 縦緩和時間 ( $T_1$ ) の構造決定への応用

(三共、分析代謝研究所) ○春山英幸 近藤三千男

(はじめに)

$^3J_{H-H}$ 、 $^3J_{C-H}$  等の二面体角依存性を用いる有機化合物の立体配置の決定は、日常行なわれている事であるが、しばしばこのような手法によっては帰属の困難な場合に遭遇する。そうした場合シフト試薬の利用、NOE効果の観測等が併用されるがさらに可能な手法の一つとして  $T_1$  の測定が考えられる。小から中程度の大きさの分子の  $T_1$  は双極子相互作用によって定まり、核間距離の関数となるから、実測の  $T_1$  を分子構造と結び付けて定量的な解析が行なえれば、立体配置決定の有効な手段となるであろう。そこで我々は、ある構造に対する三次元座標を生成し、それに基づいてプロトン  $T_1$  の計算を行なうプログラムを開発し、ビシナル結合定数を用いた解析では帰属を確定できなかった *Sapramycin A* の C21 位のニトリルの配置を決定できたので報告する。

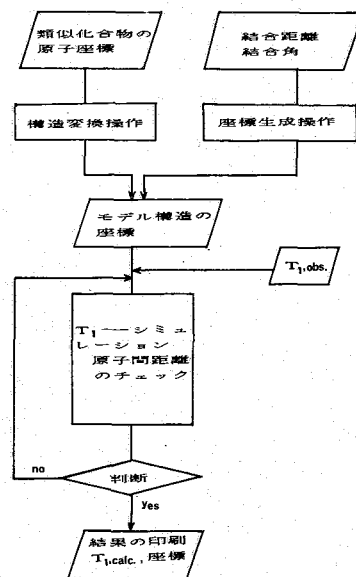
(解析法)

図1にプロトン  $T_1$  を用いる解析法の手順を示す。まず考え得るいくつかの可能な立体配置を持つ分子の座標を計算する。次にそれぞれについて  $T_1$  の計算を行ない実測の  $T_1$  を最もよく説明する立体配置を正しい配置とする。図1の長方形で囲んだ操作がプログラム化され、VAX 11/750 上で会話型に処理される。以下各操作について述べる。

a) 座標の生成 図1に示すように (i) X線結晶解析された類似分子の座標から置換基の変更などを行なって組立てる、(ii) 標準的な結合距離、結合角を用いて計算する、の二つの方法で行なえる。後者では、Cippenらの *Distance Geometry* 法のアルゴリズムを用いているので、結合定数等によって可能なコンホメーションに制限を加え、計算量を減らすことができる。

b)  $T_1$  の計算 基本的に Akasaka<sup>2)</sup> の方法に従った。すなわちルコのプロトンが相互に影響を与えつつ緩和する過程を記述する常微分方程式(1)を数値的に解き、得られた緩和曲線より50%緩和するまでの初期勾配を求め  $T_{1, calc}$  とした。数値解法としては d) に述べる独自のアルゴリズムを用いた。分子には全体としての等方回転を仮定し、単一の回転相関時間で記述した。ただしメチル基プロトン及びメチル基と他のプロトンを結び合わせるやま ひでゆき こんどう けちお

図1  
 $T_1$  解析の流れ図





トルには内部回転を考慮し、初期相関時間を用いた。これら相関時間は可変のパラメータとして、各モデル構造ごとに実測値との一致が最良となるように、計算の過程で決定した。

$$-\frac{dZ_i}{dt} = \left( \sum_{j \neq i} \rho_{ij} \right) Z_i + \sum_{j \neq i} \sigma_{ij} Z_j \quad (i=1, n) \dots (1)$$

ただし  $Z_i = \frac{I_0 - I_t}{2 I_0}$

$I_0$  ... 平衡磁化の大きさ

$I_t$  ... 180°パルスからt秒後の磁化の大きさ

$$\rho_{ij} = \frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r_{ij}^6} \left\{ \left( \frac{1}{10} \right) \cdot \tau_c + \left( \frac{3}{10} \right) \cdot \frac{\tau_c}{1 + \omega_H^2 \tau_c^2} + \left( \frac{6}{10} \right) \cdot \frac{\tau_c}{1 + 4\omega_H^2 \tau_c^2} \right\}$$

$$\sigma_{ij} = \frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r_{ij}^6} \left\{ - \left( \frac{1}{10} \right) \cdot \tau_c + \left( \frac{6}{10} \right) \cdot \frac{\tau_c}{1 + 4\omega_H^2 \tau_c^2} \right\}$$

$r_{ij}$  は  $H_i, H_j$  間の距離

$\gamma_H, \omega_H$  等は通常の意味

c) 正しい配置の選択 (2)式で定義する  $\phi$  値を指標とし、その値が小さいほど実測値と計算値の一致は良好であるが、配置の最終的決定には  $T_1$  の値の妥当性、結合定数等のデータとの整合性にも留意した。

$$\phi = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left\{ \left( \frac{1}{T_{1,obs}} - \frac{1}{T_{1,calc}} \right) / \frac{1}{T_{1,obs}} \right\}^2} \dots (2)$$

d) 緩和方程式の数値解法 汎用性を念頭に、解の不安定現象が起りにくく、長い区間にわたって誤差の蓄積が回避できる以下のアルゴリズムを用いた。説明の都合上(1)を、(3)のように書き直す。

$$-\frac{dZ}{dt} = A \cdot Z = f(Z) \dots (3) \quad \text{ただし} \quad A = \begin{pmatrix} \sum_{j \neq 1} \rho_{1j} & \sigma_{12} & \dots & \sigma_{1n} \\ \vdots & & & \\ \sigma_{n1} & & & \sum_{j \neq n} \rho_{nj} \end{pmatrix} \quad Z = \begin{pmatrix} Z_1 \\ \vdots \\ Z_n \end{pmatrix}$$

そして時刻  $t_{m-1}, t_m, t_{m+1}$  における解  $Z_{m-1}, Z_m, Z_{m+1}$  の間に成立する補間多項式(4)を、(3)に適用して(5)を得る。ここで  $Z_{m-1}, Z_m$  が定まれば(5)は  $Z_{m+1}$  について連立方程式となるから  $Z_{m+1}$  は容易に求まり、最初の二点をルンゲクッタ法で求めれば、後は逐次的に  $Z_{m+1}$  が求まることになる。このアルゴリズムによれば、刻み巾  $h$  についての制約を逃れることができ有利である。

$$Z_{m+1} = \frac{4}{3} Z_m - \frac{1}{3} Z_{m-1} + \frac{2}{3} h f(Z_{m+1}) \dots (4) \quad h = t_m - t_{m-1} = t_{m+1} - t_m$$

$$(E - \frac{2}{3} h A) \cdot Z_{m+1} = \frac{4}{3} Z_m - \frac{1}{3} Z_{m-1} \dots (5)$$

(実験法)

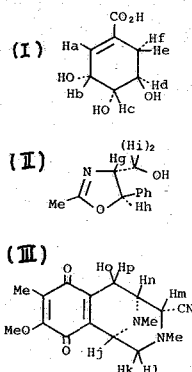
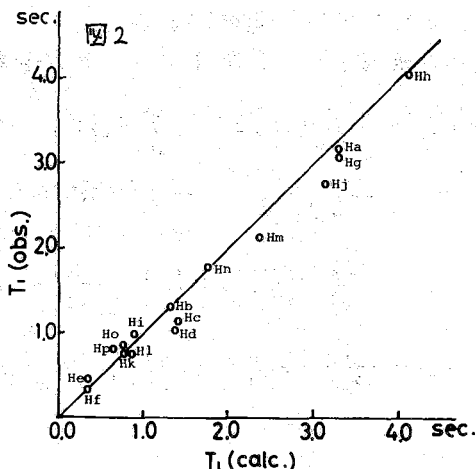
測定は日本電子 GX-400 FT-NMR 装置を用い、400 MHz で行なった。試料はすべて溶媒 ( $CDCl_3, C_6D_6, DMSO$ ) に 0.1 ~ 0.5 % となるように溶解し、真空ラインをつないで凍結-減圧-融解を 5, 6 回繰り返した後密封し、24.0 ± 0.5 °C で測定した。 $T_1$  測定は Inversion recovery 法を用い、50% 緩和までのデータに対して(6)式を適用して、線型最小二乗法によって求め  $T_{1,obs}$  とした。

$$\ln(I_0 - I_t) = -t/T_1 + C \quad C: \text{定数} \dots (6)$$

(結果、及び考察)

a) モデル分子による検討 方法論の検証のため、図2に示す骨格の異なる(I)

~(II)の分子について $T_1$ の計算と、それによるジアステレオマーの識別を試みた。計算に用いた座標は類似分子の座標から求めた。図2は $T_1$ の計算値を横軸に、実測値を縦軸にとり比較したもので、傾き1の直線上にほぼ載っており、用いた仮定は妥当なものと考えられる。表1は(II)の化合物について、 $H_g$ 、 $H_h$ が *cis*、*trans* 二つの場合を仮定して



$T_1$ の計算を行ない実測値との比較を行なった例で、正しい配置は *trans* である事が容易に判断できる。(I)、(III)についても同じく正しいジアステレオマーの識別が可能であった。

4.) Saframycin A (IV) の C 21 位

C N 基の立体配置決定 (IV) は、

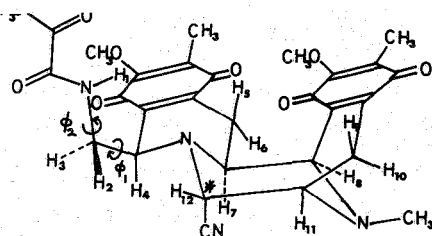
*Streptomyces lanendulal* の産する抗生物質で、抗菌、抗腫瘍活性を有する<sup>3)</sup>。その構造は<sup>13</sup>C-NMRを用いて右に示す如く決定されたが、C 21 位の立体配置は、400 MHz <sup>1</sup>H-NMRによるビシナル結合定数の解析からは決定できなかった<sup>5)</sup>。表2に示すように、<sup>3</sup>J<sub>H11-H12</sub>は2,3 Hzであるが、この位置にCN基を持たないSaframycin CにおいてC 21 位のメチレンプロトンはH<sub>11</sub>と2~3 Hzのカップリングを示すため、どちらのプロトンがCNに置換したのか判断しなからである。そこで、この問題について $T_1$ を用いる解析を検討した。

図3はSaframycin Aの主要部のスペクトルである。その他、H<sub>1</sub>が $\delta$  1.35 ppmにbroadなdoubletとして観測される。シグナルの分離は良好で、H<sub>2</sub>を除き $T_1$ を求めることができた。表3に測定結果を示す。計算はX線結晶解析されたSaframycin Cの座標からC 21 位のCNが $\alpha$ -axial、 $\beta$ -equatorialをとる構造の座標を求めて行なった。キノン環のメチル、メトキシ基プロトン、及び $\alpha$ -ジオン側鎖の先端のメチルプロトンは計算に加えず、H<sub>1</sub>~H<sub>12</sub>及びNメチルプロ

$T_1$  values for compound (II) 表1

	Obs.	Calc. (trans)	Calc. (cis)
H <sub>g</sub>	3.10	3.27	3.20
H <sub>h</sub>	4.04	4.10	3.21
H <sub>i</sub>	0.98	0.89	0.94 (sec)
q		0.07	0.15
$\tau_c$ (sec)		$3.0 \times 10^{-11}$	$3.0 \times 10^{-11}$

特にH<sub>h</sub>に大きな差異が生じている。

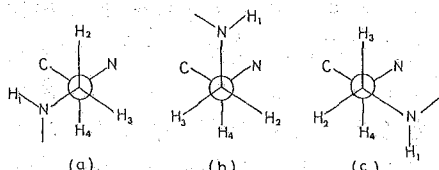
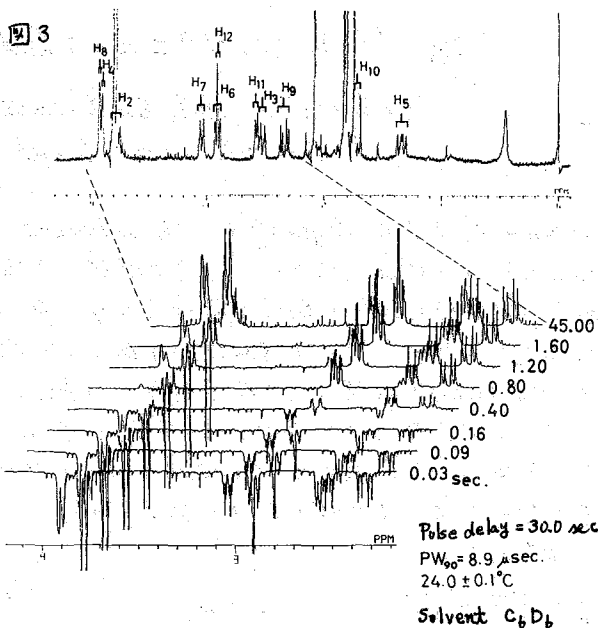


\*... C21 Saframycin A (IV)

表2 Coupling constants for Saframycin A

	Obs.	Calc. (Hz)
J(11-12)	2.3	-
J(1-2)	9.5	9.4
J(1-3)	4.0	3.7
J(2-4)	1.5	2.0
J(3-4)	4.0	5.5

トンのみを考慮した。α-ジオン側鎖の内部回転角 $\phi_1$ ,  $\phi_2$  (IVの構造式参照)については、ビシナル結合定数、及びVan der Waals 接触等の検討から、下図に示すように、 $\phi_1$ は可能な三つのゴーシュ配座のうち(b), (c)が1:1の割合で存在し $\phi_2$ はH1とH2がトランスとなるコンホメーションが優先するものと仮定した。この場合Karplus型の式を用いて計算した結合定数は実測の値と良好一致を示し、妥当な仮定と思われる。(表2、参照)



以上の条件のもとで計算した結果を表3に示す。その結果α-axialの方が $\rho$ 値が小さく、またCNの配置によって核間距離が大きく変動するH12, H7, H4は、いずれもα-axialの場合に実測値との一致が良好である。H5, H8は実測値との一致が悪いがCNの配置には依存せず、この理由については尚検討中である。以上C21位のニトリル基の配置はα-axialと決定されるが、これは反応性の検討より導かれる結論と一致する。

(文献)

1. a) G. M. Crippen "Distance Geometry and Conformational Analysis", Research studies Press (1981)
- b) J. G. Wenger et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 22, 34 (1981)
2. K. Akasaka et al., J. Magn. Resonance, 19, 413 (1975)
3. T. Arai et al., J. Antibiot. Tokyo, 29, 398 (1976)
4. T. Arai et al., Experientia, 36, 1025 (1980)
5. J. W. Loun et al., Can. J. Chem., 59, 2945 (1981)
6. T. Arai et al., Tetrahedron Lett., 2355 (1979)

T<sub>1</sub> Values for Saframycin A 表3

	Obs. <sup>a</sup>	Calc. (α-CN)	Calc. (β-CN)
H1	1.16±0.03	1.21	1.40
H3	0.37±0.01	0.40	0.40
H4	1.25	1.26	1.40
H5	0.49±0.05	0.38	0.36
H6	0.44±0.02	0.37	0.37
H7	1.27±0.08	1.32	1.01
H8	1.13	1.49	1.49
H9	0.39±0.03	0.34	0.38
H10	0.36±0.05	0.32	0.32
H11	0.89±0.09	0.89	0.89
H12	0.67±0.03	0.85	1.25 (sec)
$\rho$		0.16	0.23
$\tau_c$ (sec) <sup>b</sup>		0.84×10 <sup>-10</sup>	0.84×10 <sup>-10</sup>

<sup>a</sup> 異なる試料を用いた三回の実験の(平均値)±3σ  
<sup>b</sup>  $\tau_c$ は分子全体の等方的回転運動による回転相関時間で、α-CN, β-CN, 独立に実測値との一致が最良であるように定めた。Nメチルプロトンについては内部回転を考えた実効相関時間  $\tau_c^{eff} = 0.2 \times 10^{-10}$  secを与えた。

# 28. <sup>1</sup>H T<sub>1</sub> 及び NOE による Leukotriene 系化合物の構造解析

(Alberta 大, Merck-Frosst Canada Inc.)\* ○杉浦真希子

H. Beierbeck, G. Kotovych, P.C. Belanger\*

<序>

Leukotriene 類は、Prostaglandin, Thromboxane, Prostacyclin などと並んで、Arachidon 酸から代謝される炭素20個の鎖状生理活性物質で近年特に注目を集め、その合成研究、作用機序に関する研究が数多く行われてきている。中でもその二重結合の configuration については合成的手法などで明らかにされており、その水溶液中での conformation が特にその作用機序との関連から興味を持たれるところとなつてきている。今回我々は、Leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>, 1) と Leukotriene D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>, 2) を取り、これらの水溶液中での conformation を <sup>1</sup>H selective 及び nonselective T<sub>1</sub> と NOE を使って解析する試みを行った。又同時に、それぞれの分子運動の回転相関時間 τ<sub>c</sub> を求めた。

$$\begin{cases} \sigma_{ij} = W_2^{ij} - W_0^{ij} & \text{--- ①} \\ \rho_{ij} = W_0^{ij} + 2W_1^{ij} + W_2^{ij} & \text{--- ②} \end{cases}$$

$$W_0^{ij} = \frac{1}{10} \gamma^4 \kappa^2 \tau_c / r_{ij}^6 \quad \text{--- ③}$$

$$W_1^{ij} = \frac{3}{20} \gamma^4 \kappa^2 \tau_c / (1 + W^2 \tau_c^2) r_{ij}^6 \quad \text{--- ④}$$

$$W_2^{ij} = \frac{6}{10} \gamma^4 \kappa^2 \tau_c / (1 + 4W^2 \tau_c^2) r_{ij}^6 \quad \text{--- ⑤}$$

$$T_1^S = 1/R_d, \quad T_1^{ns} = \frac{1}{R_d + S_d} \quad \text{--- ⑥}$$

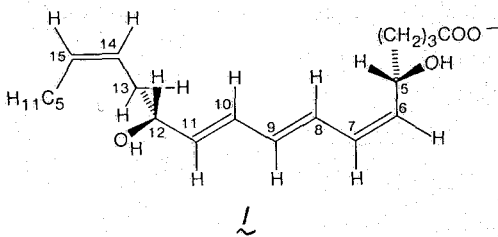
$$\therefore R_d = \sum_n N_n \rho_{dn} + \rho^*$$

$$S_d = \sum_n N_n \sigma_{dn}$$

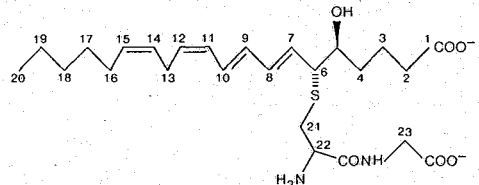
$$f_d(s) = \sum_s N_s \sigma_{ds} / R_d - \sum_{n \neq d, s} N_n \sigma_{dn} f_n(s) / R_d \quad \text{--- ⑦}$$

(ここで N<sub>n</sub> は各個核の総数)

それぞれこの H-H 間の距離からそれぞれ T<sub>1</sub><sup>S</sup>, T<sub>1</sub><sup>ns</sup> 及び NOE の値と τ<sub>c</sub> を計算すること



1



2

杉浦真希子 H. バイエルベック G. コトウイッチ P.C. ベランジェ

今、分子内双極子緩和を考えると、結合2つの核スピン i, j 間の交叉緩和項 ρ<sub>ij</sub>, 直接緩和項 W<sub>0</sub><sup>ij</sup> は①, ②式で表わされる。ここでスピン格子遷移確率 W<sub>0</sub><sup>ij</sup>, W<sub>1</sub><sup>ij</sup>, W<sub>2</sub><sup>ij</sup> はそれぞれ③, ④, ⑤式で表わされる。あるプロトン d について考えると、そのスピン格子緩和時間 (T<sub>1</sub><sup>S</sup>: selective T<sub>1</sub>, T<sub>1</sub><sup>ns</sup>: nonselective T<sub>1</sub>) は⑥式、又プロトン s を飽和した時の d における NOE (f<sub>d</sub>(s)) は⑦式のように与えられる。従って T<sub>1</sub><sup>S</sup>, T<sub>1</sub><sup>ns</sup> 及び NOE はそれぞれ独立に H-H 間の距離 r<sub>ij</sub> と回転相関時間 τ<sub>c</sub> の関数となり、1つの conformation を仮定すれば、その関係が

が出来る。

我々は、LTB<sub>4</sub>及びLTB<sub>4</sub>について、 $T_1^{NS}$ ,  $T_1^{NS}$  及びNOEを測定し、分子の rigid 部分についてその実験値と計算値が一致するようたを求めた方法で、一巻半並の conformation を検討した。

〈実験〉 LTB<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>のK塩は、あらかじめの-OH, -NH<sub>2</sub>基のHをDに置換し100% D<sub>2</sub>Oに溶かし、脱ガスしたサニナルを用いた。<sup>1</sup>H NMRはBruker WH-400/D3, Aspect 2000 data systemを用いた。Nonselective T<sub>1</sub>は180°-2-90°方法で、selective T<sub>1</sub>は、特定のシグナルをdecoupler pulseで選択的に180°反転させ、時間を経てnonselectiveの90° pulseを用いる方法で得た。NOEは差スペクトルを用い、拡大してplotした知トペーパーをカットし、その重量を測って求めた。

T<sub>1</sub>, NOEの計算は、HH結合定数などを参考にいくつかのconformationを設定し、それについてT<sub>1</sub>とNOE別個に、実験値と一致よく一致するを求め、それらを比較検討して最適なconformation及びそれを求めた。両分子共、ほぼC5~C15部分をrigid部分とし、同一の回転相関時間を持つと仮定し、他の部分は異なった運動をしているとして計算から省いた。

〈結果と考察〉 表IにLTB<sub>4</sub>のT<sub>1</sub><sup>S</sup>, T<sub>1</sub><sup>NS</sup>の実験値と計算値を示してある。2つの異なった濃度間でのT<sub>1</sub><sup>NS</sup>の実験値に差が見られぬので、この濃度付近では、分子の凝縮などの分子間の相互作用は無視出来ると思われる。又少量のEDTAを添加して測定した値も、添加前の値と変わりなく、これは常磁性物質の混在がどいこと、故って得られた実験値の信頼性を示すものである。表IIにはNOEの観測値と計算値を示してある。得られた回転相関時間τ<sub>c</sub> = 3.0 × 10<sup>-10</sup> sec. とはり、又最終的に計算に用いた最適なconformationは表IVに示した通りである。NOE, T<sub>1</sub>共その実験値と計算値は、2, 3を除いて比較的よく一致してあり、選んだconformationの妥当性を示している。

表I

The Selective and Nonselective Proton Relaxation Times for the Leukotriene B<sub>4</sub> Protons at 400 MHz.<sup>1</sup>

Sample		H2	H7	H8	H11	H12	H13	H15	H16
3.4 × 10 <sup>-3</sup> M LTB <sub>4</sub>	T <sub>1</sub> <sup>NS</sup> <sub>obs</sub>	0.71	0.95	0.69	1.15	0.98	0.44	1.52	0.77
1.6 × 10 <sup>-3</sup> M LTB <sub>4</sub>	T <sub>1</sub> <sup>NS</sup> <sub>obs</sub>	0.67	0.93	0.72	1.06	0.88	0.42	1.45	0.75
$\left. \begin{matrix} 1.6 \times 10^{-3} \text{ M LTB}_4 \\ 0.8 \times 10^{-4} \text{ M EDTA} \end{matrix} \right\}$	T <sub>1</sub> <sup>NS</sup> <sub>obs</sub>	0.76	0.95	0.71	1.16	0.99	0.43	1.45	0.75
	T <sub>1</sub> <sup>NS</sup> <sub>av</sub>	0.71	0.94	0.71	1.12	0.95	0.43	1.47	0.76
	T <sub>1</sub> <sup>NS</sup> <sub>calc</sub>		0.94	0.65	1.06	0.72			
	T <sub>1</sub> <sup>S</sup> <sub>obs</sub> (av)		1.08	0.83	1.19				
	T <sub>1</sub> <sup>S</sup> <sub>calc</sub>		1.10	0.77	1.25				

Correlation time τ<sub>c</sub> = 3.0 × 10<sup>-10</sup> sec.

1. T<sub>1</sub><sup>NS</sup> is estimated as 0.96 sec for H-9,10 and 1.10 sec for H-6. This compares with calculated values of 0.96 for H9,10 and 0.99 for H-6. These T<sub>1</sub> values are for second order and overlapping multiplets.

表 II

Observed and Calculated NOE's for LTD<sub>4</sub> in D<sub>2</sub>O  
(.003 M in D<sub>2</sub>O) at 400 MHz

Saturated Proton		Observed Protons				
		7	8	12	13	15
6 14	Calc					
	Obs	8.2	0.4	3.1	0.5	6.3
7	Calc	6				
	Obs	8.6				
8	Calc	5	7	10		
	Obs	7.6	2.1	6.5		
9 10	Calc	8	11	12		
	Obs	5.9	9.6	4.9		
11	Calc	9	12	13		
	Obs	3.9 <sup>a</sup>	7.5	6.3		
13	Calc	11	12	14	15	
	Obs	6.5	1.6	0.4		
13	Calc	11	12	14	15	
	Obs	5.3	7.8	5.2	0.7	

Optimized correlation time  $\tau_c = 3.0 \times 10^{-10}$  sec.

(a) The observed signal is very close to the saturated signal.

表 III

Proton selective and nonselective relaxation times for LTD<sub>4</sub> in D<sub>2</sub>O (0.0025 M)<sup>a</sup>

	$T_1^{NS}(\text{obs})$	$T_1^{NS}(\text{calc})$	$T_1^S(\text{obs})$	$T_1^S(\text{calc})$
H2	0.64			
H6	0.48	0.55	0.74	0.62
H7	1.13	1.12	1.23	1.26
H8 <sup>b</sup>	0.88	.87		
H9 <sup>b</sup>	0.88	0.98		
H10	0.81	.65	0.97	0.73
H11	1.11	1.00	1.07	1.13
H12	1.42			
H13	0.47			
H16	0.83			
H21	0.40			
H21'	0.40			
H23	1.02			

a The fit to the data was obtained using a correlation time of  $3.2 \times 10^{-10}$  sec.

b Values of the  $T_1$ 's were determined simultaneously because of multiplet overlap.

一方、LTD<sub>4</sub> についても同様に表 III に T<sub>1</sub> の実験値と計算値と、又表 IV に NOE の実験値と計算値を示してある。H6 及び Peptide 部分の H についても可能な H は NOE の実験を試みたが、いずれの H にも NOE を観測することはおこらなかつた。これは Peptide 部分がより遅い運動をしており、従って ω<sub>c</sub> が大きく NOE が 0 に近くなっていることが示される。最終的に計算に用いた最適化

Conformation は表 IV に示した通りであり、その回転相関時間は  $3.2 \times 10^{-10}$  sec. である。LTD<sub>4</sub> 同様、LTD<sub>4</sub> についても、

NOE、T<sub>1</sub> 共に実験値と計算値はほぼよい一致を示している。

表 IV に示した最適化 Conformation は、LTD<sub>4</sub> と LTD<sub>4</sub> を比較すると、C6 から後は C12-C11 部分を

表IV

The nuclear Overhauser effect for LTD<sub>4</sub> in D<sub>2</sub>O  
(0.0025 M, pH -9.0)<sup>a</sup>

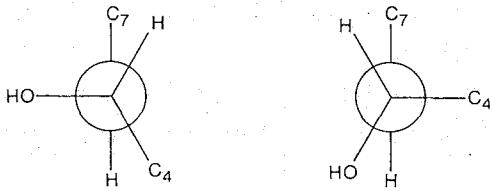
Sat'd	observed							
	H-5'	H-7	H-8	H-9	H-10	H-12	H-13	H-14
H-7	small			small				
H-8,9		6.0% (7.7)			4.0% (4.5)%			
H-10			4.5% (4.6)				1.8% (1.0%)	
H-11						8% (5.6%)		
H-13					7.7% (7.6%)	7.4% (6.9%)		11.0%

a. These data were optimized using a correlation time of  $3.2 \times 10^{-10}$  sec.  
Values in brackets represent the calculated  $\rho$ 's.

除いてはほぼ同じよう  
な conformation をと  
っていることが解る。  
一方 C5-C6 付近は、  
互いの置換基の  
違いを反映し、  
LTD<sub>4</sub> の場合は2つ  
の回転異性体の平衡  
にあり(下図参照)、  
一方 LTD<sub>4</sub> は1つの  
conformation を考  
えることが出来る。  
これらの conformation

は、force-field 計算の結果ともよく一致が見られる。

又 rigid 部分について得られたことはわかりに LTD<sub>4</sub> の方が大きく、C6 位に置換した Peptide 鎖の影響とも考えられるが、大きな Peptide 鎖が置換した割にはその差があまり大きくなく、むしろ、側鎖にもわかかわらず、rigid 部分の回転運動にはあまり差が見られずと結論することが出来る。



Conformations about C5-C6

本方法は、<sup>1</sup>H NMR を使う為、比較的少量のサンプルにも適用出来る。又従来の方法では限界のあった flexible な系も取扱えることから、今後、複雑な生理活性物質などの構造解析、又分子運動の議論などに有用な手段となりうることを期待される。

表V 最適な conformation と rigid 部分の回転相関性,  $\tau_c$

LTD <sub>4</sub> (L)	LTD <sub>4</sub> (E)
C1 ~ C5 : trans	C1 ~ C6 : trans
$\langle H5-C5-C6-C7 \rangle = \pm 30^\circ$	$\langle C4-C5-C6 \rangle = 60^\circ$
C6 ~ C11 : trans	$\langle H6-C6-C7-H7 \rangle = 180^\circ$
$\langle H12-C12-C11-C10 \rangle = \pm 30^\circ$	C6 ~ C12 : trans
C12-C13 : Three equally probable rotamers	C12-C13 : Three equally probable rotamers
C13 ~ C20 : trans	C13 ~ C20 : trans
$\tau_c = 3.0 \times 10^{-10}$ sec.	$\tau_c = 3.2 \times 10^{-10}$ sec.

## 29. 二次元NMRによる天然物の構造解析

(東レリサーチセンター, 曾田香料\*)  
 ○ 楢垣冬彦, 阿部明, 塩谷泉, 松浦佑次\*

**序** 二次元NMRの特長は化学シフト(およびスピン結合定数)を二次元に展開することにより、シグナルの重なりを取り除き、核スピン間の相互作用を検知する点にある。二次元に展開することによりシグナルの分離は飛躍的に向上するため従来の一次元NMRでは解析困難な有機化合物の構造解析をおこなうこともできる。現在構造解析に有用ないくつかの二次元NMRの手法が報告されているが、本研究ではこれらの手法を組み合わせた効率的な構造解析法について報告する。表1に我々が用いた戦略を示す。まずINEPT法によりCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CHおよび四級炭素の区別をおこなった後、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>Cシフト相関二次元NMRにより<sup>13</sup>C核に直接結合した<sup>1</sup>H核を決定する。つづいて<sup>1</sup>Hシフト相関二次元NMRにより<sup>1</sup>H核の結合を明らかにする。この段階で分子の骨格構造が決定する。次に立体構造を解明するためNOE相関二次元NMRおよび差スペクトルを測定する。このようにして複雑な有機化合物の構造解析も一義的におこなえる。本研究では *spathulenol* を例としてこの方法の有効性を示す。

**解析結果** *spathulenol* (図1)はユズ油から単離される三環のセスキテルペンである。図2(a)に400 MHz <sup>1</sup>H NMRスペクトル, 図2(b)に100 MHz <sup>13</sup>C NMRスペクトルを示す。一般に環状のセスキテルペン類の<sup>1</sup>H NMRスペクトルの解析は化学シフ

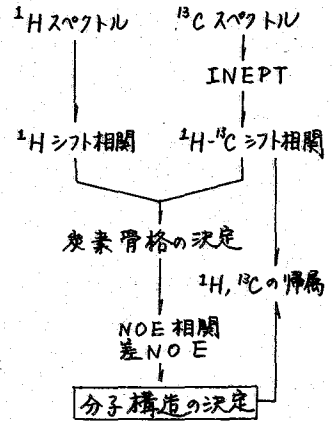
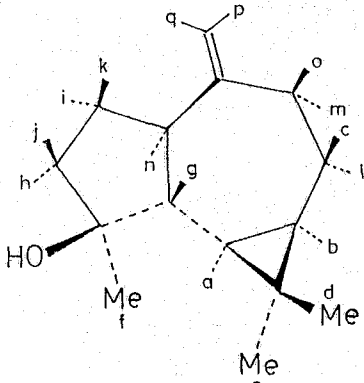
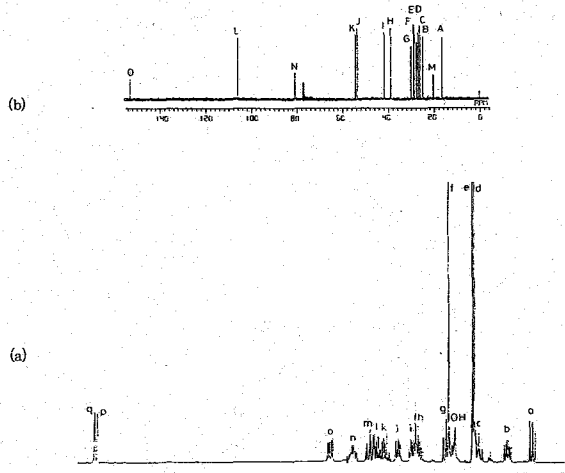


表1 二次元NMRによる構造解析法



(図1) *spathulenol* の分子構造、および <sup>1</sup>H の帰属

いながきふゆひに、あべ あきら, (おのや いずみ, まつうら ゆうじ)

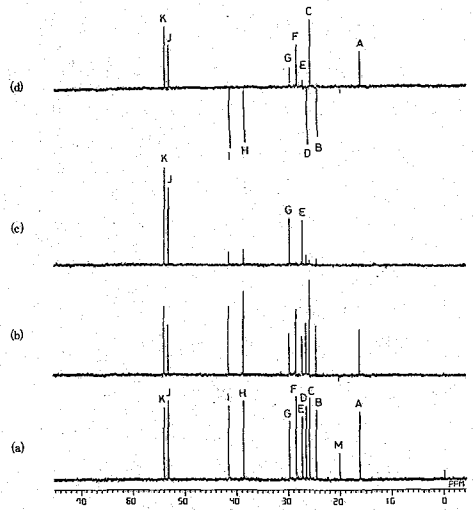


(図2) *spathulenol* の (a) 400 MHz <sup>1</sup>H NMR スペクトル および (b) 100 MHz <sup>13</sup>C NMR スペクトル



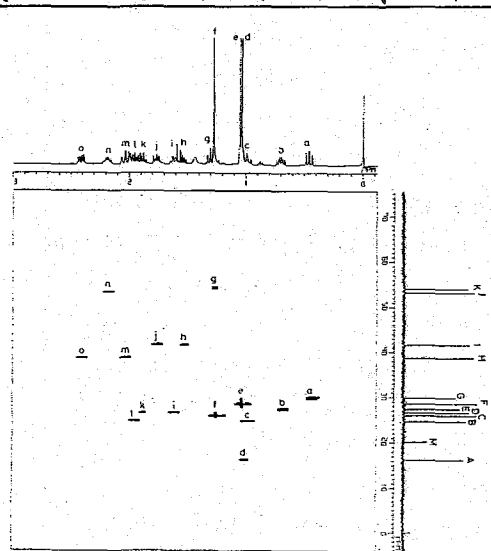
トが接近していることや、複雑なスピン系のネットワークの存在のため、高磁場のNMRを用いても困難な場合が多い。

INEPT法 まず *spathulenol* の  $^{13}\text{C}$  核の原子団の区別をおこなうため INEPT の測定をおこなった。図3(b)~(d)はそれぞれ待時間  $\Delta = 1.8 \text{ msec}$ ,  $\Delta = 3.7 \text{ msec}$ , および  $\Delta = 5.7 \text{ msec}$  における INEPT スペクトルである。図3(d)では  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}$  は上側,  $\text{CH}_2$  は下側にひくから, I, H, D, B は  $\text{CH}_2$  に帰属することができる。図3(c)では  $\text{CH}$  のみ観測されることより, K, J, G, E は  $\text{CH}$  に, (したがって A, C, F は  $\text{CH}_3$  に帰属される。以上より *spathulenol* は  $\text{CH}_3$  3個,  $\text{CH}_2$  5個,  $\text{CH}$  4個, および四級炭素 (M, N, O) 3個よりなることがわかる。更に不飽和度の計算をおこなうと, *spathulenol* は三環構造をもつこと, 化学シフトの考察より  $\text{C}=\text{CH}_2$  の部分構造をもつ三級アルコールであることがわかる。



(図3) *spathulenol* の INEPT スペクトル  
(a) normal spectrum (b)  $\Delta = 1.8 \text{ msec}$   
(c)  $\Delta = 3.7 \text{ msec}$  (d)  $\Delta = 5.7 \text{ msec}$

$^1\text{H}-^{13}\text{C}$  シフト相関二次元 NMR 炭素核に直接結合した  $^1\text{H}$  を明らかにするために  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  シフト相関二次元 NMR の測定をおこなった。図4は *spathulenol* の  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  シフト相関二次元スペクトルである。横軸は  $^1\text{H}$  の化学シフト, 縦軸は  $^{13}\text{C}$  の化学シフトであり, 直接結合した  $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  核について相関ピークが観測される。たとえば,  $\text{CH}$  炭素である K と G のプロトンが直接結合していることがわかる。特に非等価のメチレンプロトンが存在する場合には, これらのプロトンを容易に帰属できる点で有効である。 $^1\text{H}$  シグナルが重なっている場合でも  $^{13}\text{C}$  のシグナルの分離を利用して  $^1\text{H}$  シグナルを分離できる。



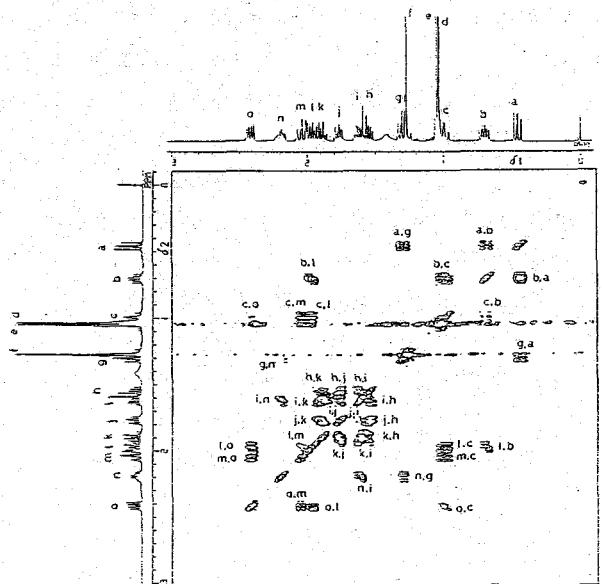
(図4) *spathulenol* の  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  シフト相関二次元スペクトル

$^1\text{H}$  シフト相関二次元 NMR 直接炭素核に結合したプロトンの帰属がつかず, 次はこれらのプロトンが分子内でどのように並んでいるか調べる必要がある。この目的のために  $^1\text{H}$  シフト相関二次元 NMR の測定をおこなった。図5に *spathulenol* の  $^1\text{H}$  シフト相関二次元スペクトルを示す。スピン結合を結ばれたプロトンの間に交

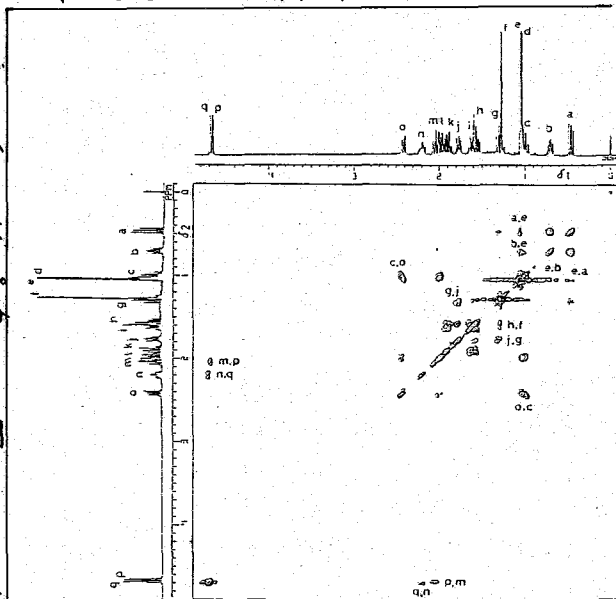
ピークが観測されている。たとえば a は b および g と、g は n との間に交叉ピークが存在することより、b - a - g - n の並びが決定される。なお、この測定では  $90^\circ - t_1 - 45^\circ - t_2$  のパルス系列を用いているため、 $90^\circ - t_1 - 90^\circ - t_2$  の測定にくらべて対角ピークの強度は減少し、対角ピークに隣接した交叉ピーク、a, g, n, i, l, m も明瞭に観測できる点の特徴である。この測定では  $J \sim 3 \text{ Hz}$  以上の比較的大きなスピン結合定数で結ばれた核スピン間の相関を測定しており、二次元スペクトル上の交叉ピークより、vicinal 結合したプロトンの配列を解明することができる。図5より、図7に示す実線部分の骨格がわかる。しかし、M, N, O 三つの四級炭素がどの位置にくるか、この段階で決定することはできない。そこで  $90^\circ - \Delta - t_1 - 45^\circ - \Delta - t_2$  のパルス系列を用いて測定したのが図6のスペクトルである。 $\Delta = 300 \text{ msec}$  に設定して測定すると  $J \sim 1 \text{ Hz}$  の小さなスピン結合定数で結ばれた核スピン間の相関を観測することができる。たとえば a と e, b と e の間に交叉ピークが存在する。これは、a および b と e メチルプロトンの間に long range coupling が存在するためであり、これより四級炭素 M は G, E と三員環を形成していることがわかる。同様に n, f 間の long range coupling の存在より、四級炭素 N は I と K の間に位置することがわかる。このようにして spathulenol の骨格構造(図7)を決定することができる。long range coupling を利用した四級炭素の帰属は感度の点で実用的な方法といえよう。

### NOE 相関二次元 NMR

spathulenol の平面構造がきまると次の問題は三次元構造を明らかにすることである。この問題には NOE 相関二次元 NMR および差スペクト

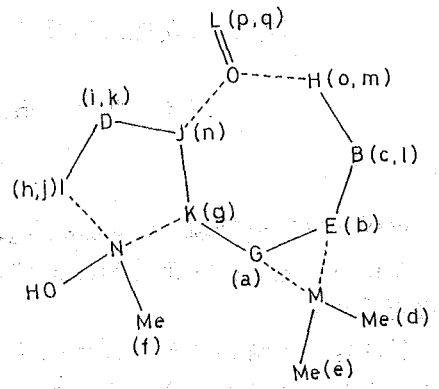


(図5) spathulenol の  $^1\text{H}$  シフト相関二次元 NMR スペクトル ( $\Delta = 0 \text{ msec}$ )



(図6) spathulenol の  $^1\text{H}$  シフト相関二次元 スペクトル ( $\Delta = 300 \text{ msec}$ )

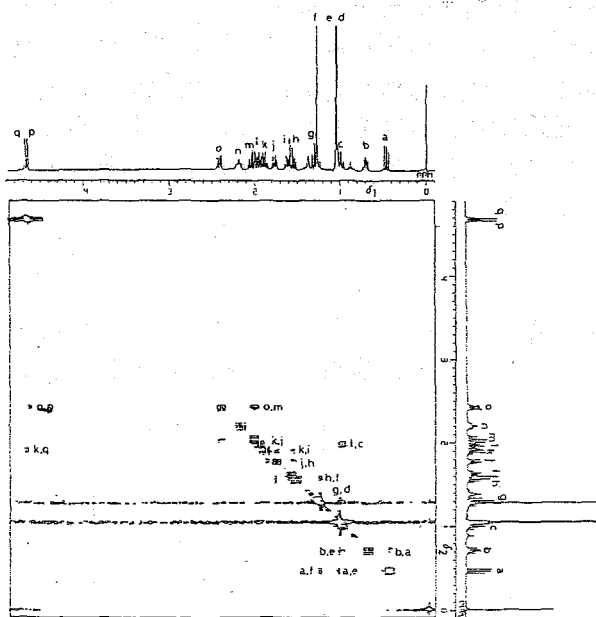
ルが有効である。spathulenol の NOE 相関二次元スペクトルを図8に示す。このスペクトルでは空間的に近い<sup>1</sup>H核の間で交叉ピークがあらわれる。たとえば a, e および a, f の交叉ピークは a, e, f が空間的に近接していることを示している。これらのプロトンは、ほぼ同じ方向を向いていることがわかる。ただし、等高線表示ではしきい値以下の交叉ピークをおとしていることもあり、一次元 NOE 差スペクトルを併用することが有効である。図9は、spathulenol の NOE 差スペクトルであり、



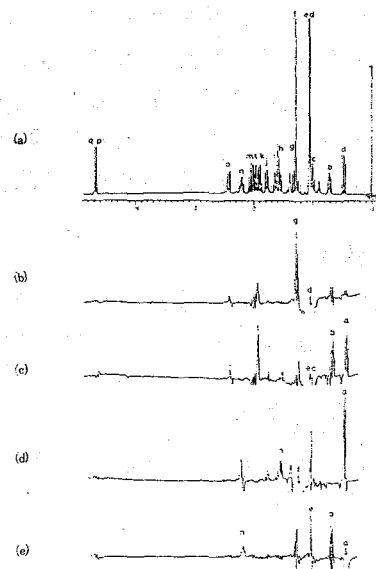
(図7) spathulenol の骨格構造

d を照射した時には g (図9(b)), e を照射した時には a と b (図9(c)), f を照射した時には a と h (図9(d)), a を照射した時には e, f, b, n に NOE が観測される。a と n の間に NOE が観測されたことは、a と n が近接していること、すなわち、五員環と七員環がトランス型に結合していることを示している。以上の NOE の結果を考慮すると spathulenol は 図1に示す構造をとることが確定した。

ここに示した戦略は天然物の構造決定に有効であり、分子量以外の化学情報を使うことなく、NMRのみで短時間に一義的に構造決定をおこなうことができる。ユズ油中に含まれる不明成分について本法により解析した結果 germacra-1E, 6E-dien-5-ol であることも確定した。



(図8) spathulenol の NOE 相関二次元 NMR スペクトル



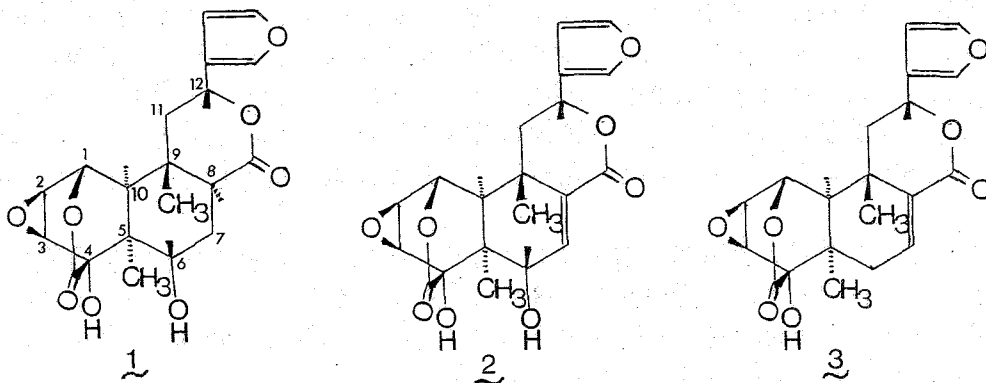
(図9) spathulenol の差 NOE スペクトル 矢印は照射位置を示す。

### 30. 二次元NMRによるフラノジテルペンの構造解析

(エーザイ・筑波研) 川上善之, 永井泰志, 根津征夫, 里忠  
国井敏信, 影井健吾

ツヅラフジ科植物 *Arcangelisia flava* の茎より単離した新規フラノジテルペンについて、二次元NMRスペクトルを中心に解析し、立体構造を決定したので報告する。

我々は、13種のフラノジテルペンを単離し、現在構造決定を行っている。そのうち、3化合物(1, 2, 3)について、元素分析・IR・質量分析・NMRにより構造を決定した。



(1)は、 $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルの帰属を従来のホモデカップリング、プロトンセレクトィブデカップリングおよびLSPD法等により行った。さらに、二次元NMRスペクトルによりその立体構造について考察を行った。 $^1\text{H}$ 相関NMR(COSY)スペクトルにより、特に、遠距離スピン結合を含むスピン結合が容易に解析できた。そして、NOE相関NMR(NOESY)スペクトルと通常のNOE測定による置換基の立体配置決定を行った。

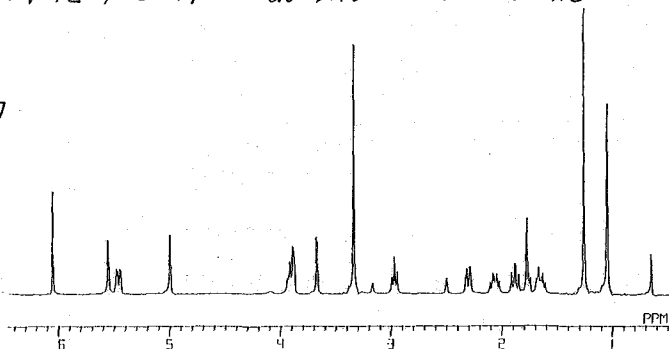
(実験)

測定はすべて JEOL GX400 スペクトロメーターを用いた。 $^1\text{H}$ -NMR 400MHz,  $^{13}\text{C}$ -NMR 100MHz,  $\text{DMSO}-d_6$  溶液、27°Cにて測定した。

(結果と考察)

右に、(1)の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示した。

図2 (1)  $^1\text{H}$ -NMR



5位と9位のメチル基に着目してNOEを調べた。5-CH<sub>3</sub>と9-CH<sub>3</sub>との間にNOEは認められず、環面に対して互いに反対方向に配置していると考えられた。また、5-CH<sub>3</sub>とH<sub>10</sub>、9-CH<sub>3</sub>とH<sub>6</sub>・H<sub>12</sub>の間にNOEが認められた(図4 O印)。

<sup>1</sup>H相関NMRにおいて9-CH<sub>3</sub>とH<sub>7</sub>、H<sub>8</sub>およびH<sub>10</sub>の間に、W字遠距離スピン結合が認められた(図3 O印)。

以上のことより、立体構造を図1の如く決定した。

なお、絶対構造については現在検討中である。

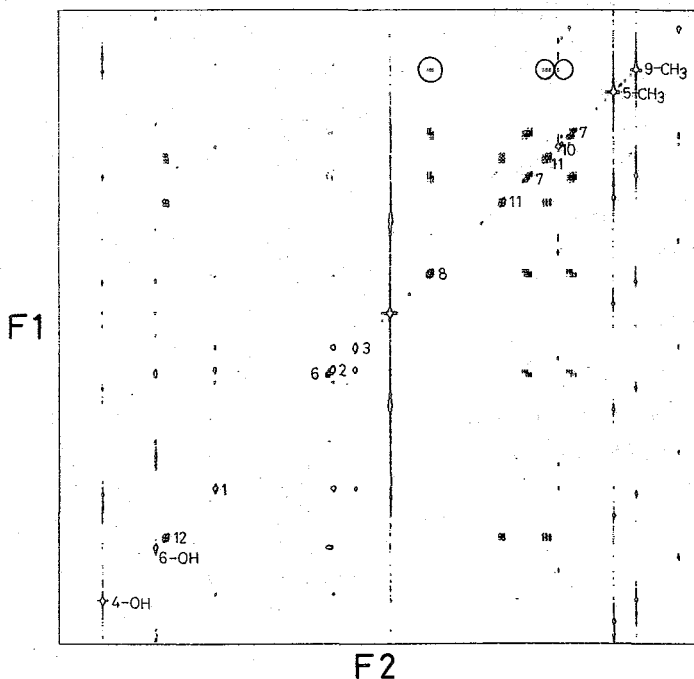


図3. <sup>1</sup>H-相関スペクトル (COSY P)

F1: 化学シフト

2400 Hz / 256 points

F2: 化学シフト

2400 Hz / 4096 points

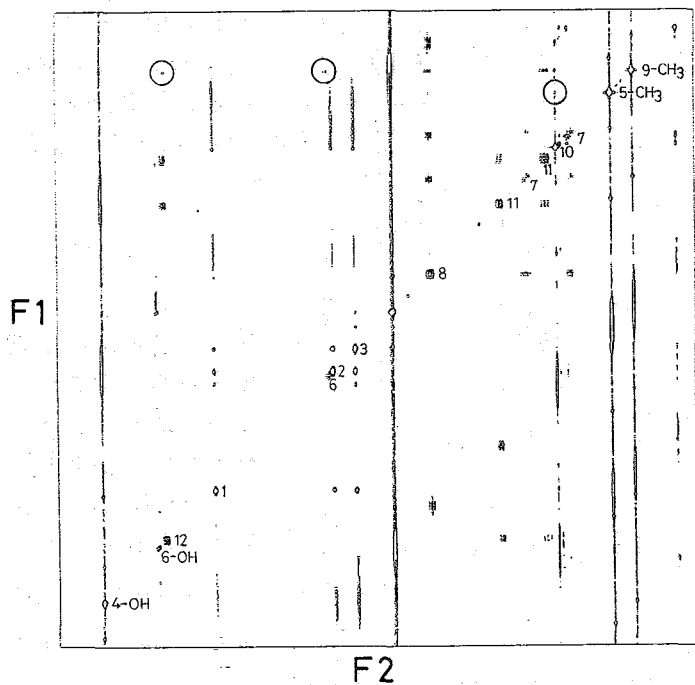


図4. NOE相関  
スペクトル  
(NOESY P)

F1: 化学シフト

2400 Hz / 256 points

F2: 化学シフト

2400 Hz / 4096 points

mixing time 300 msec

化合物(2)(3)  
 については主に、  
 ニ次元NMRスペ  
 クトルの解析を中  
 心に、それぞれの  
 立体構造を決定し  
 た。

なお、化合物3  
 は "Fibravin" と  
 一致した。

文献

1) T. Hori et al.,  
 Tetrahedron, 33,  
 2649 (1967).

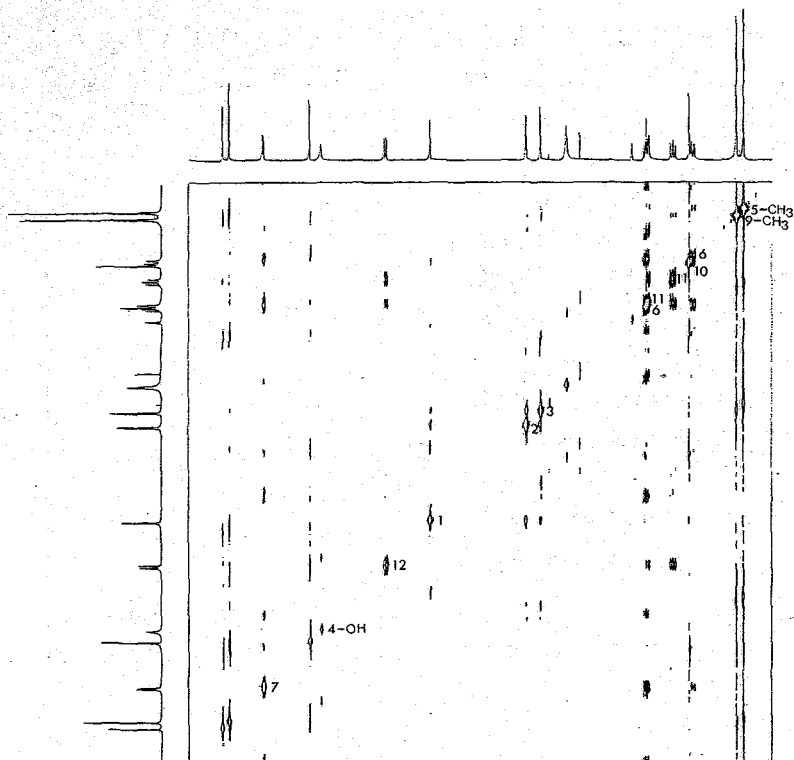


図5. 3の4相関  
 NMRスペクトル  
 (COSY P)  
 F1: 化学シフト  
 3000Hz / 256points  
 F2: 化学シフト  
 3000Hz / 4096points

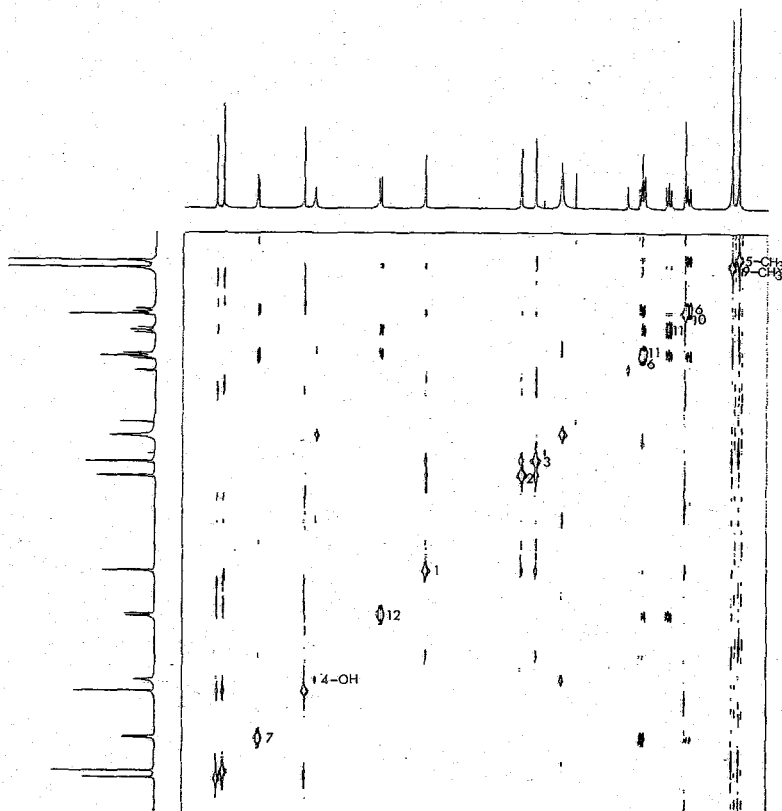


図6. 3のNOE相  
 関NMRスペクトル  
 (NOESY P)  
 F1: 化学シフト  
 3000Hz / 256points  
 F2: 化学シフト  
 3000Hz / 4096points  
 mixing time 300msec

# 31. ポルフィリン化カチオンラジカルのNMR.

(京大.工) 城 宜嗣, 高向 保彦, 森島 績

序

金属ポルフィリンの化カチオンラジカル ( $B^+$ ) は、パルオキシターゼ、カタラーゼなどハムタンパク質や、光合成中心である、クロロフィルなどの反応中間体中に見い出され、生体中で重要な働きをしている。従来これら  $B^+$  の研究は、吸収スペクトル、ESRスペクトル等を用いて進められてきており、SCF-MO計算とあわせてその電子状態について明らかにされてきた。<sup>1)</sup>

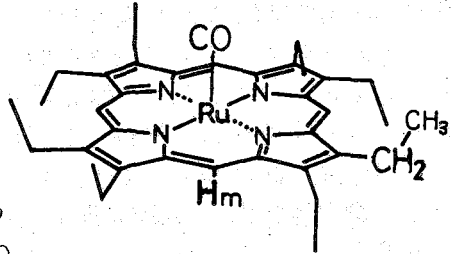


図1. OEP-Ru(II)-CO

今回、我々は、安定な  $B^+$  を生成する Octaethylporphyrin Ru(II)CO (OEP-Ru(II)CO; 図1) 及び Octaethylporphyrin Co(II) (OEP-Co(II)) について、それらの  $B^+$  の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを観測する事に初めて成功し、これに基づいて、 $B^+$  の電子状態及びその配位子効果について明らかにし、パルオキシターゼ類の反応中間体 (Compound I) との関連において検討した。<sup>2)</sup>

## 実験

OEP-Ru(II)CO 及び OEP-Co(II) は、常法により合成した。<sup>3)</sup>  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは、Nicolet NT-300 を用いて測定し、化学シフトは TMS を内部基準とし、低磁場側をプラスとした。

## 結果及び考察

### 1. OEP-Ru(II)CO の $B^+$ の生成と

#### その $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

OEP-Ru(II)CO は塩化メチレン中、窒素中で、 $\text{Br}_2$  滴下により段階的に酸化され、その吸収スペクトルは4つの等吸収点を通して変化し(図2A)、最終的には  $^2\text{A}_{1u} B^+$  のスペクトルを示した。この酸化生成物は77Kで  $g=2.00$  の ESR シグナルを示した。しかし、

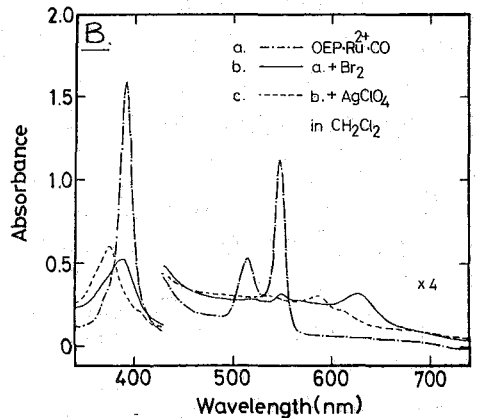
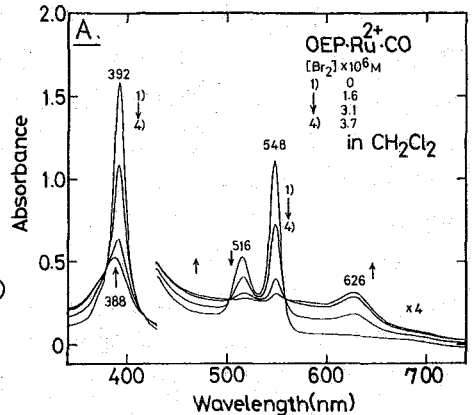


図2. OEP-Ru(II)CO の  $B^+$  の生成とその吸収スペクトル変化.

しろ よしつぐ, たかむき やすひこ, もりしま いさお

室温では、ESRシグナルは観測されなかった。

この  $[\text{OEP.Ru(II).CO}]^+ \text{Br}^-$  に  $\text{AgClO}_4$  を加え、対アニオンを  $\text{Br}^-$  から  $\text{ClO}_4^-$  に変えると、 $^2A_{2u} \text{Po}^+$  の吸収スペクトルが得られた(図2B)。 $[\text{OEP.Ru(II).CO}]^+ \text{ClO}_4^-$  は 77K、室温ともに  $g=2.00$  の ESRシグナルを示した。

それぞれの  $\text{Po}^+$  に対応する  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを図3に示した。酸化前の状態では  $\text{Ru(II)}$  の反磁性の為、常磁性シフトしたシグナルは観測されなかった(図3, a)。 $^2A_{1u} \text{Po}^+$  では、常磁性領域、低磁場側 30ppm と 24ppm に非等価なメチレンプロトン(図1参照)の、高磁場側 -35ppm にメソプロトン(図1, H<sub>m</sub>)の、非常にシャープなシグナルが観測された。一般にラジカルを含む系では、電子スピンの緩和の効果で、その NMRシグナルは観測できない。しかし、 $[\text{OEP.Ru(II).CO}]^+ \text{Br}^-$  の NMRシグナルが非常にシャープである事は、その ESRシグナルが室温で観測できない事とよい一致を示しており、この系には電子スピンの緩和に影響を及ぼす要因がある事を示唆している。

図3, c の  $^2A_{2u} \text{Po}^+$  のスペクトルでは、メチレンシグナルは広幅化して 33ppm に観測され、メソシグナルは観測されなかった。

$\text{OEP.Co(II)}$  の  $\text{Po}^+$  でも同様のスペクトルの特徴が見られた。

## 2. $\text{Po}^+$ の基底電子状態とメソプロトン NMRシグナル

$\text{OEP.Ru(II).CO}$  の  $\text{Po}^+$  が対アニオンの効果により、 $^2A_{1u}$  と  $^2A_{2u}$  の2つの基底状態を取る事は、吸収スペクトルで確かめられた。この2つの基底状態間の顕著な相違は、メソ炭素上のスピンの密度の違である。<sup>1f)</sup> 表1に、MO計算、ESR、そして今回の NMR から求められた、 $\text{Po}^+$  のメソ炭素上のスピンの密度、メソプロトンとの超微細結合定数及びメソプロトンの

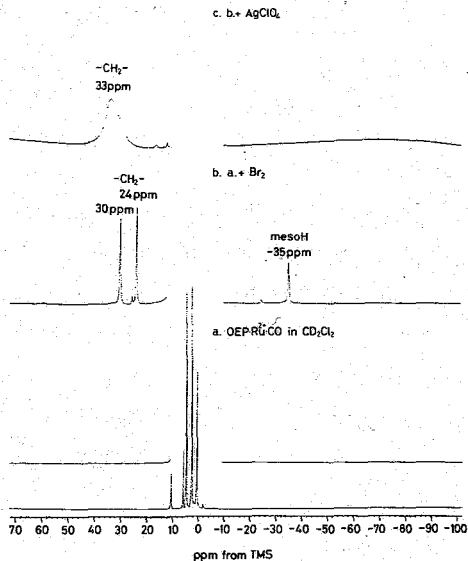


図3.  $\text{OEP.Ru(II).CO Ru}^+$  の  $\text{Po}^+$  の NMR スペクトル

表1. 種々の  $\text{Po}^+$  の meso 炭素上のスピン密度 ( $\rho_{\text{Cmeso}}$ )、メソプロトンとの超微細結合定数 ( $A_{\text{H}}$ ) との isotropic シフト

compd	state	$\rho_{\text{Cmeso}}$	$A_{\text{H}}$ (G)	$(A_{\text{H}}/H)^{\text{iso}}$ (ppm)
$(\text{OEP.Ru.CO})^+ \text{Br}^-$	$^2A_{1u}$	0.026 <sup>4)</sup>	-0.59 <sup>3)</sup>	-44 <sup>1)</sup>
$(\text{OEP.Co})^{2+} 2\text{Br}^-$	$^2A_{1u}$	0.054 <sup>4)</sup>	-1.21 <sup>3)</sup>	-91 <sup>1)</sup>
$(\text{OEP.Mg})^+ \text{ClO}_4^-$	$^2A_{1u}$	0.066 <sup>4)</sup>	1.48 <sup>2)</sup>	110 <sup>3)</sup>
SCF-MO calcd.	$^2A_{1u}$	0.0012 <sup>2)</sup> *	-0.027 <sup>4)</sup>	-2 <sup>3)</sup>
$\rho_{\text{Cmeso}}^*$	$^2A_{2u}$	0.1932 <sup>2)</sup> *	-4.35 <sup>4)</sup>	-322 <sup>3)</sup>

— : experimental data.

1) our work

2) J. Fajer, D. C. Borg, A. Forman, D. Dolphin, and R. H. Felton, J. Am. Chem. Soc., **92**, 3451 (1970).

3)  $(A_{\text{H}}/H)^{\text{iso}} = A_{\text{H}}(Y_e/Y_H) [g\beta S(S+1)/3kT]$ ; M. A. Phillippi, and H. M. Goff, J. Am. Chem. Soc., **104**, 6026 (1982).

4)  $A_{\text{H}} = -22.5 \rho_{\text{Cmeso}}$ ; G. N. La Mar, and F. A. Walker-Jensen. In "The Porphyrins", D. Dolphin, Ed.; Academic Press: New York, 1979; Vol. IV, Part B, pp61-157.



の isotropic シフトとの関係を示した。MO計算によれば、 ${}^2A_{2u} E_g^+$  のメソ炭素上のスピン密度は、 ${}^2A_{1u} E_g^+$  の約100倍と非常に大きく、この値から求めたメソプロトン NMR シグナルの isotropic シフトの計算値は、322 ppm となった。この値は  $[OEP.Ru(II).CO]^+ ClO_4^-$  の NMR スペクトルでメソプロトンシグナルが  $\pm 100$  ppm の領域に観測できなかった実験結果と良い一致を示している。

一方、ESR や今回の NMR の結果から得られた  ${}^2A_{1u} E_g^+$  のメソ炭素上のスピン密度は MO 計算より得られた値の約 20~50 倍になった(表1)。この結果は、実際の金属ポルフィリンの  $E_g^+$  では、 $A_{1u}$  と  $A_{2u}$  の軌道が縮退しているか、あるいは非常に近いエネルギー準位にある為に、 ${}^2A_{1u}$  の状態に  ${}^2A_{2u}$  の状態の混ざりあった状態にある事を示唆している。又、この混ざりあった2つの基底状態間の電子の交換が、電子スピンの緩和に影響を及ぼし、先に示した様にラジカルを含む系でありながら非常にシャープな NMR シグナルを与える結果となったと考えられる。

さらにメソ炭素上のスピン密度を直接観測する為、 $[OEP.Ru(II).CO]^+ Br^-$  の  $^{13}C$ -NMR スペクトルを測定したが、 $\pm 700$  ppm の範囲にはシグナルは観測されなかった。

### 3. $[OEP.Ru(II).CO]^+ Br^-$ ( ${}^2A_{1u} E_g^+$ ) の

#### NMR スペクトルの温度依存性

$[OEP.Ru(II).CO]^+ Br^-$  の 23°C から -80°C の  $^1H$ -NMR スペクトルを図4に示した。温度低下に伴い、より低磁場側のメチレンシグナルが選択的に広幅化した。

これは  $E_g^+$  の低温での二重化あるいは、分子間の相互作用によるものと考えられる。<sup>1b)</sup> 右図に示した様に、低温で自由回転の束縛された非等価なエチル基のうち、一方がよりラジカルの電子スピンの緩和の影響を受けた為である。

このスペクトルの温度依存性より得られ、それぞれのシグナルのシフト位置を絶対温度の逆数(1/T)に対してプロット(Curie's Plot)した(図5)。メチレンシグナルは、キュリー則に従ったが、メソプロトン

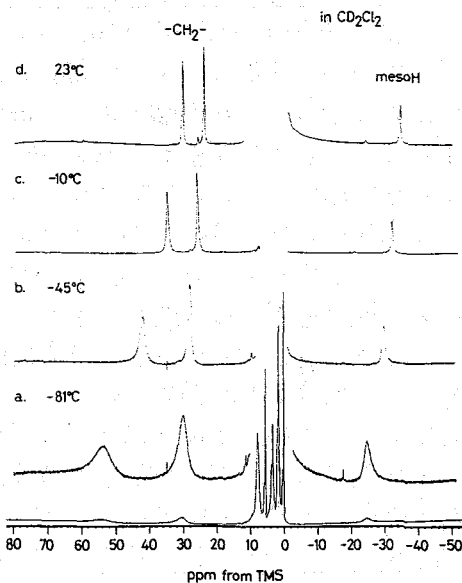


図4.  $[OEP.Ru(II).CO]^+ Br^-$  の NMR スペクトルの温度依存性

#### $OEP.Ru(II).CO^+ Br^-$ in $CD_2Cl_2$

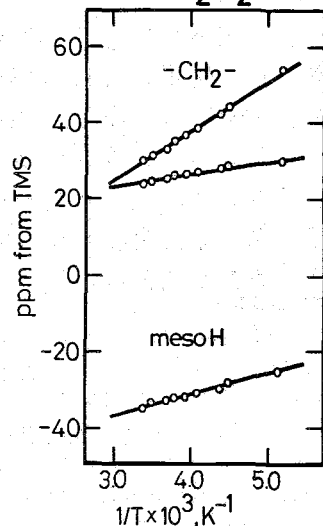


図5.  $[OEP.Ru(II).CO]^+ Br^-$  の  $^1H$ -シグナルの Curie プロット

シグナルは、キュリー-則に従わず、温度上昇に伴いより高磁場シフトした。これは、メソ炭素上のスピニ密度が1つの状態だけからの寄与で決まっていなことを示しており、先に示唆されたように、 ${}^2A_{1u}$ 状態への ${}^2A_{2u}$ 状態の混ざった状態にある事を支持している。

#### 4. ${}^2E_g$ の基底電子状態への配位子効果

$[OEP.Ru(II).CO]^+ Br^- ({}^2A_{1u})$ へのイミダゾール(Im)の配位と、それが ${}^2E_g$ の対称性に及ぼす影響について調べた。常温ではImは ${}^2E_g$ を還元する為、低温(-45°C)で、Imを追加し、そのNMRスペクトルの変化に注目した(図6)。Imの添加に伴いメチレンシグナル(42.0, 28.0 ppm)は、徐々にその強度を減少し、新しいシグナルが、40.2, 29.2 ppmに現われ、一方高磁場のメソシグナルは徐々に消失した。メソプロトンシグナルに注目すれば、この結果は、Imの配位により ${}^2A_{1u}$ の状態から ${}^2A_{2u}$ の状態へ変化した事を示している。

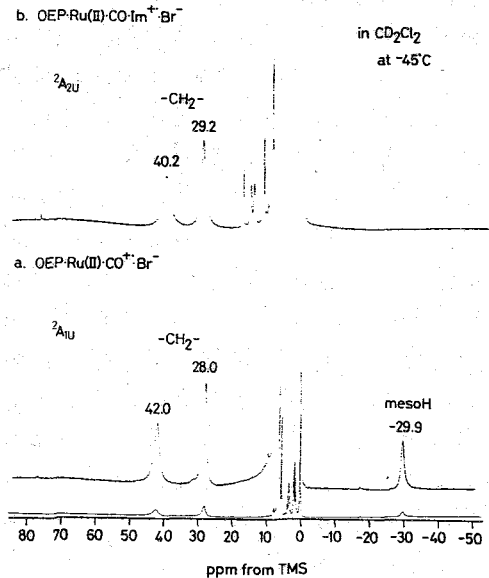


図6.  ${}^2E_g$ へIm添加に伴うNMRスペクトル変化。

#### 5. パルオキシターゼ, カタラーゼの

##### Compound I との比較. 検討.

##### 西洋ワサビのパルオキシターゼ(HRP)

ヤカタラーゼ(Cat.)は $H_2O_2$ と反応してCompound Iと呼ばれる $Fe(IV)-{}^2E_g$ の構造を持った反応中間体を生ずる。この2つのハム醜素は、同じ補欠分子族(Rotoporphyrin- $Fe_2$ )を持ちながら、その ${}^2E_g$ の基底電子状態は異なり、HRPでは ${}^2A_{2u}$ , Cat.では ${}^2A_{1u}$ の状態にある<sup>(4e)</sup>。今回の我々の実験結果は、この様な ${}^2E_g$ の基底状態の相異は、鉄の第5配位子(HRPはHisのIm, Cat.はTyrのフェノラート<sup>(4)</sup>)の効果によるもので、HRPの ${}^2E_g$ 同様にImの配位は ${}^2A_{2u} {}^2E_g$ を生成する事を確認した。

しかし、この様な ${}^2E_g$ の基底状態への配位子の効果は、ポルフィリンの中心金属がRu, Co, Feの時に見られ、ZnやMgの ${}^2E_g$ の場合には見られない<sup>(5)</sup>。これはd電子と配位子との相互作用が ${}^2E_g$ の化ラジカル軌道の対称性に影響を及ぼしている為と考えられる。

##### REFERENCE

- (a) Furchop, J.-H.; Mauzerall, D. *J. Am. Chem. Soc.* (1968) **91**, 4174; (b) Felton, R.H.; Dolphin, D.; Borg, D.C.; Fajor, J. *ibid* (1969) **91**, 196; (c) Fajor, J.; Borg, D.C.; Forman, A.; Dolphin, D.; Felton, R.H. *ibid* (1970) **92**, 3451; (d) Dolphin, D.; Forman, A.; Borg, D.C.; Fajor, J.; Felton, R.H. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA* (1974) **68**, 614; (e) Dolphin, D.; Felton, R.H. *Acc. Chem. Res.* (1974) **7**, 26; (f) Fajor, J.; Davis, R.S. "The Porphyrins" (Dolphin, D. ed.) Vol. IV, p.197, Academic Press, New York.
- Morishima, I.; Shiro, Y.; Takamuki, Y. *J. Am. Chem. Soc.* in press.
- Sovocool, G.W.; Hopf, F.R.; Whitten, D.G. *ibid* (1972) **94**, 4350.
- Murthy, M.R.N.; Reid III, T.J.; Sicignano, A.; Tanaka, N.; Rossmann, M.G. *J. Mol. Biol.* (1981) **152**, 465.
- Fujita, I.; Hanson, L.K.; Walker, F.A.; Fajor, J. *J. Am. Chem. Soc.* (1983) **105**, 3296.

## 32. Cd-113 NMRの錯体化学への応用

(近畿大 理工) ○宗像 寛・北川 進・八木 富士夫

(序論) Cd は2価以外の原子価状態をとることはなく、またd殻が満たされていない化合物をつくることがないことから、非遷移金属とみなされる。さらにCN<sup>-</sup>とでさえもCd<sup>2+</sup>イオンはd $\pi$ -p $\pi$ 結合を生成する可能性は他の遷移金属元素と比べてきわめて小さく、カルボニル、オレフィンなどの錯体は生成しない。しかしアンモニア、アミン類、ハロゲンなどと錯体を生成

しやすいことから遷移金属元素とはある程度似ている。このように2B族のCdは周期律表でも遷移金属元素と典型元素の境界にあることからも予想されるように両方の性質を有するきわめて特異的な元素である。また有機Cdは有機合成において広く利用されており、その有用性はますます大きくなりつつある。一方Cdは高血圧の原因の一つと考えられているし、経口的に摂取した場合中毒をおこし、発癌作用があることから最近注目されている。このような観点から近年、Cdの状態分析への関心が高まっている。本研究は<sup>113</sup>Cd NMRをCdの状態分析への応用を確立することを目的として行った。

(実験)

Cd(II)錯体はCd(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>を減圧下、50°CでP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>で脱水したものをを用いて合成した。<sup>113</sup>CdのNMRの測定はJeol FX200 NMRスペクトロメーターを用いて44.22 MHz, 14  $\mu$ s (45°)パルス、観測幅40 kHzにて観測した。試料温度は23°C又は-90°Cとした。積算は600~20000回、パルス繰り返し時間0.5 sで行なった。シフト基準には1.0 M Cd(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>の水溶液の<sup>113</sup>Cd NMRシグナル位置を用いた。

(結果)

**溶媒効果** 各溶媒中での<sup>113</sup>Cd NMRの化学シフトをTable 1に示した。溶媒によるシフト巾は140 ppmもあり、溶媒効果はきわめて大きい。<sup>1)</sup>アミド類もケトンもほとんど同じ化学シフトを示し、アミド類でもカルボニル基がCdに配位していることを示している。DMSO中ではケトンとアミド類より低磁場にある。これはチオニル基の方がカルボニル基より配位力が大きいためである。アルコールの配位

Stereochemistry of Cd(II)

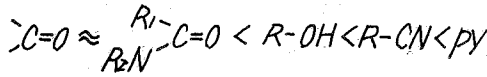
C.N	Type	Example
2	linear	Cd(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
3	trigonal	—
4	Td	Cd(CN) <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
6	octahedral	Cd(en) <sub>3</sub> <sup>2+</sup>

Table 1  
<sup>113</sup>Cd<sup>2+</sup> NMR shifts in solution

Solvent	Chemical shifts
MeOH	-27.7 ppm
EtOH	-29.3
1-PrOH	-28.2
2-PrOH	-30.3
1-BuOH	-29.9
2-BuOH	-41.7
3-BuOH	-29.2
CH <sub>3</sub> CN	20.2
PrCN	18.3
AcCN	10.4
PhCN	9.2
n-BuCN	16.7
DMA (Me) <sub>2</sub> NCOCH <sub>3</sub>	-60.5
DEA (Et) <sub>2</sub> NCOCH <sub>3</sub>	-56.0
DPA (Ph) <sub>2</sub> NCOCH <sub>3</sub>	-51.0
DMSO	-23.8
DMF	-44.3
acetone	-59.0
PY	78.6

1.0 M Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> = 0 ppm

力はケトンより強いと考えられているが、実際、ケトンより低磁場にあらわれる。配位力の強いN配位原子を有するCH<sub>3</sub>CNやpyではO配位子の溶媒よりも低磁場側にある。<sup>113</sup>Cd NMRの化学シフトは次の順に低磁場シフトする。



この順序はCdに対する溶媒の配位力の強さの順であると考えられる。

pKaと化学シフト ピリジンとその置換体を溶媒として用いたときの<sup>113</sup>Cd NMRの化学シフトをpKaに対してプロットしたのがFig.1である。

4位置換体の場合、pKaと化学シフトは良い相関性があり、pKaが大きくなるにつれて低磁場シフトする。Cd(py)<sub>6</sub>の逐次安定度定数は

log K<sub>1</sub>=2.74, log K<sub>2</sub>=2.16, log K<sub>3</sub>=1.40, log K<sub>4</sub>=0.6, log K<sub>5</sub>~0, log K<sub>6</sub>~-0.5でピリジン溶媒中でCd(py)<sub>6</sub>の生成率は70%ぐらいである。Cd(L)<sub>6</sub><sup>2+</sup> (L=py 又はその置換体)の生成率はLの塩基性、つまりpKaが大きくなるほど大きくなる。又、Cd-Lの結合はpKaが大きくなるほど強くなる。この2つの効果のため低磁場シフトしたものと理解される。4-CN-pyのように塩基性の小さい配位子ではCd(4-CN-py)<sub>6</sub><sup>2+</sup>の生成は不可能であろう。

CN基で配位した混合配位子錯体生成の可能性もある。このためか

なり高磁場にあると考えられる。

2-Me-py ではMe基のsteric effectのため、そのpKaから予測されるものより高磁場にある。3-Me-pyのそれについてもsteric effectが原因でないかと考えられる。

キレート員数及びキレート環の至み ジアミンのCd錯体ではジアミンのキレート環の員数が5,6,7と大きくなると高磁場シフトする。不飽和結合を含まない配位子では5員環が最も小さいためである。<sup>21</sup> pKaはm, 1,3-pn, 1,4-bnの順に大きくなるけれど、

Cd錯体Cd(biL)<sub>3</sub><sup>2+</sup>の安定度定数はこの順に小さくなっている。

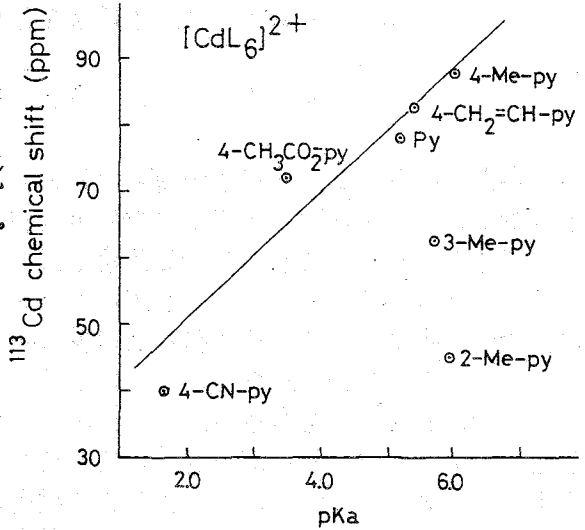


Fig.1, <sup>113</sup>Cd Chemical Shifts for CdL<sub>6</sub><sup>2+</sup>.

1.0M Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> = 0ppm

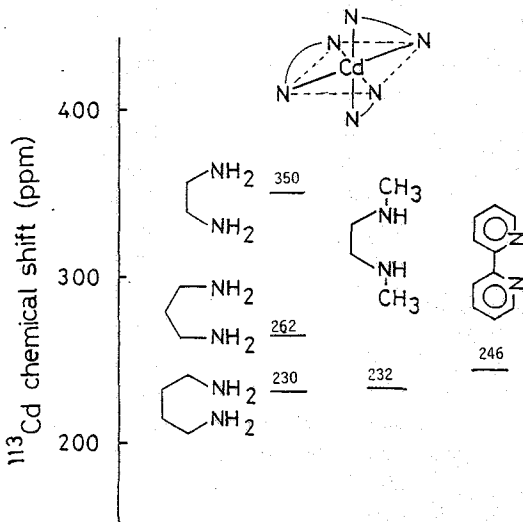


Fig. 2, <sup>113</sup>Cd Chemical Shifts for Cd(biL)<sub>3</sub><sup>2+</sup>.

1.0M Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> = 0ppm

$^{113}\text{Cd}$  NMR シフトが  $\text{Cd}(\text{en})_3^{2+}$ ,  $\text{Cd}(\text{1,3-pn})_3^{2+}$ ,  $\text{Cd}(\text{1,4-bn})_3^{2+}$  の順に低磁場シフトすることはきわめて注目される (Fig 2)。つまり、配位原子が同じでもキレート環の歪みによるわずかな  $\text{Cd}$ -配位原子結合の差を鋭敏に反映しており、 $\text{Cd}$  錯体の構造・配位環境を研究する上で  $^{113}\text{Cd}$  NMR が極めて有効な手段となり得ると考えられる。

$\text{en}$  と同じ 5 員環ではあるが  $N$  に  $\text{X}$  チル基を有する  $N,N'$ - $\text{Me}_2$ - $\text{en}$  で 120 ppm も  $\text{en}$  より高磁場側にあるのは、 $\text{X}$  チル基の *steric effect* のためキレート環が歪むことによる。実際、 $\text{Cd}(\text{N,N}'\text{-Me}_2\text{-en})_3^{2+}$  の安定度定数は  $\text{Cd}(\text{en})_3^{2+}$  より小さい。同じ 5 員環キレートの  $\text{Cd}(\text{bpy})_3^{2+}$  はさらに高磁場側にシフトする。bpy は金属イオンとは  $\pi$  の及び  $\pi$  結合の両方で結合できる性質を有する。bpy の  $pK_a$  は 4.4 で  $\text{en}$  の 7.08 と 9.89 よりかなり小さい。これは前者の  $\pi$  結合性が小さいために高磁場側にあらわれたことも考えられる。又、bpy のキレート環は  $\text{en}$  のそれより *flexibility* が小さく環に歪みがかかっている可能性もある。同じ  $d^{10}$  電子構造の  $^{63}\text{Cu}$  (I) では  $\pi$  結合性の大きい配位子ほど低磁場シフトするか  $\text{Cd}$  では  $\pi$  結合性の *effect* は小さいものと考えられる。<sup>3)</sup>

溶媒和効果  $\text{CdI}_2$  の  $^{113}\text{Cd}$  NMR の化学シフトはアセトン、 $\text{H}_2\text{O}$ 、エーテル、エタノールなどの溶媒によってかなり異なる (Table 2)。 $\text{CdI}_2$  の安定度定数は

Table 2,  $^{113}\text{Cd}$  Chemical Shifts for  $\text{CdI}_2$

Solvent	Chemical shift
$\text{H}_2\text{O}$	56
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	139
acetone	26
ether	151

1.0M  $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 = 0\text{ppm}$

$\log \beta_2 = 3.6$  であり、これらの溶媒中では、 $\text{CdI}_2$  は解離することなく、 $\text{CdI}_2$ ,  $\text{CdI}_2\text{S}_2$ ,  $\text{CdI}_2\text{S}_4$  ( $S = \text{solvent}$ ) のいずれかの化学種で存在している。エーテルのように金属イオンへの配位力の弱い溶媒中では、おそらく直線型 ( $\text{I}-\text{Cd}-\text{I}$ ) の構造であろう。配位力の強い  $\text{H}_2\text{O}$  中では  $\text{H}_2\text{O}$  が溶媒和した六配位八面体構造  $\text{CdI}_2(\text{H}_2\text{O})_4^{2+}$  をとっている。 $\text{H}_2\text{O}$  とエーテルとの中間の配位力を有するアセトンやエ

タノール中ではどのような構造をとっているか、今のところ明確でない。 $\text{CdI}_2$  の化学シフトといっても溶媒によって種々の化学種 ( $\text{CdI}_2$ ,  $\text{CdI}_2\text{S}_2$ ,  $\text{CdI}_2\text{S}_4$  など) が存在する可能性があるため、存在する化学種を明確にしておく必要がある。

複数の化学種の同定・定量 溶液内構造研究における NMR spectroscopy の最大の利点の一つは平衡状態にある複数の化学種を同時に同定・定量できることであ

Table 3,  $^{113}\text{Cd}$  Chemical Shifts for  $\text{Cd}(\text{Im})_n^{2+}$  ( $n=1-6$ ) in ethanol solution

[Cd(II)]	[Im]	ppm (-90°C)							ppm (23°C)
		$\delta A$	$\delta B$	$\delta C$	$\delta D$	$\delta E$	$\delta F$	$\delta G$	
0.5		-18							-36
0.5	0.5	-18	34	80					21
0.5	1.0		35	80	127				50
0.5	1.5			81	127	169			96
0.5	2.0			81	127	169			135
0.5	2.5				127	169	203		160
0.1	0.6						203	233	174

A, B, C...G は Fig. 3 で帰属したシグナルを表す。

る。<sup>4)</sup> ヒスチジン残基であるイミダゾールは生物学的に重要な役割を果たしている。ほとんどの金属酵素でイミダゾールが金属イオンに配位している。イミダゾールは金属イオンとの及びπ電子の両方が結合に関与できる配位子であり、錯体化学的にも興味ある配位子である。Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> などのイミダゾール錯体の安定度定数はそれほど大きくなく、溶液中では常に次のような平衡が存在し、その溶液内での性質及び構造を研究することはきわめて困難である。



しかも各化学種間の交換速度が速く、各化学種の化学シフトを正確に決定することは容易ではない。渡者らはエタノール、メタノール溶液中での Cd-イミダゾール錯体の <sup>113</sup>Cd NMR を +23°C 及び -90°C で測定した。

Table 3 にはエタノール中、+23°C 及び -90°C での化学シフトを示した。又、Fig. 3 にはエタノール中、-90°C における NMR スペクトルを示した。

このように Im/Cd のモル比が大きくなるにつれて高次錯体を生成し、低磁場シフトする様子がよく理解される。Fig. 3 のシグナルの帰属は高磁場側から Cd(S)<sub>2</sub><sup>2+</sup>, Cd(Im)(S)<sub>2</sub><sup>2+</sup>, Cd(Im)<sub>2</sub>(S)<sub>2</sub><sup>2+</sup>, Cd(Im)<sub>3</sub>(S)<sub>2</sub><sup>2+</sup>, Cd(Im)<sub>4</sub>(S)<sub>2</sub><sup>2+</sup>, Cd(Im)<sub>5</sub>(S)<sub>2</sub><sup>2+</sup>, Cd(Im)<sub>6</sub><sup>2+</sup> である。この結果から明らかのように錯体の化学シフト、特に単座配位子(ハロゲン、ドリジン、イミダゾール、アミン、擬ハロゲンなど)を有する錯体の化学シフトを決定する場合、錯体組成が単一であるか、又は複数の化学種が存在しても各化学種が完全に分離されてシグナルが観測されることが必要である。<sup>5)</sup>

#### References

- 1) R.H.Holm et al., *Inorg.Chem.*, 1976, **15**, 2408.  
P.D.Ellis et al., *J.Am.Chem.*, 1975, **97**, 1672.
- 2) 日本化学会編「八面体の配位化学」萩野博 p150. (1976)
- 3) 北川, 宗像, 龜田, 日本化学会第47回春季年会  
講演予稿集 I p45. (1983)
- 4) M.J.B.Ackerman et al., *J.Phys.Chem.*, 1980, **84**, 3151
- 5) D.Dakternieks, *Aust.J.Chem.*, 1982, **35**, 469.  
P.Gettins and J.E.Coleman, *J.Biol.Chem.*, 1982, **258**, 396.

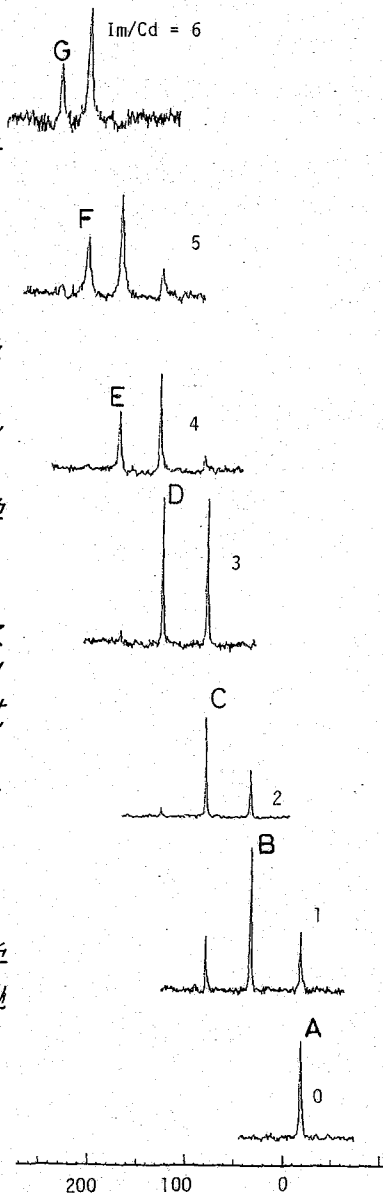


Fig. 3 <sup>113</sup>Cd NMR spectra of Cd<sup>2+</sup>-imidazole complexes. 1.0M Cd(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> = 0ppm

### 33. $^{63}\text{Cu}$ NMR を用いた銅(I) 錯体の研究

(近畿大・理工) の北川 進 宗像 秀 植田 恭司

1. 一価状態の銅イオンは、銅蛋白質の活性中心に存し、酸素運搬(ヘモシアニン)、酸化/酸素添加(チロシナーゼ)等の機能において重要な役割をしている。又近年、銅錯体を触媒とした反応も数々試みられ、機能的に興味のある金属イオンである。ところで銅(II)イオンは、 $d^{10}$ 電子構造を有するため、反磁性でありこれまで銅(II)イオンに対して有かどあつた。ESR、 $d-d$  transition を観測する可視スペクトル法を用いることが出来ない。我々はこれまで新しい銅(II)錯体を合成して  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを観測し、それらの構造と銅(II)-配位子結合について考察をしてきた<sup>(1)</sup>。本研究では、銅(II)錯体のキャラクタリゼーションを行う新しい方法として  $^{63}\text{Cu}$  核に注目し、このNMR法の開発と銅(II)錯体への応用を行った。

$^{63}\text{Cu}$  核は、Table 1 に示したように、天然存在比が約70%あり濃縮することなく試料の調製が可能である。相対感度はこの天然存在比を考慮に入れるならば、 $^{31}\text{P}$  核に匹敵し、極めて検出しやすい核と言える。しかしながら  $I = 3/2$  であるため、その吸収線は、核四極子緩和の効果を受け、広幅化する場合が多く、実質的感度は低くなる。これまで、典型的銅(II)錯体、 $[\text{CuL}_4]^+$  ( $L = \text{CH}_2\text{CN}, \text{Py}, \text{P}(\text{OCH}_2)_3$ )<sup>(2)</sup> の  $^{63}\text{Cu}$  NMR スペクトルが観測されたが、系統的な  $^{63}\text{Cu}$  NMR シフトについての考察ならびにこの応用(構造、平衡)についての研究は数少ない<sup>(3)</sup>。本研究では特に、 $^{63}\text{Cu}$  NMR スペクトルを観測するための①試料の条件、②観測されるシフトの幅とその要因、③平衡系への応用について報告する。

2. 試料: 全て高純度窒素雰囲気下にて室温で合成し、NMRチューブ(5, 10mmφ)

Table 1. NMR Parameters

Nucleus	$^{63}\text{Cu}$	$^{65}\text{Cu}$	$^{13}\text{C}$	$^{31}\text{P}$
Resonance Freq. (MHz)	52.89	56.66	50.18	80.79
Natural Abund. (%)	69.09	30.91	1.10	100
Spin	3/2	3/2	1/2	1/2
*Sensitivity	5.85	7.17	1	4.17
*Receptivity	365	200	1	376
Quadrupole Moment ( $\text{ex}10^{-24} \text{cm}^2$ )	-0.16	-0.15	-	-

\*relative value to  $^{13}\text{C}$

さたがわ すすむ むなかた めぐむ うえだ せすじ

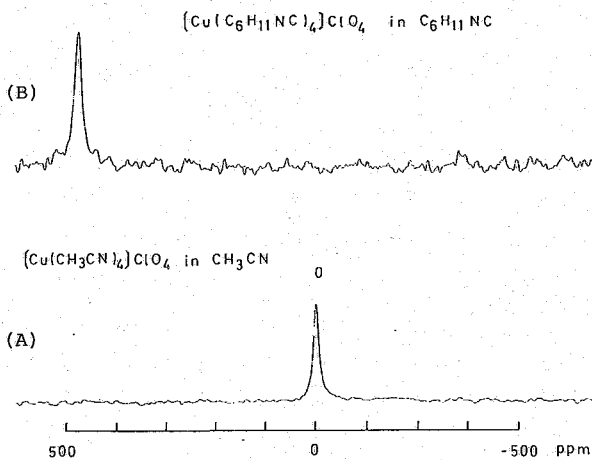


Figure 1.  $^{63}\text{Cu}$  NMR spectra at 25°C of  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$  (A) and  $[\text{Cu}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NC})_4]\text{ClO}_4$  (B).

に封入して測定した。 $[\text{CuL}_4]\text{ClO}_4$  タイプのサンプルは、完全に錯体を形成させるため、配位子は大過剰、もしくは溶媒として用いた。isocyanides は文献より合成したもの、その他は市販のものを蒸留もしくは再結晶して用いた。平衡反応に用いた溶媒は全て脱水精製した。 $\text{CuCl}_2$  は、精製<sup>(1)</sup>したものを用いた。

測定. Jeol FX 200 Spectrometer を用い、25°C、観測周波数 52.93 MHz、パルス幅 20  $\mu\text{s}$  ( $\sim 90^\circ$ ) にて観測した。観測幅は 40 ~ 100 KHz にて、パルス繰り返し 0.11s に設定した。サンプル濃度

は  $[\text{Cu}] = 0.05 \sim 0.1 \text{ M} / 10 \text{ mm } \phi$  チューブを採用した。1000 ~ 10000 SCANS で目的とするスペクトルを得た。スペクトルの感度とシグナル強度のチェックには、inner 5 mm  $\phi$  チューブに 0.2 M  $[\text{Cu}(\text{Py})_4]\text{ClO}_4$ 、outer 10 mm  $\phi$  チューブに任意の濃度の  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$  を封入した二重管を用いた。

$^{63}\text{Cu}$  NMR of  $\text{CuL}_4$

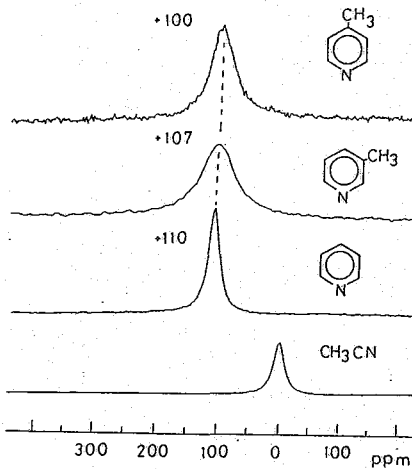


Figure 2.  $^{63}\text{Cu}$  NMR spectra at 25°C of  $[\text{CuL}_4]\text{ClO}_4$ .

3. (A) 実験感度.  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4 / \text{CH}_3\text{CN}$  は、半値幅  $\sim 500 \text{ Hz}$  の単一の  $^{63}\text{Cu}$  NMR スペクトルを与える。これを 10 mm  $\phi$  チューブを用いた、 $5 \times 10^3 \text{ M}$   $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{ClO}_4$  系では、20 分、約 10000 SCANS で Figure 1 (B) の  $[\text{Cu}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NC})_4]\text{ClO}_4$  と同様の S/N 比のシグナルを与えた。これより、半値幅 500 Hz の系では、その Cu の濃度が  $1.0 \times 10^5 \text{ M}$  であっても比較的短時間に満足すべきシグナルを得ることができることが明らかとなった。

(B)  $^{63}\text{Cu}$  NMR シフト. 銅(II)-配位子結合と  $^{63}\text{Cu}$  NMR シフトとの関連を明らかにするために、四配位銅(II)錯体、 $[\text{CuL}_4]\text{ClO}_4$  の L を逐次変えて  $^{63}\text{Cu}$  NMR スペクトルを観測した。スペクトルの一部を Figure 1, 2 ならびに観測された  $^{63}\text{Cu}$  NMR シフトを Table 1 に示した。



Table 2. Observed  $^{63}\text{Cu}$  NMR Chemical Shifts

Complex	$\delta$ (ppm)	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)
$\text{CH}_3\text{CN}$	0	500
$\text{C}_2\text{H}_5\text{CN}$	+13	950
$\text{P}(\text{OCH}_3)_3$	+81	110
$\text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$	+90	300
py	+110	1100
$\beta$ -pic	+108	2830
$\gamma$ -pic	+100	2440
$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NC}$	+468	880
$\text{C}_6\text{H}_5\text{NC}$	+548	300
$\text{CN}^-$	+499	900

Table 2 から通常の配位子を用いた銅(I)錯体の  $^{63}\text{Cu}$  NMR シフト幅は、600 ppm であることが理解される。 $\beta$ -picoline,  $\gamma$ -picoline では、半値幅が 2.5 ~ 3.0 KHz にまで達するが、その他は高々 1 KHz であることを考えるならば、このシフト幅は極めて大きいと言える。

これらの結果として、低磁場シフトの順として、aromatic isocyanides >  $\text{CN}^-$  > aliphatic isocyanides > pyridines > phosphites > nitriles を得ることができ、これは言わば、 $^{63}\text{Cu}$  NMR シフトにおける銅(I)のシフト系列とみなせる。ところで、この系列の中でも、同族グループ間で

シフトを比較してみることは、 $^{63}\text{Cu}$  NMR スペクトルの横軸(シフト)の感度という点で興味深い。Figure 2 は、ピリジン誘導体についての結果であるが、これより Me 基の導入のみで遷位のシフトが確認される。ところで  $[\text{Cu(I)}\text{Py}_4]$  錯体は、銅  $\rightarrow$  Py への CT バンドを可視領域に与える。この CT バンドは、配位子の  $\pi$  受容能が高い程、長波長シフトし、その順は、Py  $\sim$   $\beta$ -pic >  $\gamma$ -pic であった<sup>(4)</sup>。これとシフトの順はよく一致し、 $[\text{Cu}(\text{Py})_4]^+$  系は、従って配位子の  $\pi$  受容能の増大とともに  $^{63}\text{Cu}$  NMR シグナルは低磁場シフトすると結論づけられる。この結果ならびに上記シフト系列は、これまで通常の金属錯体に関して IR 法等より得られた配位子の  $\pi$  受容能の順と一致することから、同様に、配位子の  $\pi$  受容能の増大は、 $^{63}\text{Cu}$  NMR シグナルの低磁場シフトを引き起こすと考えられる。

(C) 平衡系の  $^{63}\text{Cu}$  NMR シフト。  $[\text{CuL}_4]$  型銅(I)錯体は、Figure 3 に示したように、極めて対称性の良い tetrahedral 構造を有することから比較的狭い吸収線を与えたものと考えられる。本研究では、tetrahedral 構造ではあるが配位子 L の配位数が 1 つ少く、従って **1** より対称性の落ちる **2** 型の銅(I)錯体の  $^{63}\text{Cu}$  NMR スペクトルの観測に成功した (Figure 4, 5)。  $[\text{Cu}(\text{P}(\text{OCH}_3)_4)]$  錯体は、 $^{63}\text{Cu} - ^{31}\text{P}$  間のカップリングが観測され 5 本の吸収線を与える (Figure 5)。即ち、この 5 本の吸収線が 4 配位体の直接的証拠となる。  $\text{CuX}$  ( $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$ ) を出発塩として  $\text{P}(\text{OCH}_3)_3$  を適量加えると 2 種のシグナルを与えた (Figure 5)。低磁場側の幅広いシグナルは、 $^{63}\text{Cu} - ^{31}\text{P}$  カップリングが観測されないが、 $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$  と変えたところ、シフト値と線幅が  $\text{X}$  に依存して変化したところから

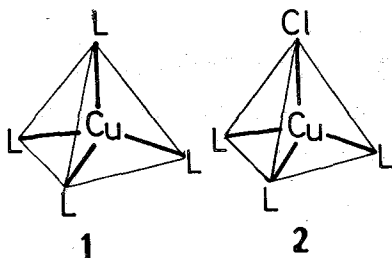


Figure 3

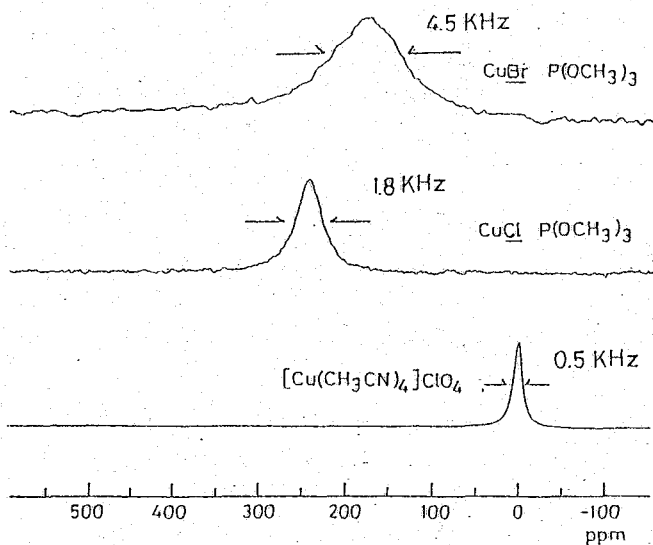


Figure 4.  $^{63}\text{Cu}$  NMR spectra at 25°C of  $[\text{CuX}(\text{P}(\text{OCH}_3)_3)_3]$ .

の場合には  $[\text{CuCl}(\text{P}(\text{OCH}_3)_3)_3]$  のみ、グループ3 (DMSO,  $\text{CHCl}_3$ , Propylene carbonate) では  $[\text{Cu}(\text{P}(\text{OCH}_3)_3)_4]$  のみ、そして、グループ2 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) では **1, 2** 双方のシグナルを与えた。この場合、**2** のシグナル位置が若干高磁場シフトをしており、化学交換効果による

シグナルの平均化が予想され、**2** にはさらに別のSpeciesとの相互作用が考えられる。 $^{63}\text{Cu}$  NMR法によりこのような平衡系において簡便、直接的に溶存銅(I)錯体の構造を知る事が可能となり、この基礎的データを蓄積することによって有効な手段となるものと考えられる。

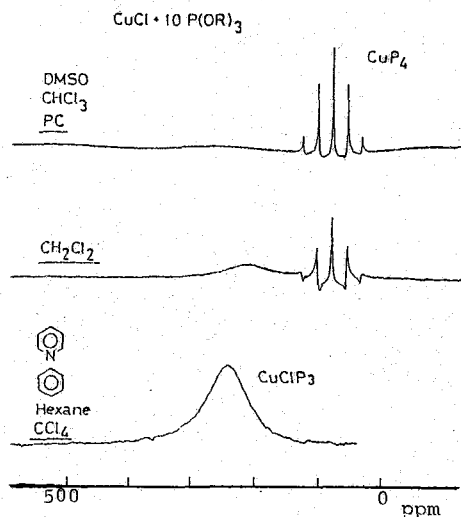


Figure 5. Solvent-dependence of  $^{63}\text{Cu}$  NMR spectra of  $\text{CuCl}-\text{P}(\text{OCH}_3)_3$  systems.

$\text{Cu}-\text{X}$  結合が存在するものと考えられる。X = I の時は、通常の条件では検出されなかった。これはおそらく line-broadening が極めて大きいため見かけ上 broad out したものと考えられる。この Species は、比較的狭いシグナル半値幅を与えることから  $\text{P}(\text{OCH}_3)_3$  が 3 配位した  $[\text{CuX}(\text{P}(\text{OCH}_3)_3)_3]$  (**2**) と帰属を行った。この **1, 2** は用いる  $\text{P}(\text{OCH}_3)_3$  の濃度、溶媒に依存して溶液中の組成が異なった。Figure 5 にその一例を示した。 $[\text{P}(\text{OCH}_3)_3]/[\text{Cu}^+] = 0$  の条件で Solvent を変えたところ、Solvent グループ1 ( $\text{CCl}_4$ , hexane,  $\square$ ,  $\square$ )

#### References

- (1) S. Kitagawa, M. Munakata, *Inorg. Chem.*, **20**, 2261 (1981). S. Kitagawa, M. Munakata, N. Miyaji, *ibid.*, **21**, 3842 (1982).
- (2) O. Lutz, H. Oehler, P. Kroneck, *Z. Naturforsch.*, **33a**, 1021 (1978).
- (3) 北川, 宗彦, 亀田, 日化中47春季年会, 1983.
- (4) S. Kitagawa, M. Munakata, A. Higashie, *Inorg. Chim. Acta*, **59**, 219 (1982).

### 34. Cu(I)化合物の水溶液および固体の<sup>63</sup>Cu-nmr

(三菱製紙感研) ○山本 京之介, 遠藤 一央  
 (日本電子) 出口 健三, 松下 和弘  
 (京大・工) 諫田 克哉, 中辻 博

1. 固体および溶液の金属錯体の構造や電子状態を追求することは興味ある問題であると同時に、現在のnmr法の一方向であろう。演者らはすでに、理論的にはMO法を用い、また実験的には<sup>109</sup>Ag nmrを測定して二、三の研究を行ってきた。

今回は主にCu(I)錯体について固体および溶液の<sup>63</sup>Cu nmr法を用いて、Cu(I)塩のケミカルシフトおよび線中を得たので、これらの測定値に対して定性的考察を試みる。

2. (1)nmr……水溶液の試料はJEOL FX270を用い、<sup>63</sup>Cuは71.50MHzで観測した。90°パルス中は17.5μs、0.15の繰返して積算し、スペクトル中は50kHzと、た。また固体の試料はJEOL FX200を用い、<sup>63</sup>Cuは52.86MHzで測定し、90°パルス中は5μs、MASによる場合その回転数は約4kHzである。

シフトは $\sigma_{\text{sam}} = (\nu_{\text{ref}} - \nu_{\text{sam}}) / \nu_{\text{ref}}$ で求め、線中は吸収線の半値中を測定値とした。

(2)試料……基準試料以外は市販品をそのまま用いた。Cu(I)化合物中のCu<sup>2+</sup>含有率はSHIMAZU UV-180を用い、Cu<sup>2+</sup>のd-d遷移と思われる800nm付近のピークの吸光度で定量した。概ね0.1mol%以下であり、Cu<sup>2+</sup>は無視してよ…と考えられる。

また各化合物のX線回折の測定から、これらの結晶構造は文献と一致した。尚、nmr測定試料の水溶液・懸濁液では分室素置換した後、30°Cに保温した。

3. Cu(I)錯体の<sup>63</sup>Cu nmrスペクトルの典型例を図1に示した。図の中央には、基準とした1.0MのCu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>のCH<sub>3</sub>CN中でのスペクトルで、CuI(suspension)、CuI(0.5M)/KI(6.0M)がそれぞれ高磁場側でプロットし、またCuCN(0.5M)/KCN(6.0M)が低磁場側でシャープに現われている。また表1にCu(I)錯体のケミカルシフト、線中および文献から引用したCuX(s)の溶解度積、Cu(I)錯体の安定度定数、さらにその値から求めた錯体のモル分率を示した。

(1)ケミカルシフト……配位子のケミカルシフトに及ぼす影響をみると、ハロゲン $\rightarrow$  S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>  $\rightarrow$  SCN<sup>-</sup>  $\rightarrow$  CN<sup>-</sup>の順に低磁場シフトして…る。中心原子と配位子との結合にはCu(I)の3d, 4s, 4p軌道が関与しており、定性的にはケミカルシフトの常磁性項にあずかる3d, 4pが考えられる。JamesonとGutowsky<sup>2)</sup>によると、1/2…定数の常磁性項 $\sigma_p$ は、

$$\sigma_p = -\frac{2}{3} \left( \frac{e\hbar}{mc} \right)^2 \frac{1}{\Delta E} \left\{ \left\langle \frac{1}{r_0} \right\rangle_p P_u + \left\langle \frac{1}{r_0} \right\rangle_d D_u \right\}$$

で表わされる。ここでP<sub>u</sub>とD<sub>u</sub>はそれぞれp, d軌道の不均衡を示しており、その原子の配位数、軌道混成、結合のイオン性に強く依存して…る。また0 ≤ P<sub>u</sub> ≤ 2, -12 ≤ D<sub>u</sub> ≤ 0である。ΔEは平均の励起エネルギー、 $\langle \frac{1}{r_0} \rangle$ は1/2の電子の1/r<sub>0</sub>の平均であり、

Table I. Chemical Shifts and Linewidths for  $^{63}\text{Cu}$  Resonance and Mole Fraction of Copper Complexes in Various Copper Salts in Aqueous Solution and Solids at  $30^\circ\text{C}$ . Solubility Products and Formation Constants of  $\text{Cu(I)}$  Complexes were cited from the Reference.

copper salt (solid and solution)	chemical shift(ppm) *MAS	linewidth (Hz)	mole fraction(%)						
			$\text{CuX(s)}$	$\text{Cu}^+$	$\text{CuX}$	$\text{CuX}_2^-$	$\text{CuX}_3^{2-}$	$\text{CuX}_4^{3-}$	$\text{X}^-$ (M)
$-\log K_{sp}$ or $\log \beta_1$			6.73		5.0	5.54	5.7	5.6	
$\text{CuCl(solid)}$	331*	2300							
$\text{CuCl(suspension)}$		-3500	95.3	0	4.7	0	0	0	
$\text{CuCl(0.5M)/KCl(4.0M)}$	200	28000	0.0	0.0	0.7	7.3	29.0	63.0	1.8
$-\log K_{sp}$ or $\log \beta_1$			8.28		-	5.04	6.05	-	
$\text{CuBr(solid)}$	388*	2700							
$\text{CuBr(suspension)}$		-3800	100	0.0	-	0	0	-	
$\text{CuBr(0.5M)/KBr(4.0M)}$	200	21000	82.4	0.0	-	0.4	17.2	-	3.8
$-\log K_{sp}$ or $\log \beta_1$			12.03		-	9.03	9.74	9.85	
$\text{CuI(solid)}$	354*	2100							
$\text{CuI(suspension)}$		-2700	100	0	-	0	0	0	
$\text{CuI(2.0M)/KI(6.0M)}$	337	3500	69.4	0.0	-	0.2	4.7	25.7	4.3
$\text{CuI(1.0M)/KI(6.0M)}$	418	11100	38.9	0.0	-	0.4	9.3	51.3	4.3
$\text{CuI(0.5M)/KI(6.0M)}$	434	12500	0.0	0.0	-	0.6	14.4	85.0	4.6
$-\log K_{sp}$ or $\log \beta_1$			-		10.53	12.3	13.7	-	
$\text{CuCl(0.5M)/Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(4.0M)$	126	---							
$\text{Cu(CH}_3\text{CN)}_4\text{PF}_4(1.0M)$	0	600							
$-\log K_{sp}$ or $\log \beta_1$			13.4		-	11.0	10.9	10.5	
$\text{CuSCN(solid)}$	-102*	8000							
$\text{CuSCN(2.0M)/KSCN(6.0M)}$	-50	7800	0.0		-	27.3	41.4	31.5	1.9
$\text{CuSCN(1.0M)/KSCN(6.0M)}$	-46	8300	0.0		-	12.5	35.9	51.6	3.6
$\text{CuSCN(0.5M)/KSCN(6.0M)}$	-50	8300	0.0		-	8.4	31.7	59.8	4.7
$\text{CuSCN(0.1M)/KSCN(6.0M)}$	-47	6700	0.0		-	6.3	28.5	65.2	5.7
$-\log K_{sp}$ or $\log \beta_1$			19.5		-	24.0	28.6	30.3	
$\text{CuCN(solid)}$	-111*	8300							
$\text{KCu(CN)}_2(\text{solid})$	-143*	7200							
$\text{CuCN(2.0M)/KCN(6.0M)}$	-496	370	0.0	0.0	-	0.0	9.6	90.4	0.19
$\text{CuCN(1.0M)/KCN(6.0M)}$	-493	100	0.0	0.0	-	0.0	0.6	99.4	3.0
$\text{CuCN(0.5M)/KCN(6.0M)}$	-494	70	0.0	0.0	-	0.0	0.4	99.6	4.5
$\text{CuCl}_2(0.5M)$	743	16100							
$\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O(solid)}$	831*	7900							
$\text{CuBr}_2(\text{solid})$	831*	8000							

More negative values refer to lower shielding. The reference sample is a 1.0 molar solution of  $\text{Cu(CH}_3\text{CN)}_4\text{PF}_4$  in  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

次式で表わされる。

$$\langle \frac{1}{r^3} \rangle = \frac{2}{l(2l+1)(l+1)} \left( \frac{Z'}{n} \right)^3$$

有効核荷電を Clementi の近似式<sup>3)</sup> から算出し、量子数  $n, l$  を代入して  $\langle \frac{1}{r^3} \rangle$  を求めると、Cu(I) の場合  $\langle \frac{1}{r^3} \rangle_{3d} = 5.1 \text{ a.u.}$ 、 $\langle \frac{1}{r^3} \rangle_{4p} = 0.40 \text{ a.u.}$  とする。すなわち報告される  $^{109}\text{Ag(I)}$  の  $\langle \frac{1}{r^3} \rangle_{4d} = 3.7 \text{ a.u.}$ 、 $\langle \frac{1}{r^3} \rangle_{5p} = 1.4 \text{ a.u.}$  と比べ Cu(II) の  $3d$  の  $\sigma_p$  への寄与がかなり大きい。従って Cu(I) の  $3d$  から配位子へ電子の浸出しが多く  $\Delta n$  が大きいと、より低磁場側にシフトする。例之は、表 1 に示すように、 $\text{CuCl}_2^{2-}$  と  $\text{CuCN}_2^{2-}$  について finite Perturbation 法で計算すると、反磁性項  $\sigma_{dia}$  は殆んど変わらず、 $\sigma_{para}$  では  $\text{CuCN}_2^{2-}$  の方がはるかに大きい値となる。トータルで  $\text{CuCN}_2^{2-}$  の方が  $\text{CuCl}_2^{2-}$  より 900 ppm 低磁場側にシフトしており、実測値 ( $\sim 700 \text{ ppm}$ ) と良好一致が得られる。

ところで  $\text{CuCl}$ 、 $\text{CuBr}$ 、 $\text{CuCN}$  の固体ある一対スペンションの状態から配位子濃度を高めると、いずれも低磁場シフトする。 $\text{CuCl}$ 、 $\text{CuBr}$  の固体は立方晶型の正四面体構造をしており、また  $\text{CuCl/KCl}$ 、 $\text{CuBr/KBr}$  の系では正四面体構造の  $\text{CuX}_2^{2-}$  が増加する。しかし、結晶の正四面体構造のハロゲンは溶液中のものに比べ  $1/4$  の寄与しか持たないため  $\text{CuX}_2^{2-}$  の方が低磁場シフトするであろう。 $\text{CuCN(S)}$  では斜方晶型で正四面体ではいっかが ( $\text{CuCN/KCN}$  系では正四面体の  $\text{CuCN}_2^{2-}$  が大半) 同様に考えることができる。ところで  $\text{CuI/KI}$ 、 $\text{CuSCN/KSCN}$  の場合、配位子濃度が高くなるにつれて高磁場シフトする。 $\text{CuI(S)}$  は  $\text{CuCl}$ 、 $\text{CuBr}$  と同様正四面体構造をしており、配位数が多くなるにつれて重原子効果が大きくなり高磁場シフトするのを知れる。 $\text{CuSCN(S)}$  は非晶型が関係しておられると思われるが、いずれの場合も原因は明らかではない。

(2) 線巾 .....  $\text{CuCN/KCN} < \text{CuI}, \text{CuCl}, \text{CuBr} < \text{CuCN}, \text{CuSCN/KSCN} < \text{CuI/KI}, \text{CuBr/KBr}, \text{CuCl/KCl}$  の順に線巾は一桁ずつ大きくなる。すなわち、 $^{109}\text{Ag}$  の場合と異なりプロトである。これは Cu(I) の核スピンの  $3/2$  で  $^{109}\text{Ag}$  と異なり四重極効果の影響があるためと考えられる。線巾  $\Delta \nu/2$  は Cu(I) の場合、近似

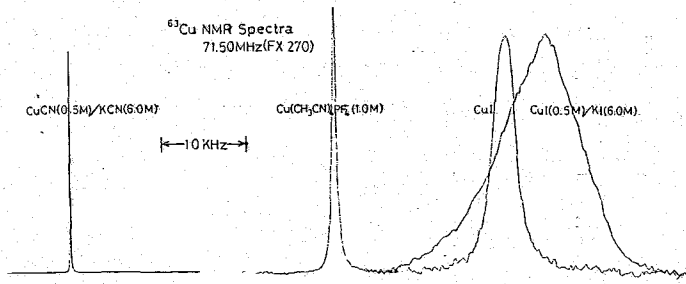


Fig. 1. Typical  $^{63}\text{Cu}$  nmr Spectra of Cu(I) Salts in Aqueous Solution.

Table II: Cu Chemical Shielding Constants of Cu(I) Complexes by the Finite Perturbation Method (ppm unit)

Cu(I) complex	$\sigma_{dia}$	$\sigma_{para}$	$\sigma_{total}$	$\Delta \sigma$
$\text{CuCl}_4^{3-}$	2667	-881	1786	0
$\text{Cu(CN)}_4^{3-}$	2557	-1691	886	-900

的に次式で表わされる。

$$\Delta\nu_{1/2} \approx \frac{1}{10} \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) \left(\frac{e^2 g Q}{h}\right)^2 \tau_c$$

ここで  $\eta$  は非対称パラメータで通常  $\eta < 1$  である。また  $\tau_c$  は相関時間で粘性の場合では  $\tau_c \approx 2\pi \times 10^{-10}$  s である。Q は核の四重極モーメントで、 $^{63}\text{Cu}$  では  $-0.16 \times 10^{-24} \text{ cm}^2$  である。Q は核のまわりの電場勾配で、 $\text{Cu}^+$  イオンでは球対称のため電場勾配はないが、配位子の影響で  $\text{Cu}(I)$  の 4p 軌道の電子密度が変化すると電場勾配が生じる。 $\Delta\nu_{1/2} = 10000, 3000, 100 \text{ Hz}$  に対して上式を用いると、 $e^2 g Q / h = 40, 22, 40 \text{ MHz}$  となる。ここで  $\text{Cu}^+$  イオンに対して外部電荷から生じる電場勾配から求めると、

$$e^2 g Q / h = \frac{e^2}{h} \frac{2\ell(\ell+1)}{(2\ell-1)(2\ell+3)} \left\langle \frac{1}{r^3} \right\rangle Q$$

となる。 $\text{Cu}(I)$  の 4p 軌道の 1 の電子からの寄与を考えると、 $e^2 g Q / h$  はそれぞれ 12, 110 MHz となり、ここで 6s 軌道からの配位子への電子の浸出への寄与が大きくなる。錯体の対称性から考えると、 $\text{CuX}_4^{2-} < \text{CuX}_3^{2-} < \text{CuX}_2 < \text{CuX}$  の順に電場勾配が大きくなるであろう。実際、ハロゲン化銅(I)では正四面体構造の固体から配位子濃度を高めると、 $\text{CuX}_2$ 、 $\text{CuX}_3^{2-}$  が増え、線幅がかなり広がります。また  $\text{CuCN}$  では固体が斜方晶型から  $\text{CuX}_4^{2-}$  の正四面体に移ると、かなりシャープになることがわかる。 $\text{CuSCN}$  の場合は、固体では非晶型、錯体では種々の配位数のものが均等に含まれるため、線幅はあまり変化しない。

ここでハロゲン化銅の固体の場合、正四面体構造をとるにもかかわらず、 $\text{CuCN}_4^{2-}$  に比べると線幅はかなり広い。この場合対称性が良く、核四重極効果の殆んどは消失してある。むしろ  $\text{Cu}(I)$  の磁気能率の双極子-双極子相互作用により広がることを考えられる。図2に示されるように、MASにより、この相互作用がキャンセルされ、non spinning の場合数千 Hz あり、線幅が数百 Hz に narrowing されることが確認された。また  $\text{CuI}$  の場合のみ MAS により 16 ppm 低磁場シフトしており、これは異方性シフト<sup>4)</sup>がある。核四重極によるものである。

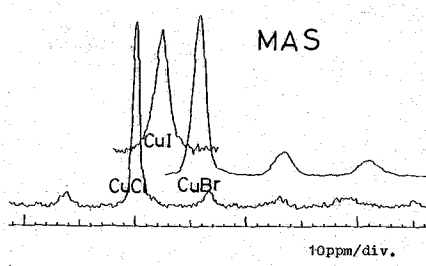
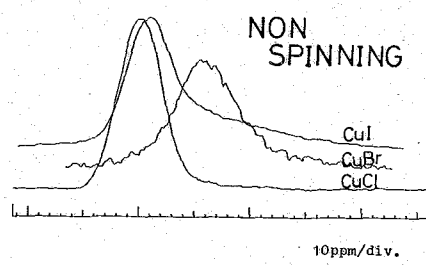


Fig. 2.  $^{63}\text{Cu}$  nmr Spectra of  $\text{Cu}(I)$  Halides in Solid

- 1) 遠藤ら、才2/圓nmr討論会等
- 2) Jamesonら、J. Chem. Phys., 40, 1714(1964)
- 3) Clementiら、J. Chem. Phys., 38, 2686(1963)
- 4) Andrew, Trans. R. Soc. Lond., A299, 505(1981)
- 5) Samosonら、J. Mag. Res., 49, 350(1982)

# 35. 有機ゲルマニウム化合物のNMR (I I) ゲルマン誘導体

(東京教養, 浅井ゲルマニウム研\*)  
O竹内敬人, 友田修司, 柿本紀博\*

## 1. 緒言

近年, 有機ゲルマニウム化合物に, 二つの面から関心が寄せられている。一つは,  $sp^2$ 混成Geを含む化合物の合成と物性に対する関心である。正倉らによるシクロトリゲルマンの合成はその一例である。もう一つは, 有機ゲルマニウム化合物のあるものが示す制ガン作用である。<sup>2)</sup>

この様な情況に対して, 有機ゲルマニウム化合物のNMRデータ<sup>3)</sup>は, 量共に限定されており, 今後予想される発展に十分対応できるとはいえない。我々は最近 Ge-132(カルボキシエチルゲルマニウムセスキオキシド)の開発に関連して, 各種有機ゲルマニウム化合物のスペクトルデータの集積を開始したので, その一環として, 四置換ゲルマンとその類似化合物の<sup>73</sup>Geと<sup>13</sup>C NMRスペクトルについて報告する。

## 2. <sup>73</sup>Ge NMRスペクトル

### a スペクトルの測定

<sup>73</sup>Ge NMRスペクトルは, JEOL FX 90 Qに, 低周波用アタッチメントを用い, 3.10 MHzで測定した。一例として Me<sub>4</sub>Ge(1)のスペクトルをFig 1に示した。

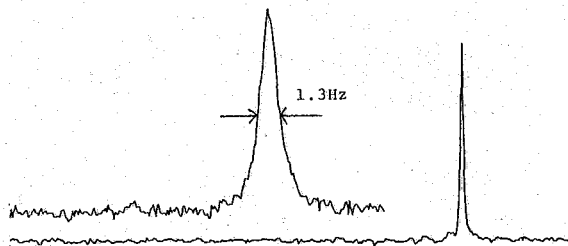


Fig. 1 Me<sub>4</sub>GeのGe-73 NMRスペクトル

測定条件: テータ 8K,  
スペクトル幅 1000 Hz, パ  
ルス間隔 4.6s, パルス幅  
90μs (45°), 積算回数 150。

### b 化学シフト

Table 1に R<sub>4</sub>Ge(1~6)の<sup>73</sup>Ge 化学シフト, および対応する炭素, ケイ素, スズ, 鉛化合物の<sup>13</sup>C, <sup>29</sup>Si, <sup>117</sup>Sn, <sup>207</sup>Pb 化学シフトをまとめた。Rがアルキル

Table 1 Chemical Shifts (ppm) of R<sub>4</sub>Ge

M \ R	Me	Et	Ph	2-furyl	Cl
C-13	0	+4.0	+36.7		+28.3
Si-29	0	+8.4	-14.0	-56.0	-18.5
Ge-73	0	+17.3	+31.6	-112.8	+30.9
Sn-119	0	-1.4	-137	-260.1	-148
Pb-207	0	+73.3	-179		

残基の場合には、対応する化合物の  $^{73}\text{Ge}$  化学シフトと  $^{29}\text{Si}$  化学シフトの間にはかなりよい相関が報告されている。<sup>4)</sup>

$$\delta(\text{Ge}) = 1.85 \delta(\text{Si}) + 1.52 \quad (r = 0.970) \quad (1)$$

Table 1 の範囲では、Cl 体に向題があるので相関からはおすと、 $^{73}\text{Ge}$  化学シフトは  $^{13}\text{C}$  化学シフト以外の、他の IVB 族元素の化学シフトとよく相関する。とくに  $^{29}\text{Si}$  化学シフトとの相関がよい。

$$\delta(\text{Ge}) = 2.01 \delta(\text{Si}) + 1.11 \quad (r = 0.9995) \quad (2)$$

### C 緩和時間

$^{73}\text{Ge}$  スピン-格子緩和時間  $T_1$  を反転回復法で測定した。一例として  $\text{GeCl}_4$  のスペクトルを Fig 2 に示す。 $^{73}\text{Ge}$   $T_1$  の報告はほとんど例がないが、一般値としては  $0.03\text{-}1\text{ s}$ <sup>5)</sup> が与えられている。他の IVB 族元素に比べて緩和が著るしく早いのは、四極緩和の寄与が大きいためである。

1, 2 について、 $T_1$  の温度変化および NOE ファクターを測定したが、DD 緩和、SR 緩和などの大きな寄与は見出さなかった。

四極緩和が主要な緩和経路であると、四極緩和時間  $T_2$  とシグナルの半値幅  $\Delta$  との間には

$$\pi \Delta = 1/T_2 \quad (3)$$

の肉保がある。<sup>5)</sup> Table 2 には 1~6 の  $T_1$ ,  $\Delta$ , 式(3)に基本く計算値をまとめた。実測値と計算値との対応はよく、四極緩和が緩和の主系路であることが確認できる。

### d シグナルの観測と構造

四極モーメントを持つ核は高度に対称な場合(例:  $^{14}\text{NH}_4^+$ )に限って鋭いシグナルを与えることが知られている。だが線幅は対称性だけでは決まらない。例えば、混合ハロゲン化合物(例:  $\text{GeClBr}_3$ )のシグナルは観測されるが、炭素置換した  $\text{GeMeCl}_3$  のシグナルは観測されない。<sup>3a)</sup> 我々も  $\text{Cl}_3\text{GeCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  (7) などのシグナルは観測できなかった。

一方、四個のアルキル基が結合している場合は、それらが全て同一の基でなくて

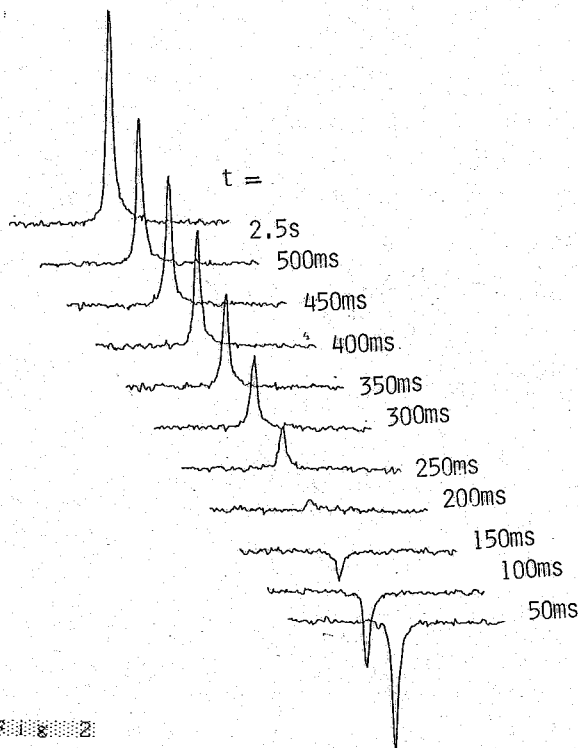


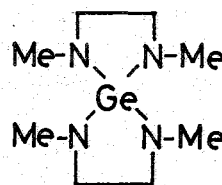
Fig. 2  
Inversion-Recovery  
 $^{73}\text{Ge}$  NMR spectra of  $\text{GeCl}_4$



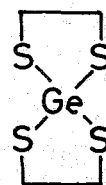
Table 2 Ge-73 T<sub>1</sub> of R<sub>4</sub>Ge

No	R	T <sub>1</sub> (ms)	Δ(Hz)	T <sub>1</sub> (calcd)
1	Me	280	1.3	245
2	Et	235	1.7	190
3	Ph		6	53
4	2-furyl	20	11	29
5	2-thienyl	44	8	40
6	Cl	287	1.2	265

メシブナルの観測は可能である(例: Me<sub>3</sub>Ge-CH<sub>2</sub>Cl, Δ 154 Hz)<sup>4)</sup> 我々も Me<sub>3</sub>Ge-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (8) のシグナルを観測した(Δ 54 Hz). ところが, 対称性のよいものでも, 9, 10 のような化合物の <sup>73</sup>Ge シグナルは観測できない。(MeS)<sub>4</sub>Ge のシグナルは観測できるから, 分子の大きさが効いていることがわかる。



(9)



(10)

### 3. <sup>13</sup>C NMRスペクトル

置換ケルマソの <sup>13</sup>C 化学シフトについては 2, 3 の報告があるが,<sup>6)</sup> 緩和機構に関する報告はほとんど無いので, 1, 2 などの δ, T<sub>1</sub>, γ を測定し, 結果を Table 3 にまとめた。1 と TMS<sup>7)</sup> を比較したところ, TMS が主として DD 緩和によるのに対して, 1 における DD 緩和の寄与は小さい。7 のメチル基でも, DD 緩和の寄与は小さい。

Table 3 C-13 NMR Data for GeR<sub>4</sub>

Compound	C	δ	T <sub>1</sub> (s)	γ
GeMe <sub>4</sub>		-4.39	15.46	0.34
SiMe <sub>4</sub>		0	23.2	1.43
GeEt <sub>4</sub>	CH <sub>2</sub>	3.79	11.09	
	Me	9.06	9.96	
Me <sub>3</sub> GeCH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> COOH	Me	-2.53	7.38	0.35
	Ge-CH <sub>2</sub>	11.31	2.40	1.10
	CO-CH <sub>2</sub>	29.84	1.48	1.91
	COOH	181.67		

REFERENCES: 1) S. Masamune, Y. Hanzawa, D.J. Williams, J. Am. Chem. Soc. 104, 6136 (1982). 2) 例えば 化学の領域 36, 668 (1983). 3) a) R.K. Harris, B.E. Mann, eds. "NMR and the Periodic Table", Academic Press, 1978, p. 340. b) G. Wilkinson, ed. "Comprehensive Organometallic Chemistry", Vol. 2, Pergamon Press, 1982, p. 503. 4) L. Zinmane, E. Liepins, E. Lukevics, T.K. Gar, Zh. Obshch. Khim. 52, 896 (1982). 5) C. Brevard and P. Granger, "Handbook of High Resolution Multi-nuclear NMR", John Wiley & Sons, 1981, p. 18, 138. 6) B.E. Mann, B.F. Taylor, "13C NMR Data for Organometallic Compounds", Academic Press, 1981, p. 64. 7) R.K. Harris, B.J. Kimber, Org. Magn. Reson. 7, 460 (1975).

# 36. NMRパラメータの計算方法

(京大理) 雑賀 亞中晃

TABLE I. Various contributions to the nuclear coupling constant of the hydrogen fluoride molecule evaluated by MO's other than Nesbet's, together with the results by other workers (in cycles per second).

Contribution	Used MO				Variational method <sup>b</sup>	Experimental
	Slater MO	Best-limited MO	H-F MO	Constrained MO		
$J^{(3)}(3\sigma \rightarrow 4\sigma)$	-1903.84	-2710.26	-1145.09	-1645.14		
$J^{(3)}(2\sigma \rightarrow 4\sigma)$	742.08	1308.73	684.40	947.27		
$J^{(3)}(1\sigma \rightarrow 4\sigma)$	1.11	2.51	1.21	1.75		
$J^{(3)}(1\pi_x \rightarrow 4\sigma)$	48.96	28.53	55.17	32.42		
$J^{(3)}(1\pi_y \rightarrow 4\sigma)$	48.96	28.53	55.17	32.42		
$J^{(3b)}(1\pi_x \rightarrow 4\sigma)$	-107.96	-71.52	-133.27	-90.45		
$J^{(3b)}(1\pi_y \rightarrow 4\sigma)$	-107.96	-71.52	-133.27	-90.45		
$J^{(1a)}$	2.14	2.06	5.10	1.67		
Total	-1276.51	-1482.94	-610.58	-810.51	+531.2 (by Duncan MO) <sup>c</sup> +54.8 (by Ballinger MO) <sup>d</sup>	615±50 (by Solomon <i>et al.</i> ) <sup>e</sup> 521 (by MacLean <i>et al.</i> ) <sup>f</sup>

TABLE II. Contributions of each excitation to the Fermi contact term  $J^{(3)}$  and the spin dipolar term  $J^{(2)}$ , evaluated by Nesbet's MO (in cycles per second).

A. Fermi contact term							
Occupied MO	Unoccupied MO						Total
	4σ	5σ	6σ	7σ	8σ	9σ	
1σ	0.12	-0.05	0.07	0.26	3.23	-2.77	
2σ	475.91	-342.92	167.68	-432.30	3865.94	-2254.37	
3σ	-447.33	205.30	-89.71	216.83	-1794.16	1012.95	
Sum	28.70	-137.67	78.04	-215.21	2075.01	-1244.19	+584.68

B. Spin dipolar term											
Occupied MO	Unoccupied MO										Total
	4σ	5σ	6σ	7σ	8σ	9σ	2π*	3π*	4π*	5π*	
1σ							-0.00	0.01	0.01	0.04	
2σ							0.48	-0.71	2.63	4.84	
3σ							-5.55	-4.30	24.55	-9.15	
1π*	2.69	-1.95	-0.18	14.12	0.82	-4.79	23.40	-1.45	-7.60	-1.26	
Sum	2.69	-1.95	-0.18	14.12	0.82	-4.79	18.33	-6.45	19.59	-5.53	+36.65

$$E(I_A, I_B) = h \bar{I}_A \bar{J}_{AB} \bar{I}_B \quad (1)$$

$$H_F = \sum_j \sum_{N=A,B} h_N(j) \quad (3)$$

$$J_{AB} = \frac{1}{h} \left. \frac{\partial^2 E(I_A, I_B)}{\partial I_{AZ} \partial I_{BZ}} \right|_{I_{AZ}, I_{BZ}=0} \quad (2)$$

$$h_N(j) = \frac{16\pi\beta}{3} \delta(\bar{r}_{jN}) S_{jN} I_{Nz} \quad (4)$$

さいか あほろ

$$H = H_0 + H_{\text{corr}} + H_f, \quad (5)$$

$$H_0 = \sum_{k,l} \langle k | T + \bar{V}_{\text{HF}} | l \rangle a_k^\dagger a_l = \sum_k \epsilon_k a_k^\dagger a_k, \quad (6)$$

$$H_{\text{corr}} = \frac{1}{2} \sum_{k,l,m,n} \langle k,l | m,n \rangle a_k^\dagger a_l^\dagger a_m a_n - \sum_{k,l} \langle k | \bar{V}_{\text{HF}} | l \rangle a_k^\dagger a_l, \quad (7)$$

$$H_f = \sum_{k,l} \langle k | \sum_{N=A,B} h_N | l \rangle a_k^\dagger a_l. \quad (8)$$

$$(T + \bar{V}_{\text{HF}}) \varphi_k = \epsilon_k \varphi_k, \quad (9)$$

$$\left[ T + \sum_{N=A,B} h_N + \bar{V}_{\text{HF}} \right] \bar{\varphi}_k = \bar{\epsilon}_k \bar{\varphi}_k, \quad (10)$$

$$H = \bar{H}_0 + \bar{H}_{\text{corr}}, \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \bar{H}_0 &= \sum_{k,l} \langle \bar{k} | T + \sum_{N=A,B} h_N + \bar{V}_{\text{HF}} | \bar{l} \rangle \bar{a}_k^\dagger \bar{a}_l \\ &= \sum_k \bar{\epsilon}_k \bar{a}_k^\dagger \bar{a}_k, \end{aligned} \quad (12)$$

$$\begin{aligned} \bar{H}_{\text{corr}} &= \frac{1}{2} \sum_{k,l,m,n} \langle \bar{k}, \bar{l} | \bar{m}, \bar{n} \rangle \bar{a}_k^\dagger \bar{a}_l^\dagger \bar{a}_m \bar{a}_n \\ &\quad - \sum_{k,l} \langle \bar{k} | \bar{V}_{\text{HF}} | \bar{l} \rangle \bar{a}_k^\dagger \bar{a}_l. \end{aligned} \quad (13)$$

$$\begin{aligned} E(I_A, I_B) &= \bar{E}_0(I_A, I_B) \\ &\quad + \sum_{n=0}^{\infty} \left\langle \Phi_0 \left| \bar{H}_{\text{corr}} \left[ \frac{1}{\bar{E}_0 - \bar{H}_0} \bar{H}_{\text{corr}} \right]^n \right| \Phi_0 \right\rangle_{\text{conn}}, \end{aligned} \quad (14)$$

$$\bar{H}_0 | \bar{\Phi}_0 \rangle = \bar{E}_0 | \bar{\Phi}_0 \rangle. \quad (15)$$

$$\begin{aligned} \left. \frac{\partial^2 E(I_A, I_B)}{\partial I_A \partial I_B} \right|_{I_A, I_B=0} &= \gamma_A \gamma_B \bar{n}^2 \left. \frac{\partial^2 E(\mu_A, \mu_B)}{\partial \mu_A \partial \mu_B} \right|_{\mu_A, \mu_B=0} \\ &\approx \gamma_A \gamma_B \bar{n}^2 \frac{E(\mu_A, \mu_B) - E(\mu_A, -\mu_B)}{2\mu_A \mu_B} \end{aligned} \quad (16)$$

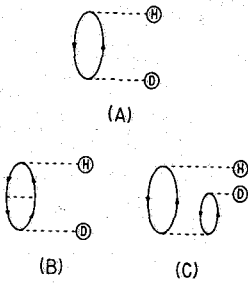


FIG. 1. Zero- and first-order correlation diagrams for the Fermi coupling in HD.  $\textcircled{H}$  and  $\textcircled{D}$  refer to the operators  $F_H$  and  $F_D$ , respectively, which may be also interchanged.

$$\begin{aligned} J_0 &= 2C_{\text{HD}} \sum_{p \neq 0} \frac{\langle 1^+ | \delta(\mathbf{r}_H) S_p | p^+ \rangle \langle p^+ | \delta(\mathbf{r}_D) S_p | 1^+ \rangle}{\epsilon_{1^+} - \epsilon_{p^+}} \\ &= C_{\text{HD}} \left[ \sum_{p \neq 2\sigma_p} \frac{|\langle 1 | \delta(\mathbf{r}_H) | p \rangle|^2}{\epsilon_1 - \epsilon_p} - \sum_{p \neq 1\sigma_p} \frac{|\langle 1 | \delta(\mathbf{r}_H) | p \rangle|^2}{\epsilon_1 - \epsilon_p} \right] \end{aligned} \quad (17)$$

TABLE III.  $\sigma$  orbital contributions (in Hz) with set B to  $J_0$ .

Orbital	$\sigma_x$	$\sigma_y$	$\sigma_x + \sigma_y$
1		0.003	0.003
2	-0.047	0.092	0.045
3	-0.483	0.920	0.438
4	-0.248	0.296	0.049
5	-2.524	3.092	0.568
6	-0.019	5.708	5.689
7	-5.908	0.688	-5.220
8	-1.692	9.711	8.020
9	-1.704	1.463	-0.241
10	-9.175	11.955	2.780
11	-0.009	3.830	3.821
12	-0.010	14.626	14.616
13	-16.263	1.908	-14.354
14	-2.982	0.038	-2.944
15	-0.068	0.433	0.365
16	-32.974	32.446	-0.528
17	-85.950	85.436	-0.514
18	-80.172	80.102	-0.070
19	-315.867	315.778	-0.089
Total	-556.094	568.526	12.432

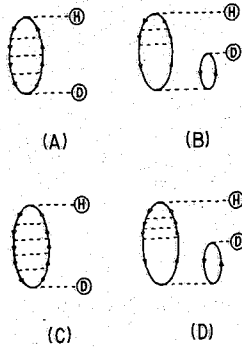


FIG. 2. Important third- and fourth-order correlation diagrams.

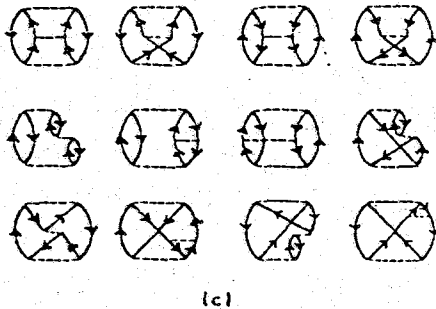
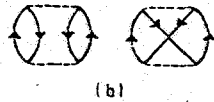
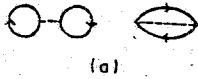


FIG. 3. Field-dependent energy diagrams: (a) Hartree-Fock, (b) second-order, (c) third-order.

$$H' = \sum_{k,l} \left\langle k \left| \sum_{N=A,B} h_N + \bar{V}_{\text{HF}} - \bar{V}_{\text{HF}} \right| l \right\rangle a_k^\dagger a_l, \quad (18)$$

$$\bar{G}_{kl}^{\text{HF}}(t, t') = G_{kl}^{\text{HF}}(t, t') + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n!} \left( \frac{-i}{\hbar} \right)^n \int_{-\infty}^{\infty} dt_1 \cdots \int_{-\infty}^{\infty} dt_n \langle \Phi_0 | T \{ H'(t_1) \cdots H'(t_n) a_k(t) a_l^\dagger(t') \} | \Phi_0 \rangle_{\text{conn}} \quad (19)$$

TABLE IV. Fermi contact contributions (in Hz) to the nuclear spin coupling constant in HD. Numbers in parentheses are relative to the experimental value.

	Normal		Shifted	
	Set A	Set B	Set A	Set B
$J_0$	12.432 (29.0%)	12.432 (29.0%)	16.432 (38.3%)	16.009 (37.3%)
1(B)	7.135	7.134	8.085	7.869
1(C)	2.250	2.250	3.848	3.553
$J_1$	9.386	9.385	11.933	11.422
$J_0 + J_1$	21.818 (50.8%)	21.817 (50.8%)	28.365 (63.9%)	27.431 (63.9%)
$J_2$	6.279	6.268	6.163	6.249
$J_0 + J_1 + J_2$	28.097 (65.4%)	28.085 (65.4%)	34.528 (80.4%)	33.680 (78.4%)
$J_3$	3.458	3.457	2.220	2.450
$J_4$	2.122	2.122	0.880	1.066
$\sum_{n=0}^4 J_n$	33.677 (78.4%)	33.664 (78.4%)	37.628 (87.6%)	37.196 (86.6%)
$J_{\text{SGA}}$	37.048 (86.3%)	37.034 (86.2%)	38.206 (89.0%)	38.018 (88.5%)
Experimental <sup>a</sup>	42.94 ± 0.1			

<sup>a</sup>Reference 15.

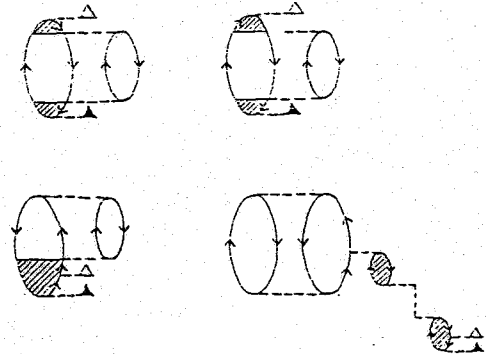


FIG. 4. Typical higher-order diagrams which originate from Fig. 3 (b).

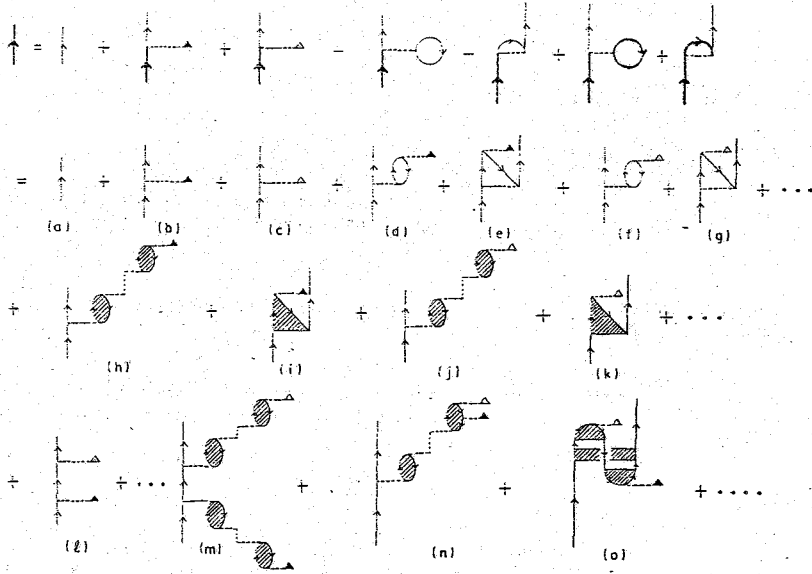


FIG. 5. (a)–(o) Diagrammatic representation of single-particle Green's functions. Heavy lines represent  $\bar{G}^{\text{HF}}$ , while light lines represent  $G^{\text{HF}}$ .  $\blacktriangle$  and  $\triangle$  refer to  $h_A$  and  $h_B$ , respectively.

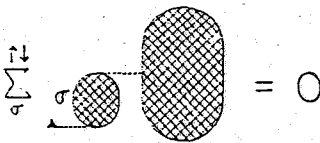


FIG. 6. Cancellation of diagrams associated with the property of the Fermi contact operator.

TABLE V. Fermi contact contribution to  $J_{\text{HD}}$  (in Hz).

Contributions	$J_{\text{HD}}$
Zeroth-order (CHF)	54.3
Second-order	-15.4
Third-order	-1.7
Total sum	37.2

$$A_{\sigma\alpha\beta} = \partial^2 \Delta E / \partial \mu_{A\alpha} \partial H_{\beta} |_{\mu, H=0}, \quad (20)$$

$$\chi_{\alpha\beta} = -\partial^2 \Delta E / \partial H_{\alpha} \partial H_{\beta} |_{\mu, H=0}, \quad (21)$$

$$A_{\sigma\alpha\beta}^d = \sum_{k,l=0}^{\infty} \langle \Phi_0 | \left( \hat{H}_{\text{corr}} \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} \right)^k f_{A\alpha\beta}^{kl} \left( \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} \hat{H}_{\text{corr}} \right)^l | \Phi_0 \rangle_{\text{conn}}, \quad (22)$$

$$A_{\sigma\alpha\beta}^p = 2 \text{Re} \sum_{k,l,m=0}^{\infty} \langle \Phi_0 | \left( \hat{H}_{\text{corr}} \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} \right)^k f_{\beta}^{kl} \left( \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} \hat{H}_{\text{corr}} \right)^l \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} f_{A\alpha}^{0l} \left( \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} \hat{H}_{\text{corr}} \right)^m | \Phi_0 \rangle_{\text{conn}}, \quad (23)$$

$$\chi_{\alpha\beta}^d = 2 \sum_{k,l=0}^{\infty} \langle \Phi_0 | \left( \hat{H}_{\text{corr}} \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} \right)^k f_{\alpha\beta}^{kl} \left( \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} \hat{H}_{\text{corr}} \right)^l | \Phi_0 \rangle_{\text{conn}}, \quad (24)$$

$$\chi_{\alpha\beta}^p = -2 \text{Re} \sum_{k,l,m=0}^{\infty} \langle \Phi_0 | \left( \hat{H}_{\text{corr}} \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} \right)^k f_{\beta}^{kl} \left( \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} \hat{H}_{\text{corr}} \right)^l \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} f_{\alpha}^{l0} \left( \frac{1}{E_0 - \hat{H}_0} \hat{H}_{\text{corr}} \right)^m | \Phi_0 \rangle_{\text{conn}}, \quad (25)$$

$$\left[ T + h_{\alpha}^{10} H_{\alpha} + \sum_{\Lambda} h_{A\alpha}^{01} \mu_{A\alpha} + H_{\alpha} h_{\alpha\beta}^{20} H_{\beta} + \sum_{\Lambda} \mu_{A\alpha} h_{A\alpha\beta}^{11} H_{\beta} \right] \varphi_{\beta i}^{10} = \sum_p C_{\beta\beta i}^{10} \varphi_p^0, \quad (27)$$

$$+ V_{\text{HF}}(\mathbf{H}, \mu) \varphi_i = \epsilon_i \varphi_i. \quad (26)$$

$$(\epsilon_p^0 - \epsilon_i^0) C_{\beta\beta i}^{10} + h_{\beta\beta i}^{10} + \sum_q \sum_j C_{\beta\alpha j}^{10} (\langle pq | j\hat{i} \rangle - \langle pj | q\hat{i} \rangle) = 0. \quad (28)$$

$$A_{\sigma\alpha\beta} = \sum_i^{\text{occ}} h_{A\alpha\beta ii}^{11} + 2 \text{Re} \sum_i^{\text{occ}} \sum_p h_{A\alpha ip}^{01} C_{\beta pt}^{10}, \quad (29)$$

$$\chi_{\alpha\beta} = -2 \sum_i^{\text{occ}} h_{\alpha\beta ii}^{20} - 2 \text{Re} \sum_i^{\text{occ}} \sum_p h_{\alpha ip}^{10} C_{\beta pt}^{10}. \quad (30)$$

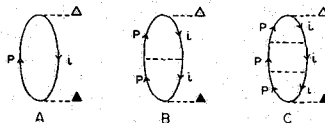


FIG. 7. Diagonal particle-hole ladder-type diagrams which form a major part of CHF corrections.

TABLE VI. Nuclear magnetic shielding (in ppm) and magnetizability (in  $10^{-6}$  erg G<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup>) of HF.

	Basis set	Gauge origin	$F_{O_{II}}^d$	$F_{O_I}^d$	$F_{O_I}^p$	$F_{\sigma}$	$H_{O_{II}}^d$	$H_{O_I}^d$	$H_{O_I}^p$	$H_{\sigma}$
CHF			481.9	482.4	-104.2	412.7	44.09	1.91	16.94	27.26
MBPT										
Zeroth order			481.9	482.4	-38.95		44.09	1.91	11.83	
First order					-26.69				3.43	
Second order	A	F			-14.84				1.10	
CHF type					-16.51				1.21	
non-CHF type			-0.90	-0.58	1.67		0.49	1.47	-0.11	
Total sum			481.0	481.8	-80.48	427.9	44.58	3.38	16.36	28.02
CHF			481.9	467.6	-88.52	413.4	44.09	140.6	-109.0	35.76
MBPT										
Zeroth order			481.9	467.6	-11.27		44.09	140.6	-86.65	
First order					-32.43				-17.05	
Second order	A	H			-21.32				-1.77	
CHF type					-21.24				-4.02	
non-CHF type			-0.90	-0.68	-0.08		0.49	-0.24	2.25	
Total sum			481.0	466.9	-65.02	428.3	44.58	140.4	-105.5	38.13
CHF			481.8	482.4	-103.1	413.5	44.05	1.56	17.66	27.50
MBPT										
Zeroth order			481.8	482.4	-38.62		44.05	1.56	11.96	
First order					-26.37				3.53	
Second order	B	F			-14.46				1.18	
CHF type					-16.31				1.24	
non-CHF type			-0.54	-0.23	1.85		0.41	1.34	-0.06	
Total sum			481.3	482.2	-79.45	428.9	44.46	2.90	16.67	27.89
CHF			481.8	467.3	-91.93	410.9	44.05	140.7	-113.8	32.58
MBPT										
Zeroth order			481.8	467.3	-11.00		44.05	140.7	-90.50	
First order					-33.74				-17.75	
Second order	B	H			-22.68				-2.34	
CHF type					-22.20				-4.20	
non-CHF type			-0.54	-0.38	-0.48		0.41	-0.19	1.86	
Total sum			481.3	466.9	-67.42	426.8	44.46	140.5	-110.6	34.75
Other results										
CHF <sup>a</sup>		F	481.56 <sup>b</sup>		-101.57	413.85		15.76 <sup>b</sup>	19.02	28.45
		H								30.85
CHF <sup>c</sup>		F	482.27 <sup>b</sup>		102.63	413.95		108.62 <sup>b</sup>	-118.23	29.80
		H								
CHF <sup>d</sup>		F	481.6	482.5	-100.8	415.0	44.06	1.52	18.06	27.74
		H	481.6	467.8	-87.2	414.3	44.06	140.7	-118.9	29.25
Experiment		F			-94.2 <sup>e</sup>	410 <sup>e</sup>				28.37 <sup>f</sup>
						(±6)				(±0.2)

$$\sigma^a = \frac{1}{2}(\sigma^p - \tilde{\sigma}^p), \quad (31)$$

$$\Delta\sigma = \sigma_{33} - \frac{1}{2}(\sigma_{22} + \sigma_{11}), \quad (32)$$

$$\eta = (\sigma_{22} - \sigma_{11})/(\sigma_{33} - \sigma_{av}), \quad (33)$$

$$\sigma_{av} = \frac{1}{3} \sum_i \sigma_{ii}. \quad (34)$$

$$1/T_1 = \omega_0^2 \tau_c \{ 2[(\sigma_{12}^a)^2 + (\sigma_{23}^a)^2 + (\sigma_{13}^a)^2] + \frac{2}{15}(\Delta\sigma)^2(1 + \frac{1}{3}\eta^2) \}, \quad (35)$$

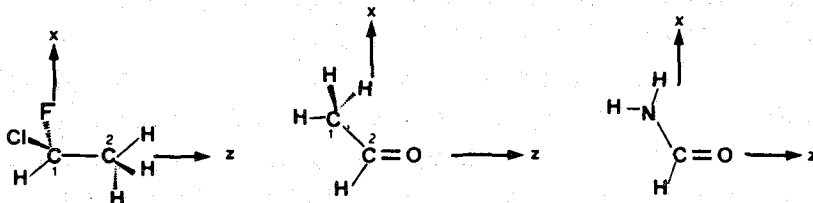


Fig. 8.

Table VII.

Principal values, principal axes, asymmetry factors, anisotropies and antisymmetric parts of  $^{13}\text{C}$  shielding tensors (in ppm) for  $\text{CHFClCH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CHO}$  and  $\text{NH}_2\text{CHO}$

	$\sigma_{11}$	$\sigma_{22}$	$\sigma_{33}$	$\text{Tr}(\sigma)/3$	$\eta$	$\Delta\sigma$	$\Sigma(\sigma^a)^2$
$\text{CHFClCH}_3$	333.1	288.8	227.1	283.0	0.7925	-83.81	12.68
$\text{CH}_3\text{CHO}$	-87.14	29.97	241.4	61.40	0.6507	270.0	3.090
$\text{NH}_2\text{CHO}$	235.2	109.3	-44.71	99.91	0.8704	-216.9	1.661
	direction cosines			antisymmetric components			
	1	2	3	$\sigma_{12}$	$\sigma_{13}$	$\sigma_{23}$	
$\text{CHFClCH}_3$	X	-0.4994	-0.7980	-0.3374	-2.354	2.563	0.2895
	Y	0.5895	-0.0276	-0.8074			
	Z	0.6349	-0.6020	0.4842			
$\text{CH}_3\text{CHO}$	X	-0.9997	0.0237	0.0000	-1.758	0.0000	0.0000
	Y	0.0000	0.000	-1.0000			
	Z	-0.0237	-0.9997	0.0000			
$\text{NH}_2\text{CHO}$	X	0.0000	0.0983	-0.9952	0.0000	0.0000	1.289
	Y	-1.0000	0.0000	0.0000			
	Z	0.0000	0.9952	0.0983			

1) Y. Kato and A. Saika, J. Chem. Phys. 46, 1975 (1967).

2) T. Itagaki and A. Saika, *ibid.* 71, 4620 (1979).

3) M. Iwai and A. Saika, Phys. Rev. A 28, (October, 1983).

4) M. Iwai and A. Saika, J. Chem. Phys. 77, 1951 (1982).

5) M. Iwai and A. Saika, Int. J. Quantum Chem. (in press).

6) M. Iwai and A. Saika, Chem. Phys. Letters 95, 596 (1983).

7) A. Saika and C. P. Slichter, J. Chem. Phys. 22, 26 (1954).

## 37. CO/H<sub>2</sub> 高压ガス下でのRhカルボニル・クラスターの動的構造変化の研究

(阪大教養・ケント大) O江口太郎, B.T. Heaton

はじめに

合成ガス(COとH<sub>2</sub>の混合ガス)から基礎的な有機化合物(エタレングリコール, アセトアルデヒド, 酢酸, エタノールなど)を合成するフィッシャー・トロプシュ型反応は, "C<sub>1</sub>化学"として注目されている。反応にはいろいろな金属触媒が使用され, ことにRhカルボニル化合物は工業化の面からも有望視されている。

フィッシャー・トロプシュ型反応の特徴は, 触媒存在下でもかなりの高温・高压をとる点が多い点である。Rhカルボニルを触媒にして合成ガスからエタレングリコールを合成する場合は, CO/H<sub>2</sub> (1:1)で493K, 約1000気圧の反応条件が使われている。このような高温・高压下での反応については, 測定条件の設定自体がたいへん困難であり, 反応経路, 中間生成物などに関して未知の部分が多く残されている。

触媒に使用する多核金属クラスターの構造は, 赤外, Raman分光法やX線構造解析などにより決められている。これらの手段に加えて, 最近ではFT-NMR法がもっとも有効な研究手段の一つになり, <sup>1</sup>Hのみならず<sup>13</sup>C, <sup>31</sup>Pなどいろいろな核種について比較的容易に高分解能スペクトルがえられるようになってきた。

NMR法の利点は, 溶液内の金属クラスターの構造だけでなく, クラスター自身のfragmentationや配位子のrandomisationに関しても研究できる点である。金属クラスター内, クラスター間の配位子の交換過程, クラスターの金属多角形面の反応性やcapping, クラスター内の結合状態などについて微視的に調べることができる。したがって, NMRスペクトルをCO/H<sub>2</sub>ガスの高压雰囲気下で観測すれば, 触媒反応のメカニズム解明にとって重要な情報がえられる。

### 実験

超伝導磁石用のタンタル合金製高压高分解能NMRプローブを使用した。これは, イリノイ大学のジョナスらが開発したものと同様のシステムである。<sup>1)</sup> 試料回転なしで磁場の均一度を確保する(磁場シム)ため, いくつかの改良をほどこした。サドルコイルはRh・Au合金製の薄いリボンから成り, 外径約13mm中の石英管内壁に貼り付けたものを使用した(Bruker製)。試料容器は, 市販の10mm中NMRチューブを長さ約35mmに切断し, アンプル型に整形したものを開封状態で用いた。

外部の高压ポンプ(4段のコンプレッサーで1kbarまで運転可能)を使い, COやN<sub>2</sub>ガスで容器内の圧を希望値に調整した。

C-13 NMR Studies of Rhodium Carbonyl Clusters on Pressurization with CO/H<sub>2</sub>  
T. Eguchi and B. T. Heaton

えぐち たろう, B.T. ヒートン



磁場シムは溶媒のプロトンFID信号をモニターして行った。このため $^1\text{H}$  (200 MHz) と  $^{13}\text{C}$  (50.3 MHz) 周波数の二重同調・インバーダンス整合回路を自作した。このマッキング回路で、高圧カプローブと Bruker WM-200 WB・FT-NMR 装置を接続した。

高圧高分解能 NMR システムの特徴をまとめると— i 圧力 (最高 5 kbar), 温度 ( $-80 \sim 200^\circ\text{C}$ ) を外部から適当にコントロールできる。ii 圧力サイクルに対して十分な耐久力がある。iii 試料容器は市販の NMR チューブと同様で、開放系における測定が可能になる。iv 二重同調の採用で磁場シムが比較的容易—ということになる。これらの特徴は、*in situ* でのフィッシャー・トロプシュ型触媒反応の研究上重要な鍵になる。

$[\text{NMe}_3(\text{CH}_2\text{Ph})]_2 [\text{Rh}_{12}(\text{CO})_{30}]$  のテトロヒドロフラン (thf) 溶液, アセトン溶液について実験した。

### 結果と考察

試料回転させた通常の NMR 装置と試料回転なしの高圧カプローブの分解能を比較したスペクトルを図 1 に示す。いずれも  $\text{N}_2$  ガス 1 気圧下での  $[\text{Rh}_{12}(\text{CO})_{30}]^{2-}$  のスペクトルである。図 1-d は高圧カプローブ使用の場合で、a, b, c はスピナーをもった装置による結果である。b と d はとも  $R_T = 298\text{K}$  でのスペクトルで、両者の分解能はほぼ等しく、試料回転しなくても高圧カプローブは十分な分解能をもつ。

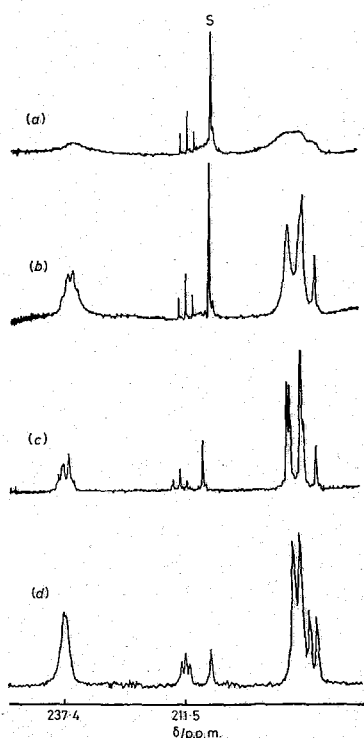
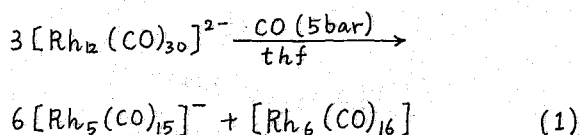


FIGURE 1 Carbon-13 n.m.r. spectra of  $[\text{NMe}_3(\text{CH}_2\text{Ph})]_2[\text{Rh}_{12}(\text{CO})_{30}]$  obtained under  $\text{N}_2$  (1 bar) in a conventional high-resolution probe in thf- $^{13}\text{C}$  acetone (9:1) at (a) 323, (b) 298, and (c) 193 K; (d) the high pressure probe in acetone solution at 298 K

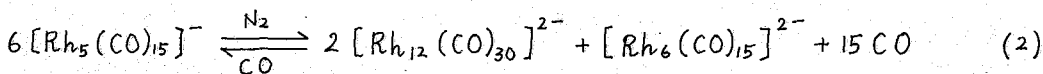
$[\text{Rh}_{12}(\text{CO})_{30}]^{2-}$  クラスタは、5 気圧の  $\text{CO}$  ガス下で式 (1) の組み替え反応をする (室温)。<sup>2)</sup>



反応生成物の  $[\text{Rh}_5(\text{CO})_{15}]^{-}$  クラスタの構造は、結晶中では図 3-a (X線解析), 溶液中では図 3-b (NMR) になることがわがっている。

また、溶液中での  $[\text{Rh}_5(\text{CO})_{15}]^{-}$  クラスタには式 (2) に示す可逆平衡が成り立っている。

図 2-a, b, c に、 $\text{CO}$  ガス 5 気圧雰囲気下の  $[\text{Rh}_5(\text{CO})_{15}]^{-}$  の  $^{13}\text{C}$  スペクトルを示す。 $^{103}\text{Rh}$  は天然存在比 100%, スピン  $I = 1/2$  の核種であ



る。図2に相対強度が3:6:6の3種のピーク群が見られる。a, bのRh共鳴のデカップリング・スペクトルから, 247 ppmの信号は図3のX印で示したCO<sub>eq</sub>に帰属され, 207.9 ppmの信号は三方両錐の頂点と中央面を架橋したCO<sub>ea</sub>, また190.6 ppmの信号は頂点に結合したCO<sub>ap</sub>に帰属できる。

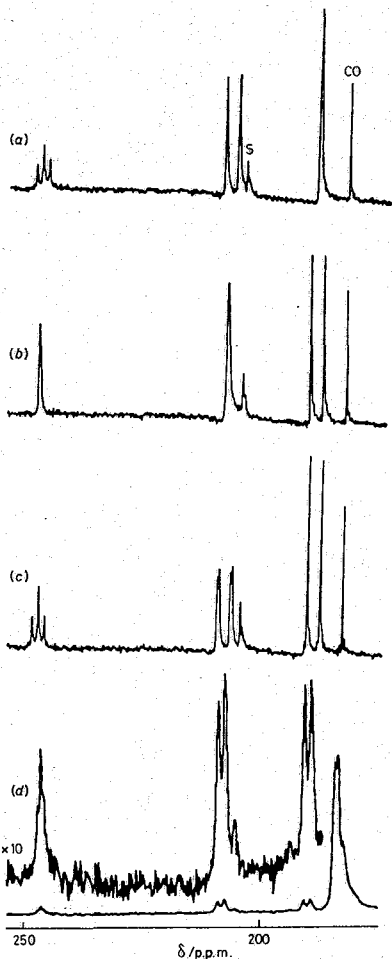


FIGURE 2 Carbon-13 n.m.r. spectra of  $[\text{Rh}_5(\text{CO})_{15}]^-$ : (a)–(c) at 201 K (33.8%  $^{13}\text{CO}$ ) under CO (5 bar) with  $^{103}\text{Rh}$  decoupling at (a) 3.157 093 MHz,  $\delta(\text{Rh}_{ap}) = -925.0$  p.p.m., (b) 3.159 531 MHz,  $\delta(\text{Rh}_{eq}) = -163.5$  p.p.m., (c) no decoupling, and (d) at 240.2 K (13.2%  $^{13}\text{CO}$ ) under 850 bar of  $\text{CO}/\text{H}_2$  (2.1:1, 13.7%  $^{13}\text{CO}$ ). S = Carbonyl resonance of  $^{13}\text{C}_6$ acetone solvent

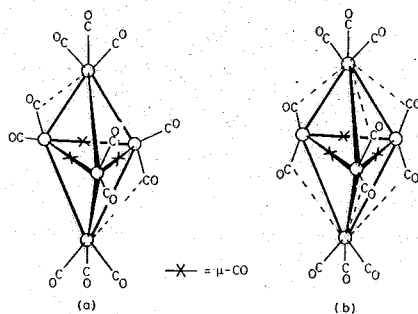


FIGURE 3 Schematic representation of the structures of  $[\text{Rh}_5(\text{CO})_{15}]^-$  in (a) the solid state<sup>4</sup> and (b) solution

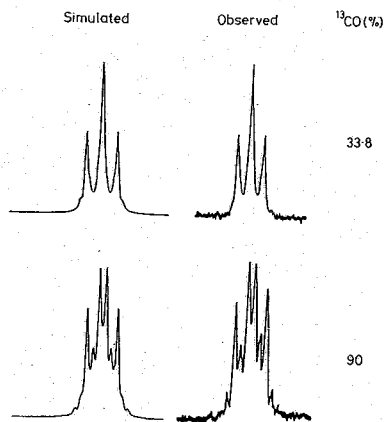


FIGURE 4 Observed and simulated  $\text{CO}_{eq}$  resonance in  $[\text{Rh}_5(\text{CO})_{15}]^-$  at 33.8 and 90%  $^{13}\text{CO}$  using the parameters in the text

図2-a, cの247 ppm附近の tripletは, 2次のカップリング項  $^2J(\text{C}_{eq}-\text{C}_{eq})$ に由来している。 $^1J(\text{Rh}-\text{C}_{eq}) = 32.7$ ,  $^2J(\text{Rh}-\text{C}_{eq}) = 0$ ,  $^2J(\text{C}_{eq}-\text{C}_{eq}) = 20$ ,  $^1J(\text{Rh}-\text{Rh}) = 0$  Hzとしてスペクトルの $^{13}\text{C}$ 濃度依存性を計算すると図4にあり, 実測の線形とよく一致する。

COガスの圧力をさらに増加させたばあい, この $[\text{Rh}_5(\text{CO})_{15}]^-$ クラスターの再組み替えが起こるかどうか問題になる。

$[\text{Rh}_{12}(\text{CO})_{30}]^{2-}$ だけを含む溶液を221 Kで575 barまでCOガスで加圧すると,

式(1)の反応に従って $^{13}\text{C}$ スペクトルに $[\text{Rh}_5(\text{CO})_{15}]^-$ の成分が増加してゆくのが観測される。しかしながら、未反応の $[\text{Rh}_{12}(\text{CO})_{30}]^{2-}$ 成分が残り、この状態は24時間後でも変化が見られなかった。これに $\text{H}_2$ ガスを混合し $P_{\text{total}}=850\text{ bar}$  ( $\text{CO}:\text{H}_2=2.1:1$ )でスペクトルを観測したが、やはり変化しなかった。

系の温度を、たん室温まで上昇させ、再び $240.2\text{ K}$ に冷却してから測定したのが図2-dのスペクトルである。ほぼ完全に $[\text{Rh}_5(\text{CO})_{15}]^-$ クラスターに変換しているのがわかる。

図2-dのスペクトルには重要な点が二つある。第1の点は、溶存するfreeのCOとクラスターのCO基の間の分子間交換過程がかなり遅いということである。これは、溶液中のCO成分、3種類のCO基、 $\text{CO}_{\text{eq}}$ 、 $\text{CO}_{\text{ea}}$ 、 $\text{CO}_{\text{ap}}$ 、のピークがそれぞれきれいに分離していることからわかる。たとえば、図1-aにCO交換によるスペクトルピークの混合効果が見られる。第2の点は、 $[\text{Rh}_5(\text{CO})_{15}]^-$ クラスターのみが存在し、圧力を増加させてもクラスターは再組み替えなどは起こさないことが示されたことである。

おわりに

高圧高分解能NMRプローブにはなお改善すべき点はいくつかある。高圧力容器の内径を少し広げて、デカップリング・コイルが使用できれば、スペクトルの各ピークの帰属はさらにやさしくなる。とくに、 $^1\text{H}$ とのカップリングが強い系のスペクトルを観測するにたいして、デカップリングはなくてはならない手段になる。また、圧力容器の材質がチタン合金なので、金属の水素脆性を考慮に入れなければならない。現有容器では、高圧水素ガスによる実験のばあい、測定温度が室温以下に限られる。水素脆性に強い金属での圧力容器製作を計画中である。

いずれにせよ、このような*in situ*における高圧高分解能NMRによる研究は非常に少ない。今後は、触媒反応ばかりでなく、いろいろな分野への応用が考えられる。

最後に、イリノイ大学のジョナス教授の御助力と英国 Science and Engineering Research Council と I.C.I. の資金援助に感謝する。

## 参考文献

1. J. Jonas, D.L. Hasha, W.J. Lamb, G.A. Hoffman, and T. Eguchi, *J. Magn. Res.* **42**, 169 (1981); D.L. Hasha, 江口太郎, J. Jonas, 第20回NMR討論会講演要旨集 P.21 (1981).
2. A. Fumagalli, F.T. Koetzle, F. Takusagawa, P. Cini, S. Martinengo, and B.T. Heaton, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 1740 (1980); J.L. Vidal and W.E. Walker, *Inorg. Chem.*, **19**, 896 (1980).

# 38. 超臨界域における有機液体の核磁気緩和と自己拡散係数の測定 (2)

シクロヘキサン

北大 工 ○ 下川 繁三 , 山田 英二

1)2)

(序) 液体が臨界点を越えたときに示す性質は極めて興味深い。例へば溶解性の異常、電気伝導度の増加、等々である。超臨界流体の物性や構造がどの様に通常の液体やガスと異なるかを分光学的に捕えてみたい。ガスと液が共存しているのか、そこに液体的な集合があるのかどうか。NMRは液体やガスの性質を調べるのに好都合な分光法である。我々は先に報告した高温高压<sup>13</sup>C-NMR<sup>3)</sup>をマルチ周波数に改良し、分解能を向上させて純有機液体や種々の複合系(有機-塩系、有機-金属系、等々)の臨界域前後から超臨界までの観測を試みたい。前回はベンゼン系液体の一つとしてトルエン<sup>4)</sup>についての実験の一部を報告した。そこでは臨界点附近でのトルエンの緩和や拡散係数に相転移と思はれる程の大きな変化を観測した。今回は非ベンゼン系有機液体の一つであるシクロヘキサンを例として実験をしたので報告する。メチルシクロヘキサンについては今回は時間の都合上省略する。

(実験装置の改良と実験の方法) 高温高压NMRの基本的なことはすでに報告した。今回この装置を4~40MHzのどの周波数でも計測出来るマルチ周波数型高温高压NMRにシステムに改良した。高分解能型であるので従来 $5 \times 10^{-7}$ のものを $9 \times 10^{-8}$ に向上させた。但し試料の回転はしていない。時間安定度を保持するために外部NMRロックを用いているがこれも周波数可変型のマルチNMRロックシステムに増強した。ロック周波数は38.2, 36, 30, 及び20MHzである。このNMRロックの時間安定度は $9 \times 10^{-8}$ /12Hで実験中にドリフトの影響は全くなかった。高温高压容器もその一部を改良し温度センサーを下部からも導入し温度検出の精度を向上させた。測定核種により共振コイルの組込んだ高压容器を交換する。我々はまだガス圧縮機を用意出来ないで圧力は30MPaまでの実験であるが近い将来100MPaまでの圧力で実験を試みたい。試料セルは封管型であらかじめ内容積を計量しておく。試料のシクロヘキサンは分光用のも

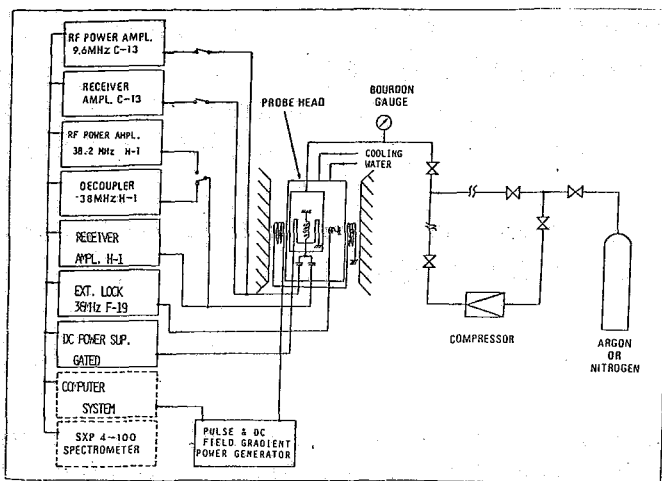


Fig. 1. Block diagram of a high-temperature and high-pressure multi-channel NMR apparatus, ....denotes Bruker spectrometer units.

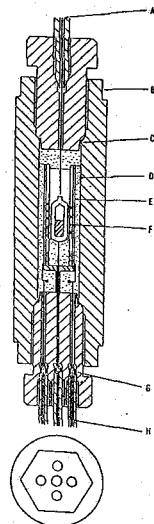


Fig. 2. High-pressure vessel of Ti-Al alloy.

のを真空系の中で四回凍結と融解をくりかえし脱酸素した。他に特別な精製の処理はしていない。

図の1は高温高压マルチ周波数型NMR装置で拡散係数測定用の磁場勾配発生コイルとそのパワーユニットが附属している。実線でかこまれた部分はすべて自作で点線の部分は市販のBrukerSXPパルスNMR分光器である。図の2は高温高压容器で下部よりRF用導線、ヒーター線が各二本づつと熱電対が導入されている。内部の圧力は臨界点まではその温度での

5)

蒸気圧から臨界点以上はMartin-Houの状態方程式から求めた。本実験は密封セルの使用であるので等温、等圧の条件の測定は出来ない。しかし

点もある。それは装置が簡単で、温度分布がよく、試料の純度※

※が保存されるからである。

図の3は化学シフトごとの緩和 (PRFT法) で得たトルエンの $T_1$ の測定例を示す。スペクトルの分離が極めて良いことが判る。

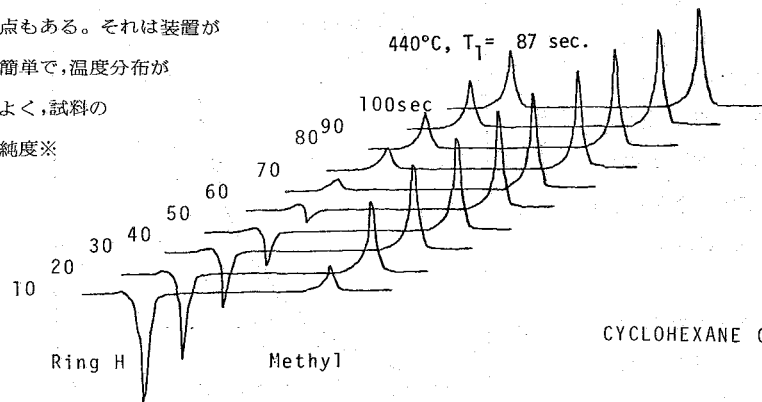


Fig.3. Partially relaxed Fourier Transform proton spectra of supercritical toluene, at 713K and 10MPa.

温度は440°Cで $T_1$ の値は87secと得られた。ここでは環のプロトンの $T_1$ が十分長いのでメチル基はすでに回復している (メチルの $T_1$ は10sec)。積算はしていない。図の4はシクロヘキサンの自己拡散係数を測定した例を示した。拡散係数は $90^\circ - \tau - 180^\circ$ のスピネコーに約10G程度の直流磁場勾配を重畳する (SG法) で行つた。

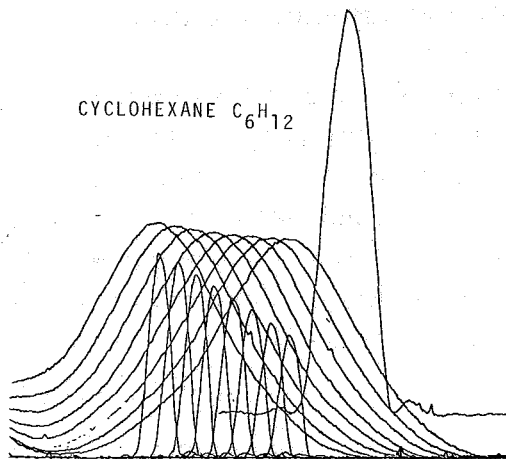


Fig. 4. Spin-echo trains; narrow echos (SG on), broad echos (SG off). An enlarged echo shows an echo (on) used for determination of g value.

この図はミニコンに一度入れて記録計に出力したものである。積算はしていない。これらの $T_1$ やDの測定は温度一点の測定に30分から1時間を要する。それ故に磁場のドリフトやRFの出力変動を極端におさえねばならない。昇温のためにヒーターにDCの電流を流す。その量は温度の上昇と共に増大し磁場を悪くする。我々はRFパルスによる核の励起とその後のFIDの続く時間はヒーターをOFFにする方法で観測磁場を改善した。

6)

(結果) シクロヘキサンはイス型とボート型の二つのコンホマーが室温で $4 \times 10^{-4}$  secの交換速度にある。 $T_1$ の値は室温~500°Cで7~43secであるから測定に支障がなく出来る。図の5は温度に対して $T_1$ の値をプロットしたものである。 $T_c$ は553.2Kであるがこの試料の場合 0.180ml/0.365mlで570 K附近で密度ゆらぎが観測された。600K以上では $T_1$ の値は温度に対して極めて微少の変化のみであつた。これは前回のトルエンの $T_1$ の温度変化に比べてゆるやかであり又 $T_c$ 以上では $T_1$ の値が負の方向に向うと際立つて異なる。

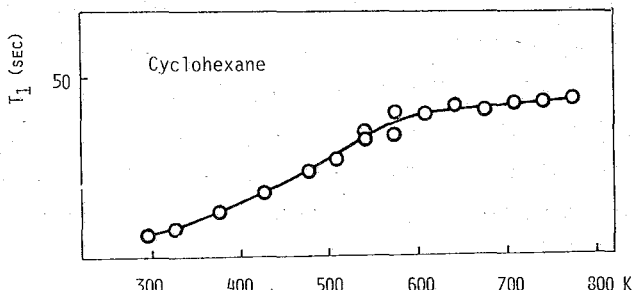


Fig. 5. Proton spin-lattice relaxation time,  $T_1$ , for cyclohexane versus temperature.

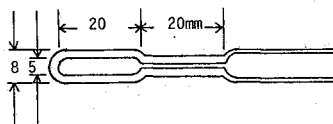


Fig. 6. Pyrex glass sample cell.

図の6は耐熱ガラス製の試料セルを示す。あらかじめ内容積を測り試料を入れた後上部毛细管の部分をつじ切る。図の7はシクロヘキサンの自己拡散係数を温度に

対してプロットした図である。温度の上昇とともにDの値は大きくなるが540Kから600K附近の変化は急で $T_C$ 附近であることを示している。しかし $T_C$ を越えても大きな温度依存性がありシクロヘキサンの分子運動の特異なふるまいを強く示唆している。これはベンゼン系液体のトルエンとはいささか相違する。以上の様にシクロヘキサンの $T_C$ 前後の様相は二段階の温度依存性が特徴的である。

(考察)

本実験は封管中での測定を行つているので等温、等圧の条件ではない。温度の上昇と共に圧力も変化する。活性化エネルギーは見かけの値しか求まらない。しかしながら緩和パラメータの解析から、シクロヘキサンの分子運動に関

して興味深い結果を得た。液体のプロトンのスピン-格子緩和はプロトン間の双極子-双極子相互作用によって生じこれは次の様に記述される。

$$(T_1^{-1})_{\text{exp}} = (T_1^{-1})_{\text{intra}} + (T_1^{-1})_{\text{inter}} \quad (1)$$

分子内と分子間の相互作用の寄与を分離する方法として通常その分子の重水素化物で希釈して行う方法があるが本実験ではこの希釈法は使えない。KrigerはTorryの考えをKuboとTomitaの一般理論を用いて定式化して次の様に表現した。

$$(T_1^{-1})_{\text{inter}} = (2/5)(\pi\gamma_H^4 / h \hbar_H / dD)(1+5\alpha) \quad (2)$$

$$(T_1^{-1})_{\text{intra}} = (T_1^{-1})_{\text{exp}} - (T_1^{-1})_{\text{inter}} \quad (3)$$

即ち自己拡散係数 D が求まると分子間の相互作用が決まり二つの緩和速度が分離出来ることを示した。我々は容易に D を求めることが出来るからこの方法で分離する。又相関時間 $\tau$ は次の様になる。

$$\tau_{\text{inter}} = (d^2/5D)(1+5\alpha) \quad (4)$$

$$\tau_{\text{intra}} = (2/3)(b^6/\gamma_H^4 \hbar^2)(1/T_1)_{\text{intra}} \quad (5)$$

ここで $n_H$ はプロトンの個数、bは同じ分子内の最近接プロトン-プロトン間距離、dは異なる分子間の最近接距離である。 $\alpha$ は $\langle r^2 \rangle / 12d^2$ であるが rの値が厳密には求まらないので $\alpha = 1/12$ 即ち互の分子が最も接近したときと $\alpha = 0$ 即ち分子は互に十分離れた場合、この二つの極限で計算した。温度に対する $\tau_{\text{inter}}/\tau_{\text{intra}}$ も計算した。

次のページの図の8は緩和速度 $(1/T_1)$ を温度の逆数に対してプロットした図である。 $\alpha = 1/12$ である。図の9は同様に $\alpha = 0$ とした場合の結果である。いずれの場合も分子内の寄与が大きく分子間のそれは小さい。しかし臨界点附近での様子は分子間の緩和速度によく反映されていることが判る。又臨界域を越えても温度に依存して行くことが判明した。

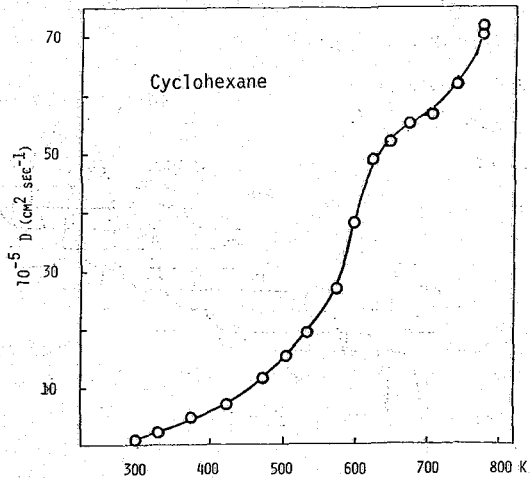


Fig. 7. The experimental temperature dependence of the self-diffusion coefficients in cyclohexane in the pressure range 0.1 to 15MPa.

格子緩和はプロトン間の双極子-双極子相互作用によって生じ

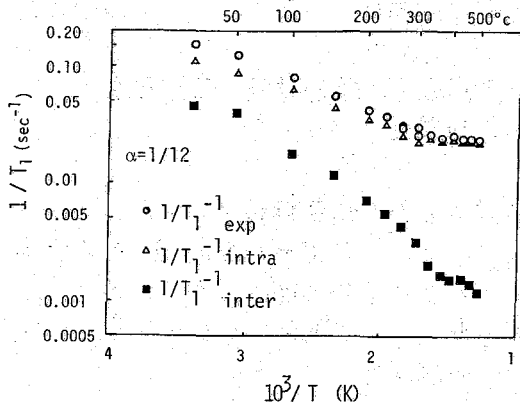


Fig. 8. Proton spin-lattice relaxation rate,  $1/T_1$ , for cyclohexane vs. inverse temperature.

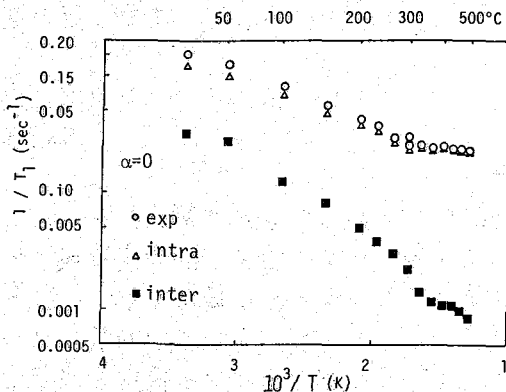


Fig. 9. Proton spin-lattice relaxation rate,  $1/T_1$ , for cyclohexane vs. inverse temperature.

式 (4,5) を用いて相関時間 $\tau$  を求めたのが図の10と11である。10図は $\alpha = 1/12$ としたとき, 11図は $\alpha = 0$ での結果である。すぐ判る様に臨界域附近での変位は $\tau_{inter}$ に効果的である。これに比べて $\tau_{intra}$ はわずかに変化した。

両図から判る様に $\alpha$ の値が変わっても臨界点までは大きな相違はなく臨界点を越えると図11の $\alpha$ が0の場合に $\tau_{inter}$ と $\tau_{intra}$ が逆転する。次の表は緩和速度と相関時間の温度に対するArrheniusのプロット(見かけの)から得られた活性化エネルギーを示す。すべて液体の場合である。両者ともその傾向はほぼ同じである。今後圧力バランスセルを用い

KJ/mol	$\alpha = 1/12$	$\alpha = 0$	$\alpha = 1/12$	$\alpha = 0$
exp	9.04			
inter	13.9	14.0	13.9	13.9
intra	7.99	8.23	7.8	8.24

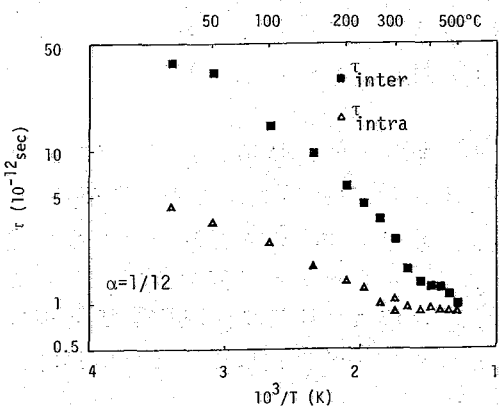


Fig. 10. Correlation times of inter and intra molecular vs. inverse temperature.

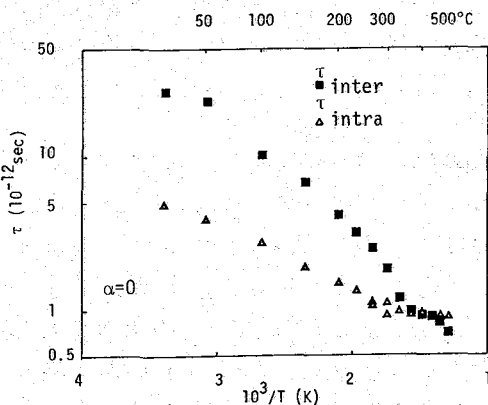


Fig. 11. Correlation times of inter and intra molecular vs. inverse temperature.

てより詳細な実験を行いたいと考えている。我々は将来複合系の超臨界域における問題に挑戦を試みるつもりである。

Reference

- 1) E.U.Franck, Endeavour 27,55(1968).
- 2) G.Wilke, Angew.Chem.17,701(1978).
- 3) S.Shimokawa and E.Yamada, J.Magn.Reson. 51,103(1983).
- 4) S.Shimokawa and E. Yamada, in press.
- 5) J.J.Martin and Y.C. Hou, A.I.Ch.E.J. 1,142(1955).
- 6) A.Allerhand, F.M.Chen, and H.S.Gutowsky, J.Chem.Phys. 42,3040(1965).
- 7) A.Abragam, The Principles of Nuclear Magnetism, Chap.VIII(1961),Clarendon Press. Oxf.
- 8) G.J.Krüger, Z.Naturforsch. Teil A 24,560(1969).

# 39. $A_3A_3'$ スピン系の液晶中の配向について

(名工大) ○ 著 藤公児・野崎宗一・服部枝実・吉野明広  
吉田忠義・高橋憲助

## 一序一

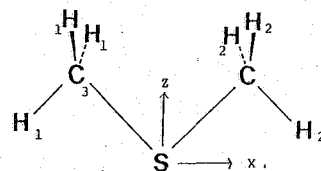
液晶中に配向した分子のNMRスペクトルは、その分子の化学構造やコホーメーションとして優勢な配向に関する詳細な情報を含んでいる。<sup>1)</sup>そこで私たちは、2つのメチル基の運動がどの程度分子構造や配向に影響を与えているかを調べるために  $A_3A_3'$  系を試料として選んだ。そして  $^1H$  NMR スペクトルの測定により配向パラメータを算出し、 $^{13}C$  NMR スペクトルの測定から分子構造を決定しようと試みた。

## 一実験一

ジメチルスルフィド、ジメチルジスルフィド、及びアセトン、また液晶溶媒として用いた *N*-*P*-エトキシベンジリデン-*P*-*n*-ブチルアニリン (EBBA) は、市販のものそのままを使用した。試料の濃度は、それぞれ 14.6, 15.1, 14.3 mol% であった。

$^1H$  及び  $^{13}C$  NMR の測定には、Varian XL-200 型分光計が用

Fig. 1  
Numbering system  
for Dimethyl Sulfide



いられた。 $^1H$  NMR の測定条件は、パルス幅 10  $\mu$ , 取り込み時間 1 sec, SW 10000 Hz, データポイント 32 K, 積算は 4~24 回であったのに対して、 $^{13}C$  ではパルス幅 18  $\mu$ , 取り込み時間 0.8 sec, SW 20000 Hz, データポイント 32 K, 積算は、1000~6000 回であった。測定は、それぞれ 24, 30, 35  $^{\circ}C$  で行なわれ、得られたスペクトルの半値幅は、 $^1H$  で約 12 Hz

$^{13}C$  で約 8 Hz であった。Fig. 1 にジメチルスルフィドの核の番号付けを示す。

## 一スペクトル解析一

各試料の  $^1H$  NMR スペクトルは、 $A_3A_3'$  系である。解析の際に使用したプログラムは、LAOCN4D でこれは Musso と Isaia によって作られた LAOCN4A<sup>2)</sup> を双極子-双極子相互作用を考慮するように修正されたものである。シミュレーション計算では、データとしてシフト値  $\nu_i$ , インダイレクトカップリング  $J_{ij}$ , ダイレクトカップリング  $D_{ij}$ , を入力し、 $J_{ij}$  を一定として  $D_{ij}$  と  $\nu_i$  を可変とした。 $J_{ij}$  の値については、文献値を利用した。<sup>3)</sup> 2つの回転しているメチル基を持つこれらの系のスペクトルは、2つの  $D_{ij}$  と 1つの  $J_{ij}$  によって決定されている。つまり、

i) 2つのメチル基のプロトン同志のダイレクトカップリング ---  $D(1,2)$

ii) メチル基の中のプロトン同志のダイレクトカップリング ---  $D(1,1)$

iii) 2つのメチル基のプロトン同志のインダイレクトカップリング ---  $J(1,2)$

よってこの場合の未知数は、 $D(1,2)$  と  $D(1,1)$  である。

一般に  $D_{ij}$  は、下式のように表わされる。

$$D_{ij} = -\frac{h\nu_i \nu_j}{4\pi} \frac{S_{ij}}{r_{ij}^3} \quad S_{ij} = \sum_{pq} \cos \alpha_p \cos \alpha_q S_{pq} \quad \dots (1)$$

さいとうこうじ・のぎきむおかず・は・とりえみ・よしのあきひろ

よしただよし・たかはしけんすけ



ここで  $\alpha_p, \alpha_q$  は、核  $i$  と  $j$  を結ぶ軸がある瞬間に  $p$  と  $q$  軸とそれぞれなす角、 $S_{pq}$  は磁場に対する分子の配向パラメータ、 $h$  はプランク定数、 $\nu$  は磁気回転比、 $r_{ij}$  は核  $i$  と  $j$  とのある瞬間における距離、 $S_{ij}$  は核  $i$  と  $j$  を結ぶ軸の磁場に対する配向パラメータである。よって先の(i)式より、 $D_{ij}$  は配向パラメータ  $S_{ij}$  と構造パラメータ  $\alpha_p, \alpha_q$  によって決定される。

Table 1

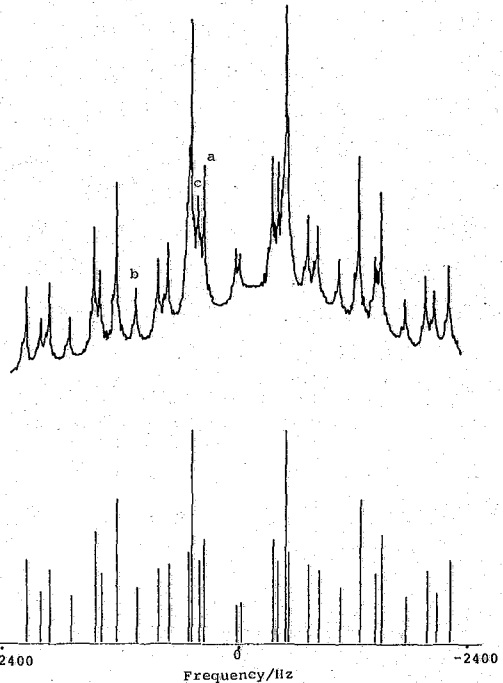
Spectral parameters and Direct couplings for Dimethyl Sulfide dissolved in a Nematic Phase

Indirect couplings*	Direct couplings
$J(1,2) = 0.25$	$D(1,2) = -224.0 \pm 0.1$
$J(1,3) = 137.5$	$D(1,3) = 345.6 \pm 0.2$
$J(2,3) = 4.8$	$D(2,3) = -70.3 \pm 0.2$
	$D(1,1) = 467.0 \pm 0.1$
	$D(2,2) = 467.0 \pm 0.1$

\*Taken from the isotropic phase value

Fig. 2

A observed  $^1H$  spectrum and a calculated stick spectrum in Dimethyl Sulfide



観測されたピーク数は、ジメチルスルフィド、ジメチルジスルフィド、アセトンの順に、28、26、24本であり、その数はすべての温度で変化はなかった。ジメチルスルフィドの場合、観測された28本に対して40本を帰属し、 $D(1,2), D(1,1)$  を決定している。その解析の結果を Table 1 に示す。解析の際の  $\text{rms}$  誤差は、1.5 Hz で最大吸収位置誤差は、4 Hz であった。 $D(1,2)$  と  $D(1,1)$  の値は、実測のスペクトルより直接読み取ることができ、Fig. 2 に示してあるジメチルスルフィドの実測スペクトル中に記してある a, b, c の吸収線のそれぞれのシフト値を利用すると次のような式が成り立つ。<sup>4)</sup>

$$\begin{aligned} \nu_a &= 3/2D(1,2) & \nu_b &= 9/2D(1,2) \\ \nu_c &= 3D(1,1) + 9/2D(1,2) \end{aligned}$$

よってこれらの関係式より  $D(1,1), D(1,2)$  を求め、シミュレーション計算により決定した。Table 1 の結果を利用して求めた計算スペクトルも Fig. 3 に示す。

各試料の  $^{13}C$  NMR スペクトルは、 $A_3A_3X$  系とした。これらのスペクトルは、先の3つのパラメータとさらに2つの  $D_{ij}$  と2つの  $J_{ij}$  によって決っている。つまり、

- (i) X4基の中のカーボンとプロトンのダイレクトカップリング ---  $D(1,3)$
- (ii) 2つのX4基の間のカーボンとプロトンのダイレクトカップリング ---  $D(2,3)$
- (iii) X4基の中のカーボンとプロトンのインダイレクトカップリング ---  $J(1,3)$
- (iv) 2つのX4基の間のカーボンとプロトンのインダイレクトカップリング ---  $J(2,3)$

観測された  $^{13}C$  のスペクトルは、ジメチルスルフィドとアセトンの形状は、お互いの全体幅は違いますが良く似ているのに対し、ジメチルジスルフィドは、他の2つとは大きく異っている。試料は同じものでも温度が異なると観測できる吸収線の数も異っている。

そこでシミュレーション計算の際には、明確に得られた吸収線のみを利用して、D(1,3)とD(2,3)を決定した。例えばジメチルスルフィドの場合、24°Cで26本の吸収が観測されたのに対して、30°Cでは21本、35°Cでは22本であった。24°Cでそれに42本が帰属された。この際のrmsエラーは1.6Hzで最大吸収位置誤差は3Hzであった。解析の結果をTable 1に示すとともに、これに基づいた計算スペクトルを実測スペクトルとともにFig. 3に示す。

- 配向と構造 -

ジメチルスルフィドとアセトンとは、2つのメチル基が自由回転していると考えるとC<sub>2v</sub>対称であるから、分子の配向を表すのに必要な配向パラメータは、2種類である。その配向パラメータを私たちは次のようにして求めた。まずMW法により、すでに求められている分子の構造のパラメータ<sup>5)</sup>を用いて各物質の原子の座標を決定し、これに基づいて2つのメチル基のコホーメーションを考えた。この際、メチル基の回転角度を120°, 60°, 40°, 30°, 20°, 10°としてそれぞれの場合の7プロトン同志の距離を計算し、これを平均した。ここであるX軸とAA'のプロトン同志を結ぶ軸の間の角度の平均を $\langle \cos^2 \theta_{XAA'} \rangle$ とすると、 $\cos^2 \theta_{AA'}$ は、プロトンAの座標を(l<sub>1</sub>, m<sub>1</sub>, n<sub>1</sub>)、プロトンA'の座標を(l<sub>2</sub>, m<sub>2</sub>, n<sub>2</sub>)とすると、次のように表わされる。

$$\cos^2 \theta_{AA'} = \frac{l_1 l_2 + m_1 m_2 + n_1 n_2}{\sqrt{l_1^2 + m_1^2 + n_1^2} \sqrt{l_2^2 + m_2^2 + n_2^2}}$$

そして次の関係式

$$S_{AA'} = (\cos^2 \theta_{AX}^{AA'}) S_{XX} + (\cos^2 \theta_{AY}^{AA'}) S_{YY} + (\cos^2 \theta_{AZ}^{AA'}) S_{ZZ} \dots (3)$$

$$S_{AA} = (\cos^2 \theta_{AX}^{AA}) S_{XX} + (\cos^2 \theta_{AY}^{AA}) S_{YY} + (\cos^2 \theta_{AZ}^{AA}) S_{ZZ}$$

に前出の(1)式に、すでに得られたD(4,2)とD(4,1)を代入してS<sub>AA</sub>とS<sub>AA'</sub>を求めた。

Fig. 3  
A observed <sup>13</sup>C spectrum and  
a calculated stick spectrum  
in Dimethyl Sulfide

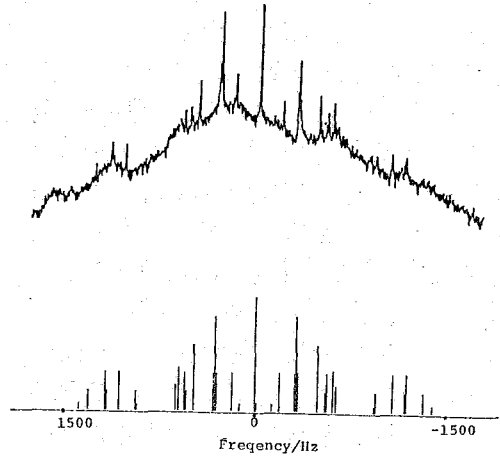


Table 2  
Orientational parameters of Dimethyl Sulfide  
obtained at three temperatures and  
those by changing the rotational angle and  
averaging the mutual interaction of  
two methyl groups at 24 °C.

T(°C)	S <sub>xx</sub>	S <sub>zz</sub>
24	0.11370	-0.05113
30	0.10751	-0.04827
35	0.10288	-0.04634
		(± 0.0001)
angle	S <sub>xx</sub>	S <sub>zz</sub>
120	0.11235	-0.04928
60	0.11369	-0.05111
40	0.11370	-0.05113
30	0.11370	-0.05113
20	0.11370	-0.05113
10	0.11370	-0.05113
		(± 0.0001)

...

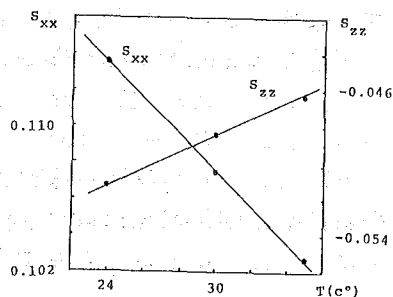
そして配向パラメータの関係式

$$S_{xx} + S_{yy} + S_{zz} = 0 \quad \dots \quad (4)$$

を用いて(4)式を連立させて解くことで配向パラメータ  $S_{xx}$  と  $S_{zz}$  を求めた。

Table 2 にメチル基の回転角度に伴う配向パラメータの変化を示す。明らかに  $40^\circ$  よりも小さい角度では、数値は変化していない。また Table 2 に各温度での配向パラメータの値も示している。これらの値を Fig. 3 にプロットすると、温度と配向パラメータの間に明確な直線関係があることがわかる。

Fig. 4  
Orientational parameter vs temperature in Dimethyl Sulfide



ジメチルスルフィドの構造を決定するのは Table 2 の  $D_{ij}$  からだけでは不可能であるが、いくつかの仮定により、ある程度の構造は決めることができる。その仮定は次のようなものである。

① C-S 結合長は、 $1.802 \text{ \AA}$  である。

② C-S 結合軸と 2 つのメチル基の  $C_3$  回転軸は、一致している。

③ メチル基は、お互いに相関なく自由回転している。

これらの仮定により次の 2 つの関係式が成り立つ。(6, 7)

$$\frac{D(1,1)}{D(1,3)} = \frac{\gamma^{13} C}{\gamma^{1H}} \left( \frac{r_{HH}}{r_{CH}} \right)^3 \left[ \left( \frac{r_{HH}}{r_{CH}} \right)^2 - 2 \right] \quad \frac{r_{HH}}{r_{CH}} = 2 \sin \theta \quad \dots \quad (5)$$

ここで  $\theta$  は  $C_3$  回転角、 $\theta$  はメチル基の HCH のなす角度である。

$$\frac{D(1,2)}{D(1,1)} = -6\sqrt{3} \left\{ S_{xx} \sin^2 \alpha \left[ \frac{(\cos \phi - \cos \phi')^2}{P^5} \right] - (S_{xx} + S_{zz}) \left[ \frac{(\sin \phi - \sin \phi')^2}{P^5} \right] + S_{zz} \left[ \frac{\beta^{1/2} + \cos \alpha [\cos \phi + \cos \phi']^2}{P^5} \right] \right\} / (S_{xx} \cos^2 \alpha + S_{zz} \sin^2 \alpha) \quad \dots \quad (6)$$

$$\beta = (2d/r)^2 \quad P^2 = \sin^2 \alpha (\cos \phi - \cos \phi')^2 + (\sin \phi - \sin \phi')^2 + (\beta^{1/2} + \cos \alpha [\cos \phi + \cos \phi'])^2$$

ここで  $r$  はメチル基の回転半径、 $\alpha$  は CSC のなす角度の半分である。

よって(5)式を解き、(6)式を  $\phi$  と  $\phi'$  について重積分してやることで  $r_{HH}/r_{CH}$ 、 $\theta$ 、 $\beta$ 、 $\alpha$  などが求まる。現在この積分については、検討中である。またジメチルスルフィドの  $^{13}C$  のエンリッチ化により得られる情報を加えた構造解析の結果及び多量子 NMR の測定による 2 つのメチル基の相関性の有無についてもあわせて報告したいと考えている。

References

1. Emsley, J.W.; Lindon, J.C. "NMR Spectroscopy using Liquid Crystal Solvents"; Pergamon Press: Oxford, 1975
2. J.A. Musso, A. Isaia J. Chim. Phys. 66 1676 (1967)
3. N. Van. Meurs Spectrochim. Acta. 19 1695 (1963)
4. M.S. Gopinathan, P.T. Narasimhan J. Magn. Reson. 6 147 (1972)
5. L. Pierce, M. Hayashi, J. Chem. Phys. 35 479 (1961)
6. C.L. Khetrapal, A. Saupe, Mol. Cryst. and Liq. Cryst. 19 195 (1973)
7. J. Dalton, J.D. Kennedy, W. McFarlane, J.R. Wedge Mol. Phys. 34 215 (1977)

# 40. リン脂質二層膜系における<sup>14</sup>N緩和時間とその周波数依存性

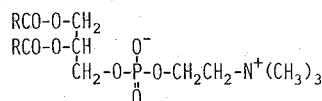
(九大薬、日本電子\*) °金沢洋子、古賀けい子、松下和弘\*

サーモトロピック液晶における核磁気緩和には、オーグ・ティレーのからぎ(ODF)の寄与が大きいことが知られており、<sup>1)</sup>液晶物性の研究に活用されている。一方、秩序パラメータ(S)が小さいトロピック液晶系では、ODFの核磁気緩和への寄与はこれまで殆ど議論されて来ていなかった。最近、水中のリン脂質二層膜においても、疎水性部の炭素鎖中の<sup>2</sup>H NMRの緩和速度に周波数依存をもつ部分があることが報告され、ODFの寄与の可能性が論じられて<sup>2)</sup>いる。

本実験では、リン脂質二層膜を用い、さらに秩序度の低い親水性部について、<sup>14</sup>N核緩和時間の測定周波数依存を検討した。この系においては秩序パラメータが小さい(S < 0.1)にもかかわらず、周波数に依存する項の寄与が無視できないことが示された。

## [実験]

試料は、卵黄から抽出したホスファチジルコリン(PC、あるいは単にPCと略称)を水中に分散させた二層膜ベシクル(Single unilamellar vesicle, 図1)である。脂質濃度は約0.2Mである。また、PCにコレステロールを添加した系も同様に調製した。



ホスファチジルコリン

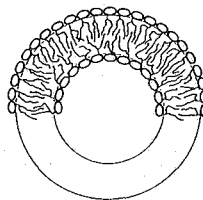


図1. 二層膜ベシクル

<sup>14</sup>N NMRは ① 2.35 T, ② 6.34 T, ③ 9.40 Tで測定した。用いた装置はそれぞれ ① JEOL PS-100の電磁石+パルスFT系, ② FX-270, ③ GX-400である。試料の量は ①, ③が10mm管, ②が15mm球状管である。

試料温度の測定法および測定結果は、① 温度計試料管内挿入法。温度設定、制御精度を合わせて±0.5°C, ② 熱電対試料管内挿入法と、標準試料(アセチルコリン)の緩和時間より算出。温度設定<±5°C, 制御精度<±0.1°C, ③ 熱電対法。設定値<±1°C, 制御精度<±0.1°Cであった。

パルス中(π/2)と、装置のデッドタイムとしてとった値は、① 40-63μsと600-760μs, ② 40-55μsと220-420μs, ③ 60-82μsと150μsであった。

T<sub>1</sub>測定のための信号積算回数は、① 8,000-16,000回, ② 750-2,000回, ③ 2,000-4,000回である。なお、①は<sup>1</sup>H外部ロック, ②, ③はロックなしで測定した。PC系のT<sub>1</sub>測定回数数は各① 4-9回, ② 3回 ③ 1回であり、PC-コレステロール系では ① 1-2回, ② 2回である。

[結果]

いずれの周波数においても、  
 縦磁化の反転回復は単一の指数関  
 数による過程としてあらわすこと  
 ができた。得られた  $T_1$  を図2に  
 示す。これによくと  $T_1(28.9 \text{ MHz})$   
 $> T_1(19.4 \text{ MHz}) > T_1(7.2 \text{ MHz})$   
 である。

$T_1$  の周波数依存を解析するに  
 当って、各測定温度が重要な要  
 素になる。ここでは測定温度、同  
 時測定が可能であった 7.2 MHz と  
 28.9 MHz のデータを比較、解析  
 する。

PC 中の  $^{14}\text{N}$  の  $T_1$  は、N-C $\beta$  軸  
 の運動による。ここでは、  
 N-C $\beta$  軸が局所運動により再配向する早い運動(相関時間を  $\tau_r$  とする)、PC 分子  
 が球状のベシクル表面にそって移動することによる比較的小さい動き(相関時間を  
 $\tau_m$  とする)、および ODF による項の三つになり、あらわされるものとする。  
 ( $e^2qQ/h$ ) は  $^{14}\text{N}$  の核四極子結合定数である。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3\pi^2}{2} \left( \frac{e^2qQ}{h} \right)^2 \left[ \frac{F(\tau_r)}{5} + \frac{F(\tau_m)}{5} S^2 + \frac{C}{\sqrt{\omega_0}} S^2 \right] \quad (1)$$

$\tau_r$  はこれまでの実験により、100 ps  
 程度とわがっている。これはいずれの周  
 波数でも  $\omega_0 \tau_r \ll 1$  の条件を満足して  
 いるので、

$$\frac{F(\tau_r)}{5} = \frac{\tau_r}{5} \left[ \frac{1}{1 + \omega_0^2 \tau_r^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_0^2 \tau_r^2} \right]$$

を  $\tau_r$  とおいてよい。

$\tau_r$  は  $1 \mu\text{s}$  程度である。<sup>3)</sup> 関数  $F(\tau_m)$   
 は測定周波数  $\omega_0$  を含んでいるが、これ  
 までの 7.2 MHz の実験で  $F(\tau_m) S^2 / 5$   
 を  $T_2$  を用いて求めたところによれば  
 $\tau_m$  の 1-3% であった。これまでの、

$\tau_m$  の寄与を無視していたことを考慮にいれても、 $F(\tau_m)$  の寄与が相対的に減少  
 評価されていたことにはならない。測定周波数が上れば、 $F(\tau_m)$  の寄与は急激に減  
 少する。したがって、より高周波の実験ではこの項は無視する。本実験条件下での  
 解析では周波数によるのは  $\tau_m$  のみであるとする。

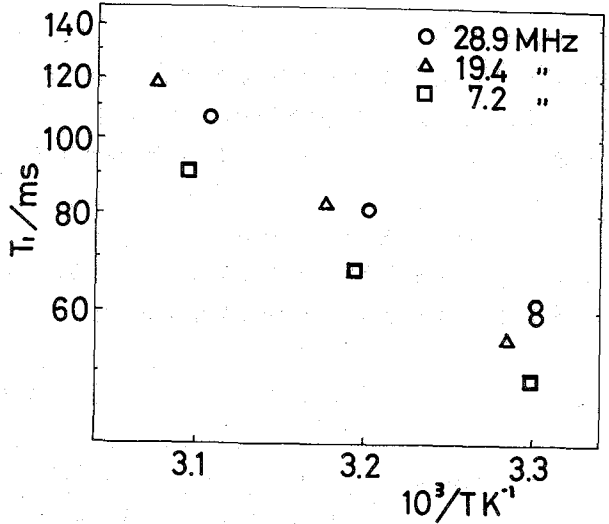


図2. PC 中の  $^{14}\text{N}$  の縦緩和時間  
 O:  $\pm 3\%$ ,  $\Delta$ :  $\pm 2-3\%$ ,  $\square$ :  $\pm 7\%$

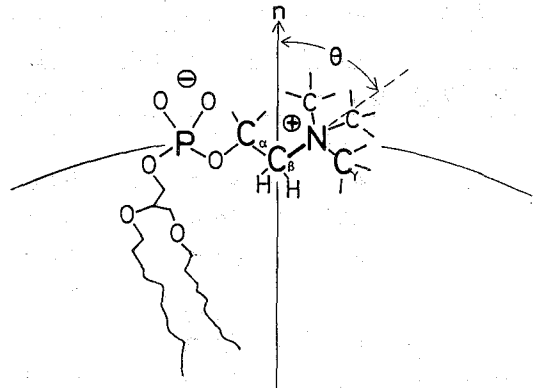


図3. ベシクル表面における  $^{14}\text{N}$  の位置

(1) の第三項  $CS^2/\omega_0$  はネマチック液晶の秩序のゆらぎ(ODF)に与えられて  
いる関係と同じ形においたもので、ネマチック液晶では

$$C = (3/16\sqrt{2}\pi) \cdot RT/[K\{(K/\eta) + D\}^{1/2}] \quad (2)$$

の形をとっている。ここで  $K$  は平均剛性率、 $\eta$  は粘度、 $D$  は拡散係数である。

(1) 式と

$$1/T_1 = A + B/\omega_0 \quad (3)$$

として A, B の分離を行った。結果を表 I に示す。なお、28.9 MHz の結果は  
温度を 30, 40, 50 °C に内外挿して用いた。

表 I. PC の  $^{14}\text{N}$  の緩和速度の周波数依存部分の分離

Temp/°C	A/s <sup>-1</sup>	B/10 <sup>9</sup> s <sup>-1</sup>	$\tau_1$ /ps	$CS^2/10^{-9}$ s	C/10 <sup>-5</sup> s
30	13.0 ± 1.5	5.0 ± 1.6	56	2.2	2.4
40	9.3 ± 1.1	3.6 ± 1.1	40	1.6	2.1
50	7.1 ± 1.2	2.7 ± 1.4	31	1.2	2.0

( $e^2qQ/h$ ) を 125 kHz とし  $A$  から  $\tau_1$  を求めた。これの活性化エネルギーは  
25 kJ/mol であった。さらに  $e^2qQ$  の  $S$  の値<sup>5)</sup> をいれれば  $C$  が求められる。  
これらを図 4 に示す。

PC にコレステロールをモル分率にして 0.2  
加えた系の結果を PC 系と比較する。

表 II. PC の  $T_1$  ( $^{14}\text{N}$ )/ms に対する  
コレステロール添加の影響

測定周波数	Temp. °C	PC	PC-chol.
7.2 MHz	20	27.2	26.5
	28	42.0	39.8
	35	60.0	46.9
	50	90.8	84.2
19.4 MHz	30	56.4	55.7
	40	82.0	80.7
	50	118.1	112.8

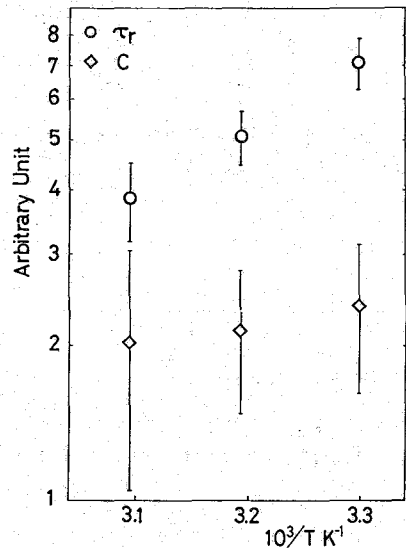


図 4. PC = 層膜の結果

PC-chol. 系の  $T_1$  測定は、19.4 MHz で各 2 回。

測定精度は 2-3% であるのに対し、7.2 MHz では各 1-2 回、±10% である。し  
かし後者ではコレステロールの含量を細かくかえり測定してあり、その結果から判  
断すると、両周波数ともにコレステロールを含む系で  $T_1$  がやや減少傾向にあるも  
の、その変化量はごく小さいといえる。

## [検討]

ネマチック液晶中の核磁気緩和の ODF の寄与については、既に理論、実験の両面において報告がいくつもある。それらによれば、双極子相互作用による緩和と、核四極子相互作用によるものとはいふれども(2)式で与えられることが示されている。

一方、リोटロピック液晶、特に二層膜系に対する理論はまだみられぬ。

以下の実験によれば、ジバルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)二層膜中の C-4 の  $^2\text{H}$  の  $T_1$  は  $51^\circ\text{C}$  において  $21.0\text{ms}$  (13.8 MHz),  $28.7\text{ms}$  (34.4 MHz),  $22.7\text{ms}$  (54.4 MHz) である。これらを(3)により分離すると  $A = 13.4/\text{s}$ ,  $B = 3.2 \times 10^5/\text{s}$  となる。 $^2\text{H}$  の  $q_0/r$  (170 kHz) と  $S(0.16)$  を用いれば  $\tau_c = 31\text{ps}$ ,  $C = 2.9 \times 10^{-5}\text{s}$  が得られる。今回の  $^{14}\text{N}$  の結果と比較した場合、egg PC (相転移温度  $< 0^\circ\text{C}$ ) と DPPC (相転移温度  $\sim 41^\circ\text{C}$ ) のちがい、および観測した部分、極性基と疎水性部分、のちがいがあるにもかかわらず、 $C$  として似た値が得られている。

Egg PC で求めた  $C$  の値、温度勾配はアレキサンダープロットにして  $6.5\text{kJ/mol}$  であり、 $\tau_c$  の  $25\text{kJ/mol}$  に比べはるかに小さかった。リニ脂質系では  $K$  と  $\tau_c$  の値が求められていないこと、二層膜系では分子の拡散は強膜面内に限られたため、ネマチック液晶系とは寄与の程度が異なると思われるなど、問題があつて、 $C$  の内容をここで論じることはできない。しかし、ネマチック液晶系ではいくつかの実験において ODF の項の温度変化が強くない例が示されており、今回の egg PC の結果と対比させると興味深い。

PC の 20 モル% のコレステロール添加の影響は、7.2 および 19.4 MHz で共に小さく、その周波数依存は認められなかった。コレステロールは膜の物性を変化させる物質として知られている。それにもかかわらず  $T_1(^{14}\text{N})$  の周波数依存にコレステロールの効果は明確でないことは、極性基部分の物性に関しては大きな影響が及んでいないことを示している。

## [文献]

1. P. Pincus, Solid State Commun. 7, 415-417(1969) など。
2. M. F. Brown, J. Chem. Phys. 77, 1576-99(1982)。
3. K. Koga & Y. Kanazawa, Biochemistry 19, 2779-83.
4. Idem, J. Phys. Chem. 87(1983) in the press.
5. たとえば G. W. Stockton et al., Biochemistry 15, 954-66(1976)。
6. K. Koga and Y. Kanazawa, The 8th International Liq. Cryst. Conf. (1980)。
7. R. Y. Dong et al., J. Chem. Phys. 72, 5014-18(1980) など。

28.9 MHz の測定は 国立岡崎共同研究機構、分子科学研究所の GX-400 を用いました。同研究所高谷秀正助教授に大変お世話になりました。記して感謝の意を表します。

## 41. New Approach to Carbon-13 Additivity Parameters

Y. A. Shahab and H. A. Al-Wahab, Department of Mechanical Engineering, University of Mosul, Mosul, Iraq.

$^{13}\text{C}$ -nmr additivity parameters of Grant and Paul<sup>1</sup> and their modifications<sup>2,3,4</sup> played a major role in the assignment of  $^{13}\text{C}$  nmr absorptions to distinct carbon atoms in low molecular weight compounds<sup>5</sup> and macromolecules<sup>6,7</sup>. However, despite their practical importance, these parameters are merely empirical and did not contribute to the understanding of the factors determining  $^{13}\text{C}$  nmr chemical shifts. In addition many ambiguities remained in the above-mentioned approach as for example the unexplained  $\beta$ -effect and the effect of proton-proton repulsion. If the latter effect possesses any weight on  $^{13}\text{C}$  nmr shifts, then it is reasonable to extend its influence on all interactions between the protons of the carbon under study and other protons of the molecule. Indeed, the effect of  $\alpha$ -protons should be more important due to their proximity to the protons concerned. Actually, there are many indications on the influence of  $\alpha$ - and  $\beta$ -protons' interaction that justify a more general approach, and we will cite here only two of them:

1. The substitution of an equatorial proton in a cyclohexane ring with a methyl group results in a 5.6 ppm downfield shift of  $\text{C}_1$  whilst a substitution in an axial position results in a shift of only 1.1 ppm. In the first case four  $\alpha$ -gauche proton interactions, and in the second only two interactions are removed.

2. The authors of reference (8) wondered about the nonreciprocal relationship existing between an upfield shift of 3.9 ppm for the axial methyl and 5.4 ppm for  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_5$  in methyl cyclohexane. Using the argument of  $\gamma$ -interaction the carbon of axial methyl should be shifted upfield by approximately 10.5 ppm due to two  $\gamma$ -gauche interactions with  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_5$ . Anyhow, by ring inversion the interactions of the protons attached to  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_5$  with other protons of the ring remain practically unaltered. In contrast, the methyl protons enter new  $\beta$ -interactions with the protons at  $\text{C}_2$  and  $\text{C}_6$ .

In light of these considerations, it is tried in the present paper to develop  $^{13}\text{C}$  nmr chemical shift increments that lend themselves to more theoretical explanation and are in the position to give probable interpretations to some unsolved problems in the subject. It is not intended to use the new set of parameters for predicting unknown chemical shifts, since the existing ones are doing excellent job in this field.



### Additive Parameters

Analysis of the literature available on  $^{13}\text{C}$ nmr chemical shifts of paraffins suggests that these are mainly determined by two factors:

1. The type of carbon being investigated, i.e., primary, secondary etc.
2. The interaction of protons in other parts of the molecule with the proton(s) of the carbon under consideration.

These two factors are definitely acting through the well known para- and diamagnetic terms. Therefore, a logical construction of the parameters would be as follows:

$$\delta_c(k) = A + B + \sum n_i c_i$$

where A is a scaling factor, B refers to the type of kth carbon,  $c_i$  a chemical shift increment belonging to a proton in a definite position:  $\alpha, \beta, \gamma$  etc., and  $n_i$  is the number of protons at that position.

### Results of Calculation

The experimental results obtained by Carman and coworkers were used to calculate the additivity parameters using a regression analysis program\*. Table 1 shows the values of the parameters.

Table 1

#### Results of regression analysis

Parameter	No. of observ.	Value (ppm)
Primary carbon	13	7.98
Secondary carbon	30	13.62
Tertiary carbon	16	12.91
$\alpha$ -proton	59	1.36
$\beta$ -carbon	59	2.91
$\gamma$ -carbon	58	0.19
$\delta$ -carbon	54	0.13
$\epsilon$ -carbon	46	0.03
No. of total observations	59	
No. of independent variables	8	
Multiple correlation coefficient		0.9985
Standard deviation (ppm)		0.27
Constant term (ppm)		-1.94

Table (2) lists the observed chemical shifts from reference (4) and the

\*Multiple linear regression program, written by Robert W. Kowitzke for Hewlett-Packard calculator 9830 A, Stat pac volume 2.

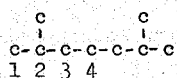
calculated ones using the parameters given in Table (1).

Table 2  
Observed and Calculated Carbon-13 Chemical Shifts\*

1	2	3	4	5	6	7	8	9
2,4-Dimethylpentane								
			$\sigma = 0.043$					
$  \begin{array}{ccccccc}  & c & & & c & & & & \\  &   & & &   & & & & \\  c_1 - c_2 - c_3 - c - c & & & & & & & &   \end{array}  $								
22.71	25.71	49.10						
(22.96)	(25.92)	(49.39)						
2,4,6-Trimethylheptane								
			$\sigma = 0.469$					
$  \begin{array}{cccccccc}  & 2a & & & 5 & & & & c \\  &   & & &   & & & &   \\  c - c - c - c - c - c - c - c & & & & & & & & \\  1 & 2 & 3 & 4 & & & & &   \end{array}  $								
24.06 <sup>d</sup>								
22.99	26.06	48.28	28.87	20.74				
(22.86)	(26.03)	(47.46)	(28.61)	(21.03)				
2,5-Dimethylhexane								
			$\sigma = 0.087$					
$  \begin{array}{ccccccc}  & c & & & c & & & & \\  &   & & &   & & & & \\  c - c - c - c - c - c & & & & & & & & \\  1 & 2 & 3 & & & & & &   \end{array}  $								
23.09	28.96	37.57						
(22.67)	(28.67)	(37.32)						
2,5,8-Trimethylnonane								
			$\sigma = 0.312$					
$  \begin{array}{cccccccc}  & 2a & & & 6 & & & & c \\  &   & & &   & & & &   \\  c - c - c - c - c - c - c - c - c & & & & & & & & \\  1 & 2 & 3 & 4 & 5 & & & &   \end{array}  $								
23.01 <sup>d</sup>								
22.79	28.69	36.86	35.18	33.70	20.01			
(22.64)	(28.60)	(37.42)	(35.09)	(34.12)	(20.44)			
2,5,8,11-Tetramethyldodecane								
			$\sigma = 0.219$					
$  \begin{array}{cccccccc}  & 2a & & & 7 & & & & c & & c \\  &   & & &   & & & &   & &   \\  c - c - c - c - c - c - c - c - c - c - c & & & & & & & & & & \\  1 & 2 & 3 & 4 & 5 & 6 & & & & &   \end{array}  $								

23.62 <sup>d</sup>					35.85 <sup>d</sup>	20.64 <sup>d</sup>
23.41	29.23	37.40	35.29	34.29	35.59	20.59
(22.64)	(28.60)	(37.42)	(35.06)	(34.05)	(35.19)	(20.41)

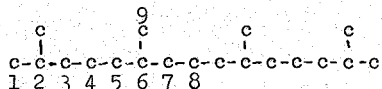
2,6-Dimethylheptane



$$\sigma = 0.218$$

22.65	28.21	39.68	25.35
(22.65)	(28.38)	(40.07)	(25.24)

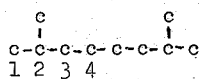
2,6,10,14-Tetramethylpentadecane



$$\sigma = 0.256$$

23.05	28.39	39.95	24.95	37.85	33.30	37.99	25.28	20.16
(22.65)	(28.35)	(40.00)	(25.37)	(37.83)	(33.51)	(37.76)	(25.51)	(20.41)

2,7-Dimethyloctane



$$\sigma = 0.144$$

22.72	28.28	39.51	28.03
(22.68)	(28.36)	(39.78)	(28.00)

Discussion

Paraffins constitute a simple system for the study of the main effects on <sup>13</sup>Cnmr chemical shifts. Once these are clearly pointed out an extension of the investigations to more complicated systems become possible. It is apparent that two properties of a certain carbon atom make the main contributions to the magnitude of its chemical shift: a) The percentage of the p-character in the hybrid of its orbitals; b) The interaction of its proton(s) with other protons of the molecule. Unfortunately, it is very difficult at the moment to construct such a set of parameters that reflect the two effects separately due to two reasons. Firstly it is difficult to estimate the p-character of carbons to such an extent of accuracy as to distinguish between different paraffinic ones.. Existing calculations<sup>9</sup> discriminate between differently hybridized carbons or carbons bearing different electro-negative substituents. Secondly, most of the data on <sup>13</sup>Cnmr are reported for averaged conformations and therefore it is not so easy to fix interprotonic distances on which the size of proton-proton interaction naturally depends. In order to test

the idea involved in this communication we chose empirical parameters that possess more theoretical nature as a compromise. Work to improve the treatment is on progress.

It is expected that an increase in the p-character would lead to an increase in the paramagnetic term through lowering of the excitation energy  $\Delta E$  to the next low-lying excited states. The type of carbon atom gives indication mainly on the p-character that increases on going from primary to secondary, tertiary and quaternary. Furthermore, addition of more carbons in the molecule also increases the p-character although the effect attenuates by increasing the number of c-c intervening bonds. At the same time branching means more congestion of protons, and this is the reason why the deshielding effect increases from methyl to methylene by 5.64 ppm and decreases slightly for methine (see table 1).

In most cases protons' interaction gives rise to upfield shifts and only few observations has been reported where a downfield shift is noted<sup>10,11</sup>. Contrary to this conclusion we notice from table (1) that the parameters representing protons' interaction have small positive values, Carbons in  $\alpha$ -,  $\beta$ -... etc. positions not only creates protons' interactions, but in the same time increase the p-character for<sup>atom</sup> being considered as mentioned before. Hence, one should examine the values as a result of two oppositely oriented effects. It is of interest to note that the  $\beta$ -effect is more deshielding than the  $\alpha$ -effect. A probable cause for this behaviour is that a  $\beta$ -substitution removes one strong  $\alpha$ -proton's interaction and also increases the p-character. These could overcompensate the shielding arising from introducing  $\beta$ -protons' interaction.

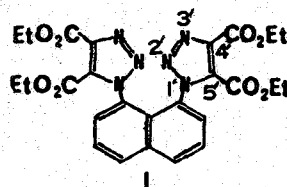
The parameters introduced in this work are able, as seen from table (2) to predict <sup>13</sup>Cnmr chemical shifts with standard deviation of 0.27 ppm using only eight parameters. The highest individual deviation amounts to 0.82 (C<sub>3</sub> of 2,4,6-Trimethylheptane). The results promise that the new approach possesses certain aspect.

#### References

1. D.M. Grant, E.G. Paul, J.Am.Chem.Soc., 86, 2984 (1964).
2. L.P. Lindeman and J.Q. Adams, Anal. Chem., 43, 1245 (1971).
3. J.C. Randall, J. Polym.Sc.Polym.Phys. Ed. 13, 901 (1975).
4. C.J. Carman, A.R. Tarpley, and J.H. Goldstein, Macromolecules, 6, 719 (1973).
5. H.J. Reich, M. Jautelat, M.T. Messe, F.J. Weigert, and J.D. Roberts, J.Am.Chem.Soc., 91, 7445 (1969).
6. L.F. Johnson, F. Heatley, and F.A. Bovey, Macromolecules, 3, 175 (1970).
7. A. Zambelli, G. Gatti, C. Sacchi, W.O. Crain, and J.D. Roberts, Macromolecules, 4, 475 (1971).
8. D.K. Dalling and D.M. Grant, J.Am.Chem.Soc., 89, 6612 (1967).
9. G.E. Maciel, J.W. Melver, Jr., N.S. Ostlund, and J.A. Poole, J.Am.Chem.Soc., 92, 1, 11 (1970).
10. J.B. Storchers, C.T. Tan, and C. Teo, Can.J.Chem., 54, 1211 (1976).
11. W.A. Ayer, L.M. Browne, S. Fung, and J.B. Storchers, Org. Magn. Resonance, 11, 73 (1978).

42. 1,8-ビストリアゾリルナフタレン誘導体のプロトンーション  
(化技研)。中西洋志, 名川吉信, 本田皓一, 矢部明, 山本修

1. 序 我々は先に、1,8-ジアジドナフタレンとアセチレンジカルボン酸エステルとを反応させ、1,8-ビス(4',5'-エトキシカルボニル-1,2,3'-トリアゾリル)ナフタレン(1)を合成した。<sup>1)</sup> これはナフタレンの1,8のペリ位に2個のトリアゾリル環が置換しているために、立体的に非常に混み合っており、従来見られない回転異性体の存在が、NMRスペクトルの研究によって明らかにされた。即ち、5'位の炭素とカルボニル炭素の間のC<sub>ap2</sub>-C<sub>ap2</sub>結合の廻りの2つの回転異性体(S-trans, S-cis体)、及びナフタレン環に対する2個のトリアゾリル環のflipping異性体(d体, l体)の存在が見い出された。<sup>2,3)</sup>



また、このメチル化反応によって合成されたN-メチル体は、その立体反発の為に、室温に於て脱メチル化反応が自然に起るといふ興味ある現象も見い出された。<sup>4)</sup>

本研究では、これに対してメチル基より立体的に小さいプロトンの付加反応について検討し、又、プロトン付加のflippingへの影響についても調べたので報告する。

2. 実験 a) 合成: 1,8-ジアミノナフタレン, 又は1-アミノナフタレンから、亜硝酸ナトリウム及びナトリウムアジドと反応させて1,8-ジアジドナフタレン, 又は1-アジドナフタレンを合成した。次に、これらのジ及びモノアジドとアセチレンジカルボン酸エステル又はプロピオール酸エステルを室温で反応させ、カラムクロマトグラフによって精製した。

b) NMRスペクトルの測定: <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N NMRスペクトルの測定は、JEOL FX-90Q, JEOL GX 400分光器を用いて行った。測定パラメーターは以下の通りである。<sup>13</sup>C NMR (100.40 MHz), SW: 20,000 Hz, PW: 10 μs (58°), AT: 1.6 s, PD: 5 s, 64 K. <sup>15</sup>N NMR (40.40 MHz), SW: 18,000 Hz, PW: 50 μs (90°), AT: 1.8 s, PD: 10 s, 64 K. gated decoupling mode. 溶媒は重クロロホルムを用いた。<sup>15</sup>Nの基準は2.0 M <sup>15</sup>ND<sub>4</sub><sup>+</sup><sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>重水溶液をキャピラリーにして用いた。<sup>13</sup>C NMR測定は5 mmφ, <sup>15</sup>N NMR測定は10 mmφの試料管を用いて行った。

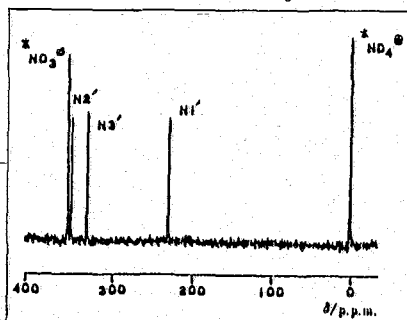
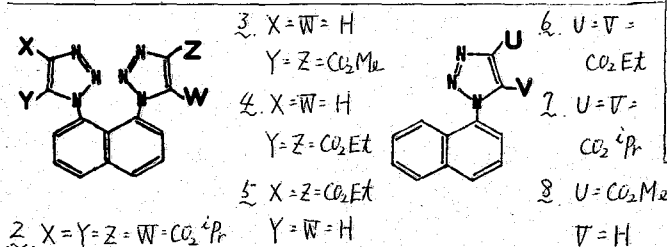


図1. 2の<sup>15</sup>N NMRスペクトル (TFA: 0.5当量, 0.9 M, 4 K<sub>2</sub>O)

なかにしひろし, ながわよし, ほんだこういち, やべあきら, やまもとあさむ

表1. トリアゾリルナフタレン類の<sup>15</sup>N NMR 化学シフト δ (ppm) (40.40 MHz, CDCl<sub>3</sub> 溶媒)

	N1'	N2'	N3'
1	229.7	352.3	335.3
2	228.9	351.9	335.0
3	228.2	350.2	335.8
	231.1	357.3	331.5
4	227.9	350.2	336.1
	230.9	356.8	331.5
5	231.2	349.6	336.2
6	229.5	351.0	334.2
7	229.3	349.6	333.6
8	232.8	350.9	336.1

<sup>15</sup>N NMR スペクトルの温度変化は GX 400 分光器を用いて行い、温度は銅-コンスタンタン熱電対で補正した。

3. 結果と考察

3-1 トリアゾリルナフタレン誘導体へのプロトンネーション

3-1-1 <sup>15</sup>N NMR スペクトル法

トリアゾリルナフタレン誘導体へのプロトン付加は、窒素原子に対して起るので、<sup>15</sup>N NMR で直接にその現象を見ることが出来る。<sup>15</sup>N NMR スペクトルの一例を図1に示す。3個の窒素のシグナルの帰属は、まず、2'位の窒素を<sup>15</sup>N 同位体を入れたものを合成し、352.3 ppmのシグナルがN2'のものであるとした。又、1'の229.7 ppmのシグナルは、5'位のエステルとトリアゾリル環との間のC-C結合の廻りの回転異性体間の交換現象により、幅広くなっていること assign できた。従って335.3 ppmのシグナルはN3'のものである。1~8の<sup>15</sup>N NMR 化学シフトをまとめて表1に示す。

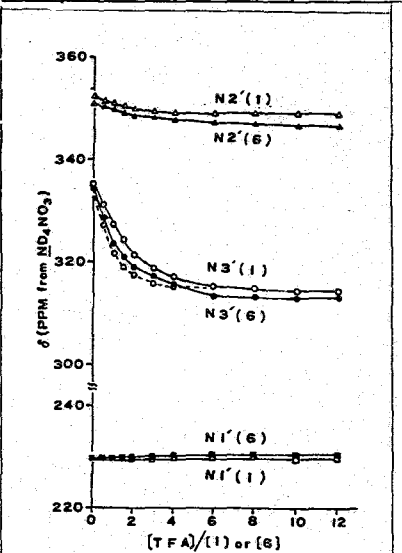
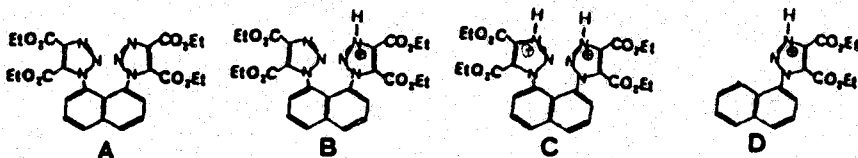


図2. 1'及び6'の<sup>15</sup>N化学シフトのTFAの添加による変化(破線は1の当量を6に合せたグラフ)

プロトン付加は重クロロホルム溶媒中、トリフルオロ酢酸(TFA)を徐々に添加することによって行った。図2に、1'及び6'へTFAを添加していった際の<sup>15</sup>N化学シフトの挙動を示した。TFAを添加すると、N3'のシグナルが大きく高磁場側にシフトする(21.1 ppm)。N2'もすくなく高磁場側にシフトするが(3.2 ppm)、N1'のシグナルは逆にわずかに低磁場側にシフト(0.7 ppm)することが見出された。ピリジンにプロトン付加すると、その<sup>15</sup>N化学シフトは112.5 ppm 高磁場側に移動することが知られているので、<sup>4)</sup> 1'ではプロトン付加は3'位の窒素原子に起っていることがわかった。テトライソプロピルエステル誘導体(2)の<sup>15</sup>N化学シフトはエチル体(1)のものに近く、そのTFA添加への挙動も1'のものほとんど変わらない。このことは、アルキル基の立体的な大きさの変化は、プロトン付加に余り影響を与えないことを示している。1'と6'を比較すると、プロトン付



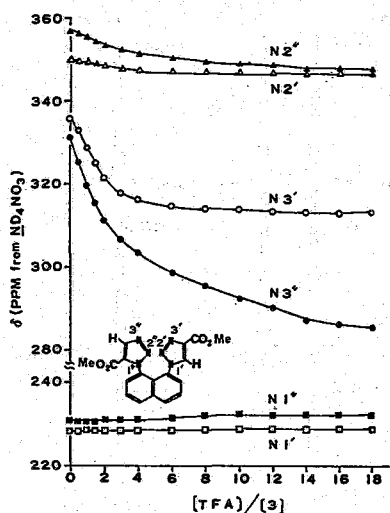
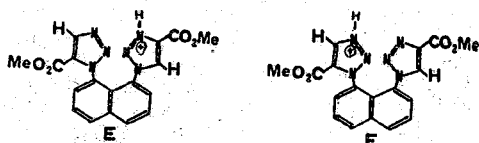


図3. この $^{15}\text{N}$ 化学シフトのTFAの添加による変化

ており、メトキシカルボニル基が4'位に置換している環の $\text{N}3'$ の高磁場シフトは、この $\text{N}3'$ のものより余り変らばい(22.7 PPM)が、4'位が水素置換の環の $\text{N}3'$ の高磁場シフトは、それ比べてはるかに大きい(46.2 PPM)。この事実は、4'位にメトキシカルボニル基が入ると $\text{N}3'$ 位のプロトン付加が起りにくくなることを示している。その原因である立体効果、電子的効果について他の実験が必要である。また、 $\text{N}3'$ 、 $\text{N}3''$ の化学シフトがTFAを添加すると程度の差はあれ、共に高磁場シフトを始めることから、2個のトリアゾリル環のプロトン付加した構造(E, F)は、余り安定性に差がないと考えられる。今後、2個の4'位がメトキシカルボニル基で



置換したこのTFA添加による $^{15}\text{N}$ 化学シフトの変化を図3に示した。シグナルの帰属は各々の値を参考にして行った。図3から明らかのように、プロトン付加は、3'、3''位の窒素原子に起

り、メトキシカルボニル基が4'位に置換している環の $\text{N}3'$ の高磁場シフトは、この $\text{N}3'$ のものより余り変らばい(22.7 PPM)が、4'位が水素置換の環の $\text{N}3'$ の高磁場シフトは、それ比べてはるかに大きい(46.2 PPM)。この事実は、4'位にメトキシカルボニル基が入ると $\text{N}3'$ 位のプロトン付加が起りにくくなることを示している。その原因である立体効果、電子的効果について他の実験が必要である。また、 $\text{N}3'$ 、 $\text{N}3''$ の化学シフトがTFAを添加すると程度の差はあれ、共に高磁場シフトを始めることから、2個のトリアゾリル環のプロトン付加した構造(E, F)は、余り安定性に差がないと考えられる。今後、2個の4'位がメトキシカルボニル基で置換したこのプロトン付加について測定を行う予定である。

### 3-1-2. $^{13}\text{C}$ NMRスペクトル法

このTFAによるプロトン付加の挙動を $^{13}\text{C}$ NMRスペクトル法で検討した。結果を図4に示す。TFAの量が増加すると、トリアゾリル環の4'位、5'位の炭素のシグナルは高磁場シフトする。エステル基のメチル炭素は、同様に高磁場シフトするが、メチレン炭素は逆に低磁場シフトする。ナフタレン環の炭素は、低磁場シフトするもの、高磁場シフトするもの、いろいろである。カルボニル炭素は、TFAがおよそ2当量までは高磁場シフトするが、それ以上にTFAを加えると、むしろ低磁場シフトする。特にその傾向は、5'位に置換したエステルのカルボニルで著しい。TFAが2当量までの低磁場シフトは $\text{N}3'$ へのプロトン付

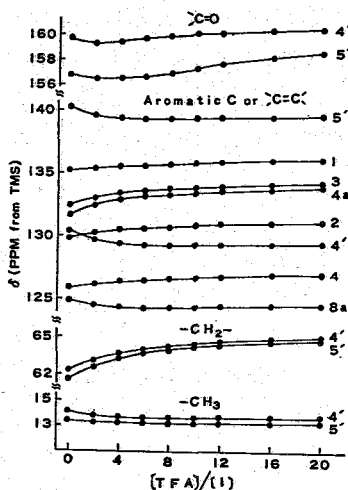
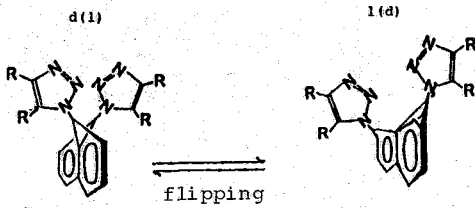


図4. この $^{13}\text{C}$ 化学シフトのTFAの添加による変化



加の結果として説明できる。それ以後の低磁場シフトの原因としては、TFAが溶液中に増加するために生ずるマクロな原因と、ミクロな、例えばカルボニル基へのTFAによるプロトン付加による影響などが考えられる。

### 3-2. 1,8-ビストリアゾリルナフタレン誘導体の Flipping

我々は先に、上や下に於て、2個のトリアゾリル環が、ナフタレン環に対して flipping を起しており、その立体異性体 d, l の間の交換(上図参照)が室温附近でゆっくり起っていることを見い出し報告した。<sup>3)</sup> 今回は、イソプロピル体之にプロトン付加が起った化合物の flipping がどのようになるかを検討した。図5に、之のプロトン付加体のメチル基の炭素の<sup>13</sup>C NMRスペクトルの温度変化を示す。2個のメチル基のシグナルは、flipping 異性体間の交換が遅い場合には、それぞれ2体に分裂する。昇温すると、4'位のメチル基及び5'位のメチル基(高磁場側)のシグナルは、線幅が広くなり、coalesce した後1本のシグナルになる。Coalescence temperature法で活性化自由エネルギーを求めると、約17 Kcal/molになり、TFAを添加しない場合とほとんど変わらない。この結果は、3'位の窒素にプロトンが付加したような小さな立体的な変化では、flipping 現象には余り影響がないことを示唆している。

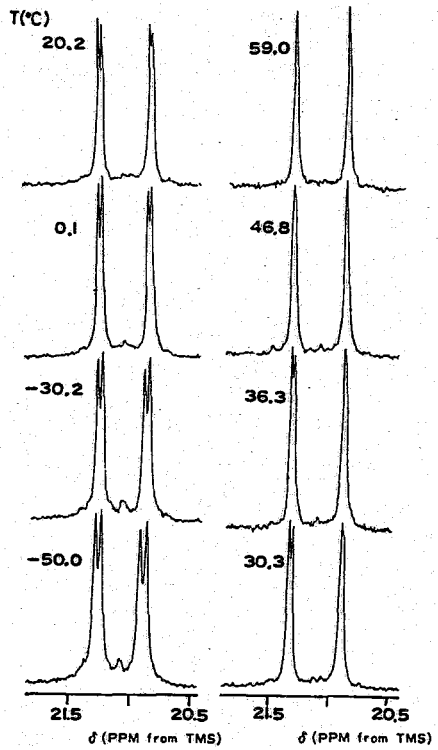


図5. 2'のメチル炭素の<sup>13</sup>C NMRスペクトルの温度変化

### 文献

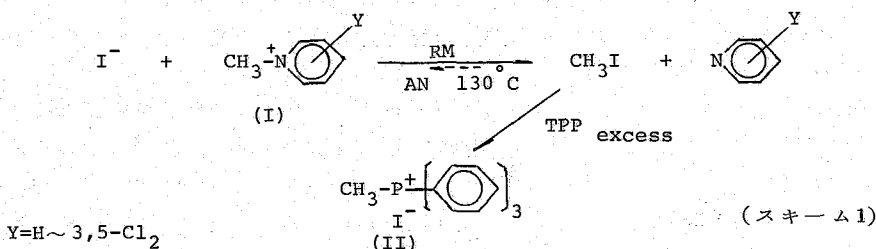
- 1) 本田, 中西, 矢部 第15回構造有機化学討論会 1982年10月京都
- 2) 中西, 本田, 矢部, 山本, 同上
- 3) 中西, 本田, 矢部 第47回日本化学会春季年会 1983年4月京都
- 4) A.J. Dixioia, G.T. Furst, L. Psota, R.L. Lichter, J. Phys. Chem, 82, 1644 (1978)



43.  $^{31}\text{P}$ 、 $^1\text{H}$ -NMRによる定量測定 (N-アルキルピリジニウム塩  
の逆メンシュトキン反応)

(阪大産研) 沢田正実 ○高井嘉雄 張中 三角荘一  
花房昭静

1. 沃化メチルとピリジンとの反応で、N-メチルピリジニウム沃化物を与えるメンシュトキン反応は典型的な $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応で、種々の物理化学的手法で詳細な研究がなされている。しかし、上記の逆向の反応 (N-メチルピリジニウムカチオンとヨードアニオン)、即ち逆メンシュトキン反応過程は熱力学的に uphill 反応であり、従って、正反応に比べて速度論的研究は少ない。一方、最近沃化メチルはピリジンとの反応に比べてトリフェニルホスフィン (TPP) と相対的に速く反応し、かつ相当するピリジンとの反応に比べて圧倒的に熱力学的 downhill 反応である点を利用して、N-メチルピリジニウム沃化物と TPP との二段階反応 (スキーム1) から逆メンシュトキン反応素過程を調べるといふアプローチの可能性が示されている。我々は生成するメチルトリフェニルホスホニウム沃化物の  $^{31}\text{P}$ -NMR、 $^1\text{H}$ -NMR (パルス FT-NMR 法) 等の定量測定から、逆メンシュトキン反応速度を決定しようることを見出した。ここでは、まずパルス FT-NMR による定量測定の吟味、定量測定法に関する限界の検討を行い、次いで得られた反応速度定数のセットから 逆メンシュトキン反応素過程について考察した。



2. 反応スキームの確認と濃度の選定

アセトニトリル中130°CにおいてNMR封管チューブ内での (I)、3-Cl 体、0.025M と TPP 0.03M との反応を  $^1\text{H}$ nmr (-4°C) で追跡したところ沃化メチルピークが観測されず、 $\text{N}^+\text{-Me}$  および  $\text{P}^+\text{-Me}$  ピークの時間変化からの速度定数は同一であった。(I)、3,5-Cl<sub>2</sub> 体の場合、同反応条件では  $\delta = 2.1$  (ca. 4%) 沃化メチルの蓄積がみられた。そこで、5倍量の TPP、0.125M を使った同様の反応を行うと、この場合沃化メチルの蓄積がみられなくなった。これらの事実は上記二段階反応スキームを支持し、(I)、0.025M と TPP、0.125M との反応では、電子吸引側でいえば、3,5-Cl<sub>2</sub> 体までは、Vant Hoff 型中間体に該当し、従って (II) の生成速度から単純に (I) の減少速度、即ち、逆メンシュトキン反応過程を観測できることが判る。

3. FT-NMRによる定量測定

FT-NMRによる定量測定は、JEOL JNM FX100、Bruker WM360、Bruker AM360を用いて行い、 $^1\text{H}$ 測定はそれぞれ100MHz、360MHz、 $^{31}\text{P}$ 測定は40.3MHz、145MHzで行った。 $^{31}\text{P}$ 測定の場合はプロトンデカップリングを行った。測定温度25~30°C。 $^1\text{H}$ nmrによる定量測定は、1,4-ジメチルベンゼン内部基準を用い、NMRロック用として一定量の重アセトニトリルを加えた。一方  $^{31}\text{P}$ nmrによる定量測定は、標準試料として生成物のメチルトリフェニルホスホニウム沃化物のケミカルシフトに近く、かつ化学的に比較的安定なフェニルホスホン酸ジエチルエステルを選  
さわだまさみ たかいよしお ちょうちゅうり みすみそういち はなふさてるきよ

び出し、その重ベンゼン溶液を作って、キャピラリー（1.5mmφ、長さ6cm）中に封管し、NMRロック用にも使用する外部基準法を利用した。

パルスFT法による反応溶液（反応率10%）の $^1\text{H}$ スペクトル（図1）には、 $\delta = 2\text{ppm}$ のアセトニトリル溶媒ピークとそのピークのすそ $\delta = 2.9\text{ppm}$ に反応生成物メチルトリフェニルホスホニウム沃化物のダブルットメチルピークがかろうじて見られ、さらに低磁場に内部基準物質（1,4-ジメトキシベンゼン）のメチルピークが現われている。しかし、スペクトル全体にわたりベースラインの欠落があり、それらシグナル類の位相補正は困難である。それぞれのピーク高さから相対強度を求め、その対数とそれぞれの反応時間とのプロット（図2 ○印）を行ってもバラツキが大きい。そこでデカップリングによる溶媒ピーク消去を行い、定量化を試みたが、デカップリングという特殊な条件のため、ベースラインの欠落が生じる。しかし、この場合には位相補正が可能のため部分的なベースライン補正後、相対面積強度を求めてプロットすると（図2 ●印）この場合にもバラツキがあり再現性が見られない。従って、 $^1\text{H}$ -FT NMRによる反応溶液（軽水素化溶媒）そのままの微量試料の定量測定は困難であり、再現性が得られないことがわかる。

一方、 $^{31}\text{P}$ NMRのスペクトル（3図）は非常に簡単で、高磁場ピークが基準物質、低磁場ピークが反応生成物であり、ベースラインがフラットであることがわかる。しかし、外部基準法（キャピラリー管）を用いているため反応生成物ピークにショルダーが現われている。これは各反応率での各々の試料にも同様に現われており不規則性が見られないため、強度測定結果に大きな影響を与えないと思われる。図4は、イオン強度を一定に保ったメチルトリフェニルホスホニウム沃化物の濃度とスペクトルから得られる相対面積強度をプロットした検量線である。その直線関係から、測定条件内での反応率の変化（生成物濃度変化）からくる試料の緩和時間の变化、 $90^\circ$ パルスの変化がないことがわかる。 $^{31}\text{P}$ NMR測定条件としては、パルスアングル $45^\circ$ 、パルス間隔3sec、スペクトル幅750（3000）Hz、積算回数300回、データポイント4K~8Kを用い、得られたFIDはすべて同じウィンド処理を施し、zero fillingを用いフーリエ変換した。

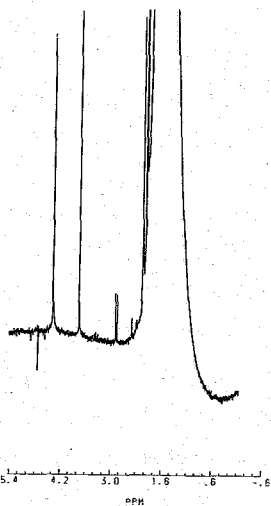


図1 反応初期の $^1\text{H}$ NMRスペクトル（360MHz）

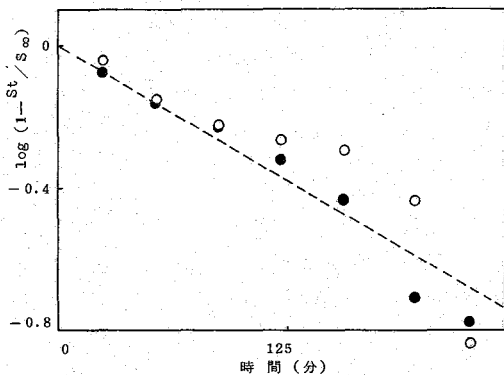


図2  $^1\text{H}$ NMR(360MHz) による反応追跡

#### 4. $^{31}\text{P}$ nmrによる反応速度定数の決定

$^1\text{H}$ nmrの結果から位相調整の積分への影響の大きいことがわかったので、 $^{31}\text{P}$ nmrスペクトルの位相調整を以下注意深く行った。一方、相対面積強度決定には積分取込幅の決定が必要である。表1に積分取込幅の違いによる相対面積比を調べた結果をまとめた。積分取込幅の増加に伴い相対面積比の増加が見られる。このことは、試料側での磁場の不均一度が外部基準により助長されたため、反応生成物ピークがブロードニングしているためと考えられる。しかし、積分取込幅を各種変えて相対面積比を求めて得られる2次速度定数として比較すると $k_2$  (1次速度定数 $k_1$ をヨードイオン濃度で割った値)は、一定であることがわかる。これらのことから、われわれの場合、積分取込幅が一定でさえあれば結果に重大な影響を与えないことになる。絶対定量の観点からいえば外部基準法は非常に注意する必要がある。

表2から位相調整の違いによる速度定数の変動が見られる。NMRの機器違いによる誤差は位相調整による誤差内に入る。結局、nmrの定量測定による2次速度定数値の誤差は $\pm 5\%$ 以内である。表2の3Clピリジニウムのメチル体と $d_3$ メチル体の2次速度同位体効果は、 $k_H/k_d = 1.10 \pm 0.04$  ( $d_3$ ) であることが判明した。

#### 5. 置換基効果と同位体効果

本反応の反応速度におよぼす置換基効果は、メタ体から、 $\rho_m = 3.61$ が求まる ( $Y = \text{H}$ 、 $m = \text{Ac}$ 、 $m = \text{Cl}$ 、 $m = \text{CN}$ 、 $m = \text{Cl}_2$ )。正メンシュトキン反応の $130^\circ\text{C}$ の平衡の $\rho$ 値 (5.1) からBronsted  $\alpha = 0.71$ が得られ、逆メンシュトキン反応では、平衡の場合のchargeの変化の70%に相当する変化がN上にあることを示した。一方、 $\alpha$ - $d$ 同位体効果の結果はメチルトランスファ反応に見られるおだやかなtightness-looseness関係内にあることを示す。

#### 6. 謝辞

大阪大学超伝導核磁気共鳴センターBruker WM360wbによる測定をしていただきました、京極好正教授、阿久津秀雄博士に感謝いたします。大阪大学産業科学研究所 材料解析センターにおける超伝導NMR (Bruker360) の購入に終始絶大なるご尽力をいただきました。石丸寿保教授に厚く感謝いたします。

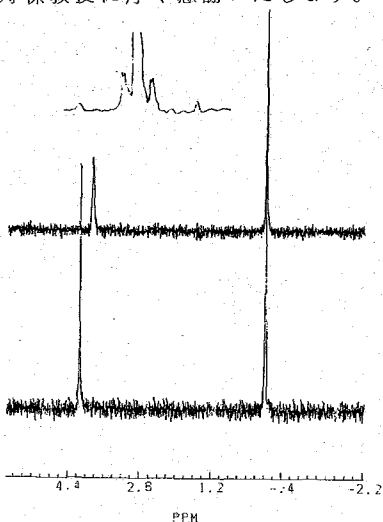


図3  $^{31}\text{P}$ nmrスペクトル 上のスペクトルは生成物ピークの拡大(40MHz)、中、下(145MHz)は $\text{CD}_3$ 体、 $\text{CH}_3$ 体

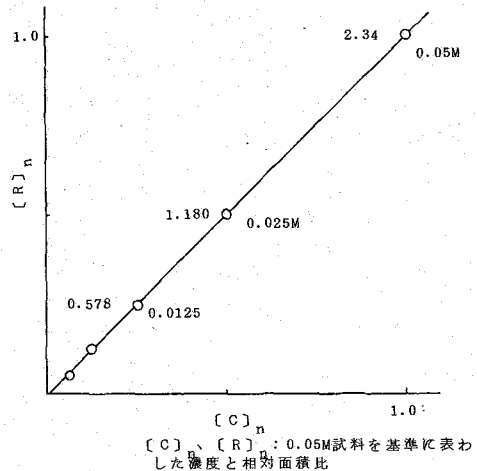


図4 検量線

表1. 積分取込幅の相対面積強度および2次速度定数への影響

積分取込幅	+25.0Hz	+18.8Hz	+15.0Hz	+12.0Hz
相対面積強度	1.97	1.95	1.91	1.74
$k_2 \times 10^3$ ( $s^{-1}M^{-1}$ )	2.36	2.37	2.38	2.38

表2.  $^{31}P$ nmr(Cによる定量測定の結果

基質	実験	$k_1^{obs} \times 10^5$ ( $s^{-1}$ )	r (n)	$k_2 \times 10^3$ ( $s^{-1}M^{-1}$ )	装置
m-Cl : $CH_3$	1	11.03	0.9993(5)	2.51	FX100
		10.71	0.9987(7)	2.44	AM360
		10.08	0.9992(7)	2.30	"
		10.53	0.9989(6)	2.40	"
	2	11.03	0.9997(7)	2.50	FX100
		10.90	0.9985(7)	2.47	"
		10.53	0.9991(7)	2.39	"
		10.50	0.9993(7)	2.38	"
m-Cl : $CD_3$	1	9.99	0.9986(6)	2.28	FX100
		9.95	0.9988(6)	2.27	"
		9.90	0.9989(6)	2.26	AM360
		9.72	0.9982(6)	2.22	"
	2	9.34	0.9993(6)	2.12	FX100
		9.68	0.9996(6)	2.20	"
		9.79	0.9991(6)	2.22	"
		9.47	0.9998(6)	2.15	"

[ Salt ]<sub>0</sub> = 0.05M、 [ TPP ]<sub>0</sub> = 0.125M

## 44. 溶液の構造と NMR

(千葉大理) ○藤原鎮男, 西本右子

### I 序

NMR は分子情報の獲得に大きな寄与をした。溶液の構造についてはいかがであるか。NMR のスペクトルは液体試料の運動に鋭敏に反応し、液体中の分子運動の解析を可能にした。このことは溶質と溶媒から成る溶液において、NMR が溶質なり溶媒なりの知見を得るのに役立つことを意味している。しかし実はそのことは溶質なり溶媒そのものの知見を与えるのが主であり、溶質と溶媒の相互作用、大きく云って溶液の構造というような全体像の理解には至らなかったといえる。これは他の分光法についても、同様なのである。たとえば Franks の「水」に関する総説はこれを強調しており<sup>1)</sup>、従来の研究は、溶質自体の研究と溶質間の相互作用の研究が主であって、溶質-溶媒の相互作用は等閑に附されたといっている。実際、NMR においてもそうであった。溶質の溶媒効果の研究は NMR の初期から人々の重要な関心事であった。けれどもそれは溶質との関連においての溶媒効果であって溶質と溶媒の相互作用を第一にとりあげたものではない。本研究はこの点で一步をすすめて溶液の構造の研究に対し、NMR が寄与をする例を述べようとするものである。とくに ESR, UV, IR, その他の分光法を併用したとき溶液の構造について、我々は新しい知見に到達することをのべたい。1) Water: A comprehensive treatise,

Ed. F. Franks, Plenum Press, New York N.Y., 1972, vol. 2, chapt. 1

### II 二元溶液のモデル : 考え方

まず考え方の骨子を述べる。

一つの溶質(これを  $S$  とする)と一つの溶媒(これを  $L$  とする)から成る二元溶液を考える。 $S$  が  $L$  に溶けるということから窺いうるように、溶質は溶媒和をうけることが出来、それは換言すれば溶質は溶媒と結合状態にあるといつてよいであろう。ただしその場合の結合は弱く、溶液中にもし溶質と結合していない溶媒分子があるときは、それと溶媒和圏にある溶媒分子とは交換が起り得るものと考えられる。いま、この溶液の濃度が希薄であるとき、すなわち  $S$  の  $L$  に対する比、 $R$  が小さいときは、溶液中には溶媒和した  $S$  とフリーの  $L$  とが存在するであろう。そこで濃度を段々に増して  $R$  を大きくしてゆくと、段々にフリーの  $L$  の数は減少し、ある臨界濃度では  $L$  は全て溶質分子に結合し(配分され)フリーの溶媒分子が溶液内に存在しない状態が出現すると考えられる。演者は、このときの溶液の全空間を溶質総数に割りあてたとして考えられる容積を分子空間と呼ぶことにした。こうなるとき溶液はどうなるか。簡単に見れば、溶液の全空間は溶媒にとりかこまれた溶質球から成るもの、すなわちその積み上げと等しいと見うるであろう。そして溶質分子は周囲をとりまく溶媒和の壁を通してではあるが、溶質同士が接しあうことになるであろう。そのときもし溶質が電気的ないし磁氣的異方性を帯びていたとすると、溶質はとなりの溶質の異方性により配向をうけ、また化学的にいうとイオン-イオン

間相互作用, すなわちイオン対の形成が始まるものと考えられる。

## II 分子空間の実験

IIの考えに対応する実験的検証例がいくつか得られる。

### a) Cu(II)イオン水溶液のESR中の濃度依存性

第1図のように, ESRの線中は低濃度依存性もなくまた陰イオン種への依存性もない, イオン個有の線中で恐らくはスピン軌道相互作用によるものとされる。それが0.1M辺りより中の減少が始まり0.5M辺りで顕著な減少となる。(2)(第1図) この減少は電子交換による狭まりと推察される。すなわち, この濃度域でCu(II)イオン同士の相互作用が始まる。試みにこのときイオンの総数で全容積を割り, イオン1ヶ当りの溶液空間を算出すると $(20 \pm 5 \text{ \AA})^3$ となる。

### b) PVAゲルの利用

ポリビニルアルコール水溶液をγ線で照射するとPVAは架橋しゲルが得られる。

そのとき, このゲルの末端基間平均距離, すなわちゲルの空隙を $\langle l \rangle$ とすると $\langle l \rangle$ の値はγ線の総量ないし当初のPVA濃度の調節により自由に制限することが出来る。このゲルを常磁性イオンや水溶性の化合物の水溶液中に浸しておくと, 常磁性体を包含したゲルをつくることが出来る。

(3)(4) こうしてCu(II)ないし図2のようなスピラベル化合物を含むゲルについてESRを測定すると $\langle l \rangle$ の値が15ないし20Å以上の場合, ESRスペクトルは等方性運動に対応する線となり, 15Å以下だと等方運動が規制されていることを示唆する非対称のスペクトルとなった。

### c) 量子力学計算

ab initio MESSQUAC 計算法によりアルカリイオンの水和結合エネルギーを計算すると $\text{Na}^+$ については第二水和相の水和エネルギーすなわち $\text{Na}^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$ 間の結合エネルギーが7.6Kcalとなり, 6Kcal前後以上と推測される。bulkの水の水素結合エネルギーより少し大きい値になることが分る。(表1)(5)

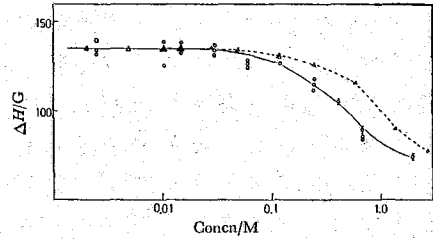


Fig. 1. Concentration dependence of the ESR line widths of aqueous  $\text{Cu}^{2+}$  ions.  
—○—  $\text{CuSO}_4$  aq. —△—  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  aq.

2) S. Fujiwara and S. Hayashi,  
J. Chem. Phys., 43, 23 (1965)

3) S. Fujiwara, K. Nagashima,  
H. Morita and Y. Kanaoka,  
Bull. Chem. Soc. Japan,  
50, 2851 (1977)

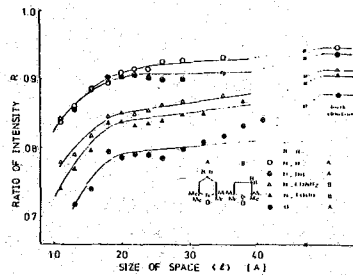


Figure 2. The size dependence of the ratio of signal intensity of the high-field line to the central line,  $R$ .  $R$  are plotted against the average size of space of solution,  $\langle l \rangle$ . Data are observed at room temperature.

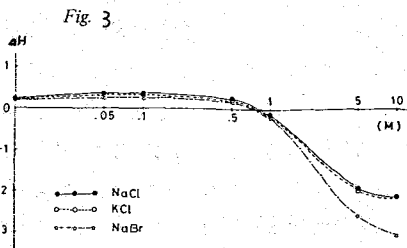
4) T. Watanabe, T. Yahagi and  
S. Fujiwara,  
J. Am. Chem. Soc.,  
102, 5187 (1980)

電解質水溶液の無限希釈エネルギー  $\Delta H$  測定値は第3図のようになる<sup>(16)</sup> NaCl について見ると約 0.5 M ないし 0.6 M まで  $\Delta H$  は純水に比して正で、0.6 M 以下は負になる。明らかに 0.5 M 以下の希薄溶液の  $\Delta H$  はイオンの分散エントロピーであり、0.6 M 以上の濃厚液はイオン対の結合エネルギーで負となっていることが分る。

以上を統合すると、たとえば  $\text{Na}^+$  イオンにあっては、水分子は第二水合層までが一つの圏を形成し、その大きさは 10~15 Å であり、これが分子空間に相当すると考えられる。すなわち、冒頭に述べた、 $R_c$  の臨界濃度は分子空間に相当し、それはイオンの水合圏の外側以内の容積であり、これは溶質-溶媒の相互作用でつくる一つの臨界濃度に相当するものと考えられる。

TABLE 1. CALCULATED BINDING ENERGIES PER WATER MOLECULE OF THE FIRST (E-I), SECOND (E-II), AND THIRD (E-III) HYDRATION SHELLS, FOR TETRAHEDRAL (Td) AND OCTAHEDRAL (Oh) COORDINATIONS, IN kcal/mol

Ion	Coordination	E-I	E-II	E-III
Li(I)	Td	25.7	9.8	1.5
	Oh	22.1	9.4	1.6
Na(I)	Td	17.3	7.6	1.5
	Oh	15.4	7.6	1.5
K(I)	Td	14.7	7.2	1.5
	Oh	14.2	6.4	1.3
Mg(II)	Td	59.4	21.6	3.3
	Oh	50.5	20.9	3.2
Ca(II)	Td	47.1	19.9	3.0
	Oh	46.9	18.3	3.0
Mn(II)	Oh	73.8	22.1	5.4
Zn(II)	Oh	71.0	22.4	5.5
Ti(III)	Oh	100.0	34.5	8.8



b) S. Fujiwara, *Geochem. J.*, **13**, 225 (1979)

5) S. Fujiwara and B.M. Rode, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **52**, 3221 (1979)

Table 2. C-13 NMR chemical shift (ppm) for propylene carbonate

H <sub>2</sub> O (M)	C=O	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
0.01	136.861	55.583	52.316	0.000
0.067	136.861	55.583	52.316	0.000
0.33	136.909	55.631	52.365	0.048
0.67	136.958	55.680	52.365	0.048

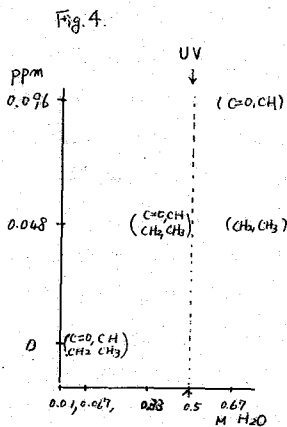


Fig. 5

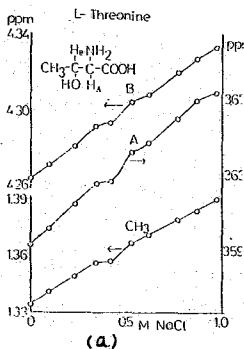
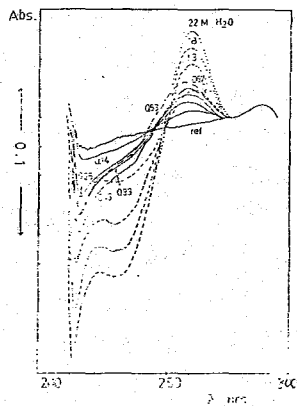
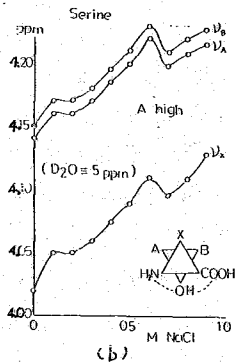
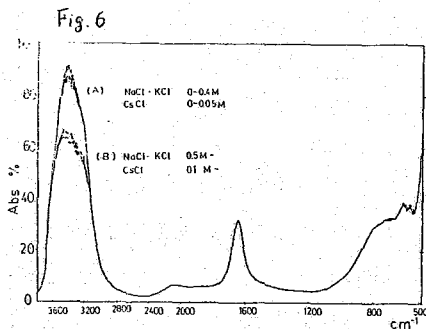


Fig. 7



(b)



#### IV NMR測定

溶質-溶媒間相互作用が溶液の全構造に関与する所以を以上考察した。そこでさらにその周の詳細な知見を得るのには、NMRが適している。そこで演者は以上の予備的知見を背景にして以下に報告するような研究を行った。

##### a) プロピレンカーボネート(PC)の水溶液のNMR

先に述べた臨界濃度の存在とその値の決定にはNMR以外にも各種の分光法が有効である。演者らはまずプロピレンカーボネートの水溶液をとり上げUVによりこれを試みた。第5図にPC-H<sub>2</sub>O系のUVの測定結果を示す。この結果は(PC-H<sub>2</sub>O)の混合系は等吸収点をさすむ二つの相から成ることを示し、等吸収点に相当する水の量は0.5Mである。さらに<sup>13</sup>C NMRを用いると表さないし第4図に示すように0.33M以下の水においてはC=O, -CH, -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>に何れも特長あるふるまいを示し、0.33M H<sub>2</sub>Oにおいてはすべての<sup>13</sup>Cの化学シフトから見て一様であり、0.5M以上になったとき分子内の官能基ごとにながうシフトをみることが出来る。そして0.5M以上のH<sub>2</sub>OではC=O, -CHとは同じシフトであり -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>は同じシフトである。すなわち0.5M以上の溶液ではPCとH<sub>2</sub>Oとは化合物をつくることにながうかがわれ、前述のことと一致する結果となる。

##### b) 電解質塩水溶液

以上の結果を背景にして、NaCl水溶液中の水のふるまいを赤外線吸収により塩濃度の関数として観察すると第6図のようになる。3600 cm<sup>-1</sup>の自由水の-OHのstretching帯(これをOHバンドとよぶ)の強度は塩と共に減少し0.4M以降は一定となる。この系についてはUVを測定し、結果を比較勘案して0.4MはNaClの水溶液の臨界濃度であることを推察するに至った。

##### c) スレオニン水溶液に対する塩添加効果

NaClの水溶液の臨界濃度は0.4Mで、それ以下では水和イオンと自由な水分子が共存し、以上では第2水和圏まで水和されたイオンの積み上げのモデルが考えられる。このような状態において解離性の-OH基をもつ分子を入れたときいかになるかを考え、セリンやスレオニンを少量溶かしNMRを測定した。スレオニンは-CH<sub>3</sub>と二つの陽子をもつのでNaCl水溶液中の水分子の状態の指標として働くことが期待される。予想にたがわず、第7図にみるようにNaClの濃度の関数としてみたとき、0.1M, 0.4M, 0.6Mでセリンとスレオニンの陽子は顕著なシフトを示している。0.4Mは今述べた考察の結果として水和の臨界濃度に対応すると見ることが出来る。これに対し、0.1Mと0.6Mは水溶液の水の構造に強く関係する領域である。演者は0.1M NaCl溶液についてはT<sub>1</sub>測定、屈折率、その他で顕著な結果を得ている。また0.6Mについてはヨウ素イオンの酸化還元反応がこの濃度以上でおこらず電子移動に大きな関与を示すことを明らかにしており、水溶液の状態に変化があることにながうかがわれる。さらにヒトの血液の塩濃度が約0.1M、海水のそれが0.6Mであることがここで注意される。

塩の水溶液、さらにいえば二元溶液の構造についてNMRは有力な研究手段たりうることを結論することが出来る。



## 45. 分子間相互作用と<sup>1</sup>H NMR 溶媒シフト 極性芳香族溶媒による ASIS

電通大 ○仁 木 國 雄 , 中 川 直 哉

1. はじめに. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR のベンゼンによる誘起シフト (ASIS) については、従来より多くの研究があり、経験則 (カルボニル平面則) が提案され分子構造解析に広く利用されている。<sup>1)</sup> また、ヘキサフルオロベンゼン<sup>2)</sup> やピリジン<sup>3)</sup> による溶媒シフトもベンゼンによるシフトとはかなり異なり興味深い。一方、高磁場 NMR の普及に伴い、分子構造解析にベンゼン、ピリジン等の溶媒効果が再び注目される可能性が出て来た。

我々はこれまでに、ベンゼンおよびヘキサフルオロベンゼンによる誘起シフトは、溶質-溶媒間での双極子-四極子相互作用により、磁気異质性をもつた溶媒分子が、極性をもつ溶質分子の周囲に配向するために生ずるとする仮説を提案し、この仮説に基づき ASIS のシミュレーション計算から、この説の妥当性を示してきた。<sup>4)</sup>

ところで、Laszloらは、*d*-カンファーの三つのメチル基の<sup>1</sup>H NMR 化学シフトを各種の置換ベンゼン中で測定し、ASIS の値が、溶媒の双極子モーメントが大きくなると減少することを報告している。<sup>1-6)</sup> しかしその原因は説明されていない。

今回は、種々の極性分子のモノ置換ベンゼンおよび $\alpha$ -置換ナフタレンによる誘起シフトを測定し、その結果が、溶質-溶媒間の静電相互作用による溶媒分子の配向を仮定すると、大部分が説明できることを見出したので報告する。

2. 実験および計算. 各種の極性溶質の<sup>1</sup>H NMR を、(I)ベンゼン、アニソール、モノクロロベンゼン、ピリジン、ニトロベンゼン、ベンゼンニトリル、(II) $\alpha$ -クロロナフタレン、キノリン、 $\alpha$ -シアロナフタレン、(III)ヘキサフルオロベンゼンとパーフルオロベンゼンニトリルの11種類の芳香族溶媒中で測定し、四塩化炭素を基準溶媒として ASIS を求めた。内部基準として TMS を用い、測定温度は 34°C、溶質濃度は 1% 以下とした。NMR の測定には 60 MHz の日立 R-20B スペクトロメータを用いた。化学シフトの測定誤差は、 $\pm 0.005$  ppm 以下である。また、ASIS のシミュレーション計算には、電通大情報センターの HITAC-M180 を用いた。

3. 結果と考察. 図 1 のは、 $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\mu = 3.45 \text{ D}$ )、 $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  ( $\mu = 1.5 \text{ D}$ )、 $(\text{CH}_3)_3\text{CCl}$  ( $\mu = 1.44 \text{ D}$ ) および  $(\text{CH}_3)_3\text{COCH}_3$  ( $\mu = 1.23 \text{ D}$ ) の ASIS である。横軸にモノ置換ベンゼン (溶媒) の双極子モーメントを、縦軸に ASIS の値を示した。図 1 のは、(1)  $p\text{-(CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$  ( $\mu = 6.96 \text{ D}$ )、(2)  $p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$  ( $\mu = 4.48 \text{ D}$ ) および (3)  $p\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{N(CH}_3)_2$  ( $\mu = 1.30 \text{ D}$ ) のメチル基プロトンの ASIS である。これらの図より、良く知られているように溶質の双極子モーメントが大きいほど ASIS (ベンゼンによる高磁場シフト) は大きい。しかし、溶媒の双極子モーメントが大きくなると、溶質の双極子モーメントの大小 (ASIS の大小) によらずベンゼンによる高磁場シフトが減少し、溶媒がベンゼンニトリルやニトロベンゼンでは非常に小さな値となることになった。

に つ き く に お ・ な が が か な み や

Solvent A:  $C_6D_6$ , B:  $C_6H_5OCH_3$ , C:  $C_6H_5Cl$   
 D:  $C_5D_5N$ , E:  $C_6D_5NO_2$ , F:  $C_6H_5CN$

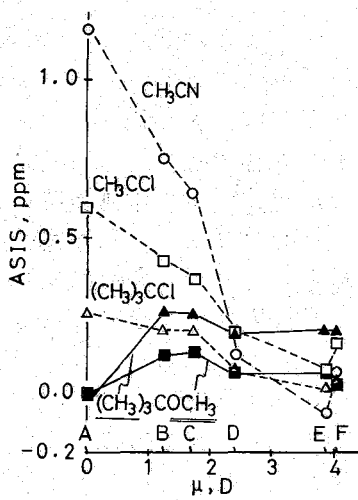


図 1 a)

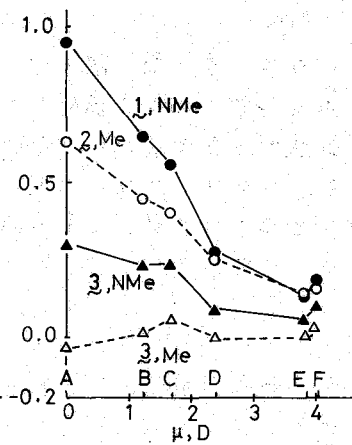


図 1 b)

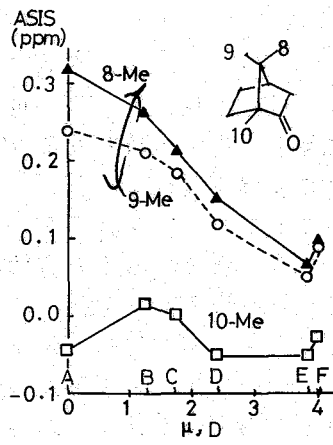


図 2

図 2 は、*d*-カンファー ( $M = 3.08$ ) の 8, 9, 10 位メチル基プロトンの ASIS である。ベンゼンによる ASIS の特徴は、以前に報告した双極子平面則<sup>4-b)</sup>で表現できるが、溶媒をベンゼンからモノ置換ベンゼンに変えると ASIS が減少する。

しかし、*d*-カンファーの 10-メチル基あるいは図 1 a) の  $(CH_3)_3COCH_3$  のメチル基プロトンの様に、双極子面の近くに位置する場合は、ASIS の変化が水以上に複雑である。

次に、溶質としてベンゼン誘導体を用い、そのメチル基および環プロトンの ASIS について、ベンゼンとニトロベンゼン、およびヘキサフルオロベンゼンとパーフルオロベンゼンニトリルの ASIS の相異について検討してみたい。(表 1) 表 1 には、 $\alpha$ -クロロナフタレンと  $\alpha$ -シアロナフタレンの ASIS の相異についても示してあり、なお、 $C_6D_5CN$  および  $C_6F_5NO_2$  が入手困難なため、ここでは  $C_6D_5NO_2$  および  $C_6F_5CN$  を溶媒とした。

表 1 から、溶媒を  $C_6D_6$  から  $C_6D_5NO_2$  へ、あるいは  $\alpha$ -*cl*-ナフタレンから  $\alpha$ -*CN*-ナフタレンへ変えると、 $C_6D_6$  および  $\alpha$ -*cl*-ナフタレン中で高磁場シフトしていたプロトンはその高磁場シフトが大幅に減少する。一方、低磁場シフトしていたプロトンは、わずかの低磁場シフトが減少する。しかし、4-メチル、4'-ニトロビフェニルの 2 および 2' 位プロトン以外は、ASIS の符号が変わるほどの変化は示さない。また、溶媒を  $C_6F_6$  から  $C_6F_5CN$  に変えると、一般的に、環プロトンがメチル基プロトンより ASIS の変化が大きくなり、特に  $C_6F_6$  中で低磁場シフトを示していたプロトンが  $C_6F_5CN$  中でさらに低磁場シフトを示すことがわかった。この結果は、溶媒をベンゼンからニトロベンゼンに変えたときの様子と大きく異なっている。また、 $p$ - $(CH_3)_2NC_6H_4NO_2$  は双極子モーメントが大きく、ASIS も割合大きにも関わらず  $C_6F_6$  中と  $C_6F_5CN$  中で化学シフトがあまり変化しないのもベンゼン-ニトロベンゼンの系と大きく異なる点である。

表1. ベンゼン誘導体の極性芳香族溶媒によるASIS (ppm)

Solute	proton	ASIS	$\Delta$ ASIS	ASIS	$\Delta$ ASIS	ASIS	$\Delta$ ASIS
		$(C_6D_6)$ $(-CCl_4)$	$(C_6D_5NO_2)$ $(-C_6D_6)$	$(C_6F_6)$ $(-CCl_4)$	$(C_6F_5CN)$ $(-C_6F_6)$	$(Cl-Naph.)$ $(-CCl_4)$	$(CN-Naph.)$ $(-Cl-Naph.)$
p-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	p-CH <sub>3</sub>	+0.627	-0.487	-0.206	+0.014	+0.953	-0.544
	m-H	+0.688	-0.638	-0.107	-0.193	-	-
	o-H	+0.257	-0.175	+0.105	-0.335	-	-
p-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	p-CH <sub>3</sub>	-0.036	+0.036	+0.056	-0.036	-0.043	+0.018
	m-H	-0.205	+0.059	+0.150	-0.261	-	-
	o-H	-0.121	+0.041	+0.244	-0.157	-	-
	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	+0.278	-0.182	-0.070	+0.271	+0.396	-0.205
p-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	+0.946	-0.823	-0.260	+0.011	+1.396	-0.813
	m-H	+0.572	-0.565	-0.196	-0.044	-	-
	o-H	-0.042	+0.039	+0.178	+0.002	-	-
4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4'-NO <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub>	+0.280	-0.208	-0.092	-0.002	+0.411	-0.206
	3-H	+0.317	-0.265	-0.005	-0.041	-	-
	2-H	+0.568	-0.585	-0.138	-0.086	-	-
	2'-H	+0.289	-0.315	-0.092	-0.058	-	-
	3'-H	+0.219	-0.197	-0.069	-0.049	-	-

+は高磁場シフト, -は低磁場シフトを示す。

これまでに述べてきたASISの測定結果をまとめると次の様になる。

1. ASISの大きさに関する溶媒双極子モーメント依存性は, Laszloらの報告したカンファーの様なカルボニル化合物だけでなく, すべての極性溶質に共通する現象である。
2. 特異な結合(水素結合等)の無い系について, 一般に溶媒の双極子モーメントが大きくなると, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>で高磁場シフトを示していたプロトンは急激に, 低磁場シフトを示していたプロトンはゆるやかにそのシフトを減少する。また, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>で高磁場シフトを示していたプロトンは, やはり高磁場シフトを減少するが, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>で低磁場シフトを示していたプロトンが溶媒の双極子モーメントが大きくなるとさらに低磁場シフトを示す場合がかなりある。
3. 磁気異方性および双極子モーメントの大きなナフタレン誘導体を溶媒に用いると, ASISは大きくなるが, ベンゼン誘導体を溶媒とした場合と同様に, 溶媒の双極子モーメントが大きくなるとASISが減少する。

ところで, Laszloらも述べている様に<sup>4-b)</sup>, 芳香族化合物の磁気異方性の主な原因と考えられているリングカレントは, ベンゼンとモノ置換ベンゼンで10~20%程度しか変わらない。<sup>5)</sup>従って, 今まで述べてきたASISの大きな変化の原因は, 溶媒分子固有の磁気異方性の値の大小によるのではなく, その磁気異方性をもった溶媒分子の溶質分子のまわりにおける配向に大きな変化が起こっていると考えるのが無理がないと思われる。

すでに報告したように、ASISは溶質-溶媒間の双極子-四極子相互作用によって溶媒分子が溶質分子の周囲に配向するために生ずると考えられる。図3に双極

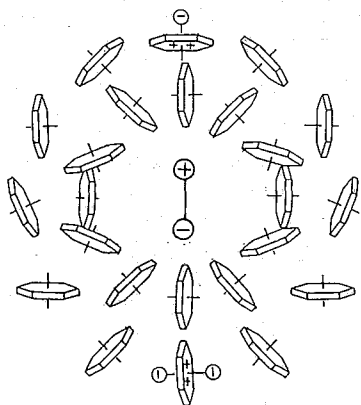
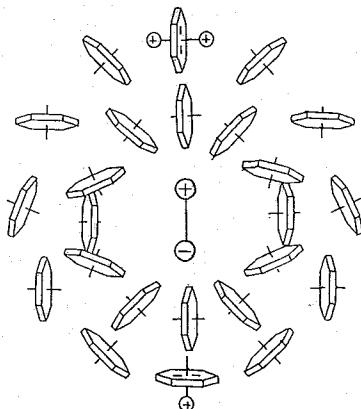


図3. a) 溶媒 ベンゼン



b) 溶媒 ヘキサフルオロベンゼン

子の周囲に静電相互作用(双極子-双極子(内側), 双極子-四極子(外側))による配向の, エネルギーが最も安定となる方向のみを示した。

また, 双極子(溶質)-四極子(溶媒)相互作用に基づく双極子平面則は図4の様になる。

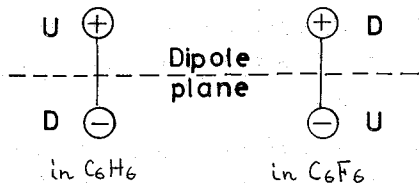


図4.

図の双極子平面よりU側は高磁場シフトを, D側は低磁場シフトを示す領域である。言い換えると, U領域にある $C_6D_6$ あるいは $C_6F_6$ はU領域にあるプロトンに高磁場シフトを与える配向が安定である。ただし, 双極子の近くのプロトンのシフトは溶質の形により異なる場合がある。

一方, 双極子(溶質)-双極子(溶媒)相互作用では, シフトの方向は図5の様になり, 双極子の軸方向では低磁場シフトを, 横方向では高磁場シフトを示す。

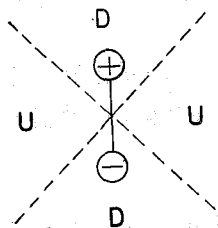


図5.

従って, 極性をもった芳香族溶媒によるシフトは, 定性的には図4で示した双極子平面則を基本に, 溶媒の双極子モーメントが大きくなるに従って図5のシフトの効果を加えて行くと, 大部分のASISが説明できる。なお, 現在計算機を使って静電相互作用に基づいてASISの定量的考察を行っている。

#### References

1. a) J.Ronayne and D.H.Williams, Annu. Rev. NMR Spectrosc., **2**,83(1969)  
b) E.M.Engler and P.Laszlo, J. Am. Chem. Soc., **93**,1317(1971)
2. J.A.Mosbo, J.R.Pipal, and J.G.Verkaide, J. Magn. Resonan., **8**,243(1972)
3. G.Slomp and F.McIcellar, J. Am. Chem. Soc., **82**,999(1960)
4. K.Nikki, N.Nakagawa, and Y.Takeuch, Bull. Chem. Soc. Jpn., **48**,2906(1975)  
K.Nikki and N.Nakagawa, Bull. Chem. Soc. Jpn., **51**,3267(1978)
5. H.P.Figeys and Flammang, Mol. Phys., **12**,581(1967)  
R.J.Abraham and M.A.Cooper, J. Chem. Soc. B,202(1967)

## 46. 置換エントロピー定数とNMR化学シフト

(阪大薬) ○高井 均, 徐 素蘭, 原 貞祿,  
佐々木喜男

〔序論〕 讀者らの一人は、第三法則エントロピーの変化に基づいた、置換基効果における新しいパラメータ ( $\delta_{50}$ )<sup>1)</sup> を案出し、そのパラメータが、QSAR<sup>2)</sup>、ガスクロマトグラフィーの保持時間の解析<sup>3)</sup>、その他の多方面に亘って有用であることを指摘してきた。又、その研究の一環として統計的手法(クラスター解析)によって  $\delta_{50}$  の特性の一端を明らかにした。<sup>4)</sup> それによれば、 $\delta_{50}$  は、極性置換基定数(例えば Hammett 型置換基定数)とは独立であり、それらと  $\delta_{50}$  との Linear combination で各種の解析を行なうことの妥当性が裏づけられている。

他方、NMR 化学シフトにおける置換基効果の解析は、芳香族・脂肪族でそれぞれその基礎となるモノ置換ベンゼン誘導体あるいは置換メタン誘導体について、多くの試みがなされているが、満足すべき結果は得られていない。そこで、今回、讀者らは、 $\delta_{50}$  と、湯川ら<sup>5)</sup> によって求められている  $\delta_{\text{H}}$ ,  $\delta_{\text{C}}$  による置換基効果の解析を試みた。

〔方法〕 化学シフト値: 芳香族系のモノ置換ベンゼン誘導体<sup>6)</sup>、 $\alpha$ -置換トルエン誘導体<sup>7)</sup>、 $\beta$ -置換エチルベンゼン誘導体<sup>7)</sup> のシフト値は、文献より、四塩化炭素中の稀薄溶液の値を引用した。脂肪族としては  $n$ -プロパン誘導体、 $n$ -ブタン誘導体を選び、四塩化炭素溶液および気体状態でのシフト値を測定した。

測定方法: 溶液状態での測定は、TMS を内部基準とし、通常の方法に従った。気体状態での測定は、試料管内での温度勾配による試料の凝縮を避けるため、試料管を Scheme 2 に示すような形状に加工して用いた。気体試料の測定値の一例を、Table に示す。

重回帰分析: 置換基に対する相対位置別に、化学シフト値と各種置換基定数 ( $\delta_{\text{H}}$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ,  $\delta_{50}$ ) との相関を重相関分析で解析した。即ち、置換基を電子求引性基 (+R 基) と供与性基 (-R 基) に区別し、それぞれについて F-検定を目安として最良の結果を得た後、両者を合して一式で表現するよう試みた。計算には、大阪大学大型計算機センター ACOS 900 システムの NEC TSS ライブラリーを主に使用した。

〔結果・考察〕 解析結果の一例を示す。

$n$ -Butane derivatives ( $^{13}\text{C}$  NMR):  $n = 23$

$$\text{SCS}_{\alpha} = 138.1 \cdot \sigma_z + 175.5 \cdot \sigma_{\text{S}}^+ - 3511.1 \cdot \sigma_{\text{S}_0} - 3.5 \quad (\text{図参照})$$

$(\pm 10.0) \quad (\pm 16.2) \quad (\pm 238.7)^{\text{MA}} \quad (\pm 2.8)$

$$R = 0.967, \text{SD} = 5.23, F = 91.5$$

$$\text{SCS}_{\beta} = 6.4 \cdot \sigma_z + 130.3 \cdot \sigma_{\text{S}_0}^+ - 530.4 \cdot (\sigma_{\text{S}_0}^+)^2 + 0.2$$

$(\pm 2.3) \quad (\pm 12.5) \quad (\pm 65.2) \quad (\pm 0.7)$

$$R = 0.937, \text{SD} = 1.42, F = 45.7$$

たかい ひとし、しい すうらん、よむ ぢょんろく、ささき よしお

$$SCS_Y = -12.8 \cdot \sigma_i - 44.3 \cdot \sigma_{S_o}^+ + 151.8 \cdot (\sigma_{S_o}^+)^2 + 250.0 \cdot \sigma_{S_o}^{MA} + 0.2$$

$(\pm 1.0) \quad (\pm 5.0) \quad (\pm 25.4) \quad (\pm 25.2)^{MA} \quad (\pm 0.3)$   
 $R = 0.960, SD = 0.53, F = 53.1$

Monosubstituted benzene derivatives ( $^{13}C$  NMR) : n = 21

$$SCS_{ipso} = 56.0 \cdot \sigma_i + 176.5 \cdot \sigma_{S_o}^+ - 6144.1 \cdot \sigma_{S_o}^{MA} - 2.9$$

$(\pm 10.1) \quad (\pm 27.1) \quad (\pm 509.3)^{MA} \quad (\pm 3.3)$   
 $R = 0.950, SD = 5.36, F = 52.0$

$$SCS_{ortho} = 23.4 \cdot \sigma_{\pi} - 20.1 \cdot \sigma_i + 1835.2 \cdot \sigma_{S_o}^{MA} - 1.0$$

$(\pm 2.1) \quad (\pm 3.2) \quad (\pm 218.4)^{MA} \quad (\pm 0.8)$   
 $R = 0.960, SD = 2.10, F = 52.0$

$$SCS_{para} = 20.1 \cdot \sigma_{\pi} - 0.9$$

$(\pm 0.7) \quad (\pm 0.2)$   
 $R = 0.988, SD = 0.81, F = 789.5$

$\alpha$ -Substituted toluene derivatives ( $^{13}C$  NMR) : n = 19

$$SCS_{para} = 6.9 \cdot \sigma_i + 0.5$$

$(\pm 0.6) \quad (\pm 0.2)$   
 $R = 0.938, SD = 0.45, F = 124.6$

ここで、 $\sigma_{S_o}^+$  は、電子供与性基についてのみ  $\sigma_{S_o}$  を考慮したことを示す。又、 $\sigma_{S_o}^{MA}$  は、 $\Delta\sigma$  (異方性の効果の大きさ)<sup>8)</sup> が、 $\sigma_{S_o}$  と相関していることを利用し、一部の置換基 (ハロゲンと CN) については、別に、 $\sigma_{S_o}$  を同帰式に組み入れたことを示す。

同帰式から明らかのように、 $\pi$ -ブタン誘導体では、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の全位置において、 $\sigma_{S_o}$  は、電子供与性基についてのみ有効であった。さらに、 $\beta$  および  $\gamma$  位では  $(\sigma_{S_o})^2$  項<sup>9)</sup> が必要であった。又、芳香族系では同じ  $para$  位でも、モノ置換ベンゼン誘導体では  $\sigma_{S_o}$  項、 $\alpha$ -置換トルエン誘導体では  $\sigma_{S_o}$  項の寄与が有効であり、さらに  $\beta$ -置換エチルベンゼン誘導体では  $\sigma_{S_o}$  ではなく  $(\sigma_{S_o})^2$  項がより有効であった。

解析結果の一例を図に示した。

NMR 化学シフトの置換基効果を、半経験的パラメータとの相関式で表現すること、従来から用いられている極性置換基定数のみでは不十分であり、 $\sigma_{S_o}$  項の必要性。さらに一部の置換基については  $\sigma_{S_o}^{MA}$  項の必要性が明らかとなった。

#### References :

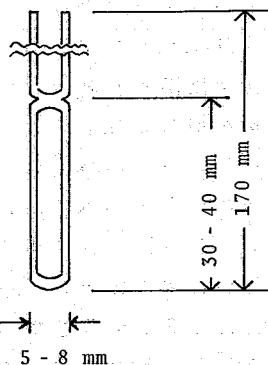
- 1) Y. Sasaki, T. Takagi, Y. Yamazato, A. Iwata, and H. Kawaki, Chem. Pharm. Bull., 29, 3037 (1981).
- 2) H. Kawaki, T. Takagi, A. Iwata, and Y. Sasaki, Chem. Pharm. Bull., 30, 750 (1982).
- 3) Y. Sasaki, T. Takagi, H. Kawaki, and A. Iwata, Chem. Pharm. Bull., 31, 330 (1983).
- 4) T. Takagi, A. Iwata, Y. Sasaki, and H. Kawaki, Chem. Pharm. Bull., 30, 1091 (1982).
- 5) M. Sawada, M. Ichihara, Y. Yukawa, N. Nakachi, and Y. Tsuno, Bull. Chem. Soc. Jpn., 53, 2055 (1980).

- 6) M. Mishima, M. Fujio, R. Takeda, and Y. Tsuno, Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ. Ser. C, 11, 97 (1978).  
 7) D. F. Ewing, Org. Magn. Reson., 12, 499 (1979).  
 8) B. R. Appleman and B. P. Dailey, Adv. Magn. Reson., 7, 231 (1974).  
 9) Y. Sasaki, T. Takagi, A. Iwata, and H. Kawaki, Chem. Pharm. Bull., 30, 3069 (1982).

Table  $^{13}\text{C}$  NMR Chemical Shifts of *n*-Propane Derivatives (Gas Phase, ppm)<sup>a)</sup>

Substituent	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
$\text{NH}_2$	13.96	-3.30	-21.43
$\text{OCH}_3$	26.09	-7.44	-22.00
OH	34.07	-4.11	-22.42
<i>t</i> -Butyl	17.16	-12.74	-17.53
<i>i</i> -Propyl	11.77	-10.07	-18.13
$\text{CH}_2\text{CH}_3$	---	-8.30	-18.13
Cl	13.81	-4.20	-20.98
Br	-0.90	-3.81	-19.36
$\text{COCH}_2\text{CH}_3$	13.42	-13.04	-18.55
$\text{COCH}_3$	14.74	-13.04	-18.61
CHO	15.52	-14.78	-18.67
$\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	5.82	-11.98	-18.70
$\text{COOCH}_3$	5.33	-12.04	-18.76
CN	-10.85	-12.23	-19.33
$\text{NO}_2$	---	-9.53	-21.42

a)  $^{13}\text{C}$  Chemical shift relative to methylene carbon of neat ethyl benzene.



Scheme Sample tube used to determine a gaseous sample

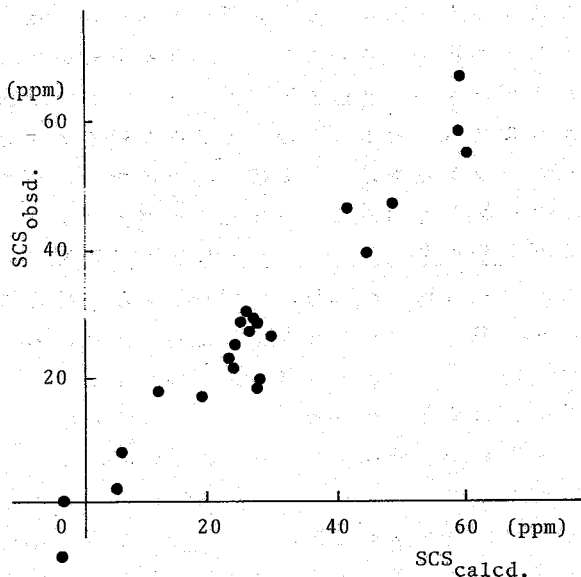


Fig. Correlation between Observed and Calculated SCS of *n*-Butane Derivatives ( $^{13}\text{C}$  NMR,  $\alpha$ -Position)

$$\text{SCS}_{\text{calcd.}} = 138.1 \cdot \sigma_z + 175.5 \cdot \sigma_s^+ - 3511.0 \cdot \sigma_{\text{SMA}}^+ + 2.2$$

## 47. 構造情報による<sup>13</sup>C NMRデータベースの検索

— 新AUREOLAシステム —

(化技研) °山本 修、早水紀久子、柳沢 勝

<sup>13</sup>C スペクトルの化学シフトは、隣接官能基についてかなりの範囲に互り加成性が成立することは良く知られている。このような加成性のパラメータを求める研究は<sup>13</sup>C NMRの初期段階から種々行われてきたが、当然のことながら隣接官能基についての構造情報を増加させるほど、また試料とする化学シフト値の数が多くなるほど、得られたパラメータの精度は向上する。われわれもこのような目的でアルカン及びアルケン類についてWiswesserの線形表示法を利用したシステムを提案している(AUREOLAシステム)<sup>1)</sup>。しかしこれらの仕事は常に限られた試料について限られた時間内で行われてきたため、得られた結果も限定されたものとならざるを得ず、試料の増加または新しい構造情報の与え方に従って絶えず更新されるべき性質のものである。今<sup>13</sup>Cの大量データベースが得られ、このデータベースが常に新しいデータを追加、更新できる能力をもっており、しかもこのデータベースに化学シフトを推定できる機能が備えられているならば、現在の時点において最も新しく最も精度の良いシフト値が得られるであろう。

このような理由により<sup>13</sup>Cデータベースには、構造情報を何等かの形で入力しておくことが極めて重要である。化技研においてこれまで構築してきたNMRスペクトル・データベースにおいては、シグナルの帰属を見易い形で与えるために構造情報が付加されている。この入力された構造情報を利用すれば、一方では上記のように化学シフトを推定し得るばかりではなく、他方では或るシフト値を与える炭素についての構造を知ることを知ることができよう。

### 構造情報の与え方 — CFWRITER

われわれは既にmachine readableな形で構造情報を与えるCFWRITERと称するシステムを開発し、本年の日本化学会春季年会において発表した<sup>2)</sup>。このシステムの本来の目的はシグナルの帰属を正確に与えることである。従来このような構造情報の与え方は情報化学の分野において大きな問題となっており、多数の提案がなされ、現在もなお勢力的な研究が行われている。ここでわれわれが行った提案もまたその一つであるが、このシステムにおいてはできるだけ簡単に、且つ化学者に馴染み深い方法で、帰属を含めた構造情報を与えることを第一の目的とした。従来の方法の多くは化合物の分類という点に主眼が置かれていたため、構造情報の与え方に一意性を強調する面が多く、普通の化学者が使用する場合煩しい点が多かったように思われる。CFWRITERにおいてはこのような一意性は全く考慮されていない。われわれが普通手書きで、或る決った空間に構造式を書く手順そのままにコマンドを連結して行けば、その通りに図形が得られるように工夫してある。勿論或程度の文法的規約は存在するが、それは非常に簡単である。ここではCFWRITERの詳細な説明は一切省略するが、図1に示す例からその一端を推察されたい。

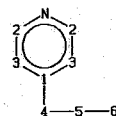
やまもと おさむ、はやみず きくこ、やなぎさわ まさる



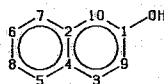
### 構造情報による<sup>13</sup>Cデータベースの検索

一般に同定のためにスペクトルのデータベースを利用する場合、或る与えられたスペクトルのピーク情報の一部または全部を計算機に入力し、そのピークがデータベースのファイル中に存在するかどうかを調べ、最も確度の高いものから順に選び出してゆくパターン・マッチングに似た手法がとられる。<sup>13</sup>Cスペクトルの場合も勿論この方法で同定を行うことができる。この方法の大きな、そして非常に危険な欠点は、見つけ出すべき化合物のスペクトルがファイル中に存在しなかった場合、論理的には全く無効な手段になってしまうことである。従ってデータベースには出来るだけ多くのデータを集積することが要求される。しかし、化合物の数はほとんど無限ということができ、また新規化合物の発見は年々増加の一途を辿っている。それ故このようなパターン・マッチングのみに頼る方法が同定のためにデータベースを利用する唯一の手段であるとするならば、スペクトル・データベースの利用価値も大したものではないと言わざるを得ない。

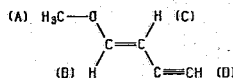
幸いにしてNMRスペクトルは化合物の構造を極めてシンプルな形で反映したスペクトルである。従って少なくともNMRスペクトルに関する限り、上記のようなパターン・マッチングのみを頼りにしたデータベースの利用だけに止まらず、もっと高度な利用方法を考えなければならない。そのためには部分構造によるNMRデータベースの検索、及び同定の一手段としてのNMRデータベースによる部分構造の推定が可能でなければならない。前にも述べたように、CFWRITERの本来の目的はシグナルの帰属を正確に与えることであつた。しかし図形表示の途中の段階において、当然各原子の位置関係が得られる。これを利用すれば、既に帰属情報が各シグナルに対応づけられているから、逆に位置関係を与えることにより各シグナルのシフト値を検索または推定することができる。また或る与えられたピークがどの官能基に対する位置関係を充たしているかを求めることもできる。これによって部分構造の推定が可能になり、たとえ求める化合物がデータベースのファイル中に存在しなくても、これらの部分構造を繋ぎ合わせて求める化合物の構造を推定できることになる。このような利用方法こそが<sup>13</sup>Cデータベースの最も有効な利用方法であろう。ここで重要なことは、<sup>13</sup>Cデータベースにはもはやあらゆる化合物を集積する必要はなく、種々の基本構造をもったものをできるだけ広範囲に集めれば良いことである。



¥001 4P BZ SK AR P1 N. 2. 3. 1. 3. 2 SB=4 -4 HB2 1 SK P1 4. 5. 6 4E



¥002 4P NA SK AR P1 10. 1. 9. 3. 5. 8. 6. 7. 2. 4 SB=2; OH: R 4E



¥003 4P EN S=2 DS=5 P1 H-(C); R. C. (B)-H; L. O. C TB=2; CH-(D); R SB=4; (A)-H=3C; L 4E

図 1 CFWRITERの出力例

## 検索用 $^{13}\text{C}$ データベースの構造と機能

化技研における検索用  $^{13}\text{C}$  データベースにおいては各シグナル毎にシフト値、多重度、溶媒の種類、カップリング情報などの他に、そのシグナルを与える炭素の種類、 $\alpha$ 位、 $\beta$ 位、 $\gamma$ 位、 $\delta$ 位の官能基、これらの官能基の連鎖方式がコード化されて格納されている。またその炭素が環の一部として存在するかどうか、及び特定の官能基に対しどのような配置にあるかという情報も部分的に入っている。このような情報はファイルに入力する際にCFWRITERのコマンドにより自動的に創成される。検索に際しては炭素の種類、官能基の連鎖などコード化された情報をそのままの形で検索コマンドに使用することは不便だから、下記表1のような記号を使用する。

表 1. 炭素及びその他の原子の表示記号

(a) 飽和炭素	C	CH	CH2	CH3
(b) 二重結合炭素	=C	=CH	=CH2	=C=
(c) 芳香族炭素	=C:	=CH:		
(d) カルボニル、チオカルボニル	C=O	CH=O	C=S	CH=S
(e) 三重結合炭素	#C	#CH	C#N	
(f) その他の原子	原子記号をそのまま入力			

但し、O、Hが他の原子と一緒にの場合には一緒に入力する。SH、OH、NO2 など。

検索コマンドが入力されると、プログラムによりこれらの記号がコードに翻訳され、データベース・マネージメント・システムに渡される。

次に検索機能の代表的な例を図2～4を参照しながら説明する。

(a) 4級炭素で、しかもシフト値が30.0～31.0ppmの間に存在するものを検索して出力する(図2参照)。

図2において、CDS-00-102はスペルトル・キーであり、その後の数字はこの化合物の一番目のシグナルであることを示している。

SPECIES > C < は4級炭素であることを意味し、その下の化学記号は4個の置換基である。この後簡単な操作により、それぞれの化合物の名前を知ることができる。

```

NMRSPK) SEA SP EQ C AND PK 30.0:31.0
+FRS1001 4 FOUND
NMRSPK) OUT
***** LIST OF PEAK INFORMATION *****
# 1 CDS-00-102 001 SHIFT= 30.3 PPM (S)
SPECIES >C<
-CH3
-CH3
-CH3
-CH2-CH2-CH2-
DELTA GROUPS -CH3
SOLVENT CDCL3
# 2 CDS-00-172 001 SHIFT= 30.2 PPM (S)
SPECIES >C<
-CH3
-CH3
-CH3
-CH2-CH2-CH-
DELTA GROUPS -CH3
SOLVENT CDCL3
# 3 CDS-04-239 003 SHIFT= 30.4 PPM (S)
SPECIES >C<
-CH3
-CH3
-CH3
-CH2-CH3
SOLVENT CDCL3
# 4 CDS-04-292 001 SHIFT= 30.7 PPM (S)
SPECIES >C<
-CH3
-CH3
-CH3
-CH2-CH=CH2
SOLVENT CDCL3
NMRSPK) OUT_NAME
1 CDS-00-102 C8 H18 2,2-DIMETHYLHEXANE
2 CDS-00-172 C9 H20 2,2,5-TRIMETHYLHEXANE
3 CDS-04-239 C6 H14 2,2-DIMETHYLBUTANE
4 CDS-04-292 C7 H14 4,4-DIMETHYL-1-PENTENE
NMRSPK)

```

(b) 炭素の種類及び置換基の連鎖を与えてシフト値を推定する(図3参照)。この例では  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$  のメチン炭素のシフト値を推定した例であり、 $\gamma$ 位までの情報しか利用していない。68.0 $\pm$ 0.0ppmの解答が得られた。この場合も簡単な操作により基礎となったデータの化合物名を知ることができる。

(c) CFWRITERのコマンドをそのまま入力して、その化合物の全部のシフト値を推定する(図4参照)。

図4は結果をプロッター出力した例である。実はこの化合物はまだファイルに入っていない。実測値は上から夫々172.9, 60.4, 33.5, 20.4, 14.3 ppmであり、良い一致が得られている。ここでLEVELとしてA, B, Cで表わされた文字の意味は夫々 $\delta$ 位、 $\gamma$ 位、 $\beta$ 位までの一致が得られたことを示している。

以上のようにこれらの検索コマンドを種々組み合わせて、多くの利用方法を考えることができよう。現在の段階ではまだ無理であるが、未知スペクトルの各シフト値、多重度、強度などを入力して、化学構造を自動的に推定することも可能であろう。

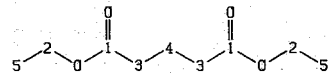
現在、構造情報は $\delta$ 位までの官能基、 $\gamma$ 位までの官能基の連鎖、その他若干の環構造、幾何異性の情報が入力されている。今までに報告された多くの文献、及びわれわれのこれまでの経験によれば、特殊な場合を除き、大体この程度の情報でシフト値を最大約1ppmの範囲で予測することができると思われる。

- 1) 山本、柳沢： 日化第37年会要旨集、第1分冊p.596(1978)；  
山本、柳沢： 第17回NMR討論会要旨集p.33(1978)。
- 2) 山本、柳沢、早水： 日化第42年会要旨集、第1分冊p.214(1983)。

```

NMRSPK) EVAL
SEARCH MODE, CARBON SEPECIES AND STRUCTURE INFORMATION
=> SEARCH
NO.1 SUBSTITUENT ALPHA/BETA/GAMMA/GAMMA/GAMMA//BETA/GAMMA/...
=> OH
NO.2 SUBSTITUENT ALPHA/BETA/GAMMA/GAMMA/GAMMA//BETA/GAMMA/...
=> CH3
NO.3 SUBSTITUENT ALPHA/BETA/GAMMA/GAMMA/GAMMA//BETA/GAMMA/...
=> CH2/CH2/CH2
AND DELTA GROUPS, IF ANY
=>
+FRS1001 4 FOUND
+FRS1001 2 FOUND

SPECIES >CH-          LEVEL=B          ASSIGN  SHIFT  V(E)  ITEM  LEVEL
-OH                    1          173.6   0.4   10    B
-CH3                    2          60.2   0.3   13    A
-CH2-CH2-CH2-          3          34.2   0.4   36    C
ESTIMATED SHIFT VALUE 68.0 PPM      2 ITEMS
V(E)                   0.0 PPM
SEARCH MODE, CARBON SEPECIES AND STRUCTURE INFORMATION
=> END
  
```



```

NMRSPK) OUT NAME
1 CDS-04-034 C6 H14 O      2-HEXANOL
2 CDS-04-297 C7 H16 O      2-HEPTANOL
NMRSPK)
  
```

図 4

48. タンパク質の水和 (3)

凍結変性防解物質存在下での水和特性

北大 佐藤研

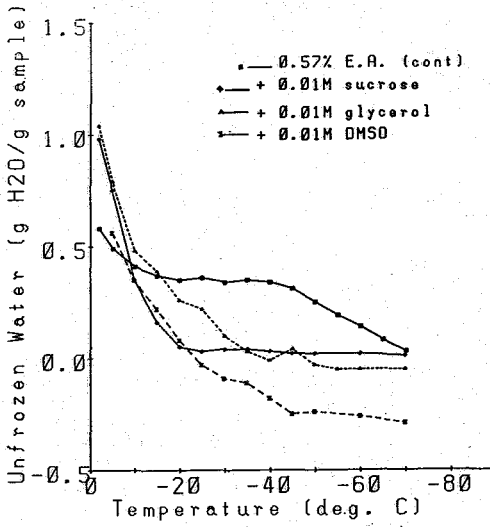
花房尚史

〔はじめに〕 凍結乾燥と同様、凍結融解のみで変性する蛋白質が、ミオシンに  
始めに知られてゐるが、これは糖や glycerol 等の添加によつて防解される<sup>1)</sup>。  
凍結変性の対策と共々、これらの物質(以下、protectant)の作用機構も、蛋白質の水和  
とその性質が大まかに等しいと考へてゐることを推測された。蛋白質の凍結乾燥の場合、  
糖やアミノ酸が protectant として極めて有効であるが、<sup>1</sup>H NMR による緩和測定と D  
SC による残存水量の測定から、これらの protectant は蛋白質の残存水量に著し  
く減少させると共々、水和水-蛋白質間の相互作用(著しく増加させる)ことが判つた。  
凍結乾燥の場合に過剰の水分子は昇華によつて系外に除去されるが、凍結の場合  
は、水の形で系内に存在する。今回は、protectant が存在するとその不凍水(蛋白質  
の水和水を含めた)の特性を、<sup>1</sup>H NMR による不凍水量の測定と、 $T_1$ ,  $T_2$  の緩和測定  
によつて調べた。

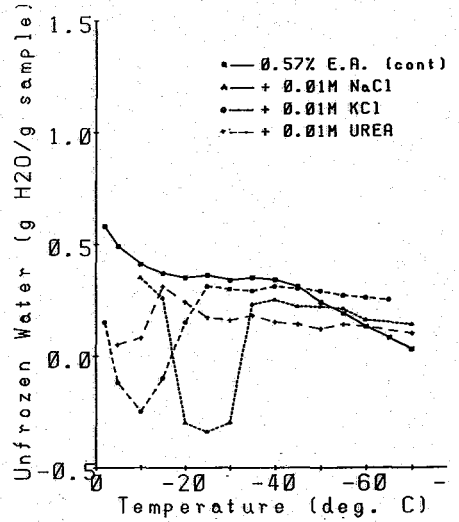
〔材料および方法〕 代表的な蛋白質として ovalbumin (X2 oryza, 日本生化学製  
)の 0.5% 水溶液を用いた。遠心して不溶画分を除き、所定の総濃度になるよう  
protectant 等を加えて固めた。試料量は、5% 試料管で 0.17 ml である。

<sup>1</sup>H-NMR の測定は JEOL FX-100 (温度可変、スピンロックシステム装置附属)に  
用いた。<sup>1</sup>H 周波数プロンプトを用い、スピンパルス中は 5 μsec, ロックシステムパルス中は 76  
、 $T_1$  測定は IR 法を用いた。不凍水量は、2% LiCl, 0.1% MnCl<sub>2</sub> 溶液を H<sub>2</sub>O 定量の  
基準 (120 46.5 M)<sup>2)</sup> として、スピンパルス中のスペクトルの積分強度の比から求めた。  
尚、添加物の水和の除去を防止するため、その溶媒のみの積分強度を求め、全体の積分  
強度から差し引き、蛋白質自体の不凍水量とした。このとき、添加物自体の不凍水量は  
蛋白質が存在しても変化するまいと仮定した。又、緩和測定によつても、添加物の影響を  
除くため、溶媒のみの緩和曲線を求め、不凍水量測定の結果とあわせて、 $R_{obs} = f R_{PH}$   
+ (f-1)  $R_{AH}$  (但し、 $R_{obs}$  は観測された緩和速度、 $R_{PH}$  は蛋白質の水和水の緩和速  
度、 $R_{AH}$  は添加物の水和水の緩和速度、f はフラクシヨナル) から蛋白質の不凍水の緩和  
時間を求め、双極子-双極子相互作用による<sup>3)</sup>として、近接解によつて回転の分子  
間隔時間を求めた。

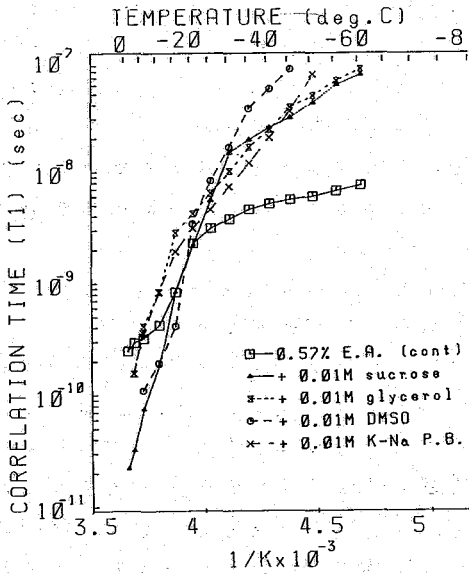
〔結果と論議〕 単一スピンパルス中のスペクトルの積分強度から、有効な protectant  
ありは無効な塩や変性剤 (urea) が存在する時の不凍水量の温度による変化を、図  
1, 2 に示す。添加物の 0.01 M の濃度は、ovalbumin の全アミノ酸残基に対してモル  
比が約 1:1 となるような濃度で、凍結乾燥の場合はこの比のとき残存水量  
は最小、 $T_c$  は最大な値である。蛋白質のみの対照では -25°C ~ 45°C の領域で不  
凍水量はほぼ一定の 0.32 を示し、他の物理化学的方法で得らるる水和量とはほぼ一致  
し、NMR により求めらるる水和量と一致するところである<sup>4)</sup>。これに対して、protectant  
として有効な糖や glycerol、更には細胞シグナルでの凍結保存によく用いられる DMSO  
では、<sup>5)</sup> 水和量を示す温度領域より高濃側では不凍水量は増加するが、この領域  
は小さいものである。



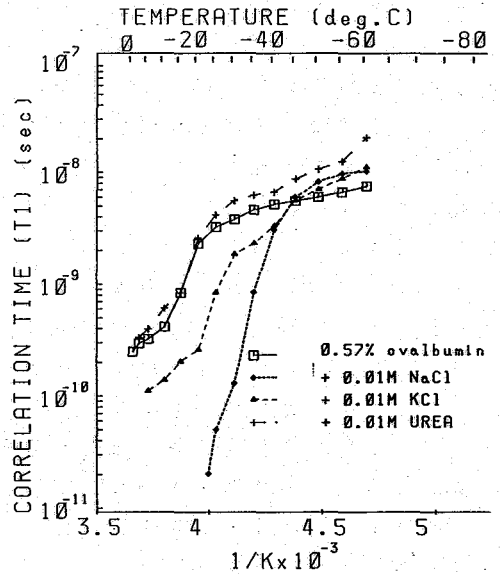
第1図 有効な変性防御剤を加えた時の不凍水量の温度による変化 (APPレグミンを主成分の不凍水量)



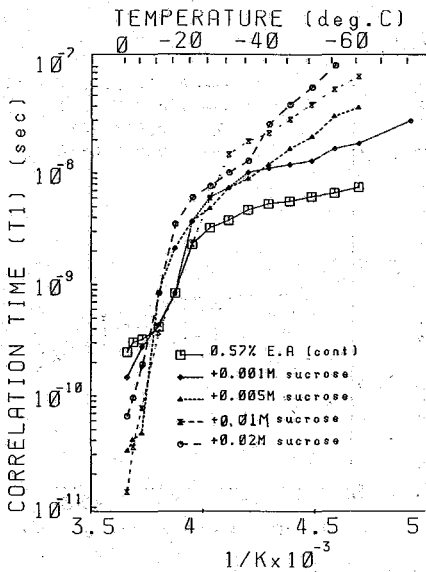
第2図 変性防御剤として無効な塩又は変性剤としてureaが共存すると主成分の不凍水の温度による変化。



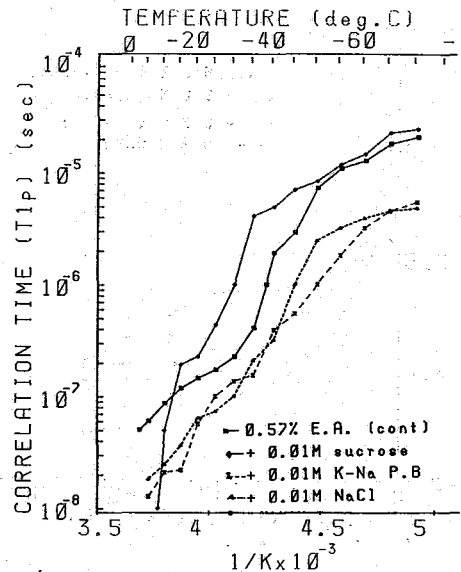
第3図 変性防御剤が共存すると主成分から求めた分子相関時間T1のArrhenius Plot



第4図 塩、変性剤が共存すると主成分から求めたT1のArrhenius Plot



第5図 sucrose共存下での  $T_1$  から求めた  $T_c$  に対する sucrose の濃度依存性。



第6図 各種物質 (有効成分は無効な) 共存下での  $T_{1P}$  から求めた  $T_c$  の Arrhenius plot.

びは程度に減少し、凍結く、あまり付員の他を示す。これに対して、塩では  $-11^{\circ}\text{C}$  近辺 (KCl の共晶点)、 $-23^{\circ}\text{C}$  (NaCl の共晶点) 近傍でそれそれ負の値を示すが、完全に凍結した  $-35^{\circ}\text{C}$  辺りの領域では対照とはほとんど同じ値を示す。又、urea では高温側で低い値を示すが、 $-35^{\circ}\text{C}$  近傍では塩よりやや低い値を示す。これらの事実は、これらの添加物のみの溶液では温度に対して不凍水量は段階的に減少するのみであると考えられ、これらの水の氷が層内との共存により影響を及ぼすことにより、氷の成長が抑制されることと関係がある。塩では共晶点付近では複雑な現象があることを示している。

これらの物質が共存するとその  $T_1$  から求めた  $T_c$  の Arrhenius plot を、4 図に示す。有効な protectant 共存下では、 $0^{\circ}\text{C}$  側の高温域では凍結が完全に進行してはいるものの  $T_c$  の値はむしろ対照より小なりが、氷結を及ぼす  $-25^{\circ}\text{C}$  以下の領域では明らかに対照より大なる値を示し、しかも同一モル濃度で sucrose と glycerol はほとんど同じ値を示す。DMSO は、purify (天然白溶液では変性作用が大なるため凍結の protectant としては用いられぬが、細胞や臓器の凍結保存では効果が大なりと之を認めるが、この結果でも低温側では糖中 glycerol より大なる値を示す。又、糖類緩衝液もある程度の防御効果があるが「氷結」の領域では対照よりはるかに大なる値を示している。これに対し、塩や urea では、特に塩では共晶点で低いことを示し、これは極めて小さく、氷結を及ぼす温度領域でも非常に小さく、氷結水-層内内の相変作用を低下させることを示している。urea の場合は、不凍水量を中程度に下

る効果を示したが、 $T_c$ の値も対照より僅かに大きい値を示す。第4図は、 $T_i$ から求めた $T_c$ の Arrhenius plot の、sucrose濃度による変化で、 $-25^{\circ}\text{C}$ 以下ではsucrose濃度の増加と共に、同一温度下は濃度が高くなるにつれて $T_c$ が増大する。図6は、 $T_i$ より求めた $T_c$ の Arrhenius plot の結果の一部である。不凍水量や $T_i$ から求めた $T_c$ の結果と異なり、有効な protectant とするべきものは明確ではない。 $T_i$ と $T_i^0$ の差が $T_c$ から求められるスビーズスビーズ距離はほとんど同じ値(1.6~1.7Å、対照)なので、双方共同-対象と考えられるが、そこで protectant は細胞内液の短い系にのみ効果があると思われた。

これらの結果から、以前報告した凍結乾燥の protectant の結果と同様に、これらの有効な protectant は、蛋白の水和量を示す $-25^{\circ}\text{C}$ ~ $-45^{\circ}\text{C}$ の温度領域で、水和量を著しく減少させ、又、 $T_i$ から求められた回転の分子相対時間 $T_c$ を著しく増大させる。即ち蛋白-水和水相の相互作用を増大させる効果をもつ。凍結乾燥の場合ほど明確ではないが、これらの効果は蛋白のアミノ酸残基とのモル比1:1のときで最大となる。前述のように、不凍水量が負の値を示すのは、添加物の不凍水量が蛋白の共存によって変化するという仮定が妥当でなからず、実際は相互に影響しあうと考えられる。アミノ酸残基と添加物とのモル比1:1で水和量極小、 $T_c$ 最大となることから、有効な protectant が水和水と置換結合すると考えると当然その分だけ protectant の水和量が減少することになる。この excess の水分子は、凍結乾燥の場合には昇華、凍結の場合は bulk の水と共に氷と結晶化するのである。このような protectant の特性が、凍結乾燥の防御機構の基本的な原則を説明していると考えられた。

最後に、NMRによる水和の研究の場合、蛋白自体の $^1\text{H}$ の分布をどの程度見極められるかという問題がある。ovalbuminの99.75%  $\text{D}_2\text{O}$  溶液(0.07%)を用いて、HMG法による液相核磁法に適用して、蛋白溶液の蛋白の $^1\text{H}$ の位置と溶媒の $\text{DHO}$ の位置をそれぞれ照射して溶媒のみの面積強度と蛋白の $^1\text{H}$ のみの面積強度を、 $\text{LiCl}_2$ の標準溶液を用いてそれぞれ同一条件下で照射した面積強度と比較した結果、全 $^1\text{H}$ 量に対する蛋白自体の $^1\text{H}$ の分布は2~3%という結果が得られた。これはあくまで大体の目安だが、この時の全 $^1\text{H}$ 量と蛋白の $^1\text{H}$ の含量比は前記の実験条件の $-30^{\circ}\text{C}$ 近傍の値に近似的で $-25^{\circ}\text{C}$ ~ $-45^{\circ}\text{C}$ の領域では最大限見極めて5%以下と考えられ、ほとんど無視し得ると思われた。

#### 参考文献

- 1) 花房隆史 蛋白質・核酸・酵素 22, 301 1977.
- 2) " 第20回 NMR 討論会要旨集
- 3) Hays, D. & Fenema, D. Arc. Biochem. Biophys., 213, 1 1982
- 4) Kuntz, I. P., et al Science, 163, 1969

## 49. 光CIDNP測定装置の設営と生体物質への応用

(阪大蛋白質研) ○林文晶, 小林祐次, 阿久津秀雄, 京極好正

<はじめに>

CIDNPとはラジカル反応の再結合の際に生じる“スピン選択”によってスピン系に分極がおこる現象であり, Kapteinらは<sup>1)</sup>フラビンを共存させて cyclic な光反応系をつくることにより生体物質への応用を可能にした。我々も同様な系でCIDNPを観測し実験条件を種々検討した。さらにタンパク質その他の生体物質に適用し、帰属・構造変化などこれから得られる情報について検討した。

<原理>

図1に光励起されたフラビンと反応物の間に起こると考えられるラジカル反応を示す。光励起されたフラビンはチロシンなどの反応物と反応して三重項状態ラジカルペアをつくる。このラジカルペアがどう反応するかは2つの電子スピンの歳差運動周波数差による“rephasing”に依存している。一重項状態にあるもののみが再結合(反応a)できるとすると“rephasing”速度とペアの拡散速度との競争でスピン分極がおこることが理解される。ただし、cyclic 反応のときは、ラジカルペアの再結合反応物と拡散後の反応物(反応c)が同一なので、どちらか一方の核スピント、より有効な緩和機構がなければならぬ。それが $T_{1R}$ の矢印で示されている。

<実験>

測定はBruker WM 360wb に光照射用プローブをつけ、日

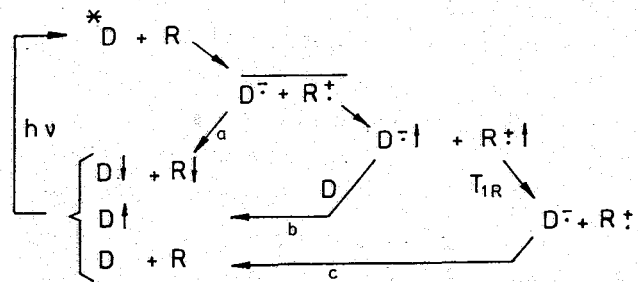


図1 フラビンD, 反応基質Rのcyclic光反応  
a)ラジカルペアの再結合反応 b)フラビンの電子交換反応 c)スピン相関を失ったラジカルの再結合  $T_{1R}$ :ラジカルの核スピン-格子緩和時間

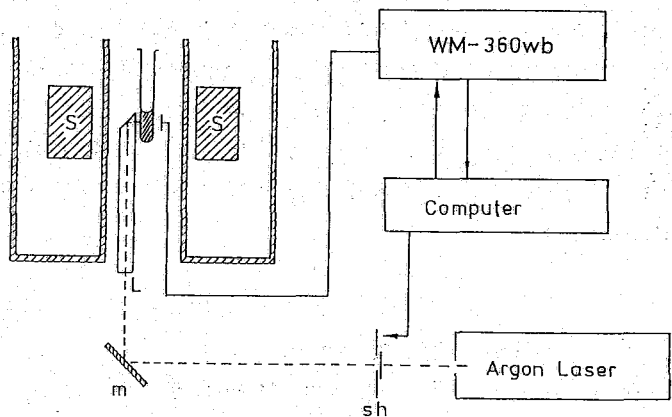


図2 光CIDNP測定装置

S: 超伝導マグネットコイル, sh: シャッター, m: ミラー, L: 石英ロッド

はやしふみあき, こばやしゆうじ, あくつひでお, きょうごくよしまさ



本電気 GLC-3300 アルゴンレーザー，コパル電磁シャッター EC-601 を用いて行った。図2に実験装置の模式図を示す。レーザー光と観測パルスは、コンピューター制御されたシャッターによって同期をとった。シャッターを出たレーザー光は、ミラーMによってプローブ内の石英ロッドに導かれ、45°にcutされたロッド上端で曲げられて試料に照射される。

パルス系列：用いたパルス系列を図3に示す。光照射 FID と非照射 FID を交互に測定し Disk へ格納した。スペクトルは、これら2つの FID の差をフーリエ変換して得た。また pre-saturation パルスは全磁化を消すためのパルスで、この実験では、90°パルス間隔を順次半分にしてい

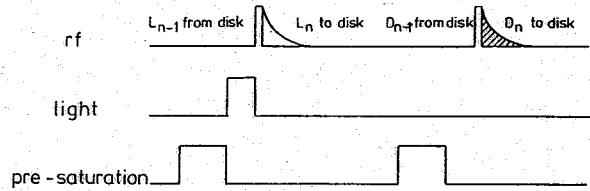


図3 パルス系列

L: 光照射 FID, D: 非照射 FID

って、その間隔が約 6 ms になるまで計 8 個のパルスを含むパルス列を用いた。これによって特に水などの低分子のピークが効率よく消され、差スペクトルが改善できた。またレシーバーゲインも 2~4 倍上げることができた。この実験で用いられた測定条件は次のとおりである。ディレイ：4 s, pre-saturation パルスの最初の間隔：0.8 s, 光照射時間：0.4~0.6 s, 観測パルス：90°, レーザーパワー：0.8~2 W (488 nm シングルライン), 積算回数：2 mM で 20 回程度 - 従って数分で光 CIDNP スペクトルが得られる。

### <結果および考察>

これまでの実験の中から我々は α-ブングカロトキシシ、チトクロム P450 リダク

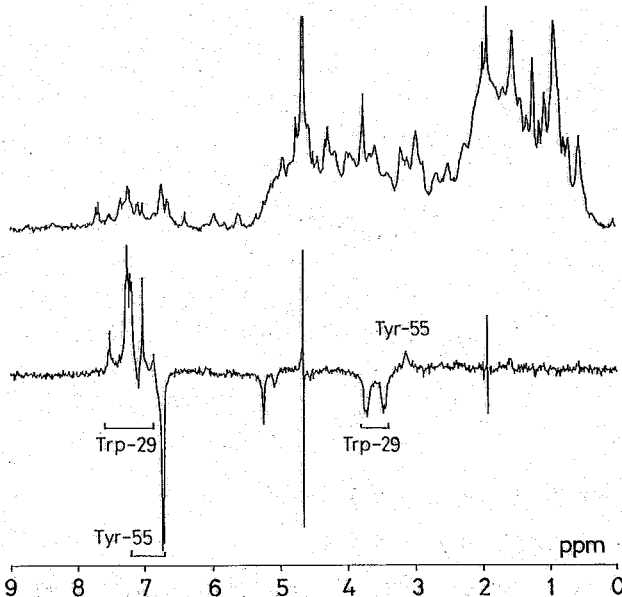


図4 α-ブングカロトキシシ  
(上)  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル  
(下) 光 CIDNP 差スペクトル  
測定条件

試料濃度：2.5 mM

N(3)-カルボキシメチルミフラビン  
：0.1 mM

pD = 7

照射条件

488 nm 2W シングルライン

0.6 s 照射

積算回数 100 回

(ただしここでは pre-saturation パルスを用いていない)

ターゼを例にとり、ここに示したい。

α-ブングアロトキシシン：α-ブングアロトキシシンは、アマガサヘビの毒腺からとれる長鎖神経毒である。このタンパクは74残基中 His 2個, Tyr 2個, Trp 1個, Phe 1個の計6個の芳香族残基をもち、それらの残基の芳香族領域はすでに遠藤ら<sup>2)</sup>により、帰属されている。図4はα-ブングアロトキシシンの光CIDNP差スペクトルである。芳香族領域, C<sub>α</sub>, C<sub>β</sub>領域に明瞭なCIDNPシグナルが観測される。シグナルは10倍程度強調されている。シグナルパターンから、7.0~7.3 ppm間の正に強調されたシグナルおよび3.4~3.8 ppm間の負に強調されたシグナルは、それぞれ Trp の環および C<sub>β</sub>-H のシグナルであり、また 6.72 ppmの負に強調されたシグナルおよび3.12 ppmの正に強調されたシグナルは、それぞれ Tyr C<sub>3,5</sub>-H および C<sub>β</sub>-H のシグナルであることがわかる。これらのシグナルは不対電子と直接A.I.S.によってカップリングしたプロトンに対応し Trp の場合は C-2, C-4, C-6, C<sub>β</sub>-H、そして Tyr の場合は C-3,5, C<sub>β</sub>-Hがこれに対応する。さらに7.51 ppm, 6.84 ppm, 7.10 ppmの強度の小さいシグナルは、光照射時間を変えて実験から交差緩和によって分極されたものであることがわかった。そしてそれらはカップリングとシグナルの符号から、前から順に Trp C-7, Trp C-5, Tyr C-2,6のシグナルであることがわかった。

以上の結果を遠藤らの帰属と比較すると、それぞれの残基は Trp-29と Tyr-55であることがわかった。また、タンパク質構造討論会で指摘したように<sup>3)</sup> Trp C-6の帰属が適切でない。また、5.06 ppm, 5.23 ppmに負のシグナルが見えるが、このシグナルは何であるか現在検討中である。

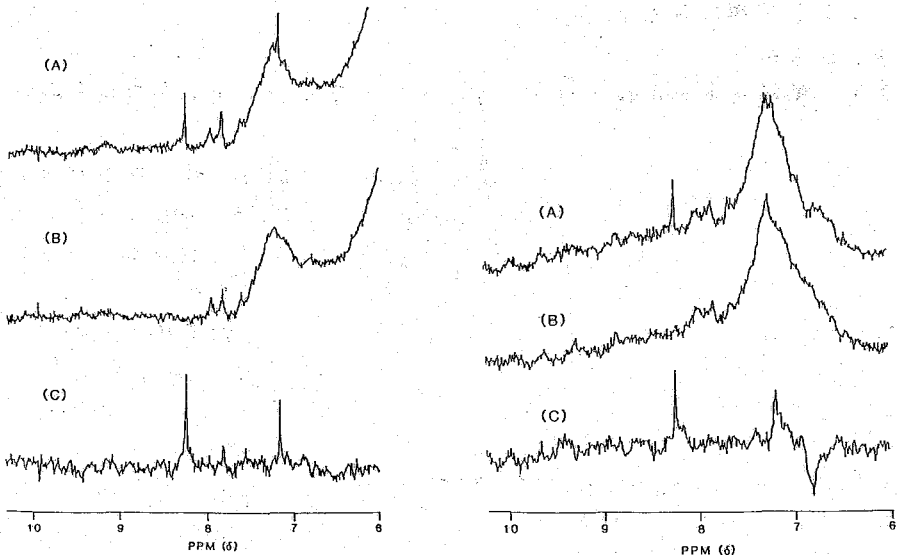


図5(左) チトクロームP450リダクターゼ ホロタンパク

図6(右) FMNを除いたチトクロームP450リダクターゼ

測定条件：試料濃度：0.1 mM, N-オクチルグルコシド：120 mM, 0.1 M リン酸バッファ (PD = 7), 照射条件：488 nm 0.8 W single line, 0.4 S 照射, 積算回数200回

チトクロム P450 リダクターゼ: 我々はウサギ肝細胞のミクロソームから精製したチトクロム P450 リダクターゼについて光 CIDNP を試みた。これは、分子量 7 万 8 千の膜タンパクで、分子内に FAD と FMN の 2 個の補欠分子族を含む。この一次構造はまだ明らかになっていない。図 5 はホロタンパクの光照射スペクトル、非照射スペクトル、差スペクトルを示す。非照射スペクトルを見てわかるように、1 本のピークとして分離できるものはなく、通常の  $^1\text{H-NMR}$  では解析不可能である。ところが光 CIDNP 差スペクトルでは鋭いヒスチジンピークを観測することができた。さらに、FMN を除いたものについて CIDNP を測定したところ、今度は図 6 に示すように His に加えて Tyr のエミッションピークを観測することができた。ここで FMN の再結合の実験から両方のタンパクに現れる His のシグナルは、同一残基由来のものであり、Tyr は再びしゃへいされたので FMN 結合領域にあって、その結合の影響を直接受けているのではないかと想像される。<sup>4)</sup>

以上 CIDNP は帰属および構造変化の追跡に非常に有効であることがわかった。しかしながら一方ではフラビンの光還元および光分解による積算効率の低下などの大きな問題があり、これらが改善されればより広い応用が可能になると思われる。

<謝辞>

$\alpha$ -ブングロトキシシンの研究にあたって、試料を提供していただいた阪大蛋白質研 張博士、崎山教授に感謝いたします。またチトクロム P450 リダクターゼの測定に御協力いただいた愛知医大 西本博士、柴田教授に感謝いたします。

<文献>

- 1) R. Kaptein, K. Dijkstra *J. Magn. Reson.* 31 171-176 (1978)
- 2) T. Endo, F. Inagaki, K. Hayashi, T. Miyajawa *Eur. J. Biochem.* 120 117-124 (1981)
- 3) 小林祐次, 林文晶, 藤原敏道, 京極好正, 中沢隆, 河田康志, 崎山文夫, 林恭三, 張均昌 第 34 回タンパク質構造討論会講演要旨集 (1983)
- 4) Y. Nisimoto, F. Hayashi, H. Akutzu, Y. Kyogoku, Y. Shibata *J. Biol. Chem.* 投稿中

# 50. $^{19}\text{F}$ -NMRによるステロイド-アルブミン相互作用の研究

( 京都府立医科大学・一生理, ※中研 )

○ 西川弘恭, 瀬尾芳輝, ※ 長谷川武史

はじめに

従来より、ステロイド-アルブミンの結合についての研究はラジオアイソトープを用いた平衡透析法や分光分析法で行われてきた。血漿中のコルチコステロイドの1部は高い親和性をもつ corticosteroid binding globulin (CBG) と結合しており、一部は低い親和性をもつアルブミンと結合していることが知られている<sup>(1)</sup>。一方、コルチコステロイドの1種である9 $\alpha$ -fluoro-16 $\beta$ -methyl prednisolone-21 disodium phosphateはC(9)にフッ素を1つもち、その生物学的活性はC(9)にプロトンをもつ場合に比し数十倍である。本報告は上記フッ化コルチコステロイドとアルブミンの相互作用を $^{19}\text{F}$ -NMRによるcoupling constant, chemical shift, 線幅, 及び $^{31}\text{P}$ -NMRのchemical shift, 線幅より解析した。

## 試料と方法

9 $\alpha$ -fluoro-16 $\beta$ -methyl prednisolone-21 disodium phosphate (9 $\alpha$ -fluoroprednisolone) は塩野義製薬 (株) より提供された。アルブミンは Bovin serum albumin (BSA) Fraction V (SIGMA Chemical Company)を用いた。緩衝液は10mM Hepes (同仁化学研究所) を用いた。

$^{19}\text{F}$ -NMRはJEOL-PFT 100 NMR ( $^1\text{H}$ で100MHz) spectrometerで測定された。スペクトルは通常2000回の平均加算で得られた。スペクトル幅は2000Hz、データポイントは4096であった。パルス繰返し時間は1.5secであった。chemical shiftの外部基準としてトリフルオル酢酸を用いた。 $^{31}\text{P}$ -NMRも同装置により、スペクトル幅は1000Hz、データポイントは4096で得られた。chemical shiftの外部基準として正リン酸を用いた。測定温度は全て24°Cであった。

## 結果と考察

9 $\alpha$ -fluoroprednisolone の $^{19}\text{F}$ -NMRスペクトル。

9 $\alpha$ -fluoroprednisolone はFig.1の構造式で示され、C(9)にF, C(21)に $\text{PO}_4^{--}$ を持つ。pH7.3の10mM Hepes緩衝液中の9 $\alpha$ -fluoroprednisolone (0.97mM)はFig.2の $^{19}\text{F}$ -NMRスペクトルを示す。2種のcoupling constantを持ち、小さなcoupling constant,  $J_{\text{F9H11}}$ は9.3Hz, 大きいcoupling constant,  $J_{\text{F9H8}}$ は31.7Hzであった。各々coupling constantはDreiding Modelから $J_{\text{F9H11}}$ はFとC(11)のプロトン,  $J_{\text{F9H8}}$ はFとC(8)のプロトン間のspin-spin couplingによるものと考えられる。 $^{31}\text{P}$ -NMRによる9 $\alpha$ -fluoroprednisolone-BSA相互作用の解析。

水溶液中で9 $\alpha$ -prednisoloneは $\text{PO}_4^{--}$ をもち、BSAの (+) 残基とイオン結合すると考えられる。Table 1 に示したBSA(2g/dl)がある場合 (pH7.3) とない場合 (pH7.6) での $\text{H}_1/\text{H}_2$ が各々0.25と0.48であることは $-\text{PO}_4^{--}$ とBSAの結合型の分画が増加することによる $-\text{PO}_4^{--}$ の共鳴線の幅広化を示している。これがBSA添加による粘性でないこと

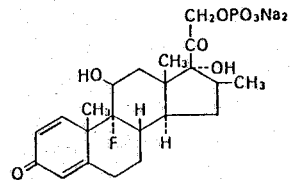


Fig. 1 9 $\alpha$ -fluoro-16 $\beta$ -methyl prednisolone-21 disodium phosphate.

にしかわ ひろやす, せお よして, はせがわ たけし

は同一BSA濃度でpHを変えた場合、 $H_1/H_2$ が酸性側で減少し、アルカリ側で増加していることから明白である。一方、同一pH7.3でのBSAによる $-PO_4^{--}$ のchemical shiftへの影響は見られず、Table 1 に示したchemical shiftの変化はpHにのみ依存するものである。

$^{19}F$ -NMRによる9 $\alpha$ -fluoroprednisolone-BSA相互作用の解析。

Fig. 3に2g/dl BSAを含む緩衝液中の0.97mM 9 $\alpha$ -fluoroprednisoloneの $^{19}F$ -NMRスペクトルをpH 3.9, 7.3, 11.3の場合について示した。Fig. 3のpH7.3と3.9はTable 1 で $-PO_4^{--}$ のBSAとの結合を示したように、両者の結合による $^{19}F$ -NMRスペクトルの幅広化を示し、BSAのない場合のFig. 2に示した明らかな spin-spin couplingによる共鳴線の分裂は見られない。しかし、pH7.3, 3.9の共鳴線のピークが平坦であることはspin-spin couplingの存在を示している。平坦部分の幅からは9 $\alpha$ -fluoroprednisoloneとBSAとの結合によるspin-spin couplingへの大きな影響は見られない。Fig. 3のpH11.3のスペクトルはFig. 2のスペクトルとほぼ同じスペクトル形を示した。これはTable 1 で $-PO_4^{--}$ 述べたように、非結合理型9 $\alpha$ -fluoroprednisolone分画が多いことによる。

一方、9 $\alpha$ -fluoroprednisoloneの $^{19}F$ -NMR chemical shiftでは、Fig. 4に示したように、9 $\alpha$ -fluoroprednisolone溶液中にBSAを含まない場合、pHによるchemical shiftの変化は全く見られないのに対し、2g/dl BSAを含む場合、chemical shiftのpH依存性を示した。また、Fig. 5においても、chemical shiftはBSA濃度に依存することを示した。これらFig. 4, Fig. 5に示された9 $\alpha$ -fluoroprednisoloneのBSAとの結合による低磁場側へのchemical shiftの変化は結合によるFとBSAとの直接の相互作用によるのか、結合による9 $\alpha$ -fluoroprednisoloneの立体的分子構造の変化によるのかは明らかではない。

コルチコステロイドとアルブミンの結合について、解離定数 (Kd) とアルブミンの結合部位数 (n) は各々 Kd は  $10^{-4}$  M付近、nは1~20と報告 (2) されている。9 $\alpha$ -fluoroprednisolone (S) とBSA (B) の平衡は  $S+B \rightleftharpoons SB$  と表わされ、

$$Kd = [S][b]/[SB] \dots (1)$$

である。観測される chemical shift

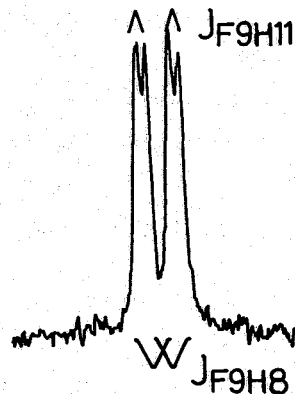


Fig. 2 緩衝溶液 (pH 7.3) 中の9 $\alpha$ -fluoroprednisoloneの $^{19}F$ -NMRスペクトル。2種のcoupling constantを含む。

pH	$H_1/H_2$	chemical shift
in the presence of BSA		
3.9	0.22	1.07
7.3	0.25	4.19
11.2	0.36	4.44
in the absence of BSA		
7.6	0.48	4.22

Table 1  $^{31}P$ -NMRによる9 $\alpha$ -fluoroprednisoloneのPと内部標準Piの共鳴線の高さの比 ( $H_1/H_2$ ) と正リン酸を基準とした chemical shift のpH依存性。

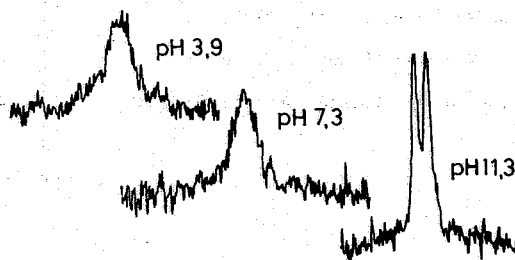


Fig. 3 BSAを含む緩衝液中の9 $\alpha$ -fluoroprednisoloneの $^{19}F$ -NMRスペクトルのpHによる変化。

を $\Delta\omega_{obs}$ , SBのchemical shiftを $\Delta\omega_b$ , SBの分面をfb とすると、

$$\Delta\omega_{obs} = fb\Delta\omega_b \dots\dots\dots (2)$$

S及びBの全濃度を $[S]_0$ ,  $[B]_0$ , Bの結合部位数をnとすると、

$$Kd = \frac{\Delta\omega_b}{\Delta\omega_{obs}} n[B]_0 - [S]_0 \dots\dots\dots (3)$$

Fig. 5から $\Delta\omega_b$  を40Hzとすると、低 [BSA] 領域で、  
 実測値  $[BSA] = [B]_0 = 7.2 \times 10^{-5} M$ ,  $\Delta\omega_{obs} = 7.8$  Hz,  $[S]_0 = 1.94 \times 10^{-3} M$  を (3) 式に代入すると、

$$Kd = 3.7 \times 10^{-4} n - 1.94 \times 10^{-3}$$

Kd のとる範囲を他のステロイドに関する U. Westphal の表 (2) から  $10^{-3} > Kd > 10^{-5}$  とすると  $7.9 > n > 5.3$  となる。

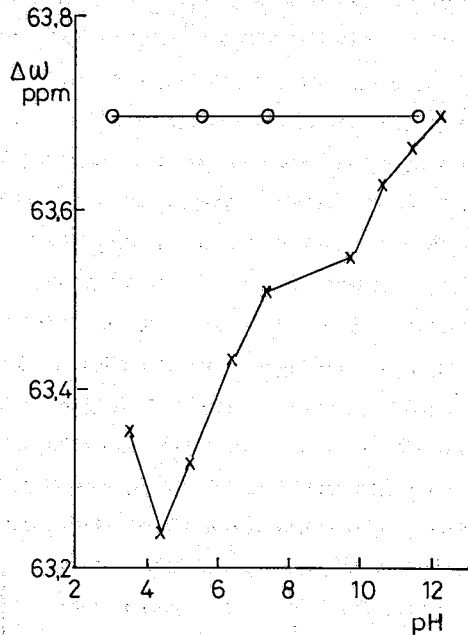


Fig. 4 BSA を含む (X) 及び含まない (O) 緩衝液中の9α-fluoroprednisolone の<sup>19</sup>F-NMR chemical shift (Δω) の pH 依存性。

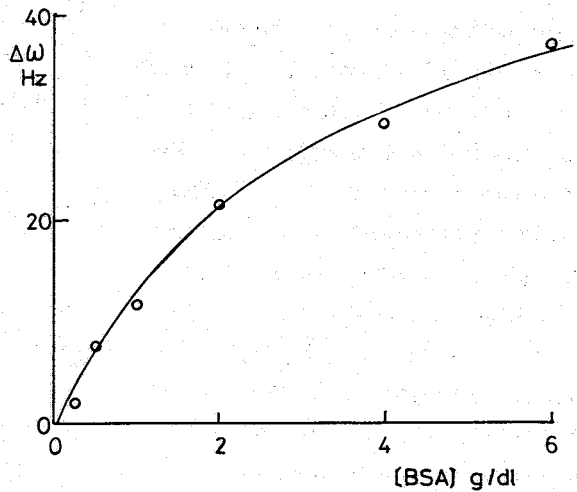


Fig. 5 pH 7.3での9α-fluoroprednisolone (1.94 mM) の<sup>19</sup>F-NMR chemical shift のBSA濃度依存性。

文献

(1) W.L. Duax et al., Recent Progress in Hormon Research, 32, 81, 1976

(2) U. Westphal, "Steroid-Protein Interactions". Springer-Verlag, New York, 1971

## 51. タンパク質の窒素素拮抗。SSIのヒスタジン。

(京大理) °赤坂一之, 井上智子, 波多野博行

タンパク質 *Streptomyces subtilisin inhibitor* (SSI) は113個のアミノ酸より成るサブユニット2個(異二量体)により構成され、1つのサブユニット中には2個の不斉価を His 残基 (His 43, His 106) が含まれる。両者は pK, C<sub>2</sub>70ロトンの窒素素交換速度により互に大きく異なり、それぞれ置かれた環境の違いを示している。しかしながら、<sup>1</sup>H NMR スペクトル上で、両者の C<sub>2</sub>70ロトンの線幅, T<sub>2</sub>, A<sub>1</sub> T<sub>1</sub> 等は (ほとんどの大差を差は認められず、) したがって両者の運動状態を識別することは不可能である。

とそこで 適当な条件を選ぶことにより、この二つの一方の His の C<sub>2</sub>-H を選択的に窒素素置換した SSI (以下、SSI 43D、A<sub>1</sub> T<sub>1</sub> SSI 106D と称す) を得ることができた。これらの試料について、窒素素拮抗を脱した (2D-depleted water) 中で観測したとすると、次の興味ある事実が判明した。

(1) SSI 43D の線幅は、40 mg/ml, pH 7.0, 25°C で 800 Hz 程度あり、これは His 43 が分子に rigid に結合しているといふ Stokes-Einstein の関係式から求めた線幅 (400 Hz) より大きい。このことは His 43 は確かに分子に rigid に結合しており且つタンパク質が若干の aggregation をしていることを示している。(Fig. 1b)。

(2) 一方、同一条件下で SSI 106D の線幅は 30 Hz 以下に過ぎない (Fig. 1a)。この事実は His 106 が SSI 分子全体とは別れ、速い内部運動を行っていると証明するものである。このような事実は <sup>1</sup>H NMR スペクトル上では識別することはできない。

(3) SSI 43D を pH 2.15 で測定するとその線幅は著しく減少し、80 Hz 以下になった (Fig. 1c)。この事実は SSI の酸変性により、His 43 自身も内部運動を維持することを示している。

### 実験

SSI 43D 及び SSI 106D の準備は藤井<sup>1)</sup>の方法により行い、得られた凍結乾燥標品を一度軽水中に溶かして予め labile deuterium atom を持つ C<sub>2</sub>70ロトンを置き換えた後、2D-depleted water (Aldrich) (0.1M NaCl 溶液) に溶かし、pH はリン酸 buffer または NaOH, HCl に調整し <sup>2</sup>D NMR の測定に供した。濃度は 20~40 mg/ml で 4.0 ml を用いた。

<sup>2</sup>D NMR の測定は JEOL GX-400 (61.25 MHz) または Bruker WM-360 (55.28 MHz) にし、通常 inversion recovery 法 (180°-τ-90°-AQ) を、τ = 70-100 msec にして行った。くり返しは 0.2 秒以上の積算回数は 20,000~200,000 程度であった。

文献 1) S. Fujii, K. Akasaka, & H. Hatano, J. Biochem. 88, 789 (1980).

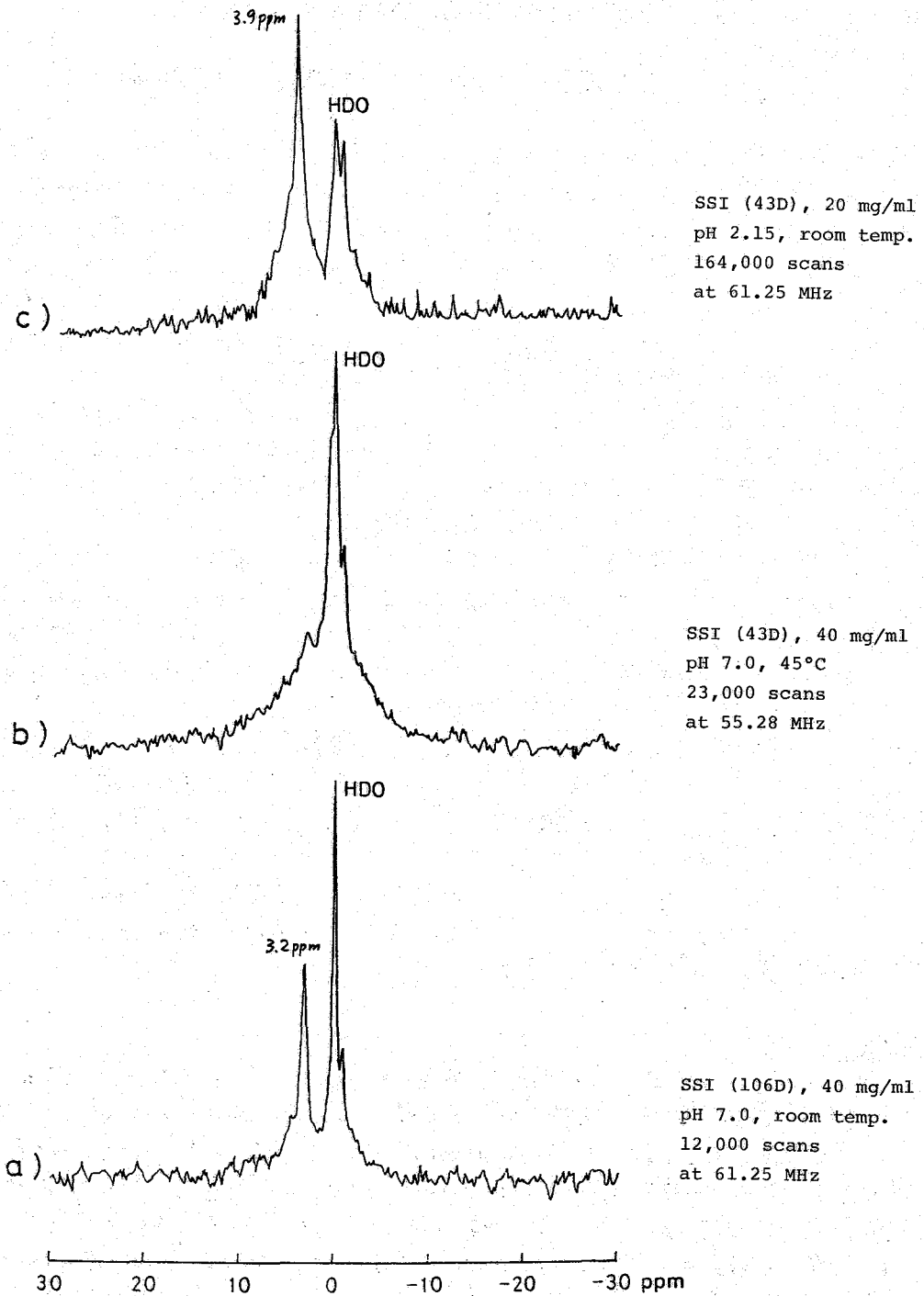


Fig. 1. Deuterium magnetic resonance spectra of SSI(His 43 C2-D) and SSI(His 106 C2-D) in  $^2\text{D}$ -depleted  $\text{H}_2\text{O}$ . Chemical shifts are referenced to the HDO peak.



## 52. 大腸菌リン脂質極性基の特異的重水素ラベルと<sup>2</sup>H-NMRによる解析

阪大蛋白質研,\*国立予防衛生研

吉川 渉, 阿久津 秀雄, 京極 好正,\*赤松 徳

### 1. はじめに

リン脂質の炭化水素鎖は、鎖長や不飽和度により生体膜の流動性を調節していることはよく知られているが、極性基部位の多様性と膜機能との間の明確な関連性は知られていない。我々は、不飽和脂肪酸要求性の大腸菌(*E. coli* K-12 UF A<sup>+</sup>)を用いて、リン脂質組成と相転移挙動との関連等を検討してきた。その中で、この系における極性基構造に関して興味ある事実と見い出した。この菌株は、高温では膜流動性に必須な不飽和脂肪酸合成が停止するので生育できず、高濃度の塩や糖で培地の浸透圧を高めると生育可能となる。この時、不飽和脂肪酸含量が異常に低下だけでなく、極性基部位も特異的にカルジオリピン(図1)が増加し、ホスファチジルグリセロールが減少する。このように極性基構造の変換と膜の浸透圧的安定性との密接な関連があることを見出した。そこで、この系にグリセリン要求性を導入して、極性基部位の特異的重水素ラベルとし、<sup>2</sup>H-NMRによる解析により極性基部位の性質を調べた。とりわけ、二重膜中での性質がほとんど知られていないカルジオリピンについての知見を得ることで報告する。

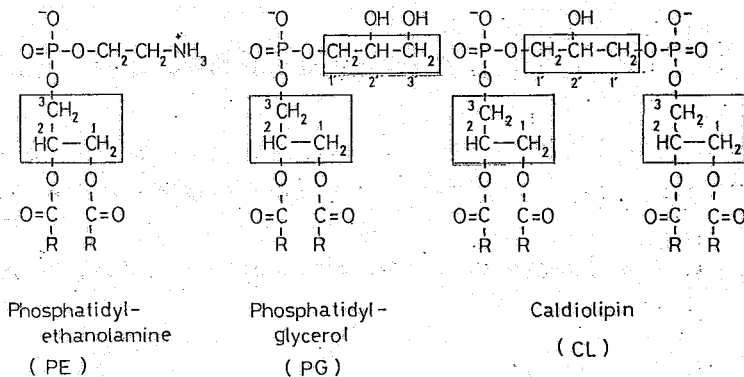


図1. 大腸菌リン脂質。グリセリン部分は4角で囲み、また各炭素の位置と添数字を示した。

### 2. 重水素ラベルの方法

グリセリン要求性の変異株を、<sup>2</sup>H<sub>5</sub>-グリセリンを含む培地で培養して重水素ラベルした。この方法により、リン脂質のグリセリン部分が効率よく特異的に重水素ラベルできる。右に示す、G3Pはすべてのリン脂質の前駆体で、ニヒモアシル化して生合成される。このG3Pの

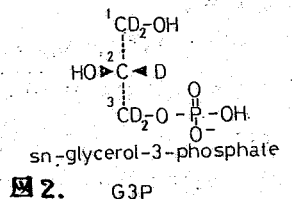


図2. G3P

生合成系路は、2通りあり

(1) 培地にあるグリセリンを取り込み、直接 $\gamma$ -酸化する

(2) 解糖系からくるDHP(dihydroxyacetone phosphate)を酸化して得られる。

グリセリン要求株は、この内反ふ(2)を触媒するG3P合成酵素(EC 1.1.1.8)に欠損をもつ。このため、培地にグリセリンがけいとリン脂質の生合成が停止するが、グリセリン存在下ではリン脂質は、(1)の系路のみで生合成される。

我々は、不飽和脂肪酸要求性変異株(K-12 UFA<sup>ts</sup>)に、このグリセリン要求性を導入して重標素ラベルに用いた。培養条件は、 $42^{\circ}\text{C}$ 、2.0% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(高浸透圧下)で行なった。炭素源として、2.0% カガミ酸を用い、また、0.002%  $^2\text{H}_5$ -グリセリン(98%ラベル、CA社から購入)を加えた。集菌は、late log-phase でした。

抽出精製したリン脂質の、クロロホルム:メタノール(3:2)中での、 $^2\text{H}$ -NMRスペクトルを図3に示す。 $^2\text{H}$ の化学シフト値は、プロトンのそれと同様で、TMSからのシフトを目標とした。\*は、溶媒のシグナルを示す。4.0、及び、5.3 ppm のシグナルは、それぞれリン脂質のグリセリン部位の1,3位、及び、2位のプロトンシフトに対応する。線幅のブロードさは、逆ミセルとして存在するからであるが、その強度比はおおよそ4:1であった。1 ppm付近には、メチル・メチレン由来の小さなシグナルがあるが、これらとの強度の比較からグリセリン部分が特異的に $^2\text{H}$ ラベルされたと結論できる。

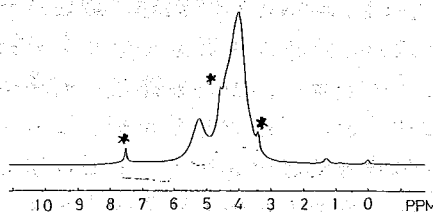


図3. 抽出全リン脂質のクロロホルム:メタノール(3:2)中での、 $^2\text{H}$ -NMRスペクトル。

抽出・精製後のリン脂質組成は、PEが76 mole%、CLが20 mole%、及び、PGが4.0 mole%であった。この組成は、高浸透圧下に培養した時の特徴を示している。

各リン脂質についての重標素化率は、クロロホルム中でのプロトンNMRで解析中である。

### 3. 脂質二重膜の $^2\text{H}$ -NMRの測定

2 mM EDTAを含む、100 mM PIPES (pH 7.2) 緩衝液中で、リン脂質を分散後、遠沈して上澄み液をどのいたものを試料とした。 $^2\text{H}$ 含量は0.2 ppm までおとした水を用いた。

$^2\text{H}$ -NMRは測定は、Bruker WM 360 (55.3 MHz)を用いた。観測幅は、100 kHz、 $90^{\circ}$ - $\tau_1$ - $90^{\circ}$  の四極子エコーパルスシーケンスにやった。

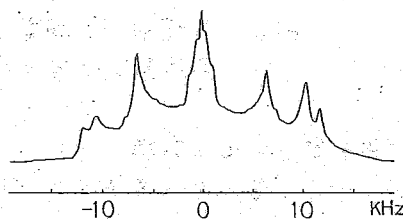


図4. 抽出全リン脂質の二重膜試料の $^2\text{H}$ -NMRスペクトル。測定は $75^{\circ}\text{C}$ 。

#### 4. 結果

抽出リン脂質について、35℃から75℃の間で、<sup>2</sup>H-NMRの測定をした。75℃におけるスペクトルを図4に示す。各温度で分離して観測された四極子分裂のプロットを、図5に示す。熱安定の結果、ゲル相から液晶相への転移は、45℃付近で終めるブロードな転移を示した。この炭化水素鎖の転移に関連した四極子分裂の不連続な変化はみられず。しかし、35℃以下の温度では、<sup>2</sup>H-NMRスペクトルは多数にブロードと分離した四極子分裂は、観測できなかった。

図5に示した各四極子分裂のリン脂質種への帰属をするために、<sup>2</sup>H-ラベルしたPE、及び、CLを分離精製した。また、別にラベルされていないグリセリン中(他の条件は同じ)で培養した菌から、<sup>2</sup>Hラベルしていないリン脂質を抽出し、さらに各リン脂質種へ分離した。つまり、<sup>2</sup>Hラベルしたリン脂質と、ラベルしていないリン脂質とを再配合した試料について、<sup>2</sup>H-NMRを測定した。

図6は、ラベルしたCLを、非ラベルの他のリン脂質と混合した試料の、四極子分裂の温度変化である。図5と図6の比較から、図5の中に示した帰属が可能である。

図7は、40℃での全ラベルのスペクトル(a)と、ラベルPEを含む混合系(b)、ラベルCLを含む混合系(c)のスペクトルの比較である。組成の割合は、PEが76 mole%, CLが20 mole%, 及び、PGが4 mole%であり、(b)と(c)で、全ラベルのスペクトル(a)が説明できようである。ここで興味あるのは、混合リン脂質の系で、CLとPEの<sup>2</sup>H-スペクトルの線幅に差が見られ、配向度もしくは運動性において両者に違いが示唆された事である。

図5に示す様に、0 KHz付近のシグナルは、高温でないと四極子分裂が観測されないが、高温の再配合試料で等方的な相があらわれ明確な帰属はできていない。しかし、この0 KHz付近には、PGの極性基末端、及び、各リン脂質のグリセリン骨格の1(5)位の<sup>2</sup>Hからの寄与があると思われる。

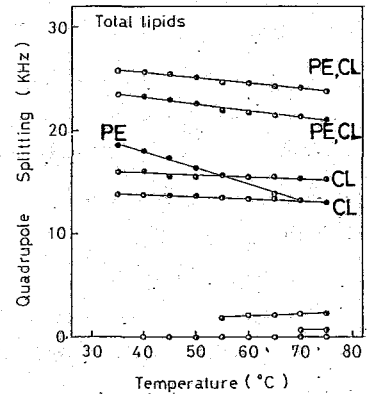


図5. 四極子分裂の温度変化

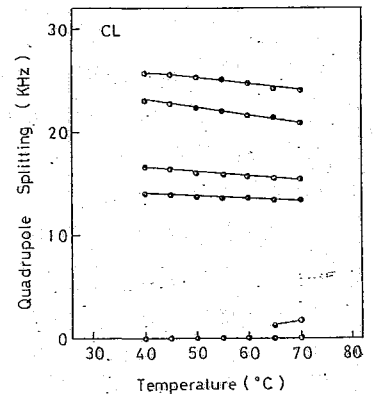


図6. ラベルしたCLを含む混合系での四極子分裂の温度変化

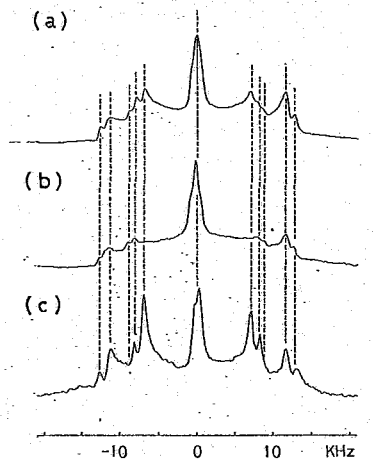


図7. 全ラベル(a), ラベルPEを含む混合系(b), 及びラベルCLを含む混合系(c)試料の40℃でのスペクトルの比較。

## 5. 考察

生体系におけるリン脂質二重膜は、多様な分枝種からなる。ニから混合系でのリン脂質の性質を調べるため、 $^2\text{H}$ -NMRの方法を適用した。精製したPEは、相転移温度以上で、二重膜構造(ラメラ)からヘキサゴンルやアイソトロピックといった非二重膜構造へ変化する。またCLは、単独では水和性がよく分散しない。しかし、抽出全リン脂質では、高温で安定な二重膜構造をとる。ラベル及び非ラベルのリン脂質を全リン脂質分画と同じ組成に再配合して、各リン脂質種の二重膜中での性質を調べることにできた。

$^2\text{H}$ -NMRで得られる四極子分裂の値は、C-Dボンドのオーダー・パラメーター  $S_{CD}$  と直接結びつけられる。 
$$\Delta\nu = \frac{3}{4} \frac{e^2qQ}{h} S_{CD} = \frac{3}{4} \frac{e^2qQ}{h} \frac{(3\cos^2\theta - 1)}{2}$$

$\theta$  は、C-Dボンドとリン脂質分子の回転軸のなす角度である。このため、四極子分裂の値は、配向度と運動性の2つの因子で支配され、ただちに構造を議論できず。しかし、リン脂質のグリセリン骨格部分は、有機溶媒中(逆ミセル)でも比較的似た構造が保たれ、この部分由来の四極子分裂は構造をよく反映すると期待される。

グリセリン骨格のC(2)-C(3)ボンドは、PEやPCの単結晶構造から、回転軸とはほぼ平行であると予想された。ニは、二重膜中でもこの位置の3個の $^2\text{H}$ が、すべて同様の四極子分裂の値(すまぎすのリン脂質で、22から28 kHzの間の値)をとる事から意図づけられた。我々の系でも、25と23 kHz付近の四極子分裂があり、その値と温度依存性にはCLとPEで差だけ認められなかった。

グリセリン骨格のC(1)位の2個の $^2\text{H}$ (IRとIS)は、それぞれ15,及び0 kHz付近に異なる四極子分裂をあたえることが知られている。この系では、PEの18から13 kHzにかけて温度変化する四極子分裂と、CLでの16 kHz付近の分裂がこのIRの $^2\text{H}$ に、それぞれ対応すると考えられる。またISについては、PEとCLへの帰属がはきり(でないが)、全ラベル系で高温で分離する2種以上の小さな四極子分裂があった。

ニから骨格グリセリン由来と思われる四極子分裂以外に、CLでは13 kHz付近にきわめて複雑の大きい四極子分裂がある。その複雑から、架橋部分の1'位の4個の $^2\text{H}$ が等価な四極子分裂をあたえていいると思われ、ニが事実ならCLの極性基構造を検討する上で重要な情報となる。また架橋部分の2'位の $^2\text{H}$ も、同じくこの分裂が、また0 kHz付近の小さな分裂のどちらかに帰属される。

以上、混合系におけるPEとCLとで、グリセリン骨格のC(1)位の $^2\text{H}$ について、四極子分裂の値、及び、温度依存性に違いが示された。Gallyらが調べた、PEとPCの4の系では、この様な差は報告されていないが、また、その挙動は我々の系のPEのそれと類似している。CLでの温度依存性の小さいのは、1分子中に4本の炭化水素鎖があり、それらが二重膜中では平行となるため、このC(1)位での自由度が束縛されるのかもしれない。

### 53. 高配向DNA固体<sup>31</sup>P NMRの線形解析と分子運動

(東葉大, 阪大タンパク研) ° 神藤平三郎, 松本 潮,  
\* 藤原敏道, \* 阿久津秀雄

#### はじめに

デオキシリボ核酸(DNA)はタンパク質などのように自己の一部を他の部分と明確に区別できるような特異的構造を持たない。このことが今日の課題である。タンパク質によるDNAの特異的認識に関する研究を困難にしている理由である。この特異的認識に重要であるかどうかは別にして、最近の研究によれば、DNAの構造は塩基配列や存在環境のちがいにより変化することが分ってきた。さらにDNAの局所的な運動もまた“Induced fit”の認識機構として注目を集めている。本報において、<sup>31</sup>P固体NMRによるこれらの課題へのアプローチの試みと、得られるスペクトルの解析法について述べる。

#### 実験方法

市販のサケ精子DNAの適当な濃度のLiCl またはNaCl 溶液から高配向DNA fiberを調製した。数本のfiberを平行にゴニオメータに取付け、一定の湿度雰囲気下で一昼夜放置したのち、NMR測定に供した。測定にはFX-200(JEOL)固体NMR装置を用い、CPDD条件下で種々の相対湿度(70%)下 22°Cで、ゴニオメータの角度0°, 45°, 90°の三点についてスペクトルを得た。

#### 一軸配向試料のスペクトルパターンの解析

試料中のある一つの核が与えるピークの位置は、この核の化学シフトテンソルの主軸座標系から実験座標系への座標変換によって次式で表れる。

$$\sigma_{20}^{obs.} = \sum_{n,m} D_{m0}^{(2)}(\Omega_2) D_{nm}^{(2)}(\Omega_1) \rho_{2n}^{(2)} \quad (1)$$

ここで $D_{nm}^{(2)}(\Omega)$ は $l=2$ のWignerの回転行列で、 $\rho_{2n}^{(2)}$ は異約結合テンソルである。一軸配向試料では、 $\Omega$ は次の座標変換によって定義されるオイラ角である。

$$\text{主軸座標系} \xrightarrow{\Omega_1(\alpha, \beta, \gamma)} \text{配向軸座標系} \xrightarrow{\Omega_2(\theta, \phi, \psi)} \text{実験座標系}$$

分子運動がなく、完全配向のとき、与えられた $\phi$ に対するスペクトルは軸の回りの角 $\theta$ の全ての角度についての重ね合せである。実際には、いくつかの因子、(1)磁場不均一性、(2)分子配向の不完全性、(3) $\alpha, \beta$ の分布、(4)分子運動の存在などを考慮して、実測スペクトルを再現できる。因子の(1)と(2)においてガウス分布を仮定してもよく、(1)はconvolution積分により、(2)は各 $\phi$ に対するスペクトルにガウス分布の重みをつけて、加算することで処理できる。 $\alpha, \beta$ の分布はガウス分布である先見の理由はない。因子(4)による効果は運動モードや運動速度に大きく影響される。

運動が十分に速い場合には次のような座標変換

主軸座標系  $\xrightarrow{\Omega_1}$  分子運動座標系  $\xrightarrow{\Omega_2}$  配向座標系  $\xrightarrow{\Omega_3}$  実験座標系  
 を行い、ピークの位置は時間平均  $\langle \rangle$  を含む次式によって与えられる。

$$\sigma_{zo}^{obs} = \sum_{p, n, m} D_{p0}^{(2)}(\Omega_3) \langle D_{mp}^{(2)}(\Omega_2) \rangle D_{nm}^{(2)}(\Omega_1) \rho_{2n}^{(2)} \quad (2)$$

DNA試料においては、状況に応じて三つの運動モードを考慮しなければならない。局所的な速い運動、ラセン軸の回りの再配向回転、fiber軸の回りの wobbling または屈曲運動。以上がスペクトル解析の基礎であるが、多数の未知パラメータの意味の有意性及び計算時間の制約のために、今回は実測スペクトルの挙動の本質を説明するにとどめる。

### 結果と考察

DNA fiberは塩の種類や濃度や r.h.によって種々の構造、A型、B型、C型などをとる。NaDNAは低い r.h.でA型であるが、r.h.の上昇とともに、85%付近でA→B型への構造転移がみられる(図1)。他方、LiDNAは60%以上の任意の r.h.でNaDNAのような構造変化はみられない。r.h.が89%以上では、NaとLi DNAともB型でスペクトル上の差はみとめられない。これらはX線 fiber 回折写真からも明らかである。

1. A型DNA: 図2の左側に配向試料特有のスペクトル、fiber軸が磁場と平行( $\phi=0^\circ$ )のとき1本線、直角( $\phi=90^\circ$ )のとき2重線がみられる。45°のスペクトルは中央の強いピークで特徴づけられる。図2の右側のスペクトルはオイラー角、 $\alpha, \beta$ を実測のピーク位置に合うように選んで、不完全配向の標準偏差 $\langle \phi \rangle = 12^\circ$ として計算されたスペクトルで、実測スペクトルを十分に再現している。それ故、A型DNAは塩基配列がランダムであるにもかかわらず、単一構造しかとり得ないことが示唆される。

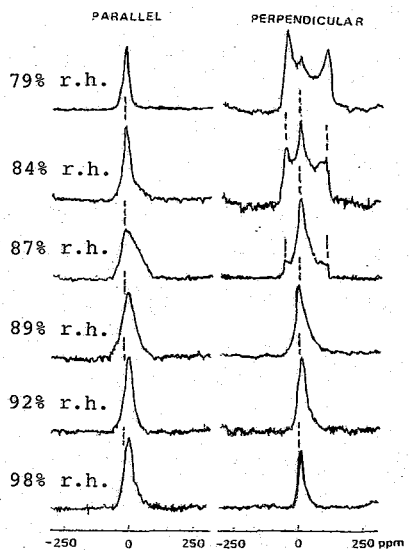


図1. DNA fiberの固体の $^{31}\text{P}$ NMRの相対強度依存性

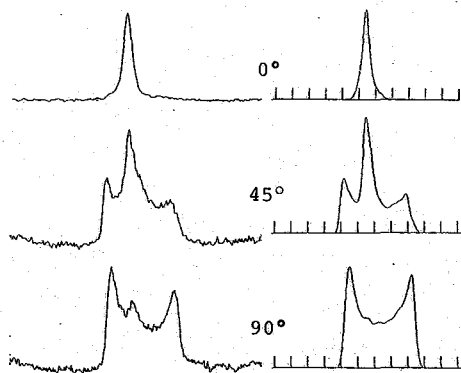


図2. A型DNA fiberの固体の $^{31}\text{P}$ NMRの実測スペクトルと計算スペクトル

2. B型 DNA: NaDNAのB型は高いr.h.下でのみ存在するが、かなり激しい分子運動のため、平均化された構造のスペクトルしか観測されない。他方、LiDNAにはA $\leftrightarrow$ B転移は起らないから、r.h.を下げることによって運動の凍結したB型が得られる。図3の左側のスペクトルはr.h. 66%でのもので、A型のそれ(図2)と比べて著しく異っている。即ち、平行スペクトルに關しA型では鋭い本線であるのに対して、B型ではスペクトルは-70~60ppmにわたる広い分布を示す。明らかにB型には、種々の異なる構造が存在する。直角スペクトルに關してA型では二重線であるのに対して、B型では中心で鋭く、左右に長いスズを持つ非対称なスペクトルである。これらの結果はB型DNAの骨格構造は極めて不規則であること、即ちDNA鎖中のリン酸基の向き、 $\alpha, \beta$ が広い分布をもつことを意味する。どのような分布であるか明らかでないが、平行スペクトルから分るように二つの構造群のあることが予測される。

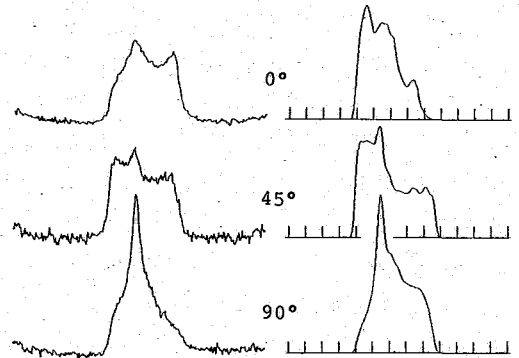


図3. B型DNAの固体の $^{31}\text{P}$ NMRの実測りスペクトルと計算スペクトル

最近 Dickerson らは 12量体のDNAの単結晶構造を決定し、それぞれの塩基残基のコンホメーションはかなり広い範囲で異なっていることを示した。この12量体の構造を用いて計算したスペクトルがどのようなパターンとなるか興味ある。2種の12量体構造から計算された個々の残基の $\alpha, \beta$ を図4にプロットした。

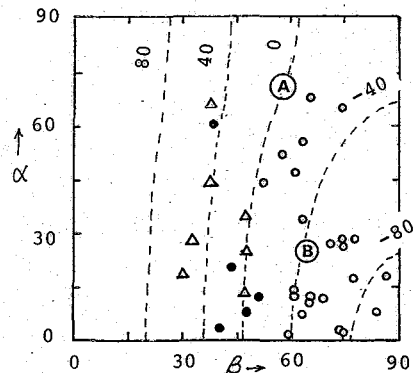


図4. 12量体合成DNAの単結晶構造から計算されたオイラー角度。

図の点線は化学シフトの等高線を示しており、 $\alpha$ は $0^\circ \sim 70^\circ$ の間に、 $\beta$ は $30^\circ \sim 90^\circ$ の範囲に分布している。一般的傾向として、 $(\alpha, \beta) = (0, 90^\circ)$ で最も低磁場側のシフトを与え、 $\beta$ が小さくなるにつれて高磁場シフトを与える。点AはA型DNAの実測値に、点Bは全ての点の平均値に対応する。点 $\Delta$ はBI構造に、点 $\bullet$ は大きいラセン回転角をもつリン酸基に対応しており、これらの構造に属するリン酸基のピークは高磁場側に現われるはずである。これら多数の $\alpha, \beta$ を用いて計算したスペクトル線の重ね合せが図4の右側のスペクトルパターンである。計算には、不完全配向の標準偏差 $\langle \phi \rangle = 12^\circ$ , 3ppmのconvolution積分を用いた。実測値との一致は、勿論、十分だとはいえないが、実測スペクトルの特徴は示されている。コンホメーションの分布の形は天然のDNAと12量体とは多少異なっているものと推察される。

### 3. 速い運動がある場合:

図1で示したように、r.h.が高くなって87%になったとき、平行スペクトルの幅はせまくなり、直角スペクトルは2重線から1本線に変化する。明らかに分子運動が関与している。我々は、この運動はラセン軸の回りの回転であることを既に示した。もしこの回転が十分に速ければ、直角スペクトルの幅は平行スペクトルの半分となることが理論的に予測される。事実、98% r.h.のスペクトルではそうになっている。図5に92% r.h.でのスペクトルを示したが、ゴニオメータの角度が0または90°以外のスペクトルの形は、この単純な自由回転モデルから説明できない。

なぜなら自由回転であるなら、45°スペクトルもまた1本線であるはずであるが、実測のパターンは二重線である。これは自由回転モデルがこの場合あてはまらないことを示している。92%、98% r.h.でのスペクトルを統一的に説明するために、fiber内のDNAの分子運動をある振幅(角度範囲)を持つラセン軸の回りの再配向回転運動に近似してみよう。この再配向運動はある振幅角度内で十分に速いと仮定する。このモデルは式(2)の  $D_{mp}^{(2)}(\Delta\alpha)$  を  $D_{mp}^{(2)}(\delta, 0, 0)$  とし、この項の時間平均を  $\delta$  について  $\pm\Delta\delta$  の範囲でとることと等価である。実際の計算では  $\Delta\delta$  の分布、不完全配向分布およびリン酸基のオイラー角  $\alpha, \beta$  の分布を考慮しなければならない。図5の右側のスペクトルは、分布の標準偏差をそれぞれ  $\langle\Delta\delta\rangle=140^\circ$ ,  $\langle\alpha\rangle=0^\circ$ ,  $\langle\alpha\rangle=10^\circ$ ,  $\langle\beta\rangle=5^\circ$  と仮定して計算したものである。計算スペクトルは、実際のスペクトルを良く再現しているといえる。即ち、45°スペクトルは低磁場側のピーク強度の大きい2重線になっている。そして67.5°スペクトルでは低磁場側の強度が大きくなっている。さらに平行および直角スペクトルの幅は実測通り互いにほぼ等しい。98% r.h.のスペクトルは  $\langle\Delta\delta\rangle$  の値を大きくすることによって同様に説明できる。

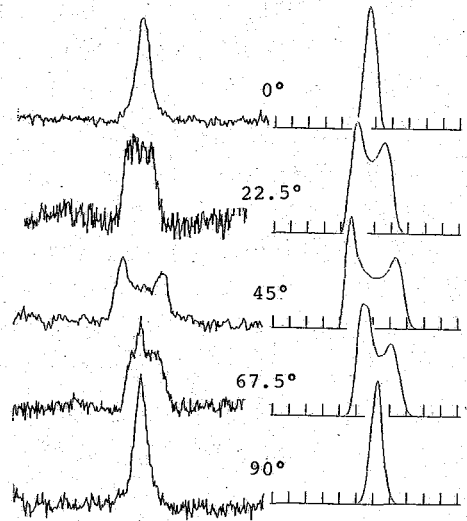


図5. 92% 相対湿度の固体<sup>31</sup>P NMRスペクトルのゴニオメータ角度依存性。左側: 実測, 右側: 計算スペクトル

既に報告したように、高いr.h.ではDNAの運動は三つのモード、速いtwo-site jump, ラセン軸の回りの自由回転, およびラセン軸のWobblingまたはbending運動によって記述できることを示した。速いtwo-site jump運動はDNA内の局所的構造変化を近似したもので、低いr.h.のスペクトルパターンに鋭敏に反映するはずである。平行スペクトルはラセン軸の回りの純粋な回転または再配向運動には影響されないことを考慮すれば、66% r.h.での幅広いスペクトルから92% r.h.のその幅の狭化には速い局所的な構造変化が関与しているものと結論できる。

しんぞうへいさぶろう まつもとこうじお あくつひでお ふじのら としむち



54. 光合成細菌クロマトホアの固体および溶液における

<sup>13</sup>C NMR スペクトル

(東北大学非水研, 東大理<sup>+</sup>, 都立大理<sup>++</sup>)

○野沢審則, 西村充司, 鐘野昌弘, 林秀則<sup>+</sup>, 嶋田敬三<sup>++</sup>

1) 序

光合成とは光のエネルギーをカロチノイド, クロロフィルなどの色素(光化学系色素)を用いて捕足し還元力をつくり, 生じた還元力を利用してCO<sub>2</sub>の固定を行なう反応である。自然界で光合成を行なう生物は緑色植物と光合成細菌に分けられるが, 両者の光合成のメカニズムは共通点が多い。緑色植物では光合成器官として葉緑体があるが, 光合成細菌では菌体内の胞状顆粒がこれにあたる。(図1A) 細胞を音波処理などで破壊すればクロマトホアと呼ばれる直径約600Åの光合成器官を含んだ顆粒が得られる。しかし必ずしも胞状ではなく *Rhodospseudomonas palustris* のようにラメラ構造を持つ種も多い。(図1B) しかし, いずれも細胞膜起源性のものであり, ラメラ構造をもつ光合成細菌でも細胞を破壊しとり出せば直径600~1000Å程度のクロマトホアが得られる。クロマトホアの化学組成の一例を表1に示した。光合成細菌の光合成色素としてバクテリオクロロフィル(BChl) α, β, γ, δ, εが知られているが, α型の構造を図2に示した。BChl αはほぼすべての光合成細菌に含まれているが光化学反応を行なう反応中心BRCにのみ存在するものとして知られている。他の大部分のBChlは集光型(アンテナ型)として働く。光合成細菌のクロマトホアには反応中心BChl-タンパク複合体のほかに集光型BChl-タンパク複合体が多く存在する。本研究で主として用いた紅色イオウ細菌(*Chromatium vinosum*), 紅色無イオウ細菌(*Rhodospseudomonas palustris*) では界面活性剤 SDS (sodium dodecyl sulfate), Triton X-1000 (p-t-octylphenyl polyoxyethylene ether), Deoxycholate 等の作用により 870, 850, 800 nm に吸収極大を持つ集合型 BChl-タンパク複合体が得られ B 870, B 850, B 800 と呼ばれる。光合成細菌は光のエネルギーをこれらアンテナ BChl で捕え, これらを効率よくアンテナ BChl 間で伝達し最終的に反応中心 BChl へと導いている。このようなエネルギー移動が効率よくクロマトホア膜中で行なわれることに関連してその構成要素間の膜中での立体構造関係, およびそれらの運動性に興味が集まっている。我々は吸収スペクトル,

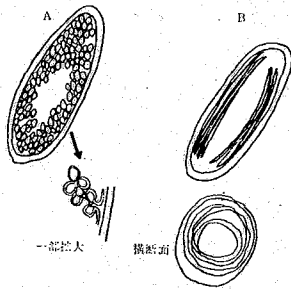


図1 光合成器官の模式図

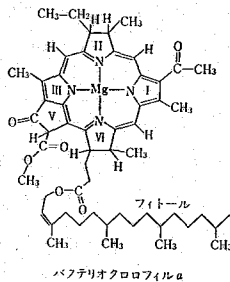


図2 BChl a

表1

クロマトホアの化学組成(乾燥重量%)

	<i>Chr. vinosum</i>	<i>Rp. palustris</i>
タンパク	27.0	63.0
脂質	67.0	30.0
BChl	8.3	5.9
カロチノイド	1.3	1.9
炭水化物	0.3	0.64

のざわつねのり, に1毛らまつし, 尻たのまきひろ, はやしひてあり, しまだ けいぞう

円偏光二色性スペクトルを用いて集光型 BChl-タンパク複合体の吸収スペクトルの持異な長波長シフトの構造化学的要因の研究を行なっているが、本研究は $^{13}\text{C}$ および $^{31}\text{P}$  NMR を用いて光合成細菌クロマトホアの膜上およびその構成物質の動的構造を明らかにすることを目的とする。

## 2) 実験

光合成細菌のクロマトホアの調整ならびに集光型 BChl-タンパクの精製は既に発表<sup>1-3)</sup>した。 $^{13}\text{C}$  をエンリッチしたクロマトホアは *Chromatium vinosum* について培地の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を  $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$  にして培養した菌から調整した。溶媒は  $\text{D}_2\text{O}$  を用いて調整した Tris Buffer (1mM ~ 10mM) に TGA (Thioglycolic acid) (1mM ~ 10mM) を添加したものをを用いた。NMR は Bruker CXP 300 FT NMR 分光計を用い、専用の BB Probe (125 ~ 30 MHz), および CP/MAS Probe (Z32 PE/MAS) を用いて測定した。固体高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR の測定に際しては、次のが閉塞したテフロンコーティングをした BN<sub>3</sub> のセプターを用い、1000 ~ 4000 Hz の MAS 下で測定した。測定は通常の溶液に対する BB Decoupling の測定と、BB Decoupling MAS の測定と、HP Decoupling CP/MAS の測定を行なった。

## 3) 結果

光合成細菌のクロマトホアで BChl-タンパク複合体はリン脂質の膜中(あるいは膜上)に存在する。 $^{13}\text{C}$ -*Chromatium vinosum* のクロマトホアは  $\text{D}_2\text{O}$  Buffer 中の 2 ~ 4 W の BB Decoupling のもとで測定すると図 3 に示した  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを与えた。この  $^{13}\text{C}$  NMR はリン脂質のみの NMR との比較により総てリン脂質のみのもので帰属された。図 3 の状態に Triton X-100 および SDS を添加したときの  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルをそれぞれ図 4 および図 5 に与えた。注目されることはリン脂質に帰属された各  $^{13}\text{C}$  NMR の先鋭化であり、特に少量の Triton X-100 の添加効果は SDS のそれと比較し著しく、注目された。また、これらの試料に Triton X-100, SDS を充分添加してもやはりスペクトルの変化はみられず、BChl およびタンパクに依存するシグナルは溶液状態の測定では検出できなかった。また、B 800-850 nm  $\text{D}_2\text{O}$  Buffer 中では Triton X-100, SDS 存在下においても BChl ならびにタンパクに依存する  $^{13}\text{C}$  NMR は与えられた。

クロマトホアをその主 BN<sub>3</sub> セプターに入れ、1000 Hz の MAS 下で測定した場合も BB Decoupling の条件のもとでは  $\text{D}_2\text{O}$  Buffer 中のものと類似したリン脂質由来の  $^{13}\text{C}$  NMR のみを示した。一方、この膜を HP/CP/MAS の条件で測定 (Spin = ~1000 Hz) した場合にはタンパクならびに BChl によると思われるブロードな  $^{13}\text{C}$  NMR を与えた。また、*Chromatium vinosum* および *Rhodospseudomonas palustris* のクロマトホアを凍結乾燥し固体状態とし、これを充分な回転 (Spin = ~4000 Hz) のもとで HP/CP/MAS の測定を行なって得られた  $^{13}\text{C}$  NMR をそれぞれ図 6 と図 7 に与えた。リン脂質由来の  $^{13}\text{C}$  NMR シグナルの他に、タンパクおよび BChl 由来の  $^{13}\text{C}$  NMR が観測されている。B 800-850 BChl-タンパクの凍結乾燥物の同様の測定結果を図 8 に与えた。この中にはリン脂質はほとんど含まれておらず、図 8 の  $^{13}\text{C}$  NMR はタンパクと BChl 由来のものである。

Fig. 3  $^{13}\text{C}$ -*Chr. vinosum*, HR/BB

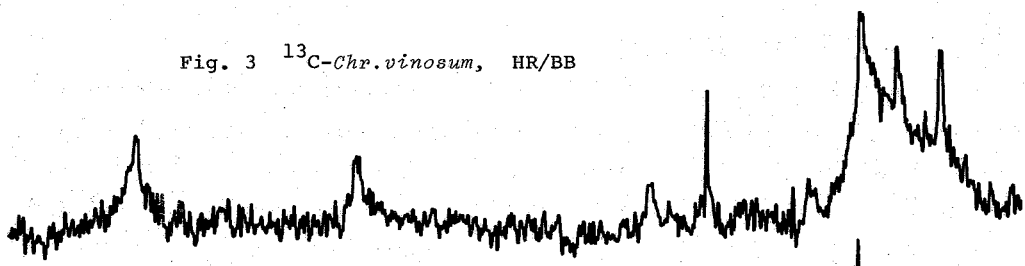


Fig. 4  $^{13}\text{C}$ -*Chr. vinosum*, HR/BB  
with 0.5% Triton-X 100

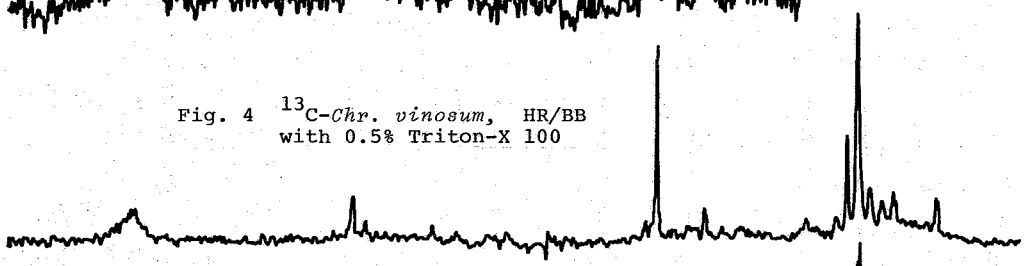


Fig. 5  $^{13}\text{C}$ -*Chr. vinosum*, HR/BB  
with 0.5% SDS

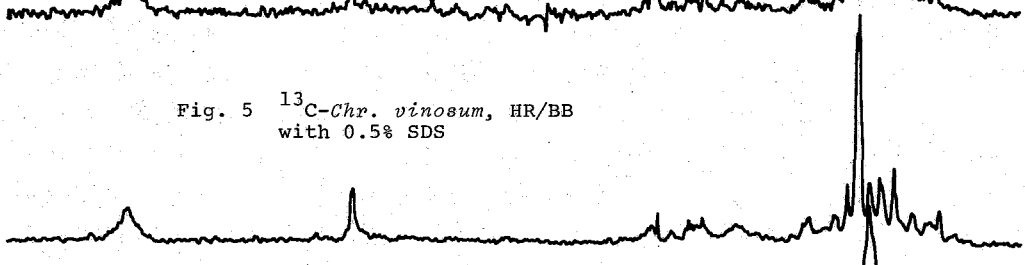


Fig. 6 *Chr. vinosum* Chromatophore, HP/CP/MAS

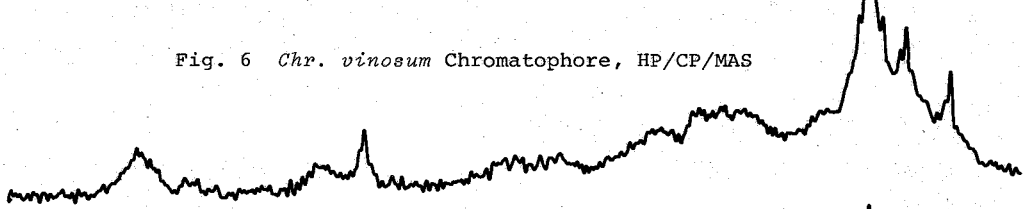


Fig. 7 *Rp. palustris* Chromatophore, HP/CP/MAS

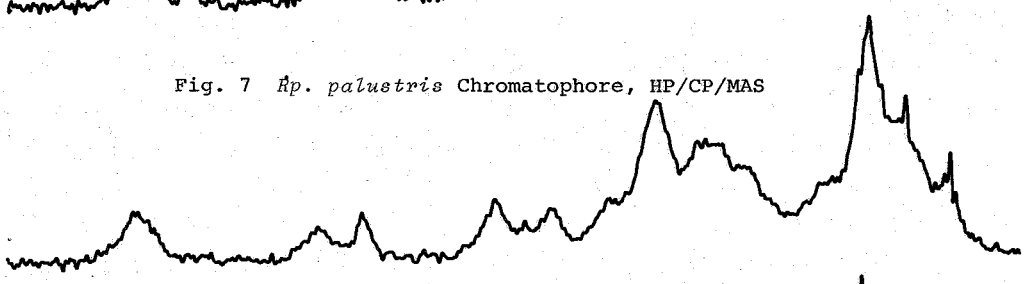
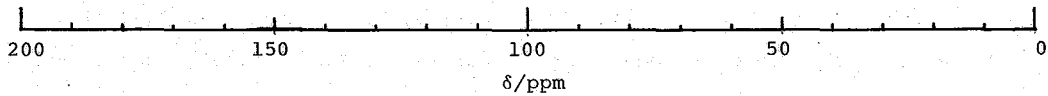
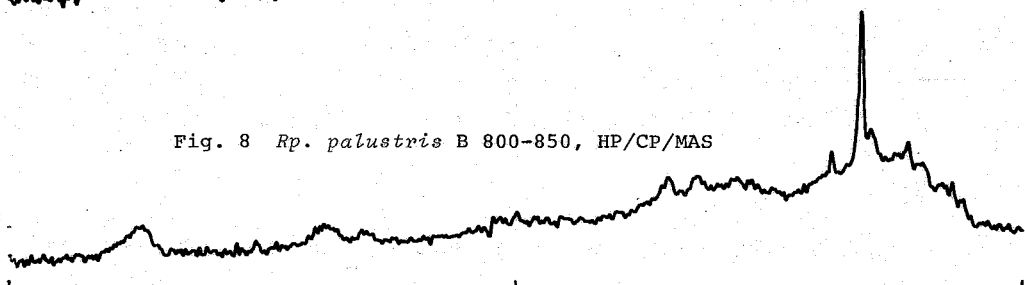


Fig. 8 *Rp. palustris* B 800-850, HP/CP/MAS



#### 4) 考察

##### (1) フロマトホア膜の動的構造

*Chromatium viridum* のフロマトホア膜は Phosphatidylethanolamine (PE) Phosphatidylglycerol (PG) からなり, *Rhodospseudomonas palustris* ではこれらと Phosphatidylcholine (PC) と Cardiolipin (CL) とからなる。これらのリン脂質は Intact のフロマトホア膜では幅広い  $^{13}\text{C}$  NMR を与えている。(図3) 界面活性剤を添加すると急激に線幅はせばまる。一方, Inversion Recovery FT法から求めた  $T_1$  値は (Intact な状態での  $\sim 400\text{ms}$ ) は界面活性剤の添加によ、多少増加するのみであった。良く知られているようにリン脂質膜の  $^{13}\text{C}$  NMR の縦緩和時間  $T_1$  はリン脂質の軸に並行なゆるい運動により決定され、一方、横緩和時間  $T_2$  (あるいは線幅) はそれとは垂直なゆるくりとした運動により決定される。したがって、フロマトホア膜中のリン脂質の軸方向の運動は Intact な状態においても界面活性剤添加時とはほぼ等しい運動性を持っていることがわかる。一方、リン脂質の軸に垂直方向の運動性は Intact の状態ではかなり制限されており、界面活性剤添加によって初めてその運動性が高くなることがわかった。この際、極く低濃度 (0.05%) の Triton X-100 がリン脂質の軸に垂直な運動性を高めることは注目される。Triton X-100 が BChl-タンパク複合体と強く相互作用することを考えると Intact なフロマトホア膜の運動性は BChl-タンパク複合体の存在によって規制されていると言えよう。逆に見れば、BChl-タンパク複合体は Intact な状態においては一部で考えられているように自由にリン脂質の膜を移動していることはなさそうである。

##### (2) BChl-タンパク複合体の動的構造

BChl-タンパク複合体のタンパクおよび BChl II 通常の溶液 NMR 法ではたとえ界面活性剤の存在下においても  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを与えなかった。この事実は今回用いた界面活性剤および実験条件下では BChl とタンパクとの結合は保たれ、また、この状態でのタンパクはかなりの運動性の乏しい状態にあることを示している。HP/CP/MAS 法による凍結乾燥状態ではあるがリン脂質をほとんど含まない BChl-タンパク複合体 (B800-850) の  $^{13}\text{C}$  NMR が観測された。(図8) 凍結乾燥下ではフロマトホアの HP/CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR にはリン脂質による  $^{13}\text{C}$  NMR が支配的であるが (図6, 図7), Intact なフロマトホアの HP/CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルでは BChl II のタンパクからの  $^{13}\text{C}$  NMR が支配的となる。このことも Intact なフロマトホア膜においては BChl-タンパクが固體状態の運動性を示していると考えられ、上述の考えと一致する。

#### 5) 文献

- 1) T. Miyazaki, S. Morita, M. Hatano and T. Nozawa, *J. Biochem.*, **86**, 1411 (1979)
- 2) H. Hayashi, T. Nozawa, M. Hatano and S. Morita, *J. Biochem.*, **89**, 1853 (1981)
- 3) H. Hayashi, T. Nozawa, M. Hatano and S. Morita, *J. Biochem.*, **91**, 1029 (1982)

第 3 日

11 月 16 日 (水)



## 55. ポリペプチド，蛋白質のC-13 CP-MAS NMRスペクトル．

コンホメーション依存C-13シフトの実験的意義

(国立がんセンター研，群馬大工短<sup>†</sup>，東工大<sup>§</sup>)

斉藤 肇，多部田涼子，荘司 顯<sup>†</sup>，尾崎拓男<sup>†</sup>，安藤 勲<sup>§</sup>

ポリペプチド，蛋白質の各アミノ酸残基のC-13シフトは，ランダムコイルあるいは変性状態では，そのシーケンスによらず一定の値をあたえる．このことは，高次構造をとるときのC-13シフト変化は，問題とする残基の局所的なコンホメーションにより引き起こされている可能性を示唆している<sup>1-8</sup>．われわれの観点は，このようにコンホメーションの変化によって生じるC-13シフト(コンホメーション依存C-13シフト)が各残基の二面体角( $\phi$ ,  $\psi$ )および水素結合状態に関係づけられ，C-13シフト値を内在的プローブとしてそれぞれの残基の位置でのコンホメーションを知る手がかりを与えると考える．この考えが正しいかどうかを検証するためには，分子のゆらぎによるC-13シフトの平均化をうけない固体状態で，かつ種々の異なったコンホメーションをとるポリペプチド，蛋白質の結晶多形のC-13シフトを測定し，X線回折，IRスペクトルなどで調べられている高次構造との対応を調べるのがよい．さらに，C-13シフトの理論計算と比較し，実験データとの対応を調べる(後者のアプローチは，20で安藤が報告する)<sup>5</sup>．

本報告では，種々のポリペプチドで特定の残基のC-13シフトがコンホメーションによってどのように変化し得るかを例示し，コラーゲンなどの蛋白質構造の研究への応用の可能性を例示する．

### <実験方法>

C-13 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で行った．ホモポリペプチドは，市販品を用い，シーケンスポリペプチドは，当研究室で合成したものをを用いた．化学シフトの基準はTMSからのppmで表示してある．

### <結果と考察>

#### A. ポリ( $\beta$ -ベンジル-L-アスパルテート) (Asp(OBzl))<sub>n</sub><sup>4</sup>

(Asp(OBzl))<sub>n</sub>は，試料調製の条件によって，右巻き $\alpha$ -ヘリックス，左巻き $\alpha$ -ヘリックス， $\omega$ -ヘリックス， $\beta$ -シートの4種類の結晶多形(コンホメーション)がある．これらのコンホメーションは図1に示す二面体角をとる．同一分子で上記に示すコンホメーションに応じてC-13シフトが大きく変化すれば，コンホメーション依存シフトの存在の直接的な証拠になる．図2に示すC-13 CP-MAS NMRスペクトルから，上記の4種類に対応して化学シフトが大きく変化することがわかる．ただし，左巻き $\alpha$ -ヘリックスと $\omega$ -ヘリックスは，二面体角の値が接近しているため，シフト変化が比較的小さい．C-13シフト値は，C $\alpha$ ，C=Oでは $\alpha$ -ヘリックスの方が $\beta$ -シートよりも低磁場(それぞれ4.2，5.3 ppm)であるのに対し，C $\beta$ では $\alpha$ -ヘリックスの方が逆に高磁

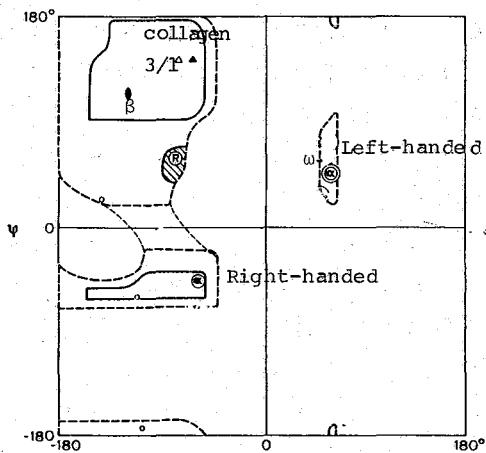


Fig. 1. Conformational map

場 (4.4 ppm) に出現する。これは、種々のポリペプチドに共通する一般的な性質である。さらに、右巻きと左巻きの $\alpha$ -ヘリックスを比較すると、右巻きの方が $C\alpha$ 、 $C=O$ でそれぞれ2.5, 3.8 ppm 低磁場にシフトしているのに対し、 $C\beta$ はほとんど変化しない。同様の傾向はL-, D-アラニン共重合体にも出現する左巻き $\alpha$ -ヘリックスにもみられ、右巻き-, 左巻き- $\alpha$ -ヘリックスを区別する一般的傾向といえる。<sup>2,5</sup>

**B. ポリアラニンおよびアラニンを含むシ-ケンスポリペプチド**<sup>2,7,8</sup>

Alaは蛋白質の最も基本的な構成単位の一つである。Ala残基からみた $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート構造のC-13シフトのreference dataとして種々の重合度のポリアラニン(Ala)<sub>n</sub>

を使用することができる。さらに、コラーゲン様3/1ヘリックスや三重ヘリックスのreferenceとして、(Ala-Gly-Gly)<sub>n</sub>、(Pro-Ala-Gly)<sub>n</sub>を、また絹フィブロインのreferenceとして(Ala-Gly)<sub>n</sub>のC-13シフトを使用することができる。図3は、種々の重合度の(Ala)<sub>n</sub>のC-13シフトを重合度DP<sub>n</sub>に対してプロットしたものである。上で述べた(Asp(OBzl))<sub>n</sub>のC-13シフト変化の挙動と比較し、DP<sub>n</sub>  $\geq$  16のポリマーでは $\alpha$ -ヘリックス、 $4 \leq DP_n \leq 16$ のオリゴマーでは $\beta$ -シート構造をとることがわかる。このスペクトル変化の挙動は、IR、X線回折の変化

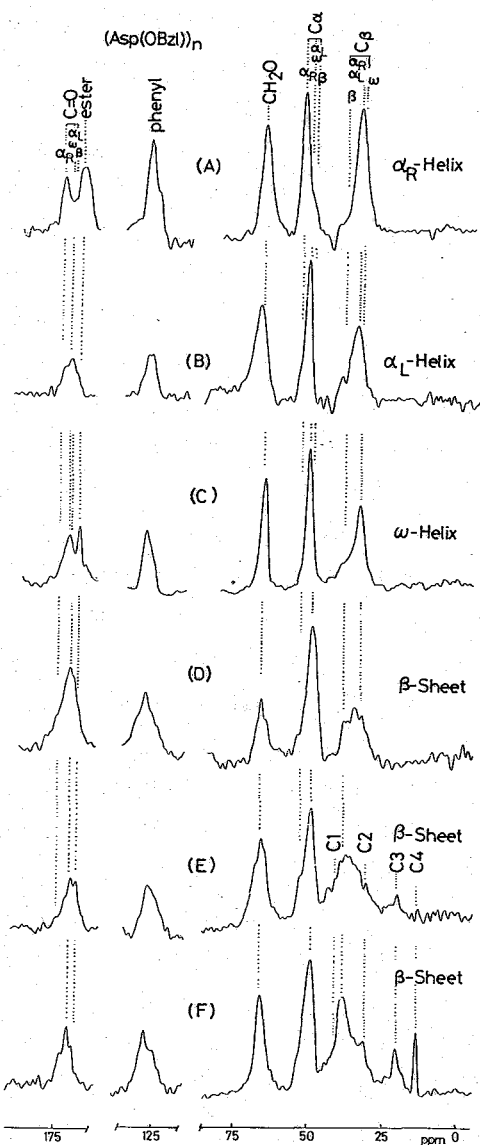


Fig. 2. 75.46 MHz <sup>13</sup>C CP-MAS NMR spectra of [Asp(OBzl)]<sub>n</sub> in the solid state



と全く同様である。DP<sub>n</sub> < 4 は、disorderedとされているが、実際に分子中の残基ごとに二面体角の変化があり、C<sub>α</sub>ピークとして2本以上に出現しているわけである。

(Ala-Gly-Gly)<sub>n</sub> は、60% LiBr水溶液に溶解し透析した後に凍結乾燥したform IIは3/1ヘリックス構造をとる。表1に示すように、AlaのC-13シフト値は、α-ヘリックス、β-シートのいずれとも異なった値をとり、コンホメーション依存C-13シフトの存在を裏付ける。(Pro-Ala-Gly)<sub>n</sub>の三重ヘリックスにおけるAla残基のC-13シフトは、Ala C-13シフトでみる限り上記の3/1ヘリックスの値とは大きく変化していない。上で得られた種々のポリペプチドのAla C<sub>β</sub> C-13シフトについて、FPT INDOのC-13遮蔽定数との対応を表2に示すが、計算値と実験値の一致は極めてよい。

### C. コラーゲン様三重ヘリックス：水素結合の影響<sup>7</sup>

コラーゲン様三重ヘリックスは、上記の(Pro-Ala-Gly)<sub>n</sub>のほか、(Pro-Gly-Pro)<sub>n</sub>もとることが知られている。この二種類のポリペプチドのPro残基は、3/1ヘリックスをとる(Pro)<sub>n</sub>に比べてC<sub>β</sub>ピークが1.6~2.2 ppm低磁場にシフトする。さらに、Gly C=Oは3/1ヘリックスの

(Gly)<sub>n</sub> II,  
(Ala-Gly-Gly)<sub>n</sub> IIの

それぞれ172.3, 172.1 ppmから、三重ヘリックスでは167.2ないし168.2 ppmに変化する。この変化は、後者では同様の二面体角をとりながらも、プロトン受容体としてGly C=Oが水素結合に関与しなくなるためであると説明できる。

Table 1. Ala <sup>13</sup>C chemical shifts of various polypeptides with various conformations (ppm from TMS)

	(Ala) <sub>n</sub>		(Ala-Gly-Gly) <sub>n</sub>	(Pro-Ala-Gly) <sub>n</sub>
	α-helix	β-sheet	3/1-helix	triple helix
C <sub>α</sub>	52.4	48.2	48.7	48.3
C <sub>β</sub>	14.9	19.9	17.4	17.6
C=O	176.4	171.8	172.1	173.1

Table 2. Comparison of Ala C<sub>β</sub> <sup>13</sup>C chemical shifts of different conformation with those of theoretical calculation<sup>5,7</sup>

Conformation	Dihedral angles φ, ψ	C <sub>β</sub> <sup>13</sup> C shifts (ppm)	
		obsd.	calcd. <sup>a</sup>
Right-handed α-helix	-48°, -57°	14.9	-63.0
Left-handed α-helix	48°, 57°	14.9	-63.7
β-sheet	-142°, 145°	19.9	-65.7
3/1 helix	-80°, 150°	17.5	-64.7

<sup>a</sup>shielding constant

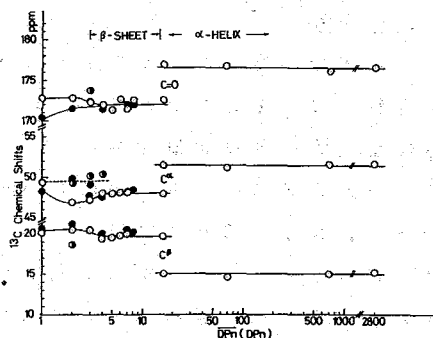


Figure 3 Plot of the <sup>13</sup>C chemical shifts of oligo(L-alanines) and poly(L-alanines) ((Ala)<sub>n</sub>) vs. DP<sub>n</sub> (or DP<sub>n</sub>): (●) HBr-H-(L-Ala)<sub>n</sub>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; (○) Z-(L-Ala)<sub>n</sub>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> and poly(L-alanines); (◻) minor peak of Z-(L-Ala)<sub>n</sub>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

### D. 蛋白質<sup>3,7,8</sup>

これまでに述べた reference 化合物の C-13 シフトをもとに、結晶性蛋白質の固体状態での C-13 CP-MAS スペクトルの解析が可能である。図 4 に種々のコラーゲンの CP-MAS とそのピークの帰属を示す<sup>7</sup>。3/1 あるいは三重ヘリックスの reference 化合物の C-13 シフト値とよく一致することがわかる。同様のアプローチを用いて、われわれは絹フィブロインの silk I,<sup>8</sup> silk II,  $\alpha$ -ヘリックスピークの帰属を行なった。<sup>3</sup> さらに、典型的な球状蛋白質であるリゾチームについて、高磁場 CP-MAS NMR スペクトルピークがかなりよく分離することを見い出している。この場合、固体と水溶液状態での構造の比較ができる。

#### <結論>

ポリペプチド、蛋白質中のアミノ酸残基の C-13 シフトは、コンホメーション依存シフトを示し、高次構造検出の内在的プローブとして十分に使用にたえることがわかった。但し、試料の結晶性が重要なポイントとなる。CP-MAS では、reference data が必要であるものの、固体と溶液の局所的コンホメーションの比較が直接可能であり、また試料の形態にそれほど影響をうけない点が有利な点である。

#### References

1. Taki, T.; Yamashita, S.; Satoh, M.; Shibata, A.; Yamashita, T.; Tabeta, R.; Saitô, H. *Chem. Lett.* **1981**, 1803.
2. Saitô, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I. *Macromolecules*, **1983**, *16*, 1050.
3. Saitô, H.; Iwanaga, Y.; Tabeta, R.; Narita, M.; Asakura, T. *Chem. Lett.* **1983**, 431.
4. Saitô, H.; Tabeta, R.; Ando, I.; Ozaki, T.; Shoji, A. *Chem. Lett.* **1983**, 1437.
5. Ando, I.; Saitô, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T. *Macromolecules*, in press.
6. Shoji, A.; Ozaki, T.; Saitô, H.; Tabeta, R.; Ando, I. *Macromolecules*, submitted.
7. Saitô, H.; Tabeta, R.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I.; Miyata, T. *Biopolymers*, submitted.
8. Saitô, H.; Tabeta, R.; Asakura, T.; Iwanaga, Y.; Shoji, A.; Ozaki, T.; Ando, I. *Macromolecules*, submitted.

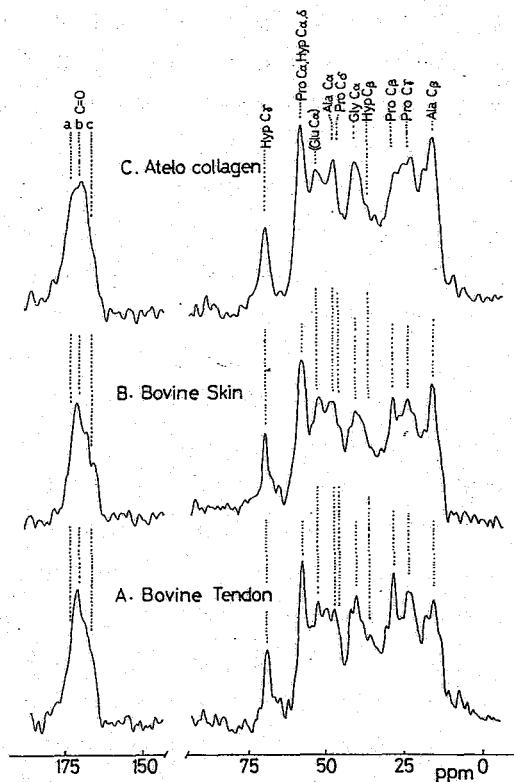


Fig. 4. 75.46 MHz <sup>13</sup>C CP-MAS NMR spectra of collagen fibrils (ref. 7).

## 56. 絹繊維の<sup>13</sup>C NMR

農工大・工〇朝倉 植野・渡辺 浩朗・鈴木 若・内田 あかね

### 1. 緒言

昆虫類の中で絹状繊維を吐糸し、営繭する種類は少ない。そのうちの絹のアミノ酸組成並びに構造は種々変化に富み、その研究は、アミノ酸組成と二次構造との関連並びに繊維状蛋白質の繊維化の機構を理解する上で極めて有用である。本討論会においても、絹繊維は何度も研究対象としてとりあげられてきたが、<sup>13</sup>C NMR法は蛋白質のアミノ酸組成、一次構造、二次構造に関する情報を与えると同時に、試料の状態として、液体から固体、更には抽出することなしに生きた生体を研究対象とすることが可能であり、構造解析の手帳として使われている。

我々は、<sup>13</sup>C NMR法を用い、グリシン含量の多い *Bombyx mori* (家蚕) とアラニン含量の多い *Philosamia cynthia ricini* (エリ蚕) について、同位体ラベルした試料を用いて、液状絹繊維、蚕体内及び抽出液状絹について詳細な構造解析を行なうことになり、その結果を報告する。

### 2. 実験

家蚕(支140×日140)は桑葉又は人工飼料、エリ蚕はシンジゴ葉にて飼育、(1-<sup>13</sup>C) Gly, [1-<sup>13</sup>C] Ala 及び <sup>15</sup>N Gly 家蚕繭は、人工飼料に各々95% エンリッチ(1-<sup>13</sup>C) Gly, [1-<sup>13</sup>C] Ala, <sup>15</sup>N Gly を5齢期に混入飼育することにより得た。再生繊維は、絹を常法にて精練<sup>5</sup>, 9M LiBr に溶解、透析後、風乾にて所定濃度に濃縮することにより得た。液状絹は、注意深く8mmφ NMR管(3cm長)に集め、水中を10mmφ管に入れ2層管とし、管間にはD<sub>2</sub>Oと化学シフト基準用Dioxaneを入れた。家蚕繊維は、再生繊維にリン酸緩衝液(pH 7.8)とα-キモトリプシンを加え、37°C, 24hr酵素分解、腐敗不酵素失活後、液状絹を脱水、乾燥により得た<sup>5</sup>。カップリング定数、<sup>3</sup>J<sub>C-N-C-H</sub>測定用試料は、測定の前約20hr前、D<sub>2</sub>O中で透析し、NH→ND置換した。

測定は、JEOL FX-200を用い、50MHzにて行なった。intact *B. mori* 及び *P. ricini* 熱蚕及び生きた蚕のスペクトルは、D-ロック及びスピニングを行なうことなしに4000-10000の積算から、抽出液状絹は、倍精度、20000以上の積算から得られた(帯域12000 Hz, 16Kデータポイント, 待時間5s, NNEモード)。C=O域スペクトルは、通常帯域1000 Hz, 8K, 倍精度で約10000の積算、カップリング定数の測定は、NOEモード、帯域1000 Hz, 8K, 500-600の積算で、8Kゼロフリンギングより得た。

### 3. 結果と議論

図1に、intact エリ蚕及び家蚕熱蚕の絹糸線部位、生きた及び抽出液状絹のC-<sup>13</sup> NMRスペクトルを示した。C=O部位を除くピークの帰属は、Ac-X-NHMe (X=Ala, Gly, Ser, Tyr, Val), 文献値<sup>6</sup>, INEPT法による結果並びに各々のスペクトルの比較

あまぐら てつお・わたなべ やすお・やすき しろし・うちだ あかね

から行なった。家蚕及  
 エリ蚕抽出液状絹の  
 スペクトルからアミノ  
 酸組成を求めると、ア  
 ミノ酸分析による文献  
 値とよく一致するこ  
 とから、C-13NMRに  
 おいては、アミノ酸  
 結晶部と非晶部が同  
 様に観測されること  
 がわかる。しかし、  
 個々のアミノ酸残基  
 の化学シフト値は、二  
 種類の蚕間で微妙に  
 異なるものが多く、  
 個々の残基の環境が  
 異なることを示唆し  
 ている。特に注目す  
 べき点は、エリ蚕体  
 内及び抽出液状絹の  
 スペクトルである。  
 Gly C $\alpha$ は単一ピー  
 クであるが、Ala C $\alpha$   
 はすべて二重ピーク  
 となっており、Ala C $\alpha$   
 C=Oでは低磁場側、  
 C $\beta$ では高磁場側のピー  
 ク強度が強い。エリ  
 蚕抽出液状絹に尿素  
 を除々に添加すると、  
 このピークは、もう  
 一方のピーク位置に  
 除々にシフトし、8M  
 尿素中ではすべて単  
 一ピークとなる。CD  
 の結果から、エリ蚕  
 抽出液状絹には $\alpha$ -  
 ヘリックスの存在が  
 指摘されているので、  
 このピークはAla連  
 鎖からなる $\alpha$ -ヘリ  
 ックスに帰属される。  
 もう一方のピークは、  
 尿素添加してもシフ  
 ト変化せず、Alaが  
 孤立又はそれに近  
 い連鎖からなるコ  
 イルピークと考  
 えられる。又、家蚕  
 抽出液状絹の場合、  
 エリ蚕 $\alpha$ -ヘリックス  
 に対応する位置にピ  
 ークが出現しないこ  
 とから、 $\alpha$ -ヘリッ  
 クスの存在は否定さ  
 れる。特に、抽出す  
 るとコンホメーション  
 の変化も含めて、変  
 性しやすい試料(特  
 別エリ蚕)の場合、  
 intact試料の測定と  
 併用する意義があ  
 るか?

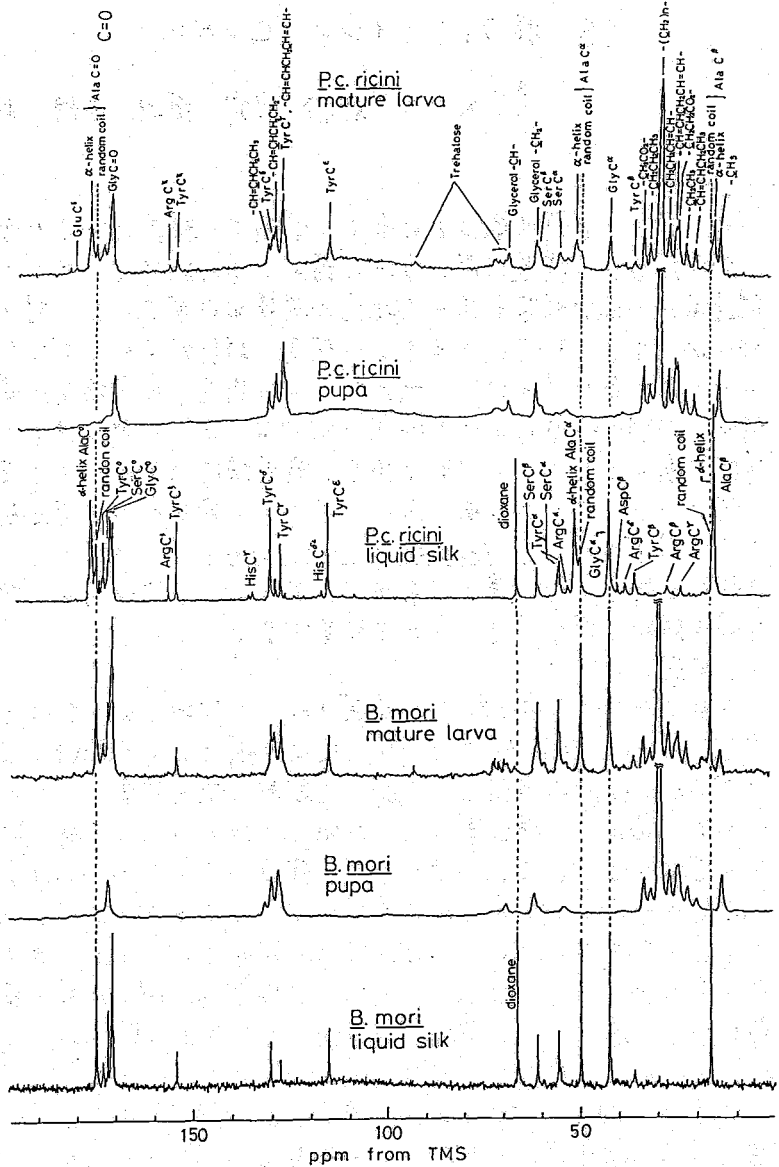


図1. エリ蚕熟蚕と家蚕熟蚕の抽出液状絹のC-13NMRスペクトル

家蚕のC=O域スペクトルで観測されるピークの分裂は、その一次構造を反映して

いる(図2)。Gly &  $\alpha$ -Ala  
 域で観測される各々、5本  
 のピークは、エリッチ試  
 料のスペクトルとの比較か  
 ら、すべてを、Gly &  $\alpha$ -  
 Ala残基に由来することか  
 らわかる。[1- $^{13}$ C]Gly 7,7  
 ロインでは、Serピークの  
 増大が認められるが、これ  
 は蚕体内で、Gly  $\rightarrow$  Glyoxy-  
 lic Acid  $\rightarrow$  Formaldehyde  
 + Gly  $\rightarrow$  Serの経路により、  
 Glyの一部、Serに転換し  
 た後、フィブロイン生成に  
 関与したこと起因する。  
 $^{15}$ N Gly フィブロイン鎖では、  
 着目残基のC端に $^{15}$ NH  
 を有する連鎖では約16 Hz  
 の $^{13}$ C- $^{15}$ Nの分裂を生ずる  
 が、これはAlaの低磁場側  
 の二本のピーク、Serピー  
 クに明瞭に認められ、エリ  
 ッチ率から考えて、これ  
 らの残基はC端にGlyがく  
 る確率が高いことがわか  
 る。水に不溶のため9M LiBr  
 中で測定した家蚕フィブロ  
 イン結晶部のスペクトルにお  
 いては、Glyの3本のピーク  
 強度はSerの場合と概そ一  
 致し、各々、Ala主ピークの半  
 分である。以上の結果は、結  
 晶部は強んじ-CAGA  
 GSG)にという連鎖からなるこ  
 とを意味し、ピークの帰属は  
 図中のように行なうことができ  
 る。尚、末端及び末端から  
 2番目のピークについては、化  
 学シフトのpH変化の実験に  
 もとづいて帰属した(結晶部)。  
 結晶部並びに非晶部の測定結  
 果から、キモトリオンはフィ  
 ブロイン鎖を選択的に...GT/G...  
 連鎖のTyr C=O側で切断するこ  
 とがわかる。従って、 $^{15}$ N Gly  
 フィブロインのスペクトルでは  
 確認できなかったが、Tyrピー  
 クは主にGT/GのTyrと帰属さ  
 れる。\*ピークとGAGAGピーク  
 の相対位置は、H<sub>2</sub>O中と9M  
 LiBr中で逆転しているが、こ  
 れはLiBr濃度依存性が異なる  
 ためであり、\*ピークはGT/G

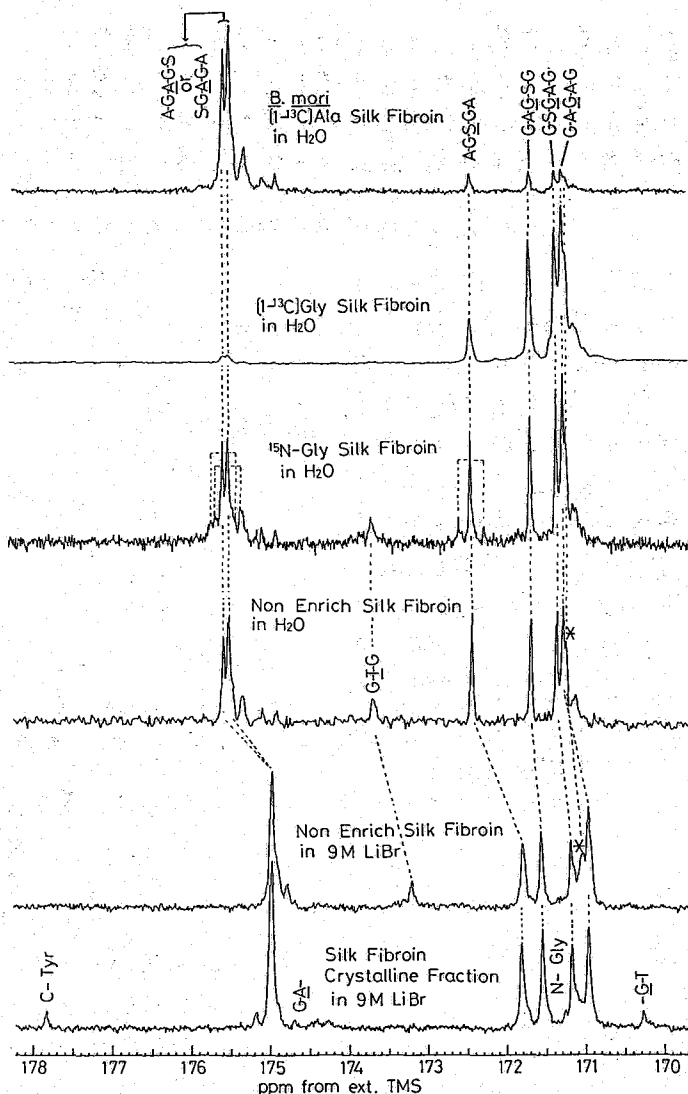


図2. 家蚕絹フィブロインカルボニル部位の $^{13}$ C-NMRスペクトル  
 とから、[1- $^{13}$ C]Ala, [1- $^{13}$ C]Gly,  $^{15}$ N Gly 及びエリッチ試料の  
 結晶中のスペクトル及びエリッチ試料を水に溶解した結晶部(キモトリオン  
 処理液残部)の9M LiBr中のスペクトル

以上の結果は、結晶部は強んじ-CAGA  
 GSG)にという連鎖からなるこ  
 とを意味し、ピークの帰属は  
 図中のように行なうことができ  
 る。尚、末端及び末端から  
 2番目のピークについては、化  
 学シフトのpH変化の実験に  
 もとづいて帰属した(結晶部)。  
 結晶部並びに非晶部の測定結  
 果から、キモトリオンはフィ  
 ブロイン鎖を選択的に...GT/G...  
 連鎖のTyr C=O側で切断するこ  
 とがわかる。従って、 $^{15}$ N Gly  
 フィブロインのスペクトルでは  
 確認できなかったが、Tyrピー  
 クは主にGT/GのTyrと帰属さ  
 れる。\*ピークとGAGAGピーク  
 の相対位置は、H<sub>2</sub>O中と9M  
 LiBr中で逆転しているが、こ  
 れはLiBr濃度依存性が異なる  
 ためであり、\*ピークはGT/G

TGの連鎖に帰属すべし。以上のように、家蚕フィブロインのGly及びAla C=O域スペクトルは、一次構造を反映してピークが分裂することを示してきたが、このことに着目し、更に内部回転角の評価を試みた。 $^3J_{C-N-C^{\alpha}H}$ は、N-C $^{\alpha}$ 結合まわりの二面角 $\theta$ 、 $\phi$ と以下のKarplus型の式で関連づけられる<sup>8</sup>。

$$^3J_{C-N-C^{\alpha}H} = 8.2 \cos^2\theta - 4.4 \cos\theta + 0.8 \sin^2\theta$$

図3に示したように、C-13エンリッチ試料を用いると、フィブロイン蛋白質について、明瞭に $^3J_{C-N-C^{\alpha}H}$ 値を決定できる。上式より $\theta$ を求め、コンホメーションエネルギーマップ等を参考に1つ、内部回転角 $\phi$ は、Serでは $-94^\circ$ (GAGSG)、Alaでは $-91^\circ$ (GAGAG)、 $-89^\circ$ (GSGAG)と決定される。2.2%濃度では試料はランダムコイルであり、得られた $\phi$ 値は平均値である。

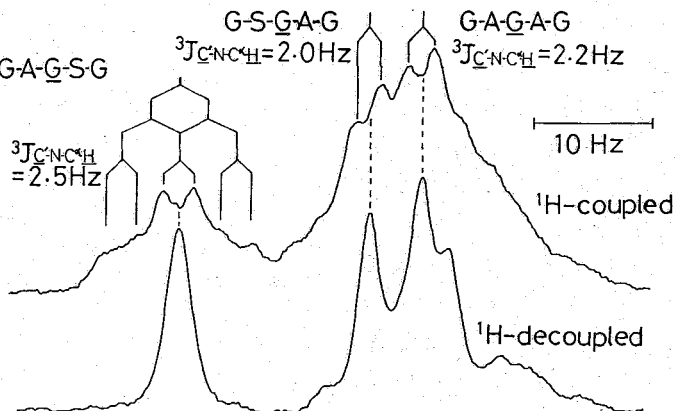


図3. ( $^{13}C$ ) Gly 炭素7.70 ppmの Gly カルボニル部位の C-13 NMR スペクトル 上:  $^1H$  カップル。下:  $^1H$  デカップル  
試料濃度: 2.2% NH $\rightarrow$ ND交換後のスペクトル。

小林らは、濃度5%を境としてより高濃度側で、1リックス様コンホメーションが出現し、30%ではその含量は40%に及ぶことを報告している(図4破線)<sup>3</sup>。Gly, Ala, Ser C $^{\alpha}$ 炭素のNT<sub>i</sub>値とNOE値の平均値から、log- $\chi^2$ 分布を仮定して求めた主鎖セグメント運動の平均相関時間は、0.1nsのオーダーで非常に短い。濃度増加に伴い増加する(図4実線)<sup>9</sup>。 $^3J_{C-N-C^{\alpha}H}$ は、7.3%までの濃度範囲内で若干の減少を示すが、固体Silk I型ヘリックスの $\phi$ 値として $-25^\circ$ を採用すると<sup>10</sup>、 $^3J_{C-N-C^{\alpha}H}$ は約0 Hzとなり、コイル含量の低下に伴い減少することとなり、実測結果を説明できない。尚、化学シフト値は、0.5%-30%、固体Silk I

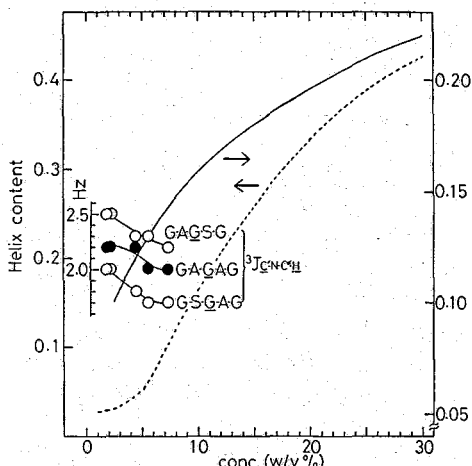


図4. 家蚕フィブロインヘリックス含量、主鎖セグメント運動の平均相関時間 $\tau_c$ が $^3J_{C-N-C^{\alpha}H}$ の濃度依存性

型の間では強んど変化しない。以上のように、NMRデータは、濃度増加に伴うSilk I型のゆるいヘリックス構造の出現を示唆する。

文献 1) 下川繁三; 第14回NMR討論会要旨集 A-219, p.223(1975) 2) 甲斐正正, 小西博子, 藤原敏夫; 第16回NMR討論会要旨集 A-249 (1977) 3) 小林祐次, 藤原敏夫, 片岡正三; 第19回NMR討論会要旨集 P.149(1980) 4) 藤原敏夫, 小林祐次, 片岡正三, 赤地好正; 第21回NMR討論会要旨集 A-213 (1982) 5) 梶原本之精造 北條幹正編 (1980) 6) O.W. Howarth, D.H.J. Lilley; Prog. NMR Spectroscopy, 12, 1 (1978) 7) T. Asakura, H. Suzuki, Y. Watanabe; Macromolecules, 16, 1024 (1983) 8) V. F. Bystrou; Prog. NMR Spectroscopy, 12, 41 (1976) 9) T. Asakura, Y. Watanabe, A. Uchida, H. Minagawa; Macromolecules, in press 10) H. Saito, R. Taketa, T. Asakura, Y. Zwanaga, A. Shoji, T. Ozaki, J. Ando; Macromolecules, submitted.

# 57. $^{13}\text{C}$ NMRによるヒストンH5とH1の球状構造形成因子の比較

(東京薬大, 放医研\*) O清水光弘, 神藤平三郎, 松本 潮  
座間光雄\*, 三田和英\*

## [緒言]

ヒストンH1は、クロマチンの凝縮や構造変化に重要な役割を演じている高リジン型蛋白質である。また、鳥類、両生類、は虫類の赤血球は核を有し、これらのクロマチンでは、H1の大部分が、H1の変異種とみなされるH5で置き換っている。これらのヒストンは、ほぼ同じ分子量であり(H1:217残基, H5:185残基)、H5の方がArg, Serなどの含量が高いという点を除いては、アミノ酸組成も類似している。

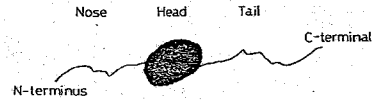


図1. ヒストンH1のnose-head-tail構造<sup>1)</sup>

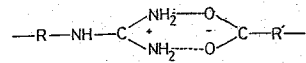


図2. Ringed-Structure Bridge<sup>2)</sup>

これまでヒストンH1の構造については、

Bradburyらが、nose-head-tail構造(図1)

を提出している<sup>1)</sup>。また、H5に關してもほぼ同様な構造が報告されている<sup>2)</sup>のhead部位の球状構造に寄与する因子として、従来、静電的相互作用、疎水性相互作用、水素結合等があげられてきた。また、座間らにより、Arg残基とGlu or Asp残基との間の「Ringed-Structure Bridge」(図2)の寄与等が指摘されている<sup>3)</sup>。そこで我々は、この相互作用の機構を明らかにするために、電荷を有するLys, Arg, Glu, Asp残基を主なプローブとし、pH titration、化学修飾等、種々の条件下で $^{13}\text{C}$  NMRを測定し、H5とH1の球状構造を比較、検討した。

## [実験]

### 1. 試料

ヒストンH1は、仔ウシ胸腺から、ヒストンH5は、にわとり赤血球から、Johnsonらの方法により、分離精製した<sup>4)5)</sup>。その純度はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。

### 2. Lys残基、Arg残基の化学修飾<sup>3)</sup>

i) Lys残基: 反応試薬として0.6 M O-メチルイソ尿素を用い、ヒストンの濃度を2 mg/mlとし、変性剤として8 M尿素を加え、pH 10.5、4°Cにおいて約4日間反応を行なった。

ii) Arg残基: 反応試薬として0.1 M 2,3-ブタンジオンを用い、ヒストンの濃度を2 mg/mlとし、pH 7.6、0.1 M ホウ酸緩衝液中において、30°Cで約3日間反応を行なった。

i), ii)とも反応終了後、徹底的に水で透析したのち、凍結乾燥し、重水に溶かしてNMR測定に供した。

しみおみつひろ、しんどうへいさぶろう、まつもとうしほ  
ざまみつお、みたかぐえい

### 3. $^{13}\text{C}$ NMR測定

分離精製したヒストンH5及びH1の濃度を約100mg/mlとし、10mm管 or 15mm管を用いた。スペクトロメーターは、日本電子FX-200を使用し、室温にて、50.1 MHzで測定した。化学シフトは、内部標準として用いたジオキサンの化学シフト値を67.37 ppmとしてTMSからの値に換算した。

#### [結果及び考察]

#### 1. ヒストンH5とH1の構造性

##### i) pHによる構造の変化

H1, H5の $^{13}\text{C}$  NMRの帰属は、斉藤らの報告の写を参照して行なった。pH 1.0から6.5の範囲で $^{13}\text{C}$  NMRを測定した。図3にpH 6.5と2.5及び8M尿素pH 2.5でのH1とH5のスペクトルを示す。H1では、pH 3以下の条件で、Ile, Asn, Phe, Tyrなどのシグナルが認められるが、中性領域では、ブロードとなり、シグナル強度の減少が認められる。この結果は、中性領域においてヒストンH1の一部が球状構造を形成し、pH 3以下では構造がなくなること示唆している。これは、Bradburyらの $^1\text{H}$  NMRの研究結果とも一致している。これに対し、H5については、全体としてpHによる変化はみられなかったが、1残基に相当するHisのピークに変化がみられた。この結果は、ヒストンH5の構造はpH依存性が小さく、pHが低い状態でも構造を保っていることを示しており、H1とは極めて対照的である。また、Ileの $\text{C}^\delta$ は異常な低磁場シフトを示しており、3残基あるTyrのC-4のシグナルは2本に分裂している。これは、Ile, Tyrなどの残基が種々の環境にあることを示している。

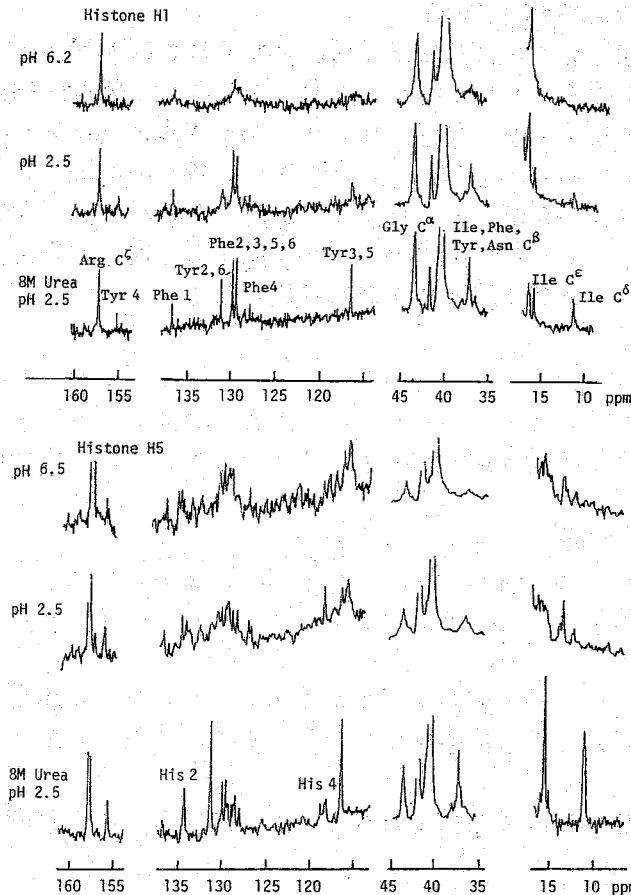


図3. ヒストンH1とH5の $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル

ii) 尿素の効果  
8M尿素を加えた溶液中でのH1のスペクトル(pH 2.5)は、全体としてpH 3以下の条件のものとはほぼ一致している。このことから、H1はpH 3以下でほぼランダムコイル状態になると考えられる。

##### 一方、H5では全体的に極

一方、H5では全体的に極



めてシアーブがシグナルを示し、Phe, Tyr, Gly, Ile, 等のシグナルが現れ、遊離のアミノ酸の化学シフト値とほぼ一致している。すなわち、H5では、8M尿素を加えることによって初めて構造がなくなることを示しており、H1とは異なっている。

ii) H5及びH1の運動性 — NOEの測定結果 —

TABLE I.  $^{13}\text{C}$  Nuclear Overhauser Enhancements (NOE's) of Histone H5 and H1 in aqueous solution (pH 6.4)

Histones		H5	H1
Backbone			
Lys	$\text{C}^\alpha$	1.70	1.97
Ala	$\text{C}^\alpha$	1.49	1.94
Pro	$\text{C}^\alpha$	1.47	1.96
Ser	$\text{C}^\alpha$	1.58	—
Side Chain			
Lys	$\text{C}^\beta$	2.40	2.49
	$\text{C}^\gamma$	2.58	2.44
	$\text{C}^\delta$	2.04	2.29
	$\text{C}^\epsilon$	2.37	2.38
Ala	$\text{C}^\beta$	2.68	2.41
Ser	$\text{C}^\beta$	2.33	—
Arg	$\text{C}^\beta$	2.22	—

Table I に pH 6.4 における H5, H1 の NOE の測定値を示す。倒鎖の炭素の NOE は、H1 と H5 の間に差は見られず、2.2 ~ 2.6 であり、予測されるように倒鎖は、非常に flexible であると思われる。他方、 $\alpha$  炭素については、H5 に対して 1.5 ~ 1.7、H1 に対しては約 2.0 であり H5 の NOE が小さいことから H5 の骨格は、rigid であると考えられる。

2. 球状構造形成因子の比較、検討

i) Lys 残基の化学修飾

この反応において、100% Lys 残基の化学修飾を行なうために、8M尿素を加えて

行なった。それは、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルから Lys  $\text{C}^\epsilon$  のシグナルがほぼ消失し、ホモアルギニンとなった  $\text{C}^\epsilon$  のシグナルの出現により確認された。H1 では、この反応によるスペクトルの変化は、Lys 残基を除き、ほとんど認められなかった。ゆえに、Lys 残基は、H1 分子中において特別な役割を担ってはいないと思われる。しかるに H5 では、aliphatic 及び aromatic 領域にはスペクトルに変化はないが、カルボニル領域において、かなりの変化が認められた。すなわち、Lys 残基は H5 の骨格構造に関与しており、そのため骨格であるカルボニル領域のスペクトルに変化が生じたものと考えられる。

ii) Arg 残基の化学修飾

この反応は中性 (pH 7.6) において行なったので、球状構造の内部に存在する Arg 残基は、修飾反応を受けにくいと予想される。この反応により、Arg  $\text{C}^\delta$  のシグナルの消失が認められる。このシグナル強度の変化から、修飾の程度は、H1、H5 とともに約 50% 程度であると見積られる。すなわち、H1 では 3 残基のうち 1.5 残基、H5 では 2 残基のうち 1.0 残基程度が球状構造の内部にあり、修飾されていない。また、H5 では 178.7 ppm と 178.4 ppm に  $\delta$  の  $\text{C}^\gamma$  のシグナルが認められ、pH 2.4 のとき (図 4(A)) 及び Lys 残基を修飾したとき (図 4(B)) は、変化はないが Arg 残基を修飾すると、178.7 ppm のシグナルが消失し、178.4 ppm にシフトしている。これは、Arg 残基のグアニジル基と  $\delta$  の酸アミドのカルボニル基との間の水素結合の存在を示唆している (図 4(C))。これらの結果から、H5 の方が H1 より球状構造内部に存在する Arg 残基が多く、この Arg 残基が H5 の強固な構造の一因となっていると考えられる。

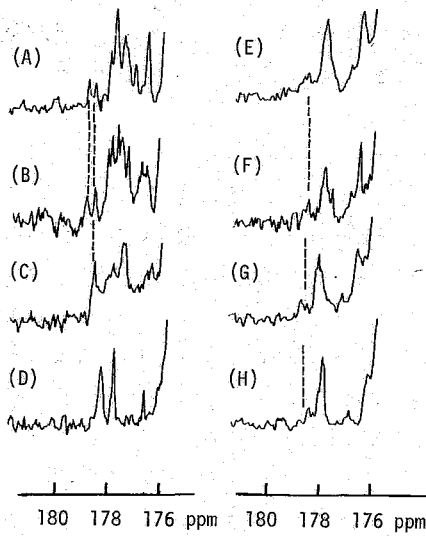


図4. H5とH1のカルボキシル基領域  
 (A)~(D) H5, (E)~(H) H1  
 (A), (E) Normal, pH2.5  
 (B), (F) Lys残基を修飾, pH2.5  
 (C), (G) Arg残基を修飾, pH2.5  
 (D), (H) 8M尿素, pH2.5

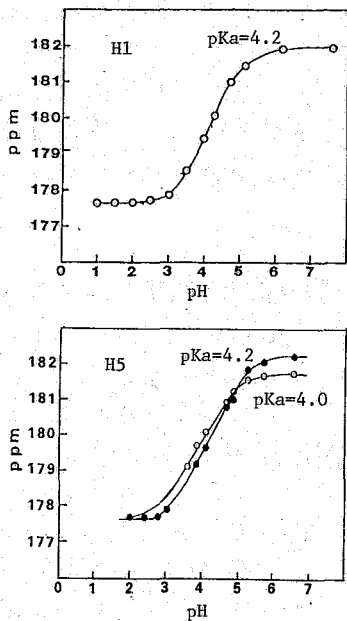


図5. H1及びH5のGlu残基のC $\gamma$ カルボキシル基の滴定曲線

### iii) 「Ringed-Structure Bridge」の可能性

pHを6.5から1.0まで変化させて、カルボキシル基の挙動を検討した。H1分子はGlu7残基、Asp2残基を含み、H5分子はGlu3残基、Asp2残基を含む。Glu残基のカルボキシル基に関しては、H1ではシグナルはクラスターとなり、182 ppmから177.8 ppmまでシフトした。H5では、Glu C $\gamma$ は2本の分離したピークとして観測できた。これから得られた「滴定曲線」を図5に示す。この曲線から求めたpKa値は、H1では約4.2、H5では約4.2と4.0である。遊離のグルタミン酸のC $\gamma$ カルボキシル基のpKa値が約4.3であることを考慮すると、上記の値は、ほぼ正常なpKa値であるとみなすことができる。すなわち、H1及びH5分子内において、Glu残基は「Ringed-Structure Bridge」のような特異的な相互作用には関与していないと考えられる。

Asp残基は、低磁場シフトしているカルボニル基と重なってしまうため、その挙動を調べることはできなかった。

また、Lys残基を化学修飾したH1、H5のスペクトルにおいてカルボキシル基には変化がなかったことから、Lys残基の正電荷は「Ringed-Structure Bridge」には関与していないと思われる。

Arg残基の化学修飾は、50%にとどまるため、球状構造内部にあるArg残基とAsp残基との間の「Ringed-Structure Bridge」は否定できない。

### REFERENCES

1. P.G.Hartman et al., Eur.J.Biochem., 77, 45 (1977)
2. G.E.Chapman et al., *ibid.*, 90, 287 (1978)
3. K.Mita et al., Biopolymers 20, 1103 (1981)
4. E.W.Johns, Biochem.J., 92, 55 (1964)
5. E.W.Johns et al., Eur.J.Biochem., 11, 495 (1969)
6. H.Saito et al., J.Biochem., 92, 233 (1982)
7. T.Tancredi et al., Biopolymers 18, 1 (1979)

58. <sup>13</sup>C-NMRによる蛋白質の構造研究 — SSI-Subtilisin BPN 複合体における活性部位の構造

(味の素中研・郡立大理工\*) ○上 尚志, 甲斐花 正恒\*

<序> SSIは、放線菌由来のタンパク性プロテアーゼ阻害剤であり、Subtilisin等のセリンプロテアーゼと複合体を形成することにより強く阻害すること知られている。自然界には、これに類するプロテアーゼインヒビターが、数多く見いだされている。これらが、セリンプロテアーゼに対する理想的な基質と考えられることから、その阻害メカニズムの解明がプロテアーゼの作用機序の解明に通じるという期待のもとに、中広い研究が進められている。インヒビターとプロテアーゼの間には、図1に模式的に示したように、通常の基質と同様の動的平衡が存在するものと思われる。実際には、ここに示した中間体のうち、いずれかの状態が安定な複合体を形成し、反応は停止するものと考えられる。複合体の構造の解明は、これを主としてX線解析により進められて来た。しかし、特に、複合体中の活性部位付近の微細な構造については、いまだに明確な結論が得られていないのが現状である。これに対し、NMRによる方法は、蛋白質のような巨大分子中でも特定の箇所を焦点とすれば、極めて有効な手段となりうる。我々はこれまで、SSIの活性部位である<sup>35</sup>Metのカルボニル炭素を観測し、帰属する方法を確立して来た<sup>1)</sup>。その過程においてSSIの活性部位の<sup>35</sup>Met-<sup>35</sup>Val(切断結合)の結合の切断の有無をJ<sub>CN</sub>の

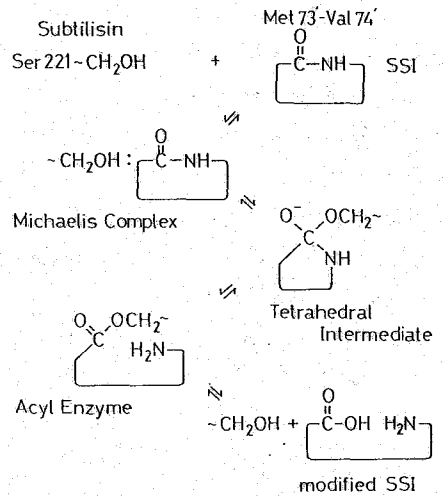


図-1. SSIとSubtilisinの反応。

存在から明らかにする手法を見出し、SubtilisinとSSIの複合体の構造が、いわゆるミカエリス型複合体であることを明らかにした<sup>2)</sup>。この結果は、X線解析の結果から見て妥当なものであるが、NMRに期待されるより重要な情報は、むしろ、切断結合の複合体における微細な構造変化に関するものである。切断結合の構造変化の定量的把握が、プロテアーゼとSSIとの相互作用の、X線解析では得ることの出来ない、より微細な姿を明らかにし、ひいてはSSIの阻害機構及びプロテアーゼの作用機序に関する有用な知見をもたらすものと期待される。その為の第一歩として複合体における切断結合を介してのJ<sub>CN</sub>の正確な測定が重要である。この値の正確な測定は極めて困難な作業であったが、ようやく、最近、正しい値と確信を持つ値を得ることに成功したので、ここでは、その結果及び、その値に基づくSSIの活性部位の構造変化について論じる。

<実験> ラベルSSIの調製: 同位体ラベルしたSSIは、同位体ラベルしたアミノ酸を含むアミノ酸混合液を窒素源とする培地中で、*Streptomyces albobriscolus* S-253 についで、かき、かきの1つ まじつね

を培養し、得られた培養上清から DEAE-セルロース、Sephadex G-100 トラム 70 マトグラフィー等に於て精製して得た。

SSI-subtilisin BPN'複合体の調製: subtilisin BPN' に、小過剰の SSI を加え 37°C で 30 分間、インキュベートした後、ゲル濾過に於て精製して得た。

$^{13}\text{C-NMR}$  の測定: Varian 社 XL-100 及び日本電気の FX-100 を用い、化学シフト値は、内部標準として用いたジオキタン<sup>1</sup>の化学シフト値を 67.8 ppm とし、TMS からの値に換算した。試料は、SSI は 30~50 mg、複合体は 60~100 mg を、重水に溶解し、pD を調整するが、水溶液のまま膜を用いて重水緩衝液に置換後、測定に供した。

### <結果>

#### 1. Met 残基の帰属<sup>1)</sup>

既に報告したように SSI に含まれる 3 個の Met 残基のカルボニルシグナルは、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  ゲルグラベル法に於て帰属が確定している。簡単に要約すると、まず、Met 残基のカルボニル炭素を  $^{13}\text{C}$  でラベルした SSI の  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルは、カルボニル領域に、3 本のシグナルを示した。(図-2d) 3 個の Met 残基 ( $^{70}\text{Met}$ ,  $^{73}\text{Met}$ ,  $^{103}\text{Met}$ ) の C 末端側の残基は、それぞれ  $^{71}\text{Cys}$ ,  $^{74}\text{Val}$ ,  $^{104}\text{Asn}$  であり、これらの残基の α-窒素を  $^{15}\text{N}$  でラベルすると、隣接するカルボニル炭素シグナルは、 $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  スピン結合に於て分裂する。この期待される。実際、Met 残基のカルボニル炭素と併せて、Val, Cys, Asn 残基の α-窒素をそれぞれ  $^{15}\text{N}$  でラベルした SSI の  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルは、図 2a, b, c のように、3 本のシグナルのうちそれぞれ 1 本に、スピン結合による四重線シグナルが観測された。この結果から、3 本のシグナルは高磁場側から、 $^{73}\text{Met}$ ,  $^{70}\text{Met}$ ,  $^{103}\text{Met}$  の各残基に帰属することが出来た。又、活性部位の  $^{73}\text{Met}$ - $^{74}\text{Val}$  のペプチド結合を紹介した。 $J_{\text{C-N}}$  値は、15.4 Hz で、アミド結合を紹介したスピン結合値としては通常の値であった。

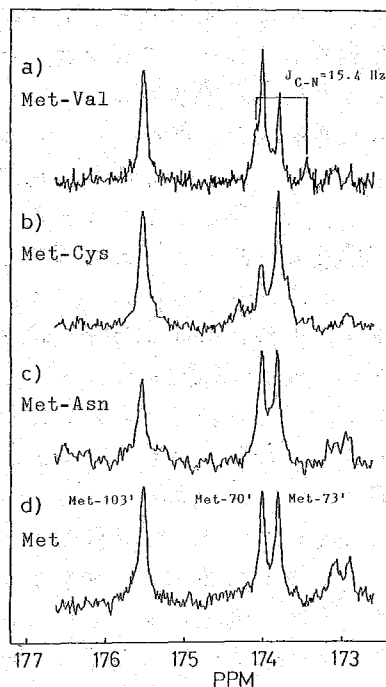


図-2. ラベル SSI の  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル

#### 2. SSI-subtilisin BPN' 複合体の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル

次に、同位体ラベルした SSI と subtilisin BPN' 複合体の  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルを測定した。まず、Met 残基のカルボニル炭素のみをラベルした複合体では、図 3c に示したように、3 本のカルボニル炭素シグナルが観測された。Cys 残基の α-窒素をラベルしたキオでは、このうち最も高磁場側のキオに、 $J_{\text{C-N}}$  による分裂の痕跡が見られた(図-3a)。Val 残基の α-窒素をラベルしたキオでは、最も低磁場側のシグナルに明らかに  $J_{\text{C-N}}$  の影響によるスペクトル変化が見られた。この結果から、3 本のシグナルは高磁場側から、 $^{70}\text{Met}$ ,  $^{103}\text{Met}$ ,  $^{73}\text{Met}$  と帰属することが出来た。強度の減少した  $^{73}\text{Met}$  シグナルの両側にはピークが観測され、キルニルゲキライトシグナル

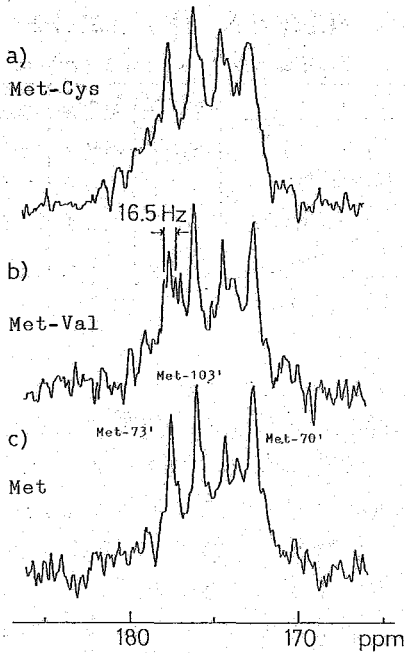


図-3. SSI-subtilisin BPN' 複合体の<sup>13</sup>C-NMRスペクトル

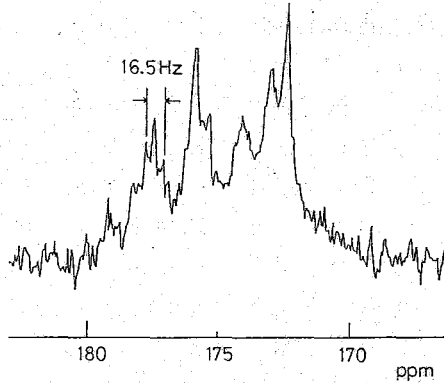


図4.  
Met-<sup>13</sup>C, Val-<sup>15</sup>N  
ラベル SSI-Sub-  
tilisin BPN' 複  
合体の<sup>13</sup>C-NMR  
スペクトル.

表-1. 複合体形成に伴う, SSIのMetカルボニル炭素シフトのシフト変化.

帰属	化学シフト (ppm)		
	SSI	複合体	シフト変化
Met-70	174.0*	172.65	-1.39
Met-73	173.8*	177.4*	+3.59
Met-103	175.5	175.9*	+0.43

ルであると考えれば、 $J_{CN}$ としては16.5Hzの程度の値と推定される。(しかし、図-2と図-3を比較して見ると明らかに、複合体の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルは分子量が小さく(天然存在の<sup>13</sup>C種のシフトの重なりと、著しい線中の増大が見られ、15Hz前後の値を正確に求めるのは困難である。より正確な値を求める方法として分子量の減少を試みた。Met残基とVal残基とラベルした複合体に、更に、同様にラベルしたSSIを加えて、本来のSSIとsubtilisin 2:2複合体に、2:1の複合体が混在するよう条件下で、測定を行った。結果は、図-4に示したが、予想したようにやや線中が減少し、この場合、 $J_{CN}$ として16.5Hzという値が得られた。複合体形成に伴うMet残基のカルボニル炭素シフトの化学シフト変化は、表-1にまとめて示した。

### <考察>

#### 1. SSI-subtilisin BPN'複合体の構造

前項で述べた様に、複合体形成に伴い、<sup>13</sup>Metのカルボニル炭素シフトは、26 ppmの低磁場シフトを示し、切断結合を介した $J_{CN}$ は、1.1Hzの増大することが判明した。このことから、図-1に示した可能な中間体のうち、複合体は、三カエリス型複合体を以てしていることが明らかであり、BPTIやSTIを用いた初期の研究で指摘されたような四面体型中間体の存在は、この場合は完全に否定される。三井らは<sup>31</sup>P NMR解析から、<sup>13</sup>Metのカルボニル炭素とsubtilisinの<sup>220</sup>ThrのNH及び<sup>155</sup>Asnの側鎖のNHとの間の強い水素結合の存在を指摘しているが、このような水素結合は、カルボニル炭素の低磁場シフトを誘起するものと思われる。<sup>13</sup>Metの大きな低磁場シフト

は、二の木素結合の存在を強く支持している。表-2に示したように、STLやBPTLとトリアシンとの複合体で、複合体形成に伴う同様の低磁場シフトが見られるが、その大きさは1ppm以下であり、SSLの場合は、極めて小さい。この差は、プロテアーゼの活性セリンのOと原子の接近度の差や、木素結合の強さ、或いは次に述べる結合の歪み具合などに依るものと思われる。

表-2. 複合体形成に伴う、切断結合のカルボニル炭素の化学シフト変化

複合体	遊離型	複合体	差
STL-トリアシン <sup>4)</sup>	173.8	174.7	+0.9
BPTL-トリアシン <sup>5)</sup>	175.7	176.4	+0.7
BPTL-アンヒドトリアシン <sup>5)</sup>	175.7	176.4	+0.7
SSL-PTTリシン	173.8 <sub>0</sub>	177.4 <sub>3</sub>	+3.5 <sub>9</sub>

## 2. 活性部位のペプチド結合の歪みについて

X線結晶構造解析の精密化の結果、最近では、BPTLやSTLのトリアシンとの複合体は、基本的にはミカエリス型であるが、活性部位のカルボニル炭素は、四面体型に歪んでいると主張されており、SSLの系でも、同様の指摘がなされている<sup>3)</sup>。ペプチド結合を介した $J_{CN}$ は、炭素と窒素の分子軌道のs性に大きく依存する為、本来のようは歪みに対しては敏感である。 $J_{CN}$ は、経験的に、 $[ \% S_N ] [ \% S_C ] = 80 J_{NC}$ で与えられ、ペプチド結合が歪んで $sp^2$ から $sp^3$ に移行するにつれ、小さくなることが期待される。実際に観測された活性部位のペプチド結合を介した $J_{CN}$ は、複合体形成に伴い、1Hz程度、増大している。どの程度の歪みか、どの程度の $J_{CN}$ の減小をきたすかは、想像の域を出ないが、この結果からは、カルボニル炭素が小さく歪んで $sp^3$ に近づいている証拠は得られなかった。一方、カルボニル炭素に対する木素結合は、 $J_{CN}$ を増大させることが知られており、この場合の $J_{CN}$ の増大は、前に述べた、二本の木素結合の存在によるものと思われる。

## 3. 阻害のメカニズムについて

以上、述べたように、SSLは、subtilisin BPN<sup>v</sup>と、ほとんど、キモの構造を保ち、たまたま複合体を形成することが明らかに示された。本来の基質が加水分解される際に当然、重要な働きをすると予想される、切断結合のカルボニル基に対する強い木素結合が存在することから、SSLはsubtilisin BPN<sup>v</sup>の活性部位に、ひびいたり収まる理想的な形としてあり、しかし、二本のS-S結合に交えられた堅固な構造をしている為、図-1に示した最初の段階で反応が停止するものと考えられる。より詳細な議論の為には、SSL-subtilisinの系では、分子量を小さくする為の工夫をして質のチロシンアミノ酸を得、 $J_{CN}$ の値を正確に求めること、類似のプロテアーゼ阻害剤を用いたチロシンを置換することが必要であり、また、一方では、カルボニル炭素の化学シフトや $J_{CN}$ に関して、構造との相関を求めることが必要である。また結合の歪みに関しては、より敏感であると思われる活性部位のアミド窒素をプローブとした<sup>15</sup>N-NMRによるアプローチも検討中である。

## <文献>

- 1) Kainosho, M. & Tsuji, T. (1982) *Biochemistry*, **24**, 6272.
- 2) 甲斐花 延 (1980) 第31回タンパク質構造討論会 p41.
- 3) 甲斐花 延, 赤川, 三井 (1982) 蛋白質・核酸・酵素, **27**, 1556.
- 4) Richarz, R. et al. (1980) *Biochemistry*, **19**, 5711.
- 5) Baillargeon, M.W. et al. (1980) *Biochemistry*, **19**, 5703.

59. 制限回転拡散モデルと<sup>13</sup>C磁気緩和

— リゾチームの内部運動解析への応用 —

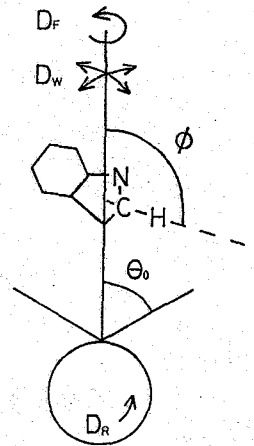
(阪大蛋白研, 東大理\*) ○藤原敏道, 永山国昭\*, 中沢隆,

小林祐次, 崎山文夫, 京極好正

〈序〉 <sup>13</sup>C磁気緩和は, 蛋白質など高分子の内部運動をよく反映し, 多くの研究が行なわれている。特に最近, 超伝導磁石NMRの普及や<sup>13</sup>Cラベル法などにより, 静磁場の強度を変えて, 蛋白質中の特定の残基に由来するシグナルのみ, 選択的に感度よく観測することが可能になった。このため測定結果を, 運動モデルにもとづいて詳細に議論できるようになった。

今回は, 内部運動のモデルとして制限回転拡散運動について, その分子運動と核磁気緩和量(T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, NOE)の関係を明らかにする。今まで, 核磁気緩和についてこのモデルは, 正確な計算が行なわれておらず, 相関時間と回転拡散定数D<sub>w</sub>の関係は明らかでなかった。

また, このモデルの応用として, 卵白リゾチームの活性部位にあるトリプトファン(Trp)62のδ位炭素について, その基質結合の緩和への影響を述べる<sup>(1)</sup>。モデルの任意性をへらすため, 3つの共鳴周波数で温度変化を行い, 緩和機構を明らかにするため, <sup>13</sup>Cと<sup>1</sup>Hのダブルラベル試料の測定も行った。



〈理論〉 図1のように角度θ<sub>0</sub>に反射壁を持つ時, 回転拡散方程式は,

$$\left\{ D_w \left( \Delta_n - \frac{\partial^2}{\partial \alpha^2} \right) + D_r \frac{\partial^2}{\partial \beta^2} \right\} f(\Omega, t) = \frac{\partial f(\Omega, t)}{\partial t}, \quad \left( \frac{\partial f(\Omega, t)}{\partial \beta} \right)_{\beta=0} = 0 \quad (1)$$

ここで, Δ<sub>n</sub>はオイラー角Ω=(α, β, γ)で表わしたラプラス演算子で, f(Ω, t)は角度分布関数である。

f(Ω, t) = f<sub>α</sub>(α) f<sub>β</sub>(β) f<sub>γ</sub>(γ) f<sub>t</sub>(t) と変数分離すると

$$-\frac{1}{f_{\alpha}(\alpha)} \frac{\partial^2 f_{\alpha}(\alpha)}{\partial \alpha^2} = m^2, \quad -\frac{1}{f_{\beta}(\beta)} \frac{\partial^2 f_{\beta}(\beta)}{\partial \beta^2} = n^2, \quad \frac{1}{f_t(t)} \frac{\partial f_t(t)}{\partial t} = D_w(m^2 - \nu(\nu+1)) - D_r m^2 \quad (2)$$

$$\frac{\partial^2 f_{\beta}(\beta)}{\partial \beta^2} + \cot \beta \frac{\partial f_{\beta}(\beta)}{\partial \beta} - \frac{f_{\beta}(\beta)}{\sin^2 \beta} (m^2 - 2m\nu + n^2) + \nu(\nu+1) f_{\beta}(\beta) = 0 \quad (3)$$

などとなる。この時, f<sub>β</sub>(β)は微分方程式で定義し, 直交化の重みを持つヤコービの多項式で, β, ν, m, nで表わされ

$$f_{\beta}(\beta)_{\nu}^{(m, n)} = (1 + \cos \beta)^{\frac{m+n}{2}} (1 - \cos \beta)^{\frac{n-m}{2}} F(\nu+n+1, n-\nu, n-m+1, \frac{1-\cos \beta}{2}) \quad (4)$$

F(ν+n+1, n-ν, n-m+1,  $\frac{1-\cos \beta}{2}$ ) は, ガウスの超幾何関数である。

ここで(1)の境界条件を満たすように, νを選んだものが, 求める解である。

承じあらとしみち, ながやまくにあき, なかざわたかし, こばやしゆうじ, さきやまみお, きょうごくよしまさ

図1, 蛋白質に結合しメインドール環の制限回転拡散運動。θ<sub>0</sub>で作られる円錐の中をD<sub>w</sub>で運動する。必要に応じてD<sub>r</sub>も考慮する。

$\nu = \nu_1, \nu_2, \nu_3, \dots$  は、この時一般に整数でない。この関数(4)に、規格化定数をかけたものは、スツルム・リウヴィル型の微分方程式(3)の解であり、関数列  $\{f_\theta(\beta)_\nu^{(m,n)}\}$  は、正規直交性、完全性、完備性を持つ。

次に、一般化された球面関数  $D_{mn}^{(2)}(\Omega) = e^{-m\alpha} d_{mn}^{(2)}(\theta) e^{in\phi}$  についての相関関数  $C_{mn}^{(2)}(t) = \langle D_{mn}^{(2)}(\Omega, t) D_{mn}^{(2)*}(\Omega, 0) \rangle$  を求める。このために必要な条件確率(グリーン関数;  $G(\Omega, t; \Omega', 0)$ , 時間  $0$  で  $\Omega'$  にあるものが、時間  $t$  で  $\Omega$  に遷移する確率)は、(4) を用いて展開すると

$$G(\alpha, \beta, t; \alpha', \beta', 0) = \sum_{m,n,\nu} \frac{\exp(-i(\alpha-\alpha')m) \exp(-i(\beta-\beta')n)}{4\pi^2 N_\nu^{m,n}} f_\theta(\beta)_\nu^{(m,n)} f_\theta(\beta')_\nu^{(m,n)} \exp(-D_w(\nu(\nu+1) - m^2 - n^2)t)$$

$$N_\nu^{m,n} = \int_{\cos\theta_0}^1 \{f_\theta(\beta)_\nu^{(m,n)}\}^2 d\cos\theta$$

従って、 $P_{eq}(\Omega)$  を平衡分布とすると、自己相関関数は

$$C_{mn}^{(2)}(t) = \int_{\Omega'} \int_{\Omega} D_{mn}^{(2)}(\Omega) D_{mn}^{(2)*}(\Omega') G(\Omega, t; \Omega', 0) P_{eq}(\Omega') d\Omega d\Omega' \quad (5)$$

$$= \frac{1}{1-\cos\theta_0} \sum_{\nu} \frac{1}{N_\nu^{m,n}} \left( \int_{\cos\theta_0}^1 d_{mn}^{(2)}(\theta) f_\theta(\beta)_\nu^{(m,n)} d\cos\theta \right)^2 \exp(-D_w(\nu(\nu+1) - m^2 - n^2)t)$$

これが、(1)式より求めた正確な相関関数である。 $\nu$  についての和は、最初の5項を用いることにより、0.1%以上の精度がある。

(5)式は、無限級数であるが、扱いやすいように単一指数関数  $C_{mn}^{(2)}(t)$  で近似する。

この時、
$$C_{mn}^{(2)}(0) = C_{mn}^{(2)}(0), \quad \int_0^\infty C_{mn}^{(2)}(t) dt = \int_0^\infty C_{mn}^{(2)}(t) dt \quad (6)$$

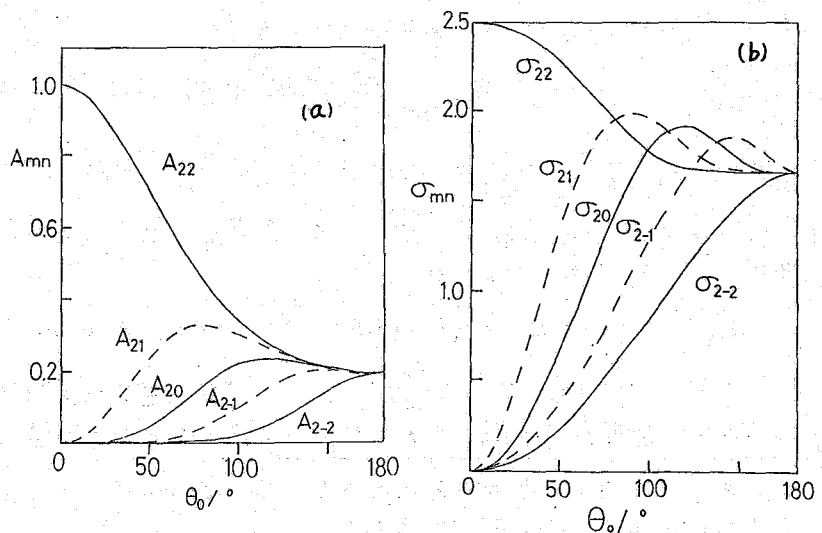
とまよようにする。従って、 $D_F = 0$  の時は、

$$C_{mn}^{(2)}(t) = A_{mn} \exp(-D_w(1/\sigma_{mn}^2 - m^2)t), \quad m \neq 0 \text{ 或 } n \neq 0 \text{ の時} \quad (7)$$

$$C_{00}^{(2)}(t) = S_0^2 + (A_{00} - S_0^2) \exp(-D_w t / \sigma_{00}^2), \quad S_0 = 0.5 \cos\theta_0 (1 + \cos\theta_0)$$

図2

$A_{mn}, \sigma_{mn}$  の中で独立な成分は、 $(m,n) = (2,2), (2,1), (2,0), (2,-1), (2,-2), (1,1), (1,0), (1,-1), (0,0)$  である。ここには、その一部を図示する。





$A_{mn}, \sigma_{mn}$  は、図2 (a) (b) に示すような値をとる。

今まで、 $m=0$  あるいは  $n=0$  についての相関関数は、木下<sup>(2)</sup> によって数値的に求められ、解析的には Lipari<sup>(3)</sup> によって (6) 式の近似のもとに得られている。今回の計算で、 $m \neq 0, n \neq 0$  についての式が、はじめて求められ、これは木下らの結果を特殊な場合として、含むものである。また、周期的なポテンシャルを持ったものについては、Nordio<sup>(4)</sup> によって数値計算され、ESRの解析に応用されている。

さらに、球状蛋白質のように等方的な回転拡散運動と重ね合わせの場合には、(6) 式同様、次のように近似する。

$$C_b(t) = \sum_{l=-2}^2 C_{bl}(t) \approx \begin{cases} \exp(-D_W(\gamma_0^2 - b^2)t) & b \neq 0 \quad (8) \\ S_0^2 + (1 - S_0^2) \exp(-D_W t / \gamma_0^2) & b = 0 \end{cases}$$

$\sigma_b$  は、図3のような数値をとる。 $D_F \neq 0$  の場合は、(8) 式に  $\exp(-D_F b^2 t)$  をかければよい。(8) 式に相当する式は、Brainard<sup>(5)</sup>, Howarth<sup>(6)</sup> によっても近似式が提出されている。しかし、Brainardによる式は  $D_F \ll D_W$  で、Howarthによる式は  $D_F$  と  $D_W$  による運動の重ね合わせ方に問題があり  $\theta_0 \rightarrow 180^\circ$  で、不正確な値を与える。また、いずれの式でも2階の一般化された球面関数についての相関関数の時間に対する減衰を特徴づける(有効)相関時間と、単位時間当りの変位の二次モーメントつまり揺動力の強さという分子運動的に定義できる拡散定数との関係は、明らかになっていなかった。(8) 式で、相関時間  $T_W = 1 / (D_W(\gamma_0^2 - b^2))$  とすればわかるように、 $\sigma_b$  は  $\theta_0$  の関数であるから、相関時間は  $\theta_0$  つまりポテンシャルの強さの関数であるが、拡散定数は  $\theta_0$  に依存しない。

なお、もしもこのような解き方で、線中のタイムスケールで制限回転拡散運動を行っている時の固体NMRの線形の計算は可能であり、確率論的リューヴィル方程式で、(7) 式を用い、さきの固有関数で展開すればよい。

〈応用〉 この測定のための、基質の存在とリゾチームの活性部位にある Trp 62 インドール環の運動性との相関を明らかにし、酵素機能と

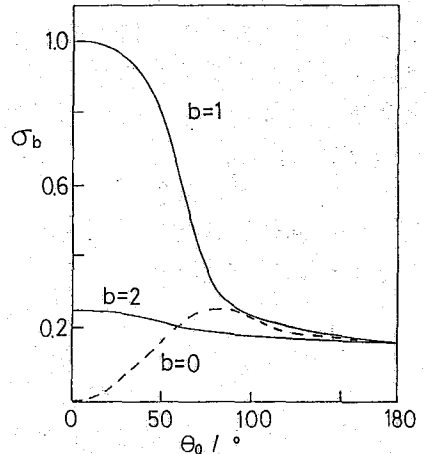


図3

$$\sigma_2 = \sigma_{-2}, \sigma_1 = \sigma_{-1}$$

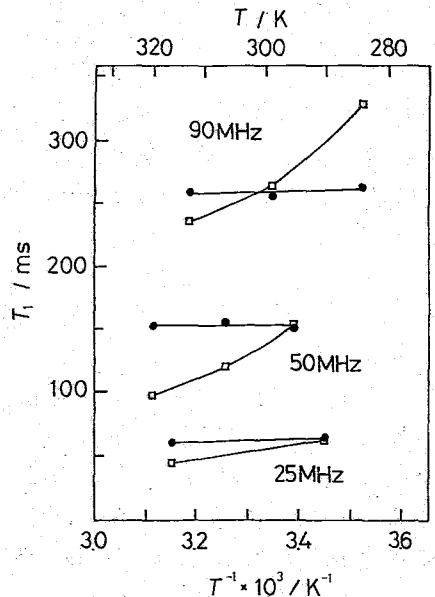


図4,  $T_1$  の磁場および温度依存性  
□ 基質共存, • 基質非共存

表 1

Parameter	Frequency	$\theta_0$	Free	Bound
$T_1$ (ms) *	25MHz		65	50
	50MHz		186	120
$D_R$ ( $s^{-1}$ )			$0.5 \times 10^7$	$0.5 \times 10^7$
$D_w$ {		$40^\circ$	$0.7 \times 10^8$	$0.3 \times 10^9$
		$30^\circ$	$0.2 \times 10^9$	$0.6 \times 10^9$

の関係をおくことである。

リゾチームは, Trp 62 の  $\delta$  位に  $^{13}C$  を化学的に 90% 導入した ユングララベル試料と,  $^{13}C$  と同時に  $^2H$  を  $\delta$  位に導入したダブルラベル試料を用いた。この 2 の試料を用いることより,  $^{13}C$ - $^1H$  双極子相互作用による寄与のみを, 評価することが可能になった。測定は, 基質アナログの N-アセチルグルコサミン三量体 [(GlcNAc)<sub>3</sub>] 共存, 非共存下に, Inversion recovery 法で行った。測定周波数は, 25 MHz, 50 MHz, 90 MHz である。

インドール環の運動として, 図 1 のような wobbling 運動 (制限回転拡散) と全体の等方的な回転拡散運動の重ね合わせを考える。この時, 一般化された球面関数についての自己相関関数は,

$$C(t) = \frac{1}{5} \exp(-6D_R t) \sum_{m=-2}^2 [S_m^2 + (1 - S_m^2) \exp(-D_w(\sigma_m^2 - m^2)L)] D_{0m}^{(2)}(\phi) \quad (9)$$

$S_m = 0 \quad (m \neq 0)$

ここで,  $D_R$  は全体の運動を表わす拡散定数であり,  $\phi$  は  $^{13}C$ - $^1H$  ベクトルと  $C^{\beta}-C^{\alpha}$  とのなす角度  $107.7^\circ$ , あるいは一般的に有効 wobbling 軸とのなす角度である。

測定と解析の結果は, 図 4 と表 1 に示すとおりである。このように  $D_R$  は, 蛋白質の大きさから, ほぼ予測できる値をとっている。また Trp 62 インドール環の内部運動は, 基質アナログ (GlcNAc)<sub>3</sub> 存在下において, 非存在下より運動性が増加していることがわかる。つまり, 基質結合による構造変化にともない, Trp 62 インドール環に対する自由体積が, 増加していると考えられる。この結果は, インドール環が水素結合を通じて, 直接基質結合に関与していることを示唆する初期の X 線結晶解析の結果から予想されることは, 逆の結果となった。

#### 参考文献

- (1) 中沢隆ら, 第 34 回タンパク質構造討論会予稿集 ('83)
- (2) K. Kinoshita et al. Biophys. J. 20 289 ('77)  
R. Richarz et al. Biochem. 19 5189 ('80)
- (3) G. Lipari et al. Biophys. J. 30 489 ('80)
- (4) P. L. Nordio et al. J. Chem. Phys. 56 2117 ('72)
- (5) J. R. Brainard et al. Biochem. 20 4618 ('81)
- (6) O. W. Howarth J. C. S. Faraday II, 75 863 ('79)
- (7) J. H. Freed et al. J. Phys. Chem. 75 3385 ('71)

## 60. CCK オクタペプチドとそのアナログの二次元 NMR による構造研究

(生理研・東大理\*) ○中沢 隆, 肥塚 泉, 亘 弘, 志賀 潔,  
矢内原 昇, 永山国昭

〔序論〕 Cholecystokinin (CCK) は 33 個のアミノ酸残基から成る消化管ホルモニとして単離, 構造決定されたが, その C 末端オクタペプチド (CCK-8) が脳内に多量に存在し, 中枢神経系を neuromodulator としての機能を果たすことが知られている。

CCK-8 の構造は  $H\text{-Asp-Tyr(SO}_3\text{H)}\text{-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$  を中心としてフェニル性水酸基が硫酸エステル化され, C 末端がアミドになっていることが特徴的である。また, グリニンから C 末端まで 5 個のアミノ酸配列はガストリン (胃液分泌促進作用を有する消化管ホルモニ) の末端構造と一致している。さらに C 末端テトラペプチド (CCK-4) と CCK-8 とは酵素 (酵素) に関して異なる放出活性を示す。このような CCK とそのアナログの多様な生理作用は, 主として異なる種類の受容体の存在によるものとして説明されているが, 各々の受容体に識別されるべきある程度安定な部分構造が CCK にいくつか存在することと考えられる。

本研究では CCK-8 とその各種類のアナログについて, 通常の一次元  $^1\text{H-NMR}$  シグナルを二次元 NMR により解析し, これらのペプチドの溶液内での構造と, 上に示した多様な生理作用の相関を探ることを目指している。今回は, 二次元スピンエコー相関 NMR (SECSY) と, 二次元 NOE 相関 NMR (2D-NOE) を主に用いて各シグナルの帰属を行い, その結果, ペプチド鎖のコンホメーション (変化) に関する若干の知見が得られたことを報告する。

〔実験方法〕 CCK-8, desulfated CCK-8 ( $\text{des SO}_3\text{-CCK-8}$ ), Boc-[Asp<sup>1</sup>(OBu<sup>t</sup>)]- $\text{des SO}_3\text{-CCK-8}^*$ , CCK-7,  $\text{des-Phe}^8\text{-NH}_2\text{-[Suc-Tyr}^2\text{(SO}_3\text{H)}]\text{-CCK-7}$  はいずれも液相法で合成した。 $^1\text{H-NMR}$  測定は Bruker WM-360wb ( $^1\text{H}$  共鳴周波数 360 MHz) を用いた。二次元 NMR を含めて計算は分光器付属の Aspect 2000 コンピューターシステムを用いた。試料は 5  $\mu\text{mol}$  試料管中, DMSO- $d_6$  溶液, 濃度 2~5 mM, 温度 31~33°C で測定した。化学シフトは内部基準の TMS からの値を示した。

〔結果と考察〕 各アミノ酸残基内のプロトンのカップリングはすべてペプチドにおいて SECSY によって一義的に決定された。ペプチド鎖内を 2 個あるメチオニン残基と, 3 個の芳香族アミノ酸残基のプロトンの帰属は, 主として Gly<sup>7</sup> の  $N^H$  と C $\alpha$  プロトンの NOE を一次元及び 2D-NOE により Met<sup>3</sup> と Trp<sup>5</sup> のそれぞれ  $C^H$  と  $N^H$  プロトンの観測し, 順次同様にして帰属を進めた。同時にシグナルの化学シフトの妥当性と 5 種のペプチド相互の比較とにより, 一次構造上離れたアミノ酸残基間の高次構造にもとづく NOE による混乱をチエックした。典型的な例として  $\text{des-Phe-NH}_2\text{-[Suc-Tyr}^2\text{(SO}_3\text{H)}]\text{-CCK-7}$  の SECSY と 2D-NOE と一次元上での帰属を図 1 に示す。  
\* アミノ酸の番号は CCK-8 を基準とす。Asp<sup>1</sup> は CCK-33 の Asp<sup>21</sup> に相当する。

## 60. CCK オクタペプチドとそのアナログの二次元 NMR による構造研究

(生理研・東大理\*) ○中沢 隆, 肥塚 泉, 亘 弘, 志賀 潔,  
矢内原 昇, 永山国昭

〔序論〕 Cholecystokinin (CCK) は 33 個のアミノ酸残基から成る消化管ホルモンとして単離、構造決定されたが、その C 末端オクタペプチド (CCK-8) が脳内に多量に存在し、中枢神経系を *neuromodulator* としての機能を果たすことが知られている。

CCK-8 の構造は  $H\text{-Asp-Tyr(SO}_3\text{H)}\text{-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$  でチロシンのフェニル性水酸基が硫酸エステル化され、C 末端がアミドになっていることが特徴的である。また、ケリニンから C 末端まで 5 個のアミノ酸配列はガストリン (胃液分泌促進作用を有する消化管ホルモン) の末端構造と一致している。さらに C 末端テトラペプチド (CCK-4) と CCK-8 とは酵素 (酵素) に関して異なる放出活性を示す。このような CCK とそのアナログの多様な生理作用は、主として異なる種類の受容体の存在によるものとして説明されてきたが、各々の受容体に識別されるべきある程度安定な部分構造が CCK にいくつか存在することと考えられる。

本研究では CCK-8 とその数種類のアナログについて、通常の一次元  $^1\text{H-NMR}$  シグナルを二次元 NMR により解析し、これらのペプチドの溶液内での構造と、上に示した多様な生理作用の相関を探ることを目指している。今回は、二次元スピンエコー相関 NMR (SECSY) と、二次元 NOE 相関 NMR (2D-NOE) を主に用いて全シグナルの帰属を行い、その結果、ペプチド鎖のコンホメーション (変化) に関する若干の知見が得られたことを報告する。

〔実験方法〕 CCK-8, *desulfated* CCK-8 (*des* SO<sub>3</sub>-CCK-8), Boc-[Asp<sup>1</sup>(OBu<sup>t</sup>)]-*des* SO<sub>3</sub>-CCK-8\*, CCK-7, *des*-Phe<sup>8</sup>-NH<sub>2</sub>-[Suc-Tyr<sup>2</sup>(SO<sub>3</sub>H)]-CCK-7 はそれぞれ液相法で合成した。 $^1\text{H-NMR}$  測定は Bruker WM-360 Nb ( $^1\text{H}$  共鳴周波数 360 MHz) を用いた。二次元 NMR を含めて計算は分光器付属の Aspect 2000 コンピュータシステムを用いた。試料は 5  $\mu\text{mol}$  試料管中、DMSO-*d*<sub>6</sub> 溶液、濃度 2~5 mM、温度 31~33°C で測定した。化学シフトは内部基準の TMS からの値を示した。

〔結果と考察〕 各アミノ酸残基内のプロトンのカップリングはすべてそのペプチドにおいて SECSY によって一義的に決定された。ペプチド鎖内で 2 個あるメチオニン残基と、3 個の芳香族アミノ酸残基のプロトンの帰属は、主として Gly<sup>4</sup> の  $N^H$  と C $\alpha$  プロトンとの NOE を一次元及び 2D-NOE により Met<sup>3</sup> と Trp<sup>5</sup> のそれぞれ C $\alpha$  と  $N^H$  プロトンに観測し、順次同様にして帰属を進めた。同時にシグナルの化学シフトの妥当性と 5 種のペプチド相互の比較とにより、一次構造上離れたアミノ酸残基間の高次構造にもとづく NOE による混乱をチエックした。典型的な例として *des*-Phe-NH<sub>2</sub>-[Suc-Tyr<sup>2</sup>(SO<sub>3</sub>H)]-CCK-7 の SECSY と 2D-NOE と一次元上での帰属を図 1 に示す。  
\* アミノ酸の番号は CCK-8 を基準とする。Asp<sup>1</sup> は CCK-33 の Asp<sup>21</sup> に相当する。

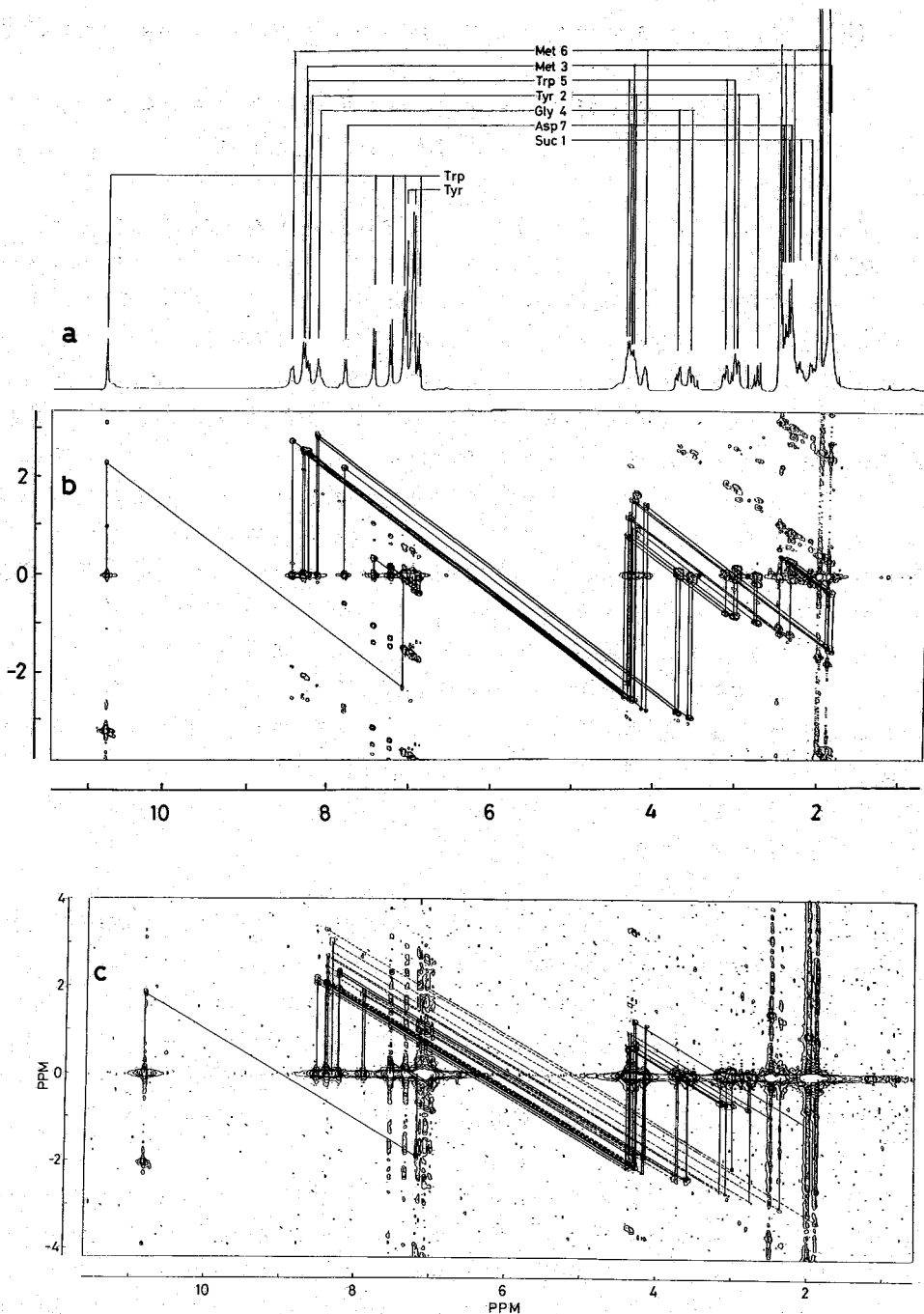


図1. Suc-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-OH の a) 一次元, b) SECSY, 及び c) 2D-NOE スペクトル。  
 二次元のスペクトルは b, c, と共に F1(縦軸), F2(横軸)の data point は 512 × 2K (words),  
 スペクトル幅は F1 3000 Hz, F2 6000 Hz の測定 (注: c) の測定は NOE-delay time (mixing time)  
 400ms を行った。図の実線は直接 J-結合した γ-β 間の cross peak を、破線は through  
 space の NOE を示す cross peak を結んだものである。

このようにしてニカナルを帰属した CCK-8 とそのアナログの <sup>1</sup>H NMR スペクトルを 図 2 と 図 3 に示した。

CCK-8 の 4 種のアナログによって消去法的に硫酸基 (図 2, b), 末端の遊離のアミノ基と C 末端 Phe-NH<sub>2</sub> (同 2, c), N 末端の Asp<sup>1</sup> (同 2, d), 及び Asp<sup>1</sup> の 2 つの解離基と硫酸基 (同 2, e), の影響をそれぞれ比較した加, 最も高い 2 つの保護基によって N 末端付近の立体構造を変え, さらに硫酸基を除いた (e) 以外, 顕著な違いはスペクトル上に現われていない。唯一の例外が Asp<sup>1</sup> の アミトプロトンで, 遊性のある CCK-8 と CCK-7 とは最も低磁場側にあり加, それ以外の場合高磁場側にシフトしている。この アミトプロトンの CCK-8 の 2D NOE で, 溶媒中の水の  $\alpha$ - $\gamma$  に対して強い cross peak を与え, 水と強く相互作用していることが見出された。この アミトプロトンの挙動と並行して Gly<sup>4</sup> の 2 個の  $\alpha$ プロトンの  $\alpha$ - $\gamma$  回転の状態も変わっている。生理活性の点から考えると, CCK-7 は CCK-8 に匹敵する活性を又つか硫酸基を除いた des-SO<sub>3</sub>-CCK-8 の活性は元比べて 1/100 に低下する。Gly<sup>4</sup> の周辺に高次構造の存在をうかがわせるその  $\alpha$ プロトンの分裂が, 活性のあるものより少ないもののほうが顕著であることは興味深い。

同様に CCK-8 のスペクトルから溶媒中の水の量と試料濃度によって Gly<sup>4</sup> の  $\alpha$ プロトンの分裂が現われたこと加ある (図 3, 4)。図 3 で, 溶媒中の水の量が減少するにしたがってこの  $\alpha$ プロトンの分裂が大きくなる。また試料濃度の増大にもよって分裂が大きくなることからスルホニル基の影響も考えられたため, 図 4 の b

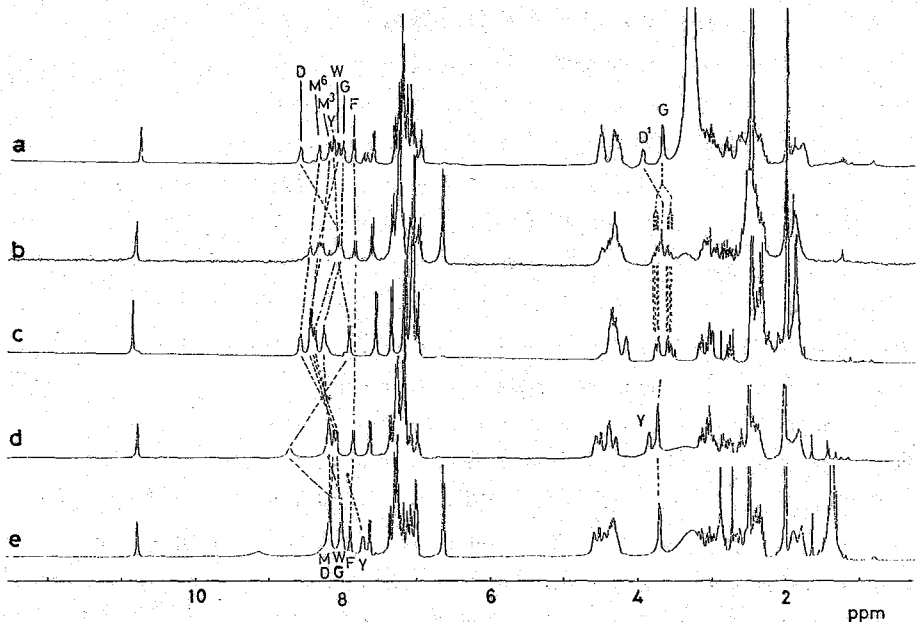


図 2. CCK-8 とその 4 種のアナログの <sup>1</sup>H NMR スペクトル。 a) CCK-8, b) des-SO<sub>3</sub>-CCK-8, c) des-Phe<sup>8</sup>-NH<sub>2</sub>-[Suc-Tyr<sup>2</sup>(SO<sub>3</sub>H)]-CCK-7, d) CCK-7, e) des-SO<sub>3</sub>-[Boc-Asp<sup>1</sup>(OBu)]-CCK-8。アミトプロトンと 2, 3 の  $\alpha$ - $\gamma$  以外の帰属は省略した。a) と c) については 2 を参照。図 1 及び 3 参照。(略号) D = Asp, M = Met, Y = Tyr, W = Trp, G = Gly, F = Phe. Suc = succinyl.

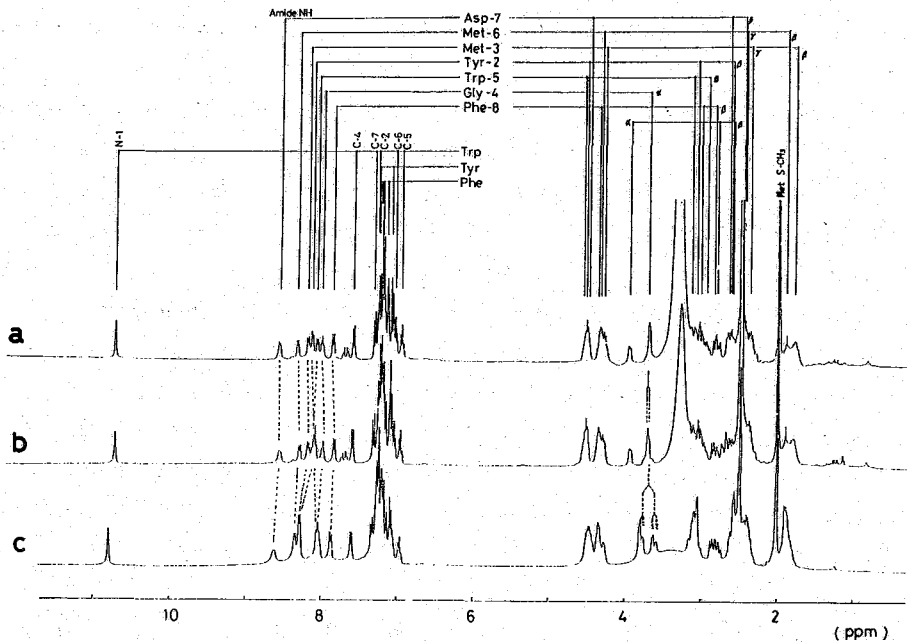


図3. CCK-8の<sup>1</sup>H NMRシグナルの帰属。試料濃度は2mM,含水量はc'-への面積比から試料のa) 20倍当量, b) 8倍当量, c) 3倍当量。

a) 溶液に微量のTFAを加えるとやはり分裂は顕著に変わった。(図4c')。CCK-7についてはDMSO中5mMの溶液でのスペクトルではこの分裂が見られる<sup>2)</sup>。しかし図2 b, cの溶液に水を加えても分裂は解消しなかったことから、CCK-8と-7に関しては少量の水と相互作用し、Gly<sup>4</sup>を中心にある程度flexibleな構造をとることから活性発現に必須条件であるのかもしれない。一方、高次構造の存在を示唆するGly<sup>4</sup>の分裂を示すベータ4つのコホモニオンは、他の生理作用を発現する際に必要にたす可能性もある。Gly<sup>4</sup>周辺のコホモニオンの点だけで生理活性を議論するのは危険であるか、この2種類のコホモニオンか、CCK類のベータ4つの多様な生理活性の一端を示しているように思われる。CCK-7の高次構造としてMet<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Trp<sup>5</sup>間にγ-turn構造が提案されてきた<sup>3)</sup>。一方今回の2D NOEの測定から"flexible"とよってMet<sup>6</sup>のNHプロトンとMet<sup>6</sup>のC<sup>α</sup>との間にNOEが観測され、ある一定の構造をとることから考えられる。さらに各々の構造を詳しく解析し、生理活性と分子構造の相関を解明したい。

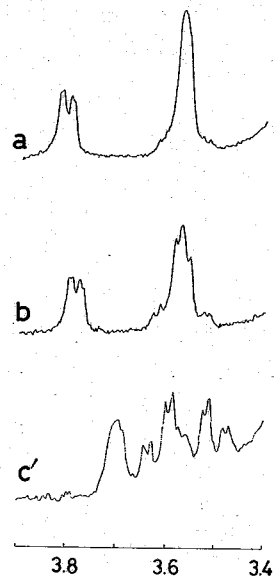


図4. a, bは図3 a, bの拡大, c'はbに少量のTFAを加えたもの。

[文献] 1). Innis, R. B., Snyder, S.H. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 6917-6921.  
2). Durieux, C., et al. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 114, 705-712.

# 61. 神経毒蛋白の構造と機能—二次元NMRによる解析

(東レリサーチセンター) 箱垣 冬彦

(序)

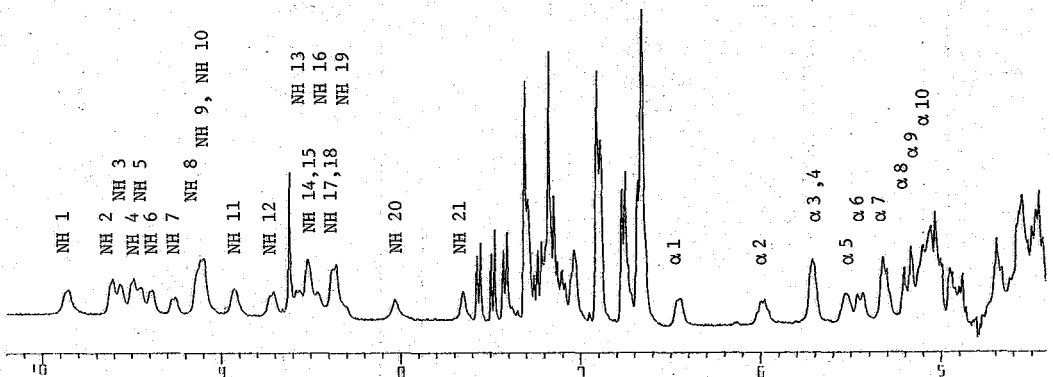
コブラおよび海へびの毒腺より単離される一連の神経毒蛋白はシナプス後膜のアセチルコリンリセプター蛋白と結合し、神経伝達をブロックすることが知られている。短鎖神経毒蛋白としてエラプトキシンb、長鎖神経毒蛋白として $\delta$ -コブラトキシンについて結晶構造解析がおこなわれ、三重鎖の逆平行 $\beta$ シートの存在することが明らかにされた。この $\beta$ シート上に毒性発現に必要な残基が多く含まれていることが示唆されており、 $\beta$ シートが一連の神経毒蛋白に共通な構造であるか、構造と機能の問題を調べる上からも興味深い研究課題といえよう。本研究は*Laticauda semifasciata* III (LS III) をとりあげ、 $\beta$ シートの存在の有無を調べ、 $\beta$ シートに含まれる残基の帰属をおこなうと共に、NOEの build up rate より $\beta$ シートの構造を明らかにすることを目的とする。

(実験)

NMRの測定には日本電子製GX-400を用いた。試料は $\sim 8$  mM ( $D_2O$ )であり、pH 4.5に調整した。10  $\mu$ MのEDTAを加え、脱気を繰り返した後Ar雰囲気中で封管した。測定温度は23°Cである。 $^1H$ シフト相関(COSY)およびNOE相関(NOESY)二次元NMRの測定をおこなった。

( $\beta$ シートの帰属)

図1にLS IIIを $D_2O$ に溶かした直後の400 MHz  $^1HNMR$ スペクトルを示す。溶媒と交換の遅いアミドプロトンは10 ppm $\sim$ 7 ppmの領域に観測されている。一般に $\beta$ シートなど高次構造を形成しているアミドプロトンは溶媒と交換しにくいことが知られており、LS IIIにも $\beta$ シートなどの高次構造が存在することを示唆している。そこでこれらのアミドプロトンの帰属をはじめにおこなった。図2はLS III



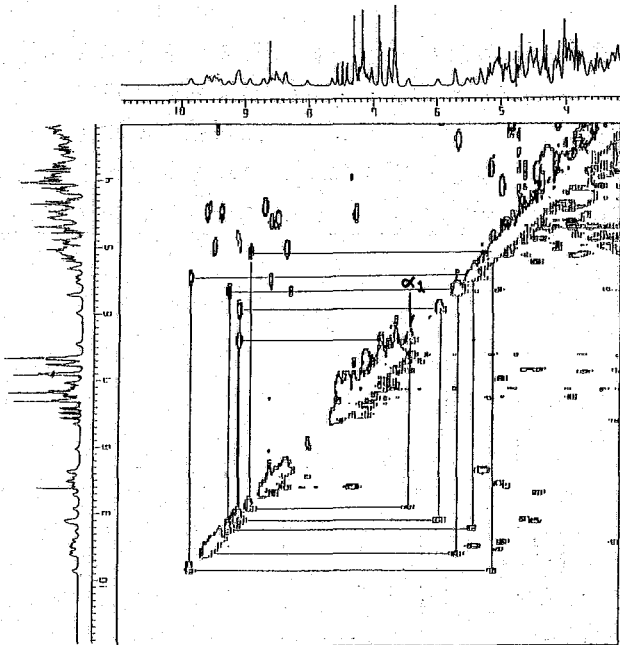
(図1) LS III ( $D_2O$ , pH 4.5, 23°C)の低磁場領域のNMRスペクトル。

アミドおよび $\alpha$ プロトンは低磁場側より番号にて示す。

いながき ふゆひこ

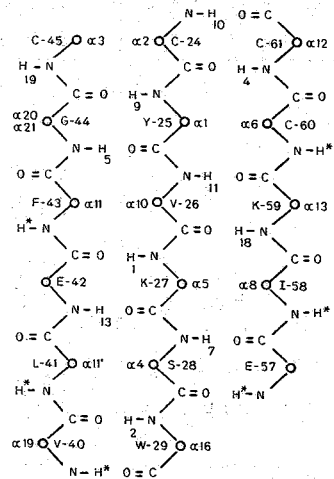


の<sup>1</sup>Hシフト相関二次元スペクトルを左上半分、NOE相関二次元スペクトルを右下半分に示したものである。左上半分では、スピン結合により結ばれたプロトン同士の間には交叉ピークが、右下半分では空間的に近接したプロトン同士の間には交叉ピークが観測されている。βシート構造が存在するとすれば、βシート上のアミノ酸残基のαプロトンに最も近いアミドプロトンはC末端側の次のアミノ酸残基のアミドプロトンであるから、NOE相関二次元スペクトルの交叉ピークより、この近接したアミドおよびαプロトンの組を選び出すことができる(図3参照)。一方同じ残基に属するアミドプロトンとαプロトンはスピン結合により結ばれているから、<sup>1</sup>Hシフト相関二次元スペクトルの交叉ピークよりスピン結合した組を選び出すことができる(図3参照)(1~3)。したがってαプロトンに最近接のアミドプロトンを右下半分の交叉ピークより、更にこのアミドプロトンとスピン結合したαプロトンを左上半分の交叉ピークよりみつけ出すことができる。このようにして既に帰属のついたαプロトンより出発して、順次β鎖に含まれるαおよびアミドプロトンの帰属をおこなうことができる(3)。LSⅢの場合にはTyr-25のαプロトン(α1)より出発すると(NH10-α2)---(NH9-α1)---(NH11-α10)---(NH1-α5)---(NH7-α4)---(NH2-α16)とβ鎖を形成していることがわかる(図2参照)。なお、点線はNOEにより、実線はスピン結合により結ばれていることを示す。( )内は同一のアミノ酸残基に含まれることを示す。一方図4に示すようにα1(Tyr-25α)を照射した時には、α6にNOEが観測されることより、α6は隣のβ鎖に存在する。更にα6を照射した時にはNH4に、NH4を照射した時にはNH10に



(図2) LSⅢの低磁場領域の二次元スペクトル  
 左上半分は<sup>1</sup>Hシフト相関、右半分はNOE相関二次元スペクトル  
 βシートに含まれる残基の交叉ピークを順次結び、β鎖を形成する。α1はβ-スチロールおよびβ-

NOEが観測される(図3参照)。以上二次元NMRスペクトルおよび一次元差NOEスペクトルを解析した結果LS



(図3) LSⅢに含まれる三重鎖の並行βシートとシート上の残基(α, β)の番号は図1参照)

Ⅲには図3に示すβシートが存在することがわかった。このようにエラプトキシンのαやδ-コブラトキシンの結晶構造で見出された三重鎖の逆平行βシートがⅢの場合には溶液中でも安定に存在することが明らかとなった。特に興味深い点は、低磁場にシフトしたアミドおよびαプロトンは主としてβシートに含まれている点であり、これらの低磁場シフトしたシグナルは蛋白質の高次構造を研究する上でよいプローブとなる可能性を示唆する。

〔βシートの構造〕

NOEデータの定量的な解析をおこなうとβシートの構造を決定することができる。NOE相関二次元NMRの測定には $90^\circ-t_1-90^\circ-t_m-90^\circ-t_2$ のパルス系列を用いる。二番目の $90^\circ$ パルスに続く混合時間 $t_m$ の間に、非平衡状態におかれた核スピンは緩和機構により外界にエネルギーを放出すると共に交叉緩和を通して磁化の交換をおこなう(4)。NOE相関二次元スペクトルのうち対角ピークは前者の過程に、交叉ピークは後者の過程を反映している。したがって対角ピークおよび交叉ピークの $t_m$ 依存性を解析すれば緩和パラメータが決定される。二スピンス系(A, B)の場合には磁化の時間変化は次の式にしたがう。

$$dM_A/dt = -\rho_A M_A - \sigma_{AB} M_B \quad (1)$$

$$dM_B/dt = -\sigma_{AB} M_A - \rho_B M_B \quad (2)$$

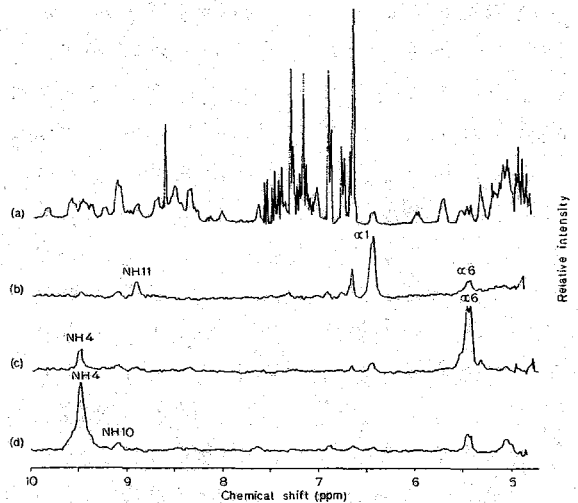
ここで $M_A, M_B$ は熱平衡磁化 $M_0$ からのずれ、 $\sigma_{AB}$ はABスピンス間の交叉緩和、 $\rho_A, \rho_B$ はABスピンス間の双極子相互作用の他にほかのスピンスとの双極子相互作用および他の緩和機構の寄与も含む。この式を初期条件 $M_A(0) = -(1 + \cos \omega_A t_1) M_0$ ,  $M_B(0) = -(1 + \cos \omega_B t_1) M_0$ のもとで解くと対角ピークおよび交叉ピークの強度は(3), (4)式で与えられる。

$$S_{AB}(\tau_m) = \frac{\sigma_{AB}}{\lambda_2 - \lambda_1} (e^{-\lambda_2 \tau_m} - e^{-\lambda_1 \tau_m}) M_0 \quad (3)$$

$$S_{AA}(\tau_m) = \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} \{ (\lambda_2 - \rho_A) e^{-\lambda_1 \tau_m} - (\lambda_1 - \rho_A) e^{-\lambda_2 \tau_m} \} M_0 \quad (4)$$

ここで $\lambda_{1,2} = \frac{1}{2} \{ (\rho_A + \rho_B) \pm \sqrt{(\rho_A - \rho_B)^2 + 4\sigma_{AB}^2} \}$ である。

図5は $\tau_m$ の値を順次かえて測定したNOE相関二次元スペクトルのNH11(Val-26)のところを $\omega_1$ 軸に平行にとったクロスセクションである。対角ピークの強



(図4) LSⅢの低磁場領域の(a) NMR スペクトル  
および NOE 差スペクトル (b) α1, (c) α6  
(d) NH4 をそれぞれ照射

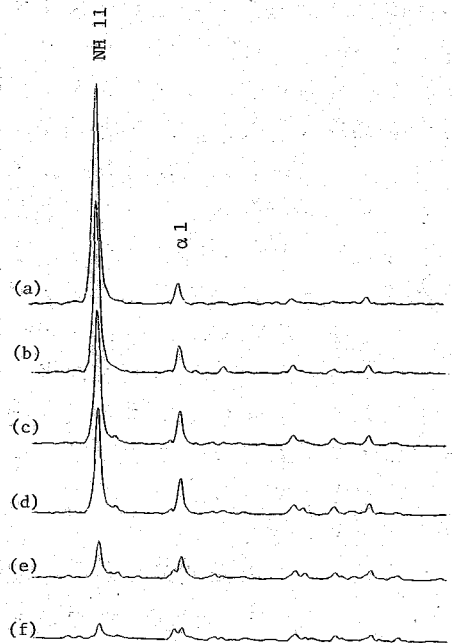
度は  $\tau_m$  が増加するにつれ減少するが、交叉ピークの強度は一たん増大し、以後減少している。図5の対角ピークおよび交叉ピークの面積強度を  $\tau_m$  に対しプロットしたのが図6である。NH 11 の場合には主に  $\alpha 1$  との間には NOE が観測されており、ニスピンス系として (3), (4) 式により交叉ピークおよび対角ピークの  $\tau_m$  依存性を解析する。最少二乗法によりこれらの実験データを再現するパラメータを決定すると  $\rho_A = 11.6 \text{ s}^{-1}$ ,  $\rho_B = 9.7 \text{ s}^{-1}$ ,  $\sigma_{AB} = -2.5 \text{ s}^{-1}$  が得られた。図6の実線は計算値を示す。  $\tau_m$  の小さな領域では交叉ピークの強度は  $\tau_m$  に対し linear であり、その勾配は  $-\sigma_{AB}$  を与える。  $\rho_A$ ,  $\rho_B$  は AB 以外の他のスピンのによる緩和や他の緩和機構による緩和の寄与も含むのに対し、  $\sigma_{AB}$  は A, B ニスピンス間のみの相互作用であり、次式で与えられる。

$$\sigma_{AB} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10r^6} \left( \frac{6\tau_c}{1 + 4(\omega\tau_c)^2} - \tau_c \right) \quad (5)$$

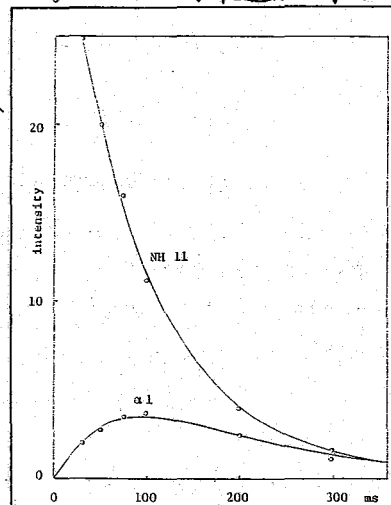
ここで  $r$  は二つのスピンス間の距離、  $\tau_c$  はこの距離ベクトルの運動の相関時間である。したがって  $\tau_c$  が既知の場合には、  $\sigma_{AB}$  より距離を決定することができる。  $\beta$  シートに含まれている  $\alpha$  プロトンやアミドプロトンの場合には、内部運動の寄与は少なく、分子全体の回転相関時間が  $\tau_c$  を決定していると考えられる。LS III の場合には、  $\alpha$  およびアミドプロトンの縦緩和時間と横緩和時間の比より分子全体の回転相関時間を求めると、  $\tau_c = 4.0 \times 10^{-9} \text{ sec}$  となる。この相関時間を (5) 式に代入し、NH 11 と  $\alpha 1$  の距離を求めると  $r = 2.1 \text{ \AA}$  となる。多スピンス系の場合でも交叉ピークの強度の初期勾配より  $\sigma$  を求めることができる。このようにして  $\beta$  シートの構造決定を行なうことができる。

謝辞 LS III を提供していただきました東北大. 理. 田宮信雄教授に感謝いたします。

- 文献 (1) Inagaki et al. Eur. J. Biochem. 123, 99 (1982)  
 (2) Dubs et al. Biochim. Biophys. Acta., 577, 177 (1979)  
 (3) Wagner et al. Eur. J. Biochem. 114, 275 (1981)  
 (4) Macura and Ernst Molecular physics. 41, 95 (1980)



(図5) NH 11 で  $\omega_1$  に平行にとったクロスセクション。  $\tau_m$  はそれぞれ (a) 30ms (b) 50ms (c) 75ms (d) 100ms (e) 200ms (f) 300ms



(図6) 対角ピークおよび交叉ピークの  $\tau_m$  依存性  
 〇は実験値, 実線は計算値である。

## 62. リン脂質二重膜に結合したペプチドのコンホメーション解析: Transferred NOEの応用

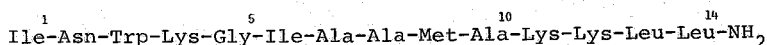
(東大・理) 若松 馨, 東島 勉, 〇宮澤 辰雄

〈はじめに〉 最近多くの生理活性ペプチドの活性発現に リン脂質膜との相互作用が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。たとえば, LHRHや Substance P, 酵母の  $\alpha$ -mating factor<sup>(1)</sup> などのホルモン様ペプチドに関して, そのアナログの脂質との相互作用の様式と, その生理活性との間に相関があることが明らかになっている。そこでリン脂質二重膜に結合した時のペプチドのコンホメーションを解析することは, ペプチドの生理活性発現のメカニズムを明らかにするうえで重要な基礎を与えると考えられる。

いままで溶液におけるペプチドの詳細なコンホメーションは<sup>1</sup>H-NMRによって決定されてきた。しかし, リン脂質膜存在下では, ペプチド由来の<sup>1</sup>Hシグナルは膜脂質由来の<sup>1</sup>H共鳴によってマスクされ, また二重膜にとりこまれたペプチドのシグナルはいちじるしくブロードとなり, それらのシグナルの観測は容易ではない。そこで Wüthrich のグループは完全重水素化したリン脂質のミセル(二重膜ではない)にメリチンなどのペプチドを取りこませて上記の問題を克服してきた。<sup>(2)</sup> しかし, ペプチドが実際に働く場はミセルではなく, 二重膜であるので, 二重膜と相互作用した時のコンホメーションを知ることは重要と思われる。

本研究ではリン脂質二重膜に結合したペプチドのコンホメーションを解析するために, Gronenborn らによって定式化されてきた Transferred NOE (TRNOE)<sup>(3)</sup> を応用して, 完全重水素化ホスファチジルコリンの二重膜に結合したマストパラリン-X (MP-X) のコンホメーションを明らかにした。

マストパラリン-X はキロスズメバチの毒液に含まれるペプチドで, マスト細胞からヒスタミンを含む顆粒を放出させる作用がある。<sup>(4)</sup> その活性発現には MP-X とリン脂質との相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。<sup>(5)</sup> MP-X の一次構造を下に示す (図1)。



(図1) マストパラリン-X (MP-X) の一次構造

〈実験〉 (1) 完全重水素化リン脂質の合成

Kingsley と Feigenson<sup>(6)</sup> の方法に基づき, 完全重水素化した *dilauroyl-phosphatidyl choline-d<sub>64</sub>* (DLPC-d<sub>64</sub>) を合成した。<sup>(7)</sup> 重水素化率は脂肪酸の  $\alpha$ -メチレン (95%) を除いては 98% 以上であった。

(2) DLPC-d<sub>64</sub> ベシクルの調製

ベシクルは, DLPC-d<sub>64</sub> の重水懸濁液を 20 W で 30 分間 sonication して調製した。

(わがまつ かあり, ひがしじま つとむ, みやざわ たつあ)

### (3) $^1\text{H}$ -NMR の測定

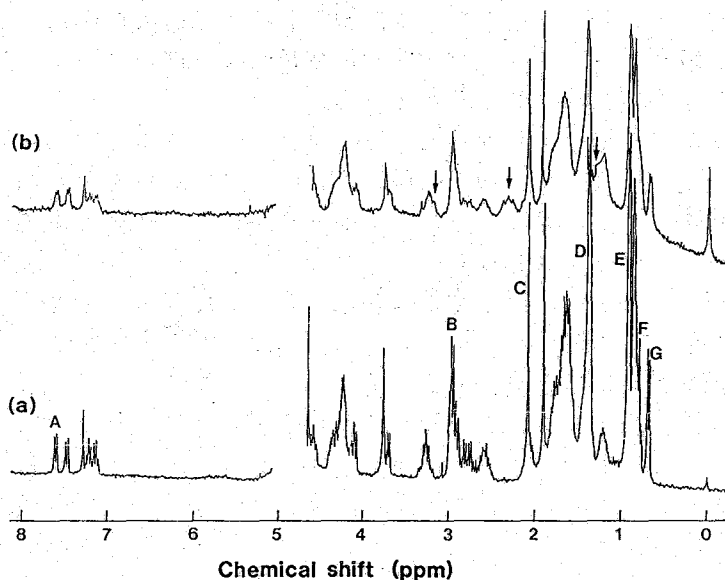
270 MHz  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルは Bruker 社の WH-270 で測定した。  
NOE 測定は free の MP-X のプロトンを, 0.05 ~ 3.6 秒間, gated mode で照射することによって行ない, 結果は差スペクトルとして表した。

ペプチド濃度は 1 mM, DLPC-d64 は 6 mM であり, pH 6.0, 25 °C である。

〈結果〉

#### (1) DLPC による MP-X のスペクトル変化

MP-X の重水溶液に 6 倍モル量の DLPC-d64 ベシクルを加えた時のスペクトル変化を図 2 に示す。



(図 2) MP-X の 270 MHz  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル (1 mM, pH 6, 25 °C)

(a) DLPC-d64 ベシクル非存在下, (b) 存在下 (lipid/peptide = 6/1)

A: Trp<sup>3</sup> C<sup>4</sup>H, B: Lys εCH<sub>2</sub>, C: Met<sup>9</sup> S<sup>1</sup>CH<sub>3</sub>, D: Ala CH<sub>3</sub>, E: Ile<sup>6</sup>, Leu<sup>13,14</sup> CH<sub>3</sub>

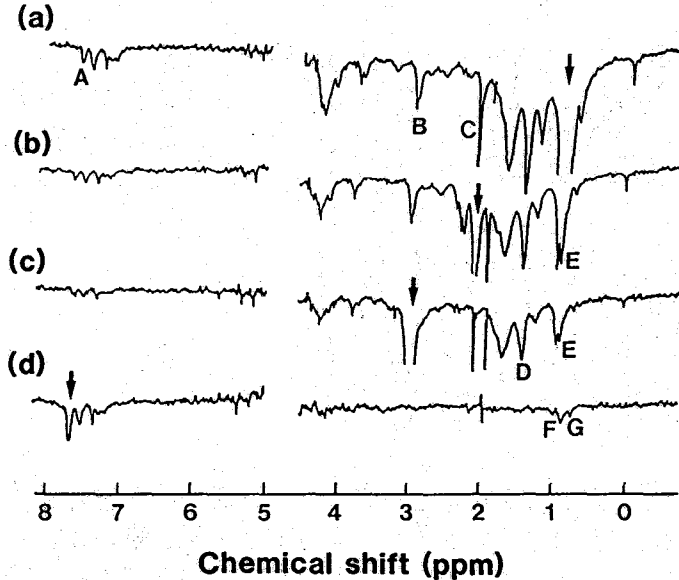
F: Ile<sup>1</sup> δ<sup>1</sup>CH<sub>3</sub>, G: Ile<sup>1</sup> γ<sup>1</sup>CH<sub>3</sub>

ベシクルの添加により MP-X のシグナルはシフトし(狭い)が, 'フレブロードニング' を起こした。これはベシクルに結合した MP-X と free の MP-X との化学交換の速度が化学シフトのスケールで slow から intermediate の領域にあることを示している。このことは, 温度を上げるとシグナルがさらにブロードになることによって, さらに確かめられた。一方, ベシクルに結合した MP-X は運動が遅くなり, シグナルはブロードニングが著しく, 観測されなかった。

#### (2) MP-X の TRNOE

DLPC-d64 ベシクルの存在下で Ile, Leu の CH<sub>3</sub> シグナルを飽和すると, Ala, Met の CH<sub>3</sub>, Lys の εCH<sub>2</sub> などのシグナルに負の NOE が生ずる (図 3-a)。DLPC のベシクルが存在しない時には NOE は観測されないで, 図 3-a の負の NOE は

ベシフルに結合したMP-Xを介するTransferred NOE であることがわかる。すなわち, freeのMP-X分子中のIle, Leu CH<sub>3</sub>に生じた飽和は膜に結合したMP-XのIle, Leu CH<sub>3</sub>に伝わり, その近傍にあるAla, Met CH<sub>3</sub>やLys εCH<sub>2</sub>にNOEを生ずる。そしてそのNOEがやはり化学交換により, freeの分子のAla, Met CH<sub>3</sub>, Lys εCH<sub>2</sub>に伝えられる。



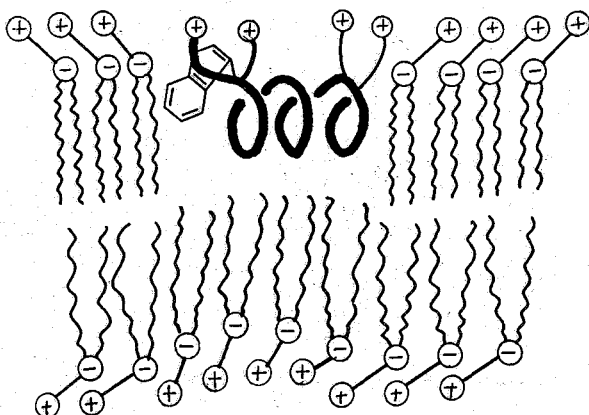
(図3) DLPC-d<sub>64</sub> ベシフル存在下でのMP-XのNOE差スペクトル  
 照射位置(↓)は (a) Ile<sup>6</sup>, Leu CH<sub>3</sub>, (b) Met<sup>9</sup> S-CH<sub>3</sub>, (c) Lys εCH<sub>2</sub>  
 (d) Trp<sup>3</sup> indole C<sub>4</sub>H (帰属は図2を参照)  
 照射は 0.2 W, 30 dB, 3.6 sec; 25°C

このNOEのパターンは照射位置によって変わる(図3a~d)ので, 非特異的なspin diffusionの効果によるものではない。またこのことは, 照射時間を0.05~3.6秒の間で変えても, パターンが変わらないことでも確かめられた。

そこでこのNOE差スペクトルから, MP-XがDLPCのベシフルに結合した際には, どのプロトンとどのプロトンとが近いか——すなわち結合状態でのコンホメーション——がわかる。たとえば図3a~cより, 結合状態でIle, LeuのCH<sub>3</sub>, Met<sup>9</sup>のCH<sub>3</sub>, LysのεCH<sub>2</sub>は互いに近くにあることがわかる。またTrp<sup>3</sup>のインドールプロトンを照射するとIle<sup>1</sup>のCH<sub>3</sub>にしかTRNOEは観測されず(図3-d)。このことは, N末端側のインドール側鎖が, 中央部・C末端側の側鎖と離れていることを示している。一方, CDよりMP-XはPCベシフル存在下で約60%α-ヘリックスを形成していることがわかっている。これらは——MP-Xの中央・C末端部はα-ヘリックスを形成しているが, N末端側の3~4残基はα-ヘリックスに関与していない——とするとよく説明できる。実際に, Ala-CH<sub>3</sub>とGly<sup>5</sup>CaHとの間にTRNOEが存在すること(図には示していない)は, Gly<sup>5</sup>のカルボニルが

Met9のアミドと水素結合を作っていること——すなわち、Glyが $\alpha$ -ヘリックス形成に参与していることを示唆している。

また、MP-Xはリン脂質ミセルと相互作用した時にLys側鎖をミセルの外側に露出させることがわかっているため、MP-Xはリン脂質二重膜と図4のような相互作用をすることができると思われる。



(図4)

マストパラン-Xとリン脂質二重膜との相互作用のモデル

〈考察〉 リン脂質二重膜はミセルとは異なり、一定の分子配列を保っているため、脂質分子の間に働く力だけでなく脂質と「アポチド」との間に働く力もミセルの場合と異なる可能性がある。そこで「アポチド」と生体膜との相互作用を研究する場合、モデルとしてミセルを用いるだけでは不十分で、脂質二重膜を用いる必要があるが、TRNOEの手法はこのような系にもきわめて有効である。

マストパラン-Xとリポソームとの相互作用をTRNOEで観測できたのは、マストパラン-Xがリポソームに結合した状態とfreeの状態との間で化学平衡にあり、かつそのon-off rateが緩和速度のスケールよりも十分に速いからである。したがって、マストパラン-Xのようなアポチドに限らずリン脂質膜とのon-off rateが十分に速い薬物については、TRNOEを用いてリン脂質膜中でのコンホメーションの解析ができるものと思われる。

References

- (1) T. Higashijima, K. Fujimura, Y. Masui, S. Sakakibara and T. Miyazawa (1983) FEBS Lett., 159, 229-232
- (2) L.R. Brown, W. Braun, A. Kumar and K. Wüthrich (1982) Biophys. J., 37, 319-328
- (3) G.M. Clore and A.M. Gronenborn (1982) J. Magn. Reson., 48, 402-417
- (4) Y. Hirai, M. Kuwada, T. Yasuhara, H. Yoshida and T. Nakajima (1979) Chem. Pharm. Bull., 27, 1945-1946
- (5) T. Higashijima, K. Wakamatsu, M. Takemitsu, M. Fujino, T. Nakajima and T. Miyazawa (1983) FEBS Lett., 152, 227-232
- (6) P.B. Kingsley and G.W. Feigenson (1979) Chem. Phys. Lipids, 24, 135-147
- (7) K. Wakamatsu, T. Higashijima, M. Fujino, T. Nakajima and T. Miyazawa (1983) FEBS Lett., in press

### 63. 400MHz $^1\text{H}$ -NMRによる抗腫瘍多糖類の高次構造

(味の素・中研) 〇鈴木栄一郎、安東藤江、藤川昌男、永嶋伸也

$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グリコシド結合を主鎖にもつ抗腫瘍多糖類、すなわち、レンチナンやカードランの水溶液中での分子構造が、中性pH付近でどのようなものであるかは、その機能発現との関連上、興味深い問題である。一般に、これらの多糖類は、水にほとんど溶けないが、レンチナンは、約0.2%程度まで、水に均一に溶解させることができる。一方、超高磁場パルスFT-NMRにすれば、とくに $^1\text{H}$ 核の観測は、このような希薄溶液でも十分可能である。そこで、本研究では、400MHz  $^1\text{H}$ -NMRを用い、とくにレンチナンの高次構造を中心に検討した。

(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンの中性付近での高次構造に関しては、主にX線繊維写真の解析から、レンチナンを初め、<sup>1)</sup>カードランや、<sup>2)</sup>スクレログルカン(scleroglucan)<sup>3)</sup>について、いずれも三重ヘリックス構造であることが示唆されている。また、レンチナンについては、中性域では、粘性の高いコロイドとなり、ゲル化し易いが、アルカリ性(NaOH濃度、0.2N以上)では、粘度は低下し、ランダムコイル状態へ転移すると言われている。この転移点については、斉藤らの<sup>13</sup>C-NMRデータ<sup>4)</sup>から、一重ヘリックス転移(0.17N NaOH, pH13付近)と考えられる。今回、我々は、これとよく一致する、 $^1\text{H}$ -NMR上の転移を見出すとともに、pH10付近での三重ヘリックス転移と考えられるスペクトル変化を観測することができた。この変化は、pH値の変化に敏感なものであり、且つ、(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-グルカンの共存でメタクロマジイ(色調変化現象)を示すコンゴレッドの円二色性(CD)スペクトルも<sup>5)</sup>これらの変化に対応して特徴的なパターンを示すことがわかり、十分意義深い知見が得られたと考えられるので、ここに報告する。

(実験方法) レンチナン(当社品)、カードラン(和光純薬)を、所定の規定濃度のNaOH溶液に、試験管ミキサーを用いて溶解した。ただし、NaOH濃度の低いものについては、まず高い濃度のNaOH溶液に溶解後希釈することにより、所定のNaOH濃度とした。また、中性の試料については、ホモジェナイザーを用いた溶解と、アルカリ溶解後中和の2種を調製した。コンゴレッドは、まず $\text{D}_2\text{O}$ に溶解し、次いでレンチナンのNaOH溶液と混合するという方法で添加した。NMR装置はJEOL JNM-GX-400型FT NMR分光計を用いた。CDスペクトルは、日本分光製のJ-20型自記旋光分散計を用いて測定した。“pH値”は、pH計の読みをそのまま用いた。

(結果と考察) まず、図1(A)に、0.19N NaOH溶液中のレンチナンの $^1\text{H}$ -NMRスペクトルとその帰属を示す。この帰属は、レンチナン分子の主鎖に対応すると考えられるカードランのスペクトル帰属を行なった上で、homo spin decoupling, convolution

すぎきえい ちろう あんどうふじえ ふじかわまさお ながしまのふや



difference法等を用いて考察の上、確定したものである。また、帰属に当っては、図2に示した3つのタイプのグルコース残基だけを考えた。

図1(B)のスペクトルパターンは、(A)と比べて、全体的にbroadであり、とくに主鎖由来(タイプIおよびII残基)のピークのbroadeningが著しい、カードランでもそうであるように、6位のメチレン(CH<sub>2</sub>OD)基が低磁場シフトしていると考えられる、などの特徴を示している。これは、図3の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルの0.7N→0.13Nの変化とよく対応している。本研究では、この変化が、0.17Nで急激に起こるものであることが観測された。0.17N(=pH13付近)で起こるこの現象は、主鎖由来のピークのみ、その広幅化が顕著であり、ランダムコイルからヘリックスへの転移と考えるのが妥当であろう。<sup>4)</sup>

次に、図1(C)の中性スペクトルは、(A)、(B)両スペクトルとは、全く異なる形状を呈している。すなわち、主鎖由来のピークは完全に消失して、若干の極めて幅広いスペクトル成分となった上に側鎖由来ピークが鋭く出現している。そこで、0.06N〜中性の間で、スペクトルパターンの転移点があるものと考え、種々のpHで、<sup>1</sup>H-NMRを測定したところ、pH10.2で、中間的な特徴を示した。また、pH10.8までは、ほとんど(B)の形状と同じであった。そこで、ピークaとピークbとの比(ピーク高)を、pH値に対してプロットした場合、かなりシャープな転移が認められることを予想して実験を行なったところ、図4に示したような滴定曲線が得られた。これは、pH約13(0.17N)での転移に次ぐ、第2の明瞭な転移点であるということが出来る。

ところで、図1(C)のように、側鎖のみが柔らかく(mobile)、主鎖由来のピークがほとんど観測されない構造としては、多重ヘリックス構造を考えるのが妥当であろう。実際、中性ゲルを延伸して得た繊維(fiber)のX線写真の解析が、レンチナン、<sup>1</sup>カードラン<sup>2)</sup>スクレログルカン<sup>3)</sup>などについて報告されており、そのいずれもが、(側鎖残基が外側を向いていると考えられる)三重ヘリックス構造を示唆して

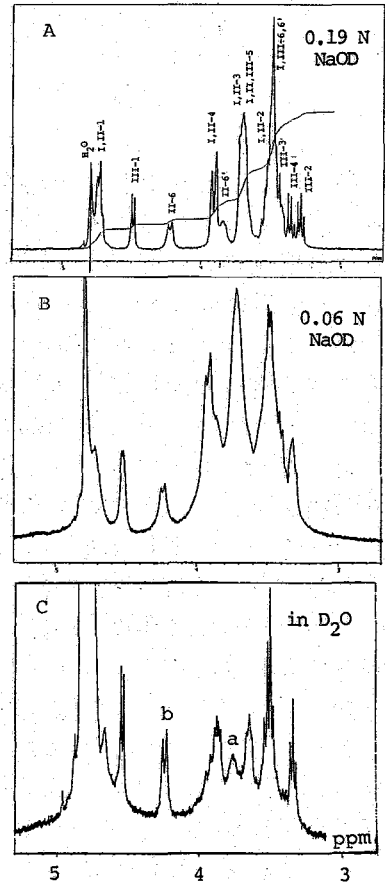


図1. 種々のアルカリ濃度におけるレンチナン重水溶液の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル (0.2%, 積算(A),(B)200回,(C)2800回)

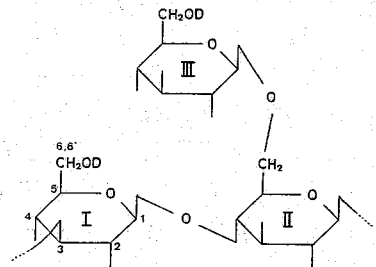


図2. レンチナン中のグルコース残基の結合様式

いることは、この $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの特徴を、よく説明するものである。

生体高分子の中では、蛋白質分子の一重ヘリックス構造由来の $^1\text{H}$ 信号は、比較的シャープなピークとして観測されるのに対し、DNA分子の二重ヘリックスでは、主鎖の運動性が極めて低下し、線幅が非常に広がってしまう<sup>6)</sup>という事例がある。いわゆるヘリックス構造は、一重の場合は意外と柔らかく、多重になると固くなるということは十分うなずけることである。

以上のように、レンチナンは、希薄水溶液中、 $\text{NaOH}$ 濃度 $0.17\text{N}$  ( $\text{pH}13$ )で一重ヘリックス転移、 $\text{pH}0.2$ で三重ヘリックス転移を起こすものと推察される。しかし、この二段階の転移を裏づけるべき、もう一つの根拠が望まれる。そこで、我々は、レンチナンとの相互作用により、メタクロマジ現象を示すことで知られるコンゴーレッドとの共存系の円二色性の検討を行なった。

図5に、レンチナン-コンゴーレッド系の $\text{CD}$ スペクトルのアルカリ濃度変化を示す。測定濃度は、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの場合とレンチナンは同じである。 $0.25\text{N}$   $\text{NaOH}$ 濃度では、 $\text{CD}$ は全く観測されないが、 $0.18\text{N}$ で少しずつ $\text{CD}$ が現われている。また、 $\text{pH}0.2$ で、 $560\text{nm}$ 付近が、 $\oplus$ 側に大きくなりはじめている。そして、中性 $\text{pH}$ では、吸収極大 $520\text{nm}$ 付近を中心に、より明瞭な楕円率分散を示している。このように、 $^1\text{H-NMR}$ と同様、コンゴーレッドによる誘起 $\text{CD}$ も、 $0.17\text{N}$ 付近と $\text{pH}0.2$ 付近で、その様相が変化する。一方、コンゴーレッド過剰添加の $^1\text{H-NMR}$ 測定で、レンチナンの主鎖由来信号の高磁場シフトが観測され、相互作用の様式として、intercalationを想像させた。

また、 $\text{pH}0.2$ ~中性領域での最長波長の $\text{CD}$ の正負は、右巻きヘリックス構造をとる通常のDNA分子の場合と同じであり、この意味でも、X線の結果(右巻き三重ヘリックス)<sup>1), 2), 3)</sup>とよく符号する結果が得られ

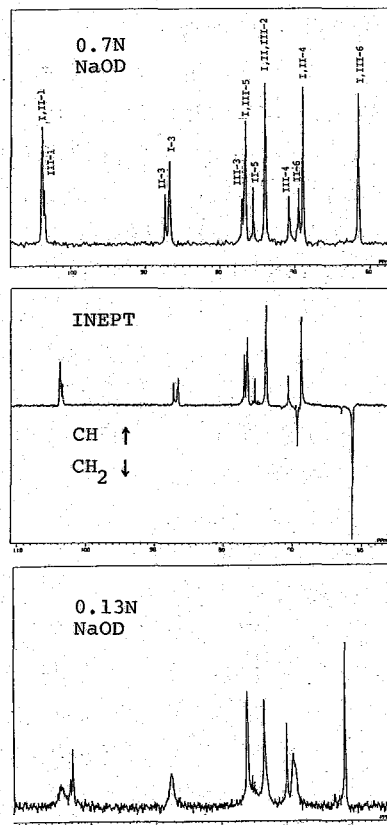


図3. レンチナン重水溶液の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル(上から、 $0.7\text{N}$   $\text{NaOD}$  およびそのINEPT法、 $0.13\text{N}$ の場合)

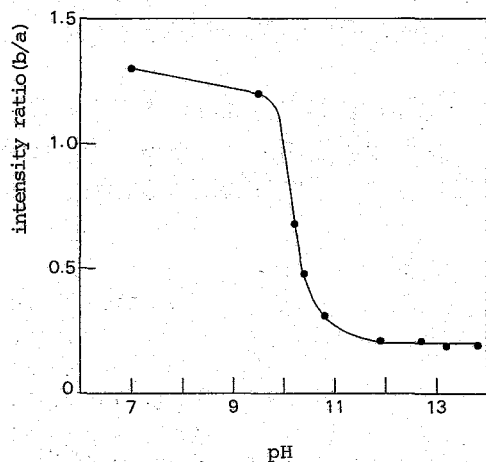


図4. レンチナンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの滴定曲線

たと考えられる。

ところで、アルカリ濃度(pH値)の低下につれ、S/N比もしだいに低下しており、以上述べたような分子の高次構造変化とは別に、分子会合が起こり、それが、S/N比に影響を与えていることは確かである。しかし、転移領域(pH9~11)での各スペクトルのS/N比は、互いにほとんど同程度であった。

次に、レンチナンの中性重水溶液のスペクトルを、スピン拡散法により、側鎖由来のシャープな成分と、主鎖由来のブロードな成分とに分離することを試みた。

図6は、Presaturationパルスを照射して、分子の固い領域に由来するスペクトル成分(図1(C)で幅広い盛上がりとなっている信号)を選択的に飽和させて得たスペクトルである。照射位置が $f_2$ であるにも拘らず、負のNOE(スピン拡散)が、3~4ppmの一群のスペクトル線の下に盛上がり成分を消滅させている。差NOE法による、この成分の半値幅は、約1ppm(400Hz)と求まり、 $T_2^* = 1/2\pi W_{1/2}$  ( $W_{1/2}$ :半値幅)の関係から、 $T_2^* \approx 400\mu s$ と推算することができた。

以上、本研究により、レンチナンの高次構造のアルカリ濃度変化に関し、二段階にわたる転移が明らかになった。

(謝辞) 本研究の遂行に当たり、東京都立大学甲斐荘正恒助教授には、有意義な示唆に富む御議論を頂いた。

(文献)

- 1) T. L. Bluhm, A. Sarko, Can. J. Chem., 55, 293(1977).
- 2) Y. Deslandes, R. H. Marchessault, and A. Sarko, Macromolecules, 13, 1466(1980).
- 3) T. L. Bluhm, Y. Deslandes, and R. H. Marchessault, Carbohydr. Res., 100, 117(1982)
- 4) 青藤 肇. 有機合成化学. 37, 43(1979)など.
- 5) K. Ogawa and M. Hatano, Carbohydr. Res., 67, 527(1978).
- 6) たとえば 永山国昭. 蛋白質. 核酸. 酵素. 17, 6(1972).
- 7) K. Akasaka, M. Konrad, and R. S. Goody, FEBS Lett., 96, 287(1978).

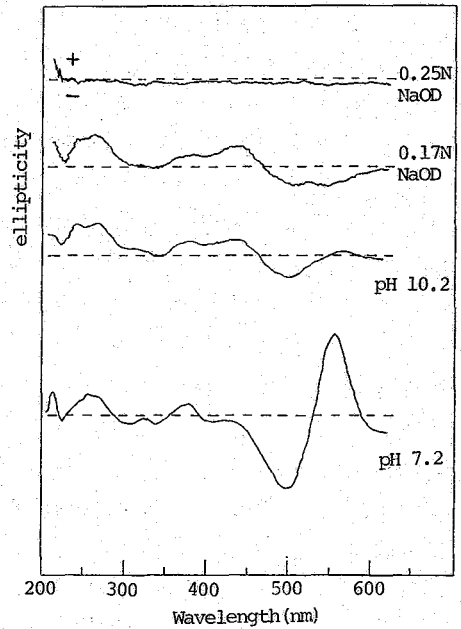


図5. レンチナン-コンゴレッド系のCDスペクトルのpH変化(重量比80:1; モル比340:1)

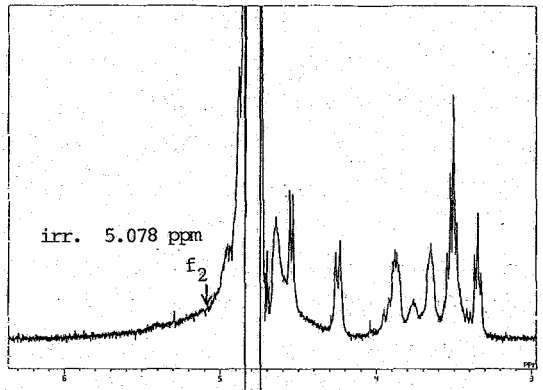


図6. レンチナン重水溶液(中性)の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル. Presaturationパルス照射直後( $f_2$ の位置)

# 64. saturation transfer 差スペクトルと線形解析による 蛋白質の<sup>1</sup>H-NMR における化学交換の研究

(北大理) 伊倉光彦、美野輪治、平沖敏文、矢沢道生、  
ハ木康一、引地邦男

<はじめに>

カルモデュリンは4つのCa<sup>2+</sup>結合ドメインをもつ蛋白質である。Ca<sup>2+</sup>添加による<sup>1</sup>H-NMRスペクトル変化において、N端側のドメイン1と2にある残基のシグナルはfast exchangeを示し、C端側のドメイン3と4にある残基のシグナルはslow exchangeを示すことがわかっている。<sup>1,2</sup> カルモデュリンをほぼ真中から切断した分解フラグメントF12(ドメイン1と2を含む)とF34(ドメイン3と4を含む)は、どちらもnativeな高次構造を保持しており、Ca<sup>2+</sup>添加によるexchangeの性質ももとのものと同じであった。<sup>2</sup> 今日、我々はこの交換過程をsaturation transfer法と線形解析により調べた。

<実験>

カルモデュリンとフラグメントF12、F34は既報の方法により得た。<sup>3</sup> サンプル濃度は3mMで、0.2M KClを含むD<sub>2</sub>O溶液を用いた。

<sup>1</sup>H-NMRスペクトルはJEDL FX-400で測定した。差スペクトルは観測パルスの直前にselective gated decouplingを行ない、on resonanceとoff resonanceをそれぞれ8回積算し、その差のFIDを約100回積算して得た。

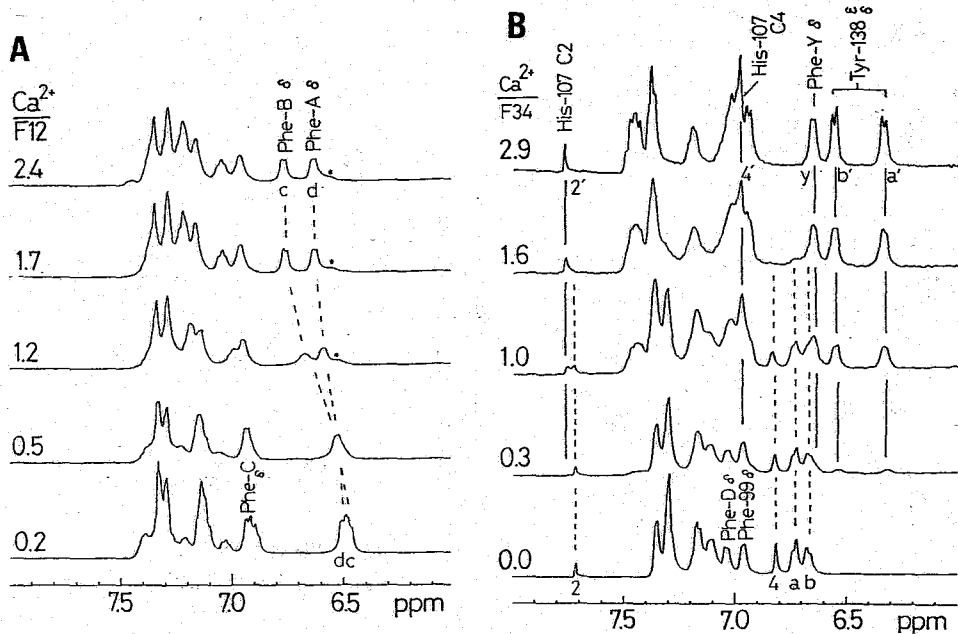


図1. Ca<sup>2+</sup>添加による400 MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトル変化(アロマティック領域)。  
(A) フラグメントF12 pH7.9, 22°C、(B) フラグメントF34 pH8.3, 22°C。

いくらみつこ、みののあさむ、ひらあきとしふみ、やぎのあみちあ、やぎこういち、ひきちくにお

<結果>

F12とF34のCa<sup>2+</sup>添加によるスペクトル変化を図1に示す。化学シフトの差から見積ると、F12のPhe-Aの交換速度は300 s<sup>-1</sup>より速く、F34のHis-107では100 s<sup>-1</sup>より遅いことがわかる。

(i)チロシン-138のsaturation transfer 差スペクトル

図2はTyr-138のδプロトンのCa<sup>2+</sup>結合状態のピークを照射したときの差スペクトルで、Ca<sup>2+</sup>非結合状態の同じδプロトンのピーク(斜線)はsaturation transferによるピーク強度の減少分が差として観測されている。これらのスペクトルは、[Ca<sup>2+</sup>]/[F34] = 0.8のもので、Ca<sup>2+</sup>結合状態と非結合状態の存在比はほぼ等モルである。解析を簡単にするために、照射ピークが照射時間によらず完全に飽和する条件を選んだ。すなわち、この条件下では、saturation transferを受ける磁化MAは、照射時間τの関数として次式で表わせる。<sup>4</sup>

$$M_A(t) = M_{A0} \left\{ \frac{T_{1A}}{T_A} \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{1A}}\right) + \frac{T_A}{T_{1A}} \right\}$$

ただし、  $T_{1A} = \frac{T_{1A} \cdot T_A}{T_{1A} + T_A}$

M<sub>A0</sub>: 平衡状態の磁化

T<sub>A</sub>: M<sub>A</sub>の滞在時間

T<sub>1A</sub>: M<sub>A</sub>のスピン格子緩和時間

図2の斜線部分のピーク面積を照射時間τに対してプロットしたのが図3Aで、磁化M<sub>A</sub>は照射時間の増加に伴い指数関数的に減少した。ln {  $\frac{M_A(t) - M_A(\infty)}{M_A(\infty)}$  } をτに対してプロットし直線回復すると(図3B)、傾きと切辺からT<sub>A</sub> = 0.40 s、T<sub>1A</sub> = 0.86 sが求まる(ただし、[Ca<sup>2+</sup>]/[F34] = 0.8、22°C)。

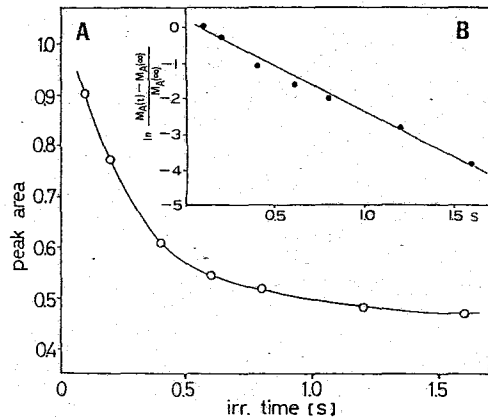
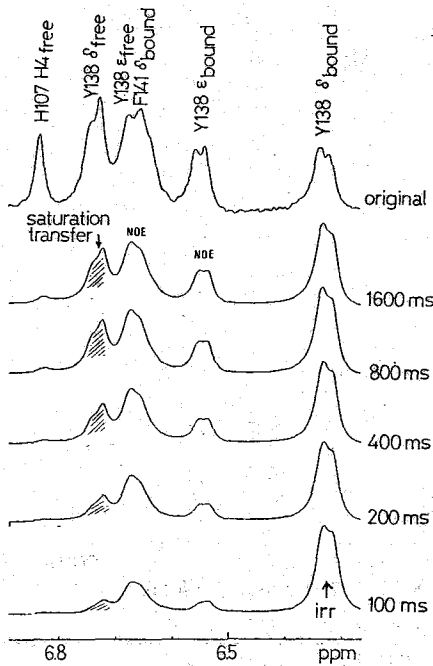


図3 (A) M<sub>A</sub>(t) vs. τ

(B) ln {  $\frac{M_A(t) - M_A(\infty)}{M_A(\infty)}$  } vs. τ

図2. Tyr-138のsaturation transfer 差スペクトル。  
[Ca<sup>2+</sup>]/[F34] = 0.8、22°C、右端に照射時間を示した。

(ii) トリメチルリジン-115の線形解析

カルモデュリノのT<sub>m1</sub>-115のメチルピークの温度変化における線形解析を行ったのが図4である。 $[Ca^{2+}]/[CaM]=1.2$ で、このメチルピークは二本観測されるが、温度を上げると徐々に一本になる。これは交換速度の上昇によると考えられ、McCormellの式によって2つの状態で化学交換がある場合の理論スペクトルを計算した。<sup>5</sup>各温度に対して最適化した速度定数(1/τ<sub>A</sub>)をArrheniusプロットすると(図5)、直線の傾きから活性化エネルギーE<sub>a</sub> = 16 kcal/molが得られる。

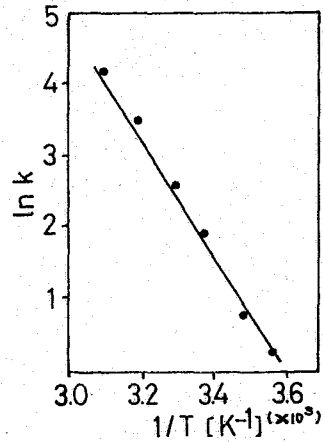
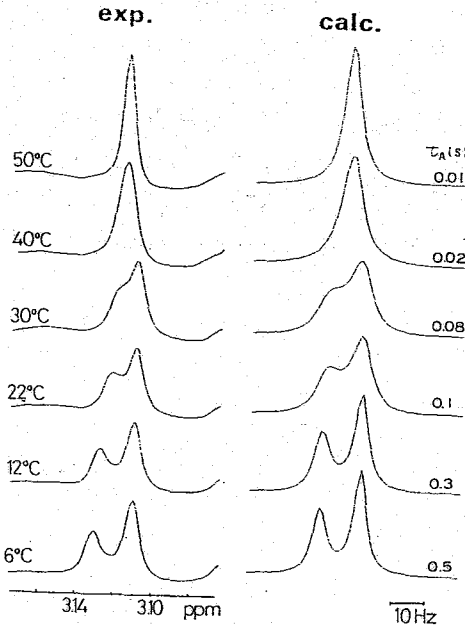


図5. T<sub>m1</sub>-115の交換速度(1/τ<sub>A</sub>)のArrhenius plot.

図4. T<sub>m1</sub>-115のメチルピークの温度変化とτ<sub>A</sub>を変えた理論スペクトル。 $[Ca^{2+}]/[CaM]=1.2$ .

(iii) Phe-AとPhe-Bの線形解析

$[Ca^{2+}]/[F12] = 0.2$ のとき、Phe-AとPhe-Bのδプロトンのシグナルはま、たく重っているが、Ca<sup>2+</sup>添加によって両方とも低磁場へシフトし、 $[Ca^{2+}]/[F12] = 2.2$ では、Phe-BがPhe-Aより低磁場に現れる(図6)。この変化の中間状態のスペクトルを、

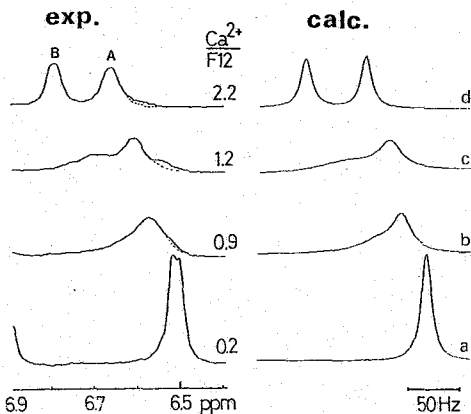


図6. Phe-AとPhe-BのδプロトンのCa<sup>2+</sup>添加によるスペクトル変化(左)と理論スペクトル(右)。

- (a) τ<sub>A</sub> ≃ ∞, τ<sub>B</sub> ≃ 0, P<sub>A</sub> ≃ 1, P<sub>B</sub> ≃ 0
- (b) τ<sub>A</sub> = 2ms, τ<sub>B</sub> = 1.3ms, P<sub>A</sub> = 0.6, P<sub>B</sub> = 0.4
- (c) τ<sub>A</sub> = 2ms, τ<sub>B</sub> = 3ms, P<sub>A</sub> = 0.4, P<sub>B</sub> = 0.6
- (d) τ<sub>A</sub> ≃ 0, τ<sub>B</sub> ≃ ∞, P<sub>A</sub> ≃ 0, P<sub>B</sub> ≃ 1

2つの状態の存在比と滞在時間をパラメーターとした理論スペクトルで最適化した。 $Ca^{2+}$ のモル比が0.9と1.2の2つのスペクトルは、1msから5msの $\tau_A$ を選べば、2つの存在比を変えることで理論スペクトルと一致した。図6には $\tau_A=2ms$ の理論スペクトルを示した。

#### <考察>

この場合の交換とは、蛋白質の $Ca^{2+}$ 非結合状態と結合状態の2つのコンホメーションの間の交換であると考えられる。これは、 $Ca^{2+}$ イオンと蛋白質の間の交換に起因する。2つの状態の存在比がほぼ等しい状態において得られた速度定数( $1/\tau_A$ )は、ドメイン3と4にあるTyr-115とTyr-138で $3\sim 10\text{ s}^{-1}$ 、ドメイン1と2にある2つのPheで $5\times 10^2\text{ s}^{-1}$ であった。

Saturation transfer法は、照射時間と繰り返し時間の実験上の限界のために、速度定数が $10^{-1}\sim 10\text{ s}^{-1}$ 程度の場合に有効であり、完全飽和の条件のために照射ピークはよく分離している必要がある。線形解析はintermediate exchangeによって線幅が広がっている場合に使えるので、 $^1H$ NMRにおける可能なchemical shift差から考えて、速度定数が $10\sim 10^3\text{ s}^{-1}$ の場合に有効である。

#### References

1. Ikura et al., Biochemistry (1983) 22, 2573.
2. 伊倉ら, 生体分子の構造に関する討論会 (1983) 17 大阪.
3. Yazawa et al., J. Biochem. (1978) 87, 1253.  
Toda et al., ibid. (1981) 90, 1493.
4. Cayley et al., Biochemistry (1979) 18, 3886.
5. McConnell, J. Chem. Phys. (1958) 28, 430.

# 65. <sup>1</sup>H NMRによる免疫グロブリンの高次構造の研究

(東大理) 遠藤聡史, ○ 荒田洋治  
(母子医療センター) 清水章

## 1. 本研究の背景と strategy: X線結晶解析との関連

代表的な免疫グロブリンであるヒトIgGは、分子量16万の糖タンパクであり、体内に侵入した異物の認識および補体系活性化による異物の排除をその主な任務とする。IgGの機能は、その独特の高次構造と密接に関連している。IgGのドメイン構造、そのassemblyのstaticな姿は、X線結晶解析により明らかにされている。硬い構造を有するドメインの基本骨格(immunoglobulin fold)は、機能発現の場である水溶液中においても保たれているであろう。しかし、複数のドメインから成るIgGは、分子全体としては、水溶液中においてさまざまな運動の自由度をもつことが予想される。この点をダイナミックな視点でとらえ、IgGの構造と機能の関連を論じるには、水溶液中において、明確に帰属されたアミノ酸残基からのシグナルをマーカーとし、pH、温度、イオン強度などを自由に変化させ、さらに、抗原との相互作用を研究しうるNMRがもっとも適していると考え、実験を続けている。<sup>1)</sup> 赤坂一之博士によってその有効性が示された spin diffusionの方法<sup>2)</sup>は、硬さと軟かさを兼ねそなえ、かつそれが機能と深く関連しているIgGを対象とする場合には、とくに有効である。本研究においては、われわれがこれまでで行ってきた方法に spin diffusionの手法を積極的にとり入れ、IgG分子における flexibilityに関して知見を得るために実験を行った。

## 2. スペクトルの帰属

intact IgG およびフラグメント(Fig.1)の<sup>1</sup>H NMRスペクトルの例をFig.2に示す。

intactなIgG分子の場合、主鎖のα-プロトンを照射して spin diffusion を起こさせると、Fig.3に示すように、ヒンジ領域のHis残基のシグナルが顕著に浮び上がってくる。Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fcについても同様な

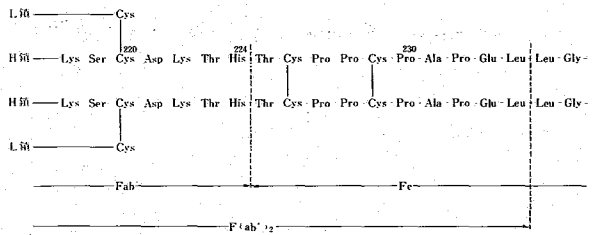
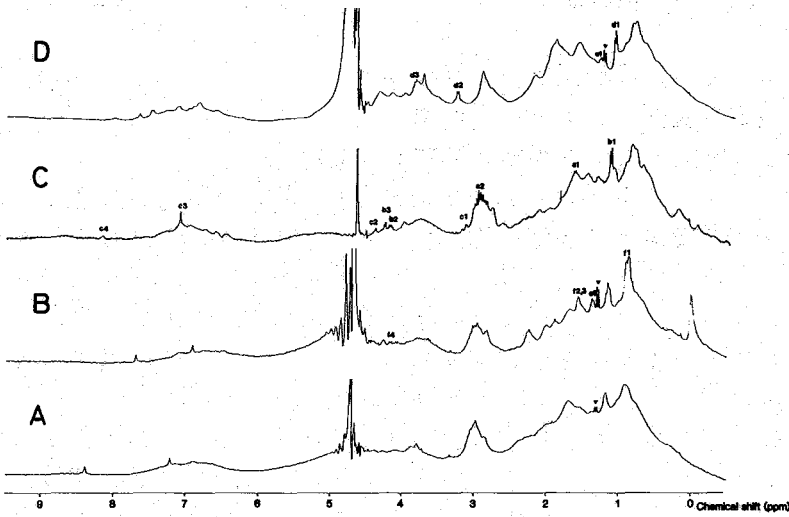


Fig.1 ヒトIgG1のヒンジ領域

実験を行い、分子中のflexibleな部分に存在するアミノ酸残基のシグナルを検出した。得られたスペクトルの帰属を行うため、pH滴定、carboxypeptidaseA、leucine aminopeptidaseによるC末端、N末端残基の逐次限定分解を行った。例として、FcのN末端Thr残基のpH滴定をFig.4に、FabのC末端部分の限定分解によってスペクトルが変化する様子をFig.5に示す。これらの結果をもとに決定した帰属をFig.2に示す。





A. IgG (6.1)  
 B. F(ab')<sub>2</sub> (8.0)  
 C. Fab (7.3)  
 D. Fc (9.0)  
 かつこの値はpH

Fig. 2 ヒトIgGおよびフラグメントの<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

帰属*	1	2	3	4
a Lys-222	δCH <sub>2</sub>	εCH <sub>2</sub>		
b Thr-223	γCH <sub>3</sub>	βCH	αCH	
c His-224	βCH <sub>2</sub>	αCH	C4H	C2H
d Thr-225	γCH <sub>3</sub>	βCH	αCH	
e Ala-231	βCH <sub>3</sub>			
f Leu-234	δCH <sub>3</sub>	γCH	βCH <sub>2</sub>	αCH

\* IgG, F(ab')<sub>2</sub>, FcのHis残基については既報<sup>1a,b)</sup>

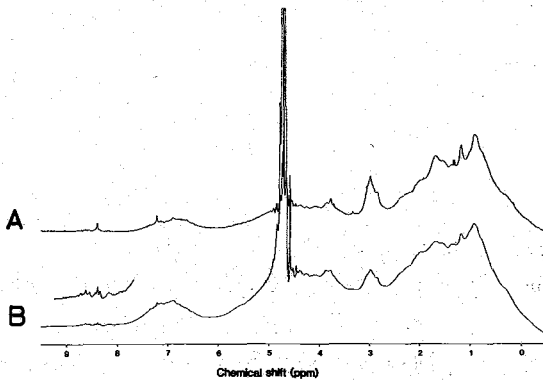


Fig. 3 ヒトIgGの<sup>1</sup>H-NMRスペクトル  
 α-700トンにpresaturateした場合(A)  
 としない場合(B)

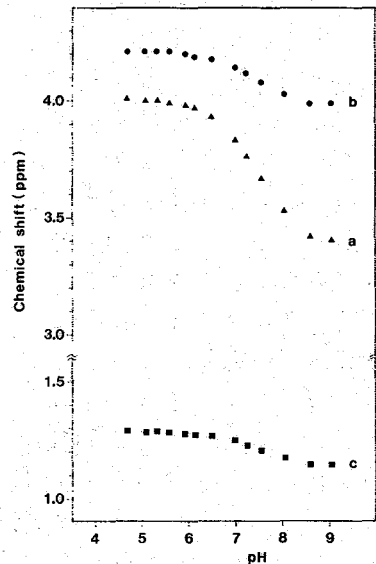


Fig. 4 FcのThr-225(N末端)の  
 pH滴定  
 a, αCH    b, βCH<sub>2</sub>  
 c, γCH<sub>3</sub>

### 3. IgG分子における internal flexibility について

intact な IgG の場合には, spin diffusion の起きている条件では, His-224 の側鎖のシグナルのみが観測される。ここで, H鎖間の S-S 結合を還元アルキル化すると, これに加え, Thr 残基のシグナルが出現する。つづいて, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fc に移行すると, mobile な環境にあるいくつかのアミノ酸残基のシグナルが, spin diffusion により, 浮かびってくる。帰属の結果, これらはいずれも, ヒンジ領域に属するアミノ酸残基によることがわかった。以上の結果は, ヒンジ領域は Lys-222 から Ala-231 にかけて, のびた flexible な構造をもっていること, H鎖間の S-S 結合の還元アルキル化によって, ヒンジ領域の flexibility がさらに増すことを示している。

IgG 分子内に flexible な部分が存在することは, これまで種々の実験により議論されてきた。flexible な部分の存在に由来すると解釈されるさまざまな形の IgG 分子が電子顕微鏡によりとらえられている<sup>3)</sup>。一方, 蛍光プローブをもつハアテンを抗原結合部位に結合したウサギ IgG を用いる蛍光偏光解消の測定から, IgG 内のどこかに, dynamic な flexibility が存在することが示唆されている<sup>4)</sup>。これらを含む多くの実験から, IgG 分子のヒンジ領域が, flexibility にかかわっているものと推定されている。しかし, ヒンジ領域が実際に flexible であることを直接的に示す実験はこれまでのところない。最近, Oi ら<sup>5)</sup>は同一の抗原結合部位をもち,

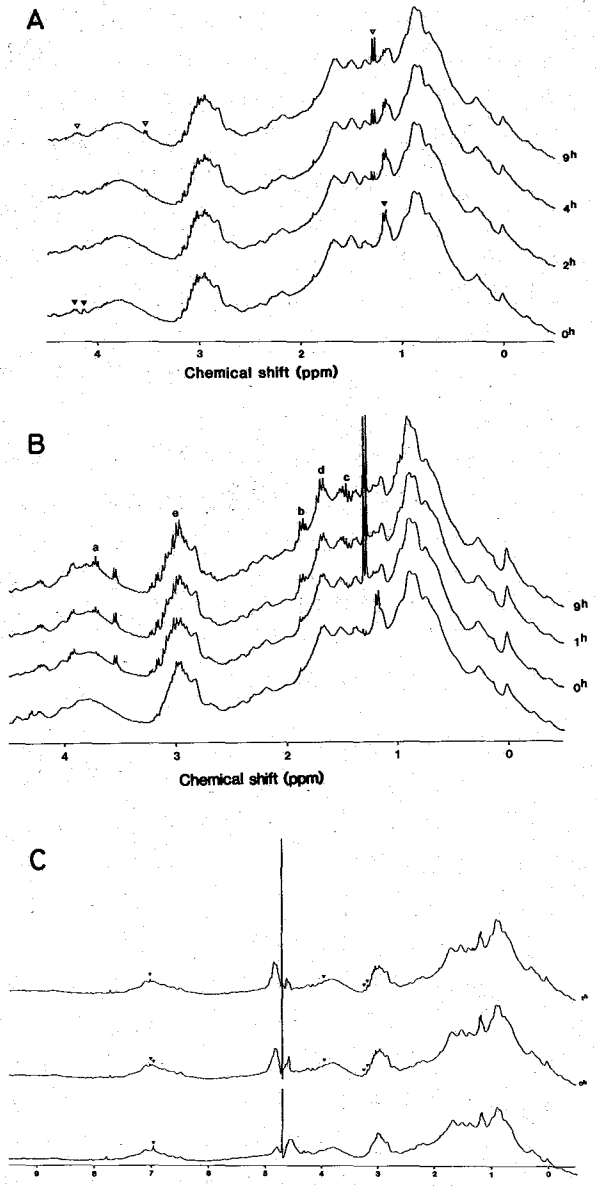
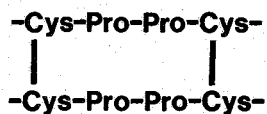


Fig.5 FabのC末端部分のCPase A1による限定分解

- A. E:S=1:4000    ▽ intact FabのThr-223  
                   ▽ 遊離したThrのシグナル(高磁場側から,  $\delta$ CH<sub>3</sub>,  $\alpha$ CH,  $\beta$ CH)
- B. E:S=1:200    遊離したLys-222のシグナル  
                   a,  $\alpha$ CH; b,  $\beta$ CH<sub>2</sub>; c,  $\gamma$ CH<sub>2</sub>; d,  $\delta$ CH<sub>2</sub>; e,  $\epsilon$ CH<sub>2</sub>
- C. E:S=1:4000    ▽ intact FabのHis-224 C4H  
                   ▽ 遊離したHisのシグナル(高磁場側から,  $\beta$ CH<sub>2</sub>(多重線),  $\alpha$ CH, C4H, C2H)

constant regionの異なるマウス抗 dansyl モノクローナル抗体を多量に調製し、蛍光偏光解消の測定を行い、マウス IgG の場合、flexibility がサブクラスによって異なること、flexibility の高いサブクラスほど、補体結合能が高いことを示した。この結果をもとに、ヒンジ領域の構造とエフェクター機能の関連の可能性について、きわめて興味のある議論が行われている。このような現状を考慮すると、IgG 分子中の flexibility について、アミノ酸残基のレベルで理解を深めることが必須と思われる。われわれは、すでに、intact IgG のヒンジ領域の His 残基のイミダゾール環の C2H および C4H が非常にシャープな線幅を与えること、イミダゾール環の pH 滴定曲線 ( $pK_a$  6.5,  $\mu=0.2$ ,  $30^\circ C$ ) が、簡単なオリゴペプチドの場合と完全に一致すること、イミダゾール環の見かけの相関時間は、ウサギ IgG について蛍光偏光解消によって求められた値よりも、少くとも一桁短いことを示した<sup>1b)</sup>。これらの実験結果をもとに、われわれは、ヒンジ領域のペプチド鎖において、His 残基の存在する 224 位付近が、実際に flexibility の源の一つであろうと推定した。ここに報告する実験結果は、IgG 分子における flexibility が、ヒンジ領域のコアとも



の部分の前後の数残基に集中していること、S-S 結合の還元アルキル化により、このコアを破壊すると、ヒンジ領域の形が変化し、flexibility がさらに増すことを直接的に示している。

4. 実験 <sup>1</sup>H-NMR の測定は、Bruker WH-270 分光計を用いて行った。試料は、0.2 M NaCl を含む D<sub>2</sub>O に、10mg/0.3ml の濃度で溶解したものをを用いた。測定温度は 30°C である。ミエローマタンパク IgG1 (Ike-N) およびそのフラグメントは常法により調製、純度は免疫電気泳動、SDS PAGE により確認した (遠藤聡史, 東京大学理学部卒業研究, 昭和 58 年)。Fc フラグメントについては、N 末端のそろった標品を得る条件を HPLC を用いて詳細に検討した。NMR の測定に用いた Fc の標品については、Edman 法により N 末端から逐次的に 4 残基の配列を決定して、その純度を確認した。

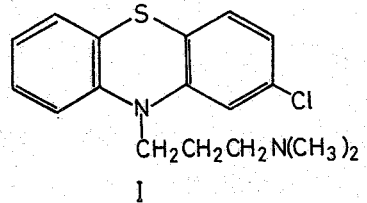
〔謝辞〕 タンパク質研究における spin diffusion の重要性とその可能性についてくりにかえし貴重な議論をしていただいた赤坂一之博士、種々のタンパク質標品における不純物について、未発表データをみせていただいた赤坂一之博士、三森文行博士、横山茂行博士、終始御援助いただいた宮沢辰雄教授、アレプリントをいただき有意義な議論をしていただいた V.T. Oi 博士に深謝いたします。また、タンパク質標品の N 末端逐次分析は崎山文夫教授、網沢進博士により御指導いただきました。厚く御礼申し上げます。

〔文献〕

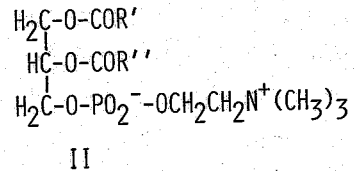
1. a) A. Shimizu, M. Honzawa, S. Ito, T. Miyazaki, H. Matsumoto, H. Nakamura, T. E. Michaelsen, and Y. Arata: *Molec. Immunol.* 20, 141 (1983); b) Y. Arata, M. Honzawa, and A. Shimizu: *Biochemistry* 19, 5130 (1980); c) A. Shimizu, M. Honzawa, Y. Yamamura, and Y. Arata: *Biochemistry* 19, 2784 (1980); d) Y. Arata and A. Shimizu: *Biochemistry* 18, 2513 (1979); e) Y. Arata, A. Shimizu, and H. Matsuo: *J. Am. Chem. Soc.* 100, 3230 (1978).
2. K. Akasaka: *J. Magn. Resonance* 45, 337 (1981); 51, 14 (1983).
3. R. C. Valentine and N. M. Green: *J. Mol. Biol.* 27, 615 (1967).
4. J. Yguerabide, H. F. Epstein, and L. Stryer: *J. Mol. Biol.* 51, 537 (1970).
5. V. T. Oi, T. M. Vuong, R. Hardy, J. Reidler, J. Dangel, L. A. Herzenberg, and L. Stryer: *Nature* (submitted).

66. 分子内および分子間核 Overhauser 効果のクロルプロマジンと  
レシチン vesicle との相互作用の研究への応用  
(京大薬, 京都薬大\*) ○黒田義弘 北村桂介\*

1. NMRによる膜と薬物との相互作用に関する研究にはこれまで線幅, T<sub>1</sub>値, 化学シフト, 強度, 常磁性イオンの添加等の手段あるいはNMRパラメーターが用いられてきた。<sup>1)</sup> 本研究においては核 Overhauser 効果(NOE)の上記相互作用の研究への応用をクロルプロマジン(I)-レシチン(II) vesicle系について試みた結果を報告する。



2. 重水中にて超音波処理(sonication)して得られたレシチン vesicle (3%, w/v) にクロルプロマジン HCl を添加(14 mmol) L JEOL FX-200 (200 MHz) にて <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した。定常状態および時間分割された NOE の測定は約 4 Hz ( $\gamma_{H_2}/2\pi$ ) の照射 rf field の強さにて前者については pre-irradiation time を 5 秒に固定し, 後者については 50-ms ~ 5-s の範囲で変えて測定した。transient NOE は約 130-ms の 180° inversion pulse にて測定した。以上 NOE 測定は全て差スペクトルとして記録した。



3. [1] 定常状態の NOE について

図 1 (a)~(l) に定常状態の NOE 差スペクトルを (m)~(o) には通常の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示す。(a)~(l) は (m) においてラベルされたシグナル A~L をそれぞれ照射して得られた NOE 差スペクトルである。シグナル A~L の帰属を表 I に示す。(CP) はクロルプロマジン由来のシグナルである。クロルプロマジンとレシチンとの相互作用部位については先に北村等により脂肪酸鎖のメチレン(C=D の隣り)のシグナル D がクロルプロマジンの添加によって高磁場シフト[(m)→(n) 矢印で示す]することからフェ)

Table I. Chemical Shifts and Assignments of Peaks A-L of Chlorpromazine (14 mmol dm<sup>-3</sup>)-Lecithin Vesicles (3%, w/v) Solution

peak	chemical shifts Ppm	assignment
A	-0.39	CH <sub>3</sub>
B	0.00	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>
C	0.74	CH <sub>2</sub> C=C, -CH <sub>2</sub> -(CP)
D	0.88	CH <sub>2</sub> CO, -CH <sub>2</sub> -(CP)
E	1.49	NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup> (CP), =C-CH <sub>2</sub> -C=
F	1.95	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup> , CH <sub>2</sub> -NH <sup>+</sup> (CP)
G	2.40	CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup>
H	2.70	N-CH <sub>2</sub> -(CP)
I	3.01	CH <sub>2</sub> OCO, CH <sub>2</sub> OP
J	3.51	HDO(solvent)
K	4.03	CH=CH, CHOCO
L	5.76	Phe(CP)

くろだよしひろ きたむらけいすけ

チアジン環はα-メチレン付近に位置していると指摘されている。そこで初めてフェニチアジン環プロトン由来のシグナルLを照射した場合のシグナルDの位置(0.88 ppm)におけるNOEを観測した結果(L)に見られるごとく確かに0.88 ppmにおいて負のNOE(約-20%)が観測された。しかし注目すべきことは距離的にずっと離れていると考えられるコリンのメチル基(F)や脂肪酸鎖の末端メチル基(A)にも負のNOEが見られることである。この非特異的なNOEが固体や溶液中の生体高分子で見られる“スピン拡散現象”に基づくものであれば他のシグナルを照射しても同様の非特異性が観測されるはずであり、シグナルA~Kを照射してみると確かにいずれの場合にも他のシグナル位置に負のNOEが観測された。これらNOE差スペクトルにおいて注目すべきことは負のNOEが異種分子間にも見られることである。そこでこのようなNOEの非特異性がレシチンvesicleがクロルプロマジンを含む(あるいは相互作用している)ために起こるのかどうかcheckするために一応相互作用はないと思われるニコチンアミドをレシチンvesicle溶液に添加した試料につき同様の測定を行なった(図2)。図2から明らかなように負のNOEの伝達“Saturation transfer”はレシチン由来のシグナル相互に限って見られる。またニコチンアミドのピリジン環プロトン相互には正のNOE(5~10%)が観測されている。図1,2の結果は(1)相互作用のないニコチンアミドは溶液中を自由に動いていて速い(ωτ<<1)運動状態にあることを、(2)クロルプロマジンについてはレシチンvesicle中に取り込まれて遅い(ωτ>>1)運動状態にありレシチンのプロトンからの負のNOEが伝わる程度、いいかえればdipole相互作用が効果的に働いているほどの距離に存在していることを、(3)しかしこのSaturation transferによ

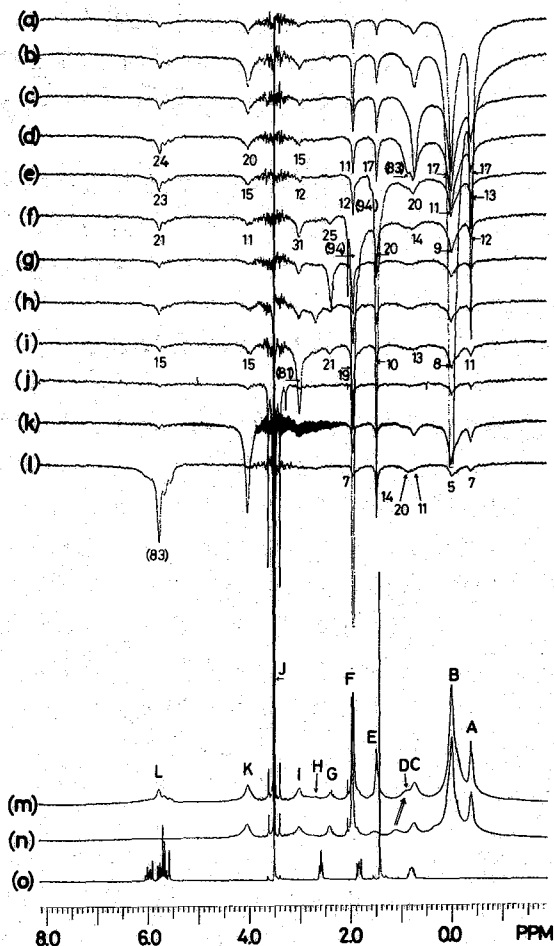


図1. (a)~(l) Chlorpromazine-HCl-lecithin vesicles 重水溶液の定常状態 NOE差スペクトル  
 (m) Chlorpromazine-HCl-lecithin vesicles 重水溶液の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル  
 (n) Lecithin vesicles 重水溶液の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル  
 (o) Chlorpromazine-HCl 重水溶液の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

りNOEは二次的にLニチンvesicle中のプロトンに広がってしまうため定常状態のNOEからは相互作用部位に関する確かな知見が得られにくい— これらのことを明白に示している。

[II] 時間分割されたNOEについて

このような定常状態のNOEで失われた特異性を回復するためには各シグナル位置におけるNOEの生長過程を時間分割して追跡し、それぞれの初期の段階における“build-up rate”を比較する方法がとられる。<sup>3)</sup> 図3にシグナルLについて照射時間を変えながら測定したNOE  $\eta(t)$  の生長曲線を示す。縦軸は定常状態におけるNOE値  $\eta(s)$  との比(%)で示した。図3から build-up rate はシグナルDについてと比べて速く  $D \gg E > F > B > A$  の順に遅くなっていることがわかる。この結果はシグナルDがクロルプロマジンにより高磁場シフトするという現象を良く説明する、つまりフェノチアジン環はメチレン近傍に位置しているという先の指摘<sup>2)</sup>を強く支持するものである。

そこでさらにクロルプロマジンの他の部分、特に側鎖の位置に関して知見を得るために同様の build-up rate の測定をシグナルD, E, F, Iを照射した場合についても行った。その結果を build-up rate の順序及びそれらから判断される距離的に近い関係にあるプロトンの種類として分類したものを表IIに示す。この表から明らかかなようにNOEの生長の初期 ( $t = 0.1 \sim 0.3$  s) 段階における build-up rate を比較検討することは  $CH_2CO/CH_2OCO$ ,  $N(CH_3)_3^+/CH_2OP$ ,  $CH_2N^+$ ,  $CH_2OP/CH_2N^+$

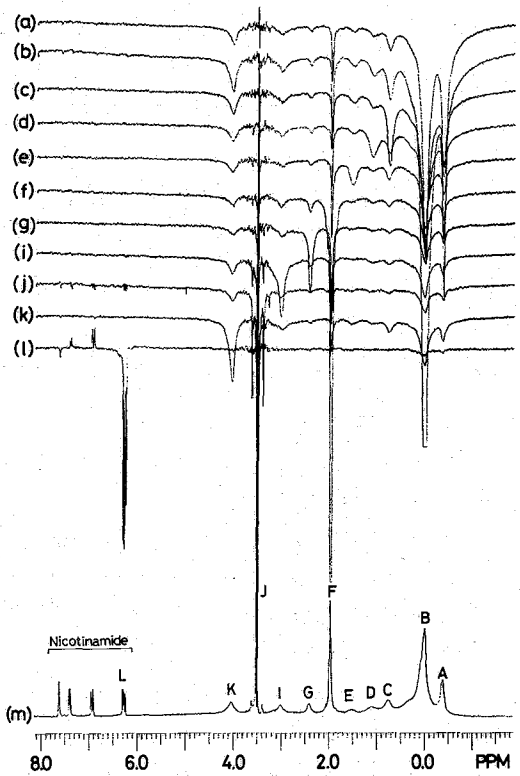


図2. (a)~(l)ニコチンアミド-leucithin vesicles 重水溶液のNOE差スペクトル (m) 同溶液の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

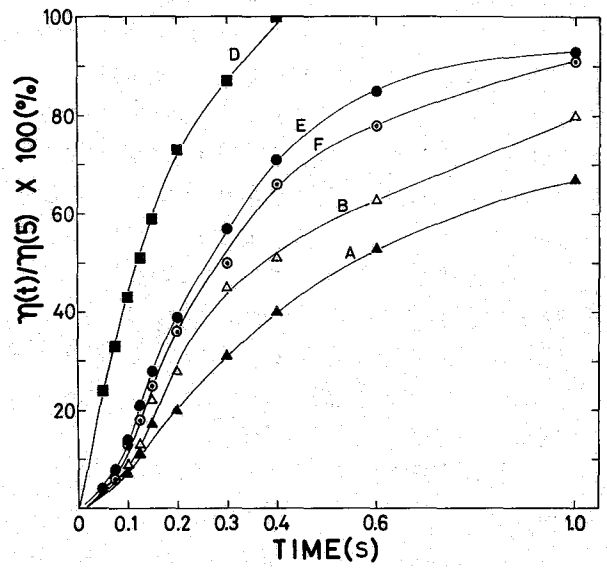


図3. Peak Lを照射した場合のPeak A, B, F, E, D位置におけるNOEの照射時間依存性

Table II. Observed Orderings of Relative Rates of Growth of NOEs and Locations of Protons

peak	assignment	observed ordering <sup>a</sup>	location of protons near
L	Phe (CP) <sup>b,c</sup>	D ≫ E > F > B > A	CH <sub>2</sub> CO
D	CH <sub>2</sub> CO, -CH <sub>2</sub> -(CP) <sup>b</sup>	I, E > L > B > F, K ≫ A	CH <sub>2</sub> OCO, NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup> (CP) <sup>b</sup> , Phe (CP) <sup>b,c</sup>
E	NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup> (CP) <sup>b</sup> =C-CH <sub>2</sub> -C=	C, I ≥ F ≥ K, L > B ≫ A	CH <sub>2</sub> OP, CH <sub>2</sub> C=C, N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>
F	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup> , CH <sub>2</sub> -NH <sup>+</sup> (CP) <sup>b</sup>	I > G > D > E > C, L > K > B ≫ A	CH <sub>2</sub> OP, CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup>
I	CH <sub>2</sub> OCO, CH <sub>2</sub> OP	G, K > D > F > C > E, L > B ≫ A	CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> , CHOCO, CH <sub>2</sub> CO

<sup>a</sup>Decreasing rates of growth of NOEs are shown from left to right.

<sup>b</sup>(CP): chlorpromazine.

<sup>c</sup>Phe: phenothiazine ring protons.

といたレニチン分子における近いプロトンの関係を正しく説明していることがわかる。そこでクロルプロマジンとの相互作用部位について注目すれば、クロルプロマジンのN-ジメチル基がグリセロール及びコリンのメチレン基(CH<sub>2</sub>OP)に近い関係にあることがわかる。このことから④の電荷を持つN-ジメチル基が⑤の電荷を持つリン酸基と相互作用していると結論することが出来る。

#### 〔Ⅳ〕 相互作用部位におけるプロトン間の距離rの推定

図3に示したようなNOEの生長曲線の如くにおける勾配は照射しているプロトンと観測しているプロトン間の交叉緩和速度σ<sub>ij</sub>として近似的にはとらえることが出来る。<sup>4)</sup> このσ<sub>ij</sub>はr及びω相関時間τとσ<sub>ij</sub> ∝ τ/r<sup>6</sup>の関係を持つからrがわかればrを推定することが出来る。そこで逆にレニチン分子内においてrの推定が可能な上記のいくつかのpairについてτを見積もるとτ ≈ 10<sup>-8</sup>secとなった。この値から相互作用の距離を推定してみるとフェニチアジン環プロトン-メチレン間が3~3.3Å, N-ジメチル-CH<sub>2</sub>OP間は3.4Åとなった。さらにN-ジメチル-コリンメチレン間について計算すると約3.5Åとなる。この距離はコリン部分が膜表面に水平に"bent"している構造をとっている場合のみ可能なものである。

#### 〔文献〕

- 1)たとえば寺田弘, 吉川研一; 膜学入門, P65-87, 喜多見書房, 東京(1978).
- 2) Kitamura, K.; Kano, H.; Yoneyama, K.; Hozumi, K. Mol. Pharmacol. 1981, 20, 124-127.
- 3)たとえば Dubs, A.; Wagner, G.; Wüthrich, K. Biochim. Biophys. Acta 1979, 577, 177-194.
- 4) Dobson, C.M.; Olejniczak, E.T.; Poulsen, F.M.; Ratcliffe, R.G. J. Magn. Reson. 1982, 48, 97-110.

## 67. 部分測定のためのコイル形状とその特性の研究

(日本電子)・梅田雅弘, 江口憲二, 小川秀次郎  
(新潟大脳研)湯浅龍彦, 栗原武夫

生体の特定部位の表面あるいは内部の高分解能NMRスペクトルを得る方法として、サーフェイスコイル法<sup>1)</sup>がある。しかしサーフェイスコイルが作るRF磁場には、コイルの形状に依存した一定の強度分布があり、コイルから遠くなる程分布の広がりや大きくなるため、測定部位の限定は困難となる。この点を解決すべく、焦点磁場法<sup>2)3)</sup>や、高周波シールド法<sup>4)</sup>などが提案されている。我々はサーフェイスコイルによる選択性向上を目的とし、形状の異なる4種類のコイルを試作し、選択性・検出感度に関する検討を行った。

### 実験

測定に用いた装置は JNM-GX270 ワイドボワ (ボワ径 89 mm) である。測定核は  $^31P$ 、共振周波数は 109 MHz である。RF磁場分布および信号強度の測定には、小球 (1.5 mm $\phi$ ) 中に入れたい 85%リン酸を用いた。測定に際し、試料をコイルに対して、Z軸方向に移動可能な試料固定台 (図1) をプローブ先端にとりつけて行った。小球の位置決めは、小球の支持棒 (図1a) につけた 1 mm 間隔の目盛、および固定台 (図1b) に 2 mm 間隔にあけた小球の支持穴により行った。この試料移動機構によりコイル面に対しコイルの中心線上の無直な一平面における各点での 90°パルス幅と信号強度を求めた。測定時、信号の線幅 (半値幅) が一定になるよう分解能調整し、得られたピーク高さを信号強度とした。

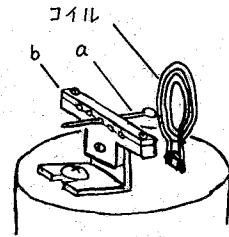


図1 試料固定台

ダイアフラムプロブの上にコイルおよび試料移動機構をつけて。

コイルはハンダにて接着する。

試料移動機構はネジ止め。

コイルにより中心位置が必要なるためZ軸方向の調整可能。

試作したコイルは図2に示した平面コイル (a) 円錐形コイル (b)、ソレノイドコイル (c)、平面楕円コイル (d) の4種類である。

一般に用いられているサーフェイスコイルは、平面コイル (a) である。

線材はすべて 0.6 mm $\phi$  のホルマル線を用いコイル各々のインダクタンスはほぼ等しくなるよう作製した。

うめだまきひろ、えぐちけいじ、おがわひでじろう  
ゆあさたつひこ、くわばらたけお、



## 結果と考察

図3に各コイルの信号強度の実測結果を示す。横軸とたて軸はそれぞれコイル中心からコイルに平行方向の距離、コイル中心からコイルに垂直方向(奥行き方向)の距離を示す。

図中の太線は信号強度の等しい点を結んだ等強度線である。

数値はコイルAの中心点(a)の信号強度を1.0としてノーマライズした値である。他のコイルについても同じノーマライズ値を用い、コイル間の信号強度比較を可能とした。

図中の黒丸はコイルの位置を示す。コイルDの実線と点線は楕円コイルの短軸、長軸上での値である。

黒丸もそれぞれ太線は短軸、点線は長軸のコイル位置を示す。

図3の結果から明らかのようにコイルBはコイル先端の内径に等しい部分にフラットなRF磁場分布特性を持ち、その外側で信号強度は急激に減少している。

このことは測定部位の大きさをコイル先端径で限定することが可能であり、局所の限定領域を測定する目的には他のコイルより優れた特性を持っている。

コイルCは通常高分解能NMRで用いられるコイル形状であり、コイル内部は極めて良いRF磁場均一性を持っている。又コイル外では急激に信号強度が減少しており生体測定時突出した

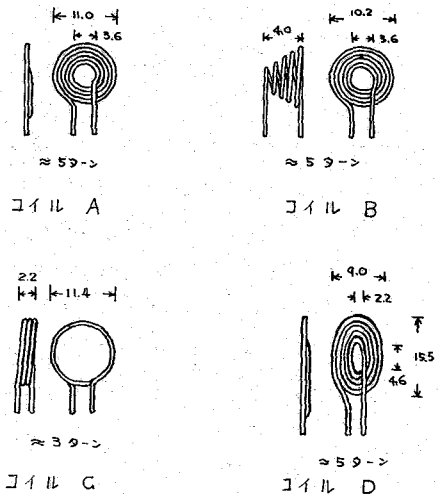


図2 種々のコイル

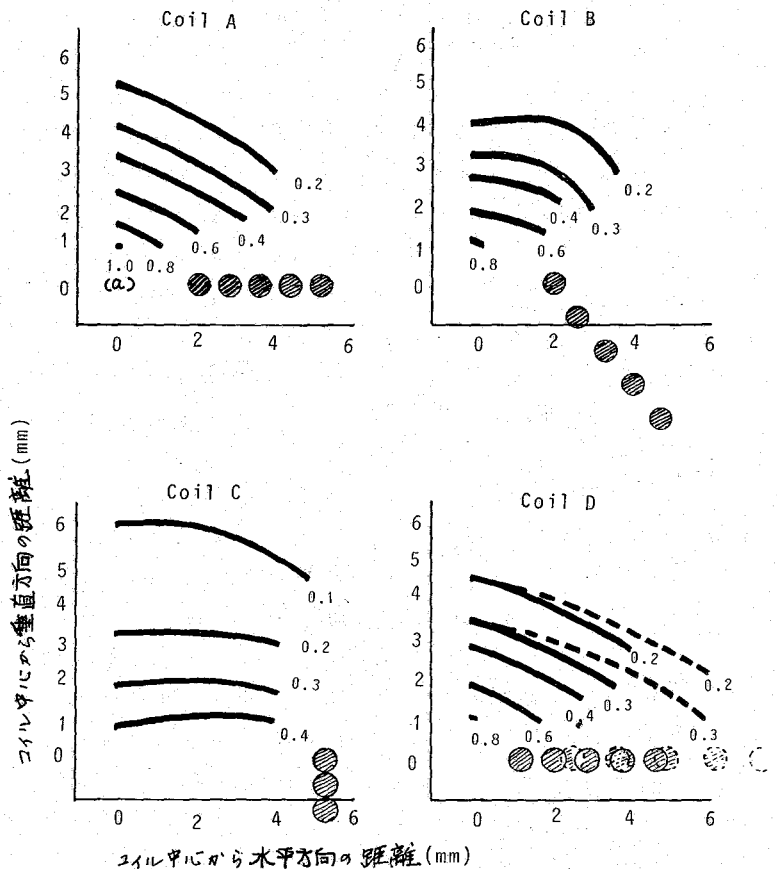


図3 各種コイルの信号強度分布

部分(皮膚ガン等)測定に対して適する。

コイルDは細長いRF磁場分布を持つことから筋肉等を効率良く測定出来ることを示している。

以上コイル形状によりRF磁場分布は大きく異なるため測定対象部位に最適なコイルの選択が必要であることを示した。

一方、一般的にコイル面に近い部分よりの信号帯域は大きく、深部を測定する場合に、コイル近傍の信号を除くことが問題となる。図4にコイルAの中心軸上の各位置(1, 2, 3, 4, 5 mm)における信号強度のパルス幅依存性を示す。例えば10  $\mu$ secのパルス幅は1 mmの位置では270°パルスに相当し、良の信号を与え、5 mmの位置では60°パルスに相当する。

コイルに近い部分の90°パルス幅が短くなっていることは、パルス系列の応用により、強制的にコイル近傍の信号を減少させ、深部の信号を相対的に増大させ得る可能性を示している。具体的には、Pre Saturationパルスによりコイル近傍の信号のみを飽和させる方法、パルス幅をある範囲で変化させて、パルス幅の短い部分の信号をキャンセルするように積算する方法、またスピニング法の応用で、特定のパルス幅をもつ部分のみを測定する方法などがある。これらのパルス系列をコイルBに適用し、実行き方向の選択性向上に対する検討を併せて報告する。

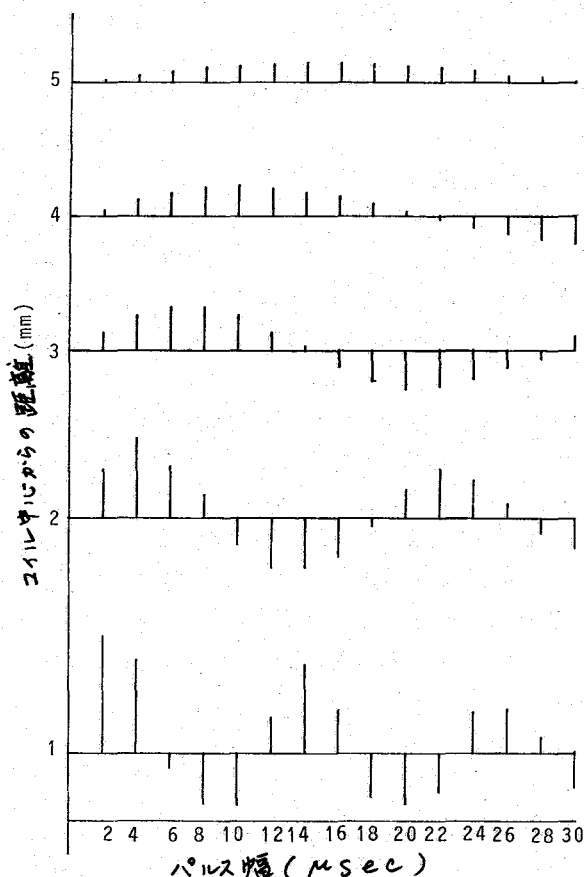


図4 異なる位置における  
信号強度のパルス幅依存性  
コイルに近い部分は少ないパルス幅変化  
でも信号強度は大きく変化している。

## 文献

- 1) J. J. H. Ackerman, T. H. Grove, G. G. Wong, D. G. Gadian, and G. K. Radda, Nature, Vol 283 167 (1980)
- 2) R. E. Gordon, P. E. Hanley, D. Show, D. G. Gadian, G. K. Radda, P. Styles, P. J. Bore, and L. Chan, Nature, Vol 287 763 (1980)
- 3) P. E. Hanley and R. E. Gordon, J. Magn. Reson. 45 520 (1981)
- 4) T. C. Ng, W. T. Evanochko, and J. D. Glickson, J. Magn. Reson. 49 526 (1982)

○山本悦治\*, 松井茂\*, 黒田正夫\*, 塩野英巳\*, 河野香樹\*, 津田宗孝\*\*  
(\* 日立中研, \*\* 日立邦珂)

はじめに

Lauterburの提案に始まるNMRイメージング<sup>(1)</sup>は、近年急速な進展を見せ、現在では幾種かの異なった方法に基づく全身用装置が臨床試験に供されている。これら全てのNMRイメージングに共通する特徴は、(1)安全性が高い、(2)任意断面のイメージングが可能、(3)軟部組織の識別に優れる、(4)骨の影響を全く受けない、などであり、X線CTと相補的な能力を有する診断法として期待されている。しかし、これまで種々のイメージング法が提案されているにも拘らず、同一の装置で異なったイメージング法を試み、比較を行った例は我々の知る限り見当たらない。本報告は、これらの方法を信号検出法という点から、SSFP(Steady State Free Precession)法<sup>(2)</sup>とSE(Spin Echo)法に便宜上分け、各々代表的な方法を選んで、イメージング例を中心に比較検討したものである。実験では0.1~1.5Tで強度可変の中型超伝導磁石を静磁場発生に用いているが、ほぼ最小値の0.15Tに設定してプロトンのイメージングを試みた。イメージングに用いたパルスシーケンスは、我々の考案になるものであり、従来まで報告されている方法に比べ幾つかの利点を有するので、それについても報告する。

SSFP法とSE法の特徴比較

SSFP法では非選択高周波パルスを間欠的に照射し、スピンの強制平衡状態を作り出すため、短時間に多数の信号を加算することができる。SSFP法のこのような性質を最初にイメージングに応用したのはHimshawである<sup>(3)</sup>。彼は傾斜磁場を低周波で振動させることにより、振動成分が

表1 SSFP法とSE法の比較

ほぼ零と見做せる領域から発生するSSFP信号だけを残し、他領域からの信号は平均化して消去する方法を提案した。次で、Mooreらはこの方法と投影-再構成(PR)法とを組合せ、初期のX線CTにも匹敵する人体断面のイメージングに始めて成功した<sup>(4)</sup>。SSFP信号の強度Sは、 $T_1, T_2 \ll T$ のとき次式で与えられる<sup>(5)</sup>。

$$S = \rho \sin \alpha / \{T_1/T_2 + 1 - \cos \alpha (T_1/T_2 - 1)\} \quad (1)$$

ここで、T; 高周波パルスの周期、 $\rho$ ; スピン密度、 $\alpha$ ; フリップ角度

信号検出法 (イメージング法)	SSFP法		SE法	
	PR	PR	PR	FT
測定時間	◎	○	○	○
測定パラメータ	$\rho T_2/T_1$	$\rho, T_1, T_2$	$\rho, T_1, T_2$	$\rho, T_1, T_2$
情報量	○	◎	◎	◎
マルチスライス	不可	可	可	可
装置構成	◎	×	×	○
センタリング	×	×	×	◎
静磁場不均一の影響	×	×	×	◎

◎ 優れる ○ 普通 × 劣る

やまもと えつじ, まつい しげる, くろだ まさお, しおの ひでみ,  
こうの ひでき, つだ むねたか

いま1秒間測定を行うとS/Nは1回の測定値の1/行倍になるので、 $\alpha=90^\circ, T_1 > T_2$ とすれば  $S = \rho T_2 / (T_1 \sqrt{T})$  と見做せる。Tは信号の帯域とサンプリング数で決まり、全身用装置では通常2.5ms程度である。従って、例えば  $T_1 = 500\text{ms}$ ,  $T_2 = 100\text{ms}$  の生体組織を考えると、 $S = 4\rho$  となり、1秒間に1回の測定しか行えないSE法に比べ4倍S/Nが向上する。しかし、その反面得られる情報は、 $\rho$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  の混在したものとなり、これらを容易には分離できない欠点がある。また、SSFP法では原理上マルチスライスが不可能である。装置構成の点では、SE法とは異なり傾斜磁場を高速で切替える必要がないため、その電源は簡単な構成で済む。高周波パルス増幅器としては数kW程度のものが必要であるが、C組でよいいためこの点に関しては余り不利とはならない。

一方、SE法を用いたイメージングは、さらにPR法とフーリエ変換(FT)法とに分けられるが、いずれもSSFP法とはほぼ反対の特徴を有する。SE法ではガウスやSINC関数で変調した90°パルスで傾斜磁場と同時に照射し、特定のスライスのスピンのみを90°傾す。次で、このスライスに直交する傾斜磁場を印加してスピンの位置情報を付与し、信号を検出する。ここで用いる90°パルスの長さは、スライス厚に応じて変化するが、通常2~10msであるため、パルスの照射中にもスピンの位相分散が生じ、これが投影データに位相歪を引き起こす。この分散を除去するには、180°パルスあるいは傾斜磁場の極性反転によりエコーを形成しなければならない。SE法では $\rho$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  を独立に測定でき、またマルチスライスも可能である。なお、PR法とFT法の相違であるが、FT法ではPR法で必要とする、投影データの中心と像再構成時の演算中心とを一致させるセンタリングが不要であるため、長時間の磁場ドリフトの影響を受けないこと、さらにPR法は静磁場の不均一により像にボケを生じるが、FT法では像の歪としかならないため、その補正も容易である、などである。装置構成の点では、FT法に比べるとPR法の場合に傾斜磁場に対する要求が高くなる。傾斜磁場は1~2ms程度で最大振幅に達することが望ましく、その振幅はPR法では投影毎に変化するので、A級あるいはAB級の増幅器を必要とし、大型化する。FT法では傾斜磁場の振幅を一定に保ち、印加時間を変えるだけで済むため、PR法に比べると傾斜磁場の発生は容易である。なお、SSFP法とFT法を組合せたイメージングは不可能であるので、FT法の利点はSE法の利点とも考えられる。以上述べた項目を表1にまとめて示す。

### 実験と考察

従来まで報告されているSSFP法を用いたイメージングでは、 $H_1$ 照射直後の信号を検出していた。この場合、高周波コイルの過渡応答が無視できないため、送信電力と受信感度を犠牲にしてコイルのQ値をダンプするが、あるいはアクティブダンピングな回路構成に工夫を要した。しかし、我

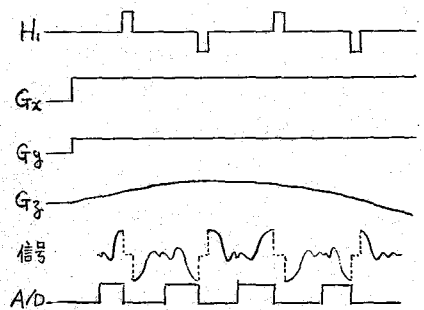


図1 SSFP法を用いるパルスシーケンス

々はSSFPに特有の現象、すなわちスピニングが定常状態に達すれば、 $H_1$ の照射直前にも、直後の信号と対称な信号が発生するため、直前の信号を受信すればコイルの過渡応答の影響を全く受けずに信号を処理することが可能であることを見出した。その結果、コイルのQ値を十分に高めることができ、SSFP固有の感度も最大限に引き出すことが可能になった。図1にはイメージングに用いたパルスシーケンスを示す。 $H_1$ を反転させるのは、ベースラインのドリフトと低周波ノイズを除去するためである。図2にはSSFP法による直径8cmのグレープフルーツの断層像を示す。果肉を仕切る膜が明確に認められるが、中心近傍の種子を識別することはできない。また、図3には豚肉の赤身(黒い部分)、脂肪(白い部分)、レバー(中心の黒い部分)の混成試料の断層像を示す。脂肪からの信号が著しく強く、SE法の密度像とは逆の傾向を示すことが分かった。測定時間はいずれも8分である。

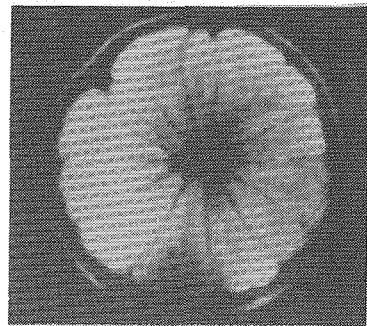


図2 SSFP法によるグレープフルーツの断層像

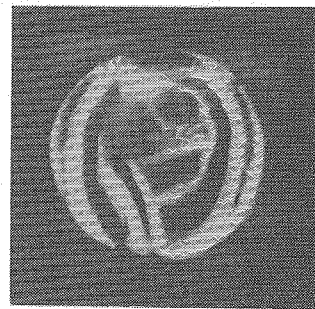


図3 豚肉の断層像

次にSE法を用いたイメージング例について述べる。PR法ではスライスの選択後、SSFP法と同様に種々の角度から投影データを取り込み、2次元分布を算出する。この場合、投影時に印加する傾斜磁場は有限のslew rateをもつため、投影毎にエコーの発生時刻が変化し、投影データに位相歪が生じることも見出した。図4には我々の用いているパルスシーケンスの内、投影に関係する傾斜磁場 $G_x, G_y$ と $H_1$ のみを示す。 $G_x, G_y$ は互いに直交し、各々投影毎にその振幅が変化する。エコーの発生時刻は各成分に対して、面積 $S_1=S_2$ が満たされる時であり、それが傾斜磁場の振幅で次式で示されるように変化する。

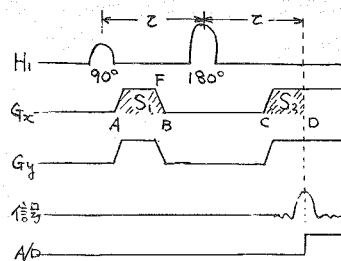


図4 SE法で用いたパルスシーケンス

$$\overline{AF} = \overline{CD} - \frac{1}{2} |G_{x,y} / k| \quad (2)$$

ここで、 $k$ はslew rateである。従って、傾斜磁場の印加時刻を投影毎に補正しなけば画質劣化を招く。

図5、図6は内径4cm $\phi$ の試料管に硫酸銅水溶液を満たしたファントムの補正前と補正後の密度像であるが、画質の違いが明確である。

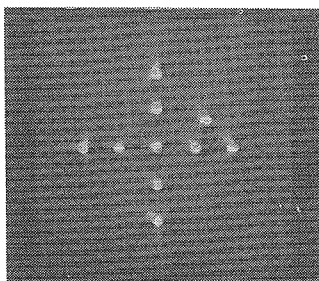


図5 補正前

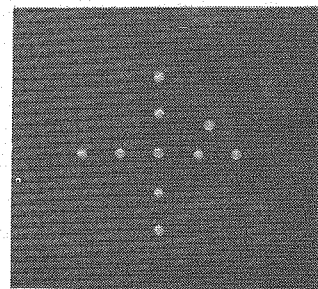
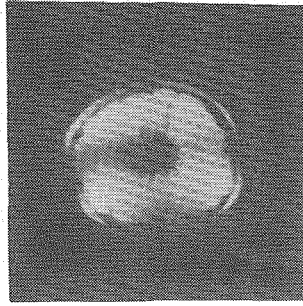


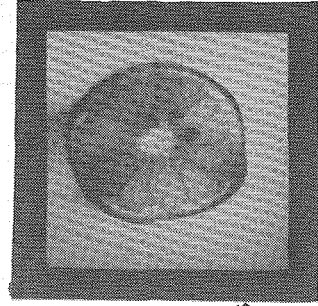
図6 補正後

図7にグレープフルーツの密

度像と $\pi$ 強調像を示す。  
 $\pi$ 強調像では種子が黒く現われているが、密度像では果肉を仕切る膜も不明瞭である。SSFP像はこゝから両者の中間の像と言えそうである。測定時間はSSFP法の場合の3倍要しており、SE法による像の方がS/Nが低い。しかし、 $\pi$ 強調像からも分かるように、得られる情報はSE法の方が多い。



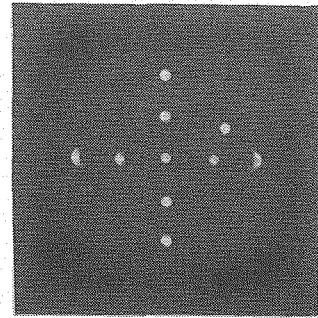
(a) 密度像



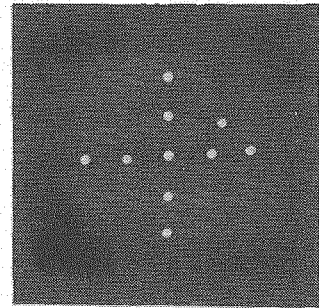
(b)  $\pi$ 強調像

図7 SE法によるグレープフルーツの断層像

最後にFT法によるイメージング例を示す。本法では図4に示すシーケンスで、 $G_x, G_y$ を同時に印加せず、重ならないようにずらして印加する。得られた信号を2次元フーリエ変換すれば、PR法のような像再構成処理をせずに元のスピン分布を知ることが出来る。FT法がPR法と測定上大きく異なる点は、エコーの形成を傾斜磁場の1成分についてのみ行うことである。さらに本法は常に1方向への投影のみを行うため、その結果磁場の不均一の影響がボケとはならず、像の歪としかならない点がPR法(SSFP, SEを含めて)と大きく異なる。図8(a), (b)は中心で50ppm(75 $\mu$ T)偏位するような磁場不均一を外から与えたときのファントムの密度像である。(a)はPR法, (b)はFT法による結果である。(a)では像がボケているが, (b)では単なる歪にしかならないことが分かる。



(a) PR法による像



(b) FT法による像

図8 中心で50ppm偏位する不均一磁場を付与したときのファントムの像

### おわりに

SSFP法とSE法とについて、そのイメージング例を中心に両者の特徴を述べた。SSFP法では短時間に高S/Nの信号を得ることが出来る。しかし各種NMRパラメータが混在しており、形態観測には適するが、定量的な診断情報を得るには不十分である。また組織の相違にも敏感ではない。装置構成はSE法に比べ簡単となる。一方、SE法は傾斜磁場電源が大型になること、 $H_1$ をSINC関数などで変調する必要のあることなど装置が複雑化するが、定量的な情報を与えて

(1) Lauterbur, R.C.; Nature, 262, 190(1973) (2) Carr, H.Y.; Phys. Rev., 112, 1693(1958)  
 (3) Hinshaw, W.S.; J. Appl. Phys., 41, 3709(1976) (4) Holland, G.N. et al, J. Comp. Assst. Tomog. 3, 429(1980)

# 69. マウスのプロトンNMRイメージング

— 脳梗塞の検出

国立中研, 東北大医\* の 松井茂, 山本悦治, 黒田正夫, 藤野英己  
河野秀樹, 大友仁\*, 加藤宏之\*, 小畠久也\*

< 序 >

近年, NMRを用いた生体のイメージングが注目を集め, 現在では人体用の製品も市販される段階に到っている。しかしながら個々の病変において, イメージングの結果と病変の状態あるいは病変の進行状況等との関連については不明な点が多い。このような問題点を解明する目的で, 今回我々は小動物を用いた基礎実験用NMRイメージング装置を試作し, 本段階として, 実験的に脳梗塞を誘発させたマウスに対して *in vivo* でプロトンNMRのイメージングを行い, 本報告の結果について報告する。

< 実験 >

図1に測定に用いた装置のブロックダイアグラムを示す。測定に必要な種々のパルス系列はDiskにStoreされており, 適時ミニコンを通じてシーケンサーにLoadすることにより簡単に測定モードの変更が可能となっている。磁石は0.1~1.5 Tの範囲で磁場強度可変の超伝導磁石を用いているが今回の実験では0.5 T (プロトン共鳴周波数21.28 MHz) に設定して実験を行った。スライス選択はTailored pulseと磁場勾配のcombinationによる選択照射法(1)を用いた。スライス厚は約5 mmとした。

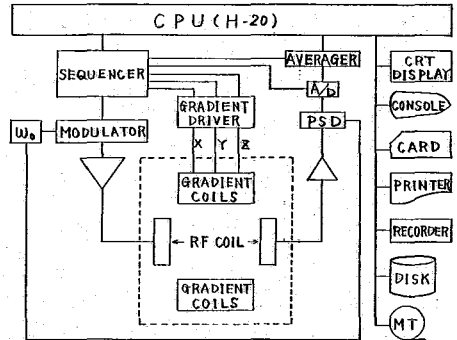


図1. Block Diagram of NMR Imaging Apparatus

0.5 G/cmの projection)用磁場勾配を用いて, 選択したスライス面内信号の128方向への projectionを測定し, Projection-Reconstruction法により像再構成を行った。現在の測定Modeは(i)スピン密度(ii)  $T_1$ 強調(Inversion Recovery) (iii)  $T_2$ 強調の3種に大別される。ただし, いずれのModeにおいても, 静磁場の不均一性に基づく信号の位相ズレの効果を除くため  $90^\circ - \tau - 180^\circ$  によるスピンエコー信号の後半を測定した。(Mode (i), (ii) では  $\tau = 7 \text{ ms}$  であり, Mode (iii) では  $\tau = 27 \text{ ms}$  あるいは  $53 \text{ ms}$  とした。したがって各Modeの情報量は純粋でないが, 特に頭部のイメージングにおいては  $T_2$  が比較的長いので,  $\tau = 7 \text{ ms}$  とした。何れ  $T_2$  の効果は無視し得る程度であると思われる。また, より正確な  $T_1$ ,  $T_2$  値を得るために測定待ち時間は1.6 secとし, 1 projectionについて4回の信号積算を行った。したがって測定時間は, 例えはMode (i) では約14分である。

まっしげろ, やまもとえつじ, くさねまさお, しのみゆみ, こじゆみ, おおともひとし, おとよみゆき, こぐれみさ

測定に用いたマウスは Mongolian gerbil である。脳梗塞を実験的に誘発するには種々のモデルがあるが、我々は主として総頸動脈を閉塞し血流遮断のみ、あるいは更に血流再開を行、 $T_2$  虚血モデルを用いた。

<結果と考察>

図2に60分虚血(虚血後血流再開)により右脳半球(画像では左半球)のみに梗塞を誘発したマウスの頸部断面のスピン密度画像を示す。a)は血流再開後約5時間、b)は系)

22時間後には湖産を行、 $T_2$  虚血である。上部の楕円形の部分が脳であるが、5時間後では正常の左脳半球と比較して異常な右脳半球にはほとんど変化は見られず、判別しにくい。

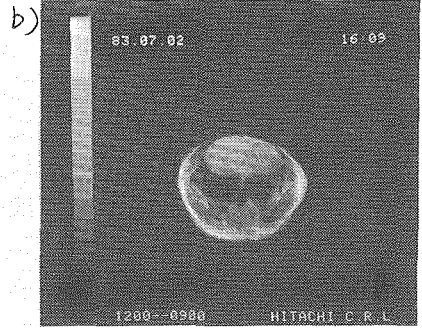
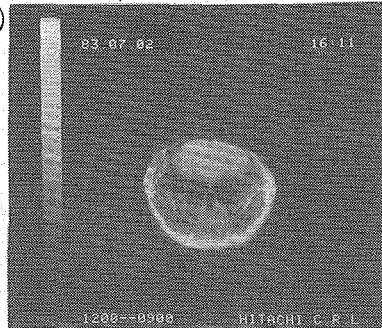


図2 右脳半球に梗塞を誘発したマウス頸部断面のスピン密度画像  
a) 虚血後5時間 b) 虚血後22時間

22時間後(図2-b)において、わずかに差異が認められる程度である。しかしながら、図3に示すように同一部位をスピンエコーにより

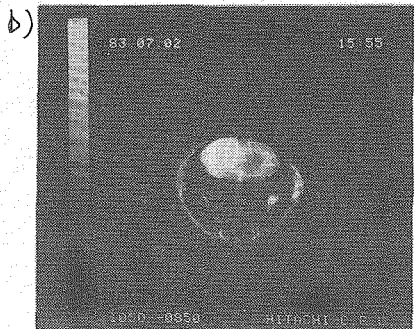


図3 右脳半球に梗塞を誘発したマウス頸部断面の  $T_2$  強調画像 ( $\tau=53ms$ )  
a) 虚血後4.6時間 b) 虚血後21時間

した画像では非常に明瞭に左右脳半球に差が見られる。この差は4.6時間後と比べ21時間後では更に拡大している。同様に、図4に示す In

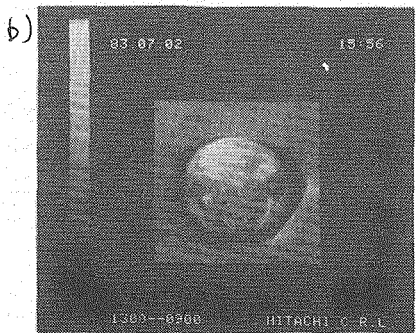
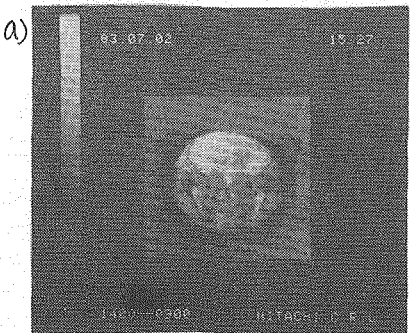


図4 右脳半球に梗塞を誘発したマウス頸部断面の  $T_2$  強調画像 ( $\tau=300ms$ )  
a) 虚血後4時間 b) 虚血後21.7時間

version Recovery 法による  $T_2$  強調



( $100^\circ - \tau - 90^\circ$ ;  $\tau = 300 \text{ms}$ ) (右画像に示す) (図3は明瞭では無いが十分識別可能な左右差とその時間変化が認められる。

以上の測定データから、更に脳の Cortex (灰白質) とそれ以外の部分の2ヶ所についてサンプリングした、左右脳半球の信号強度比の時間変化を図5に示す。3つの測定 Mode のうち  $T_2$  強調の Mode が最も顕著検査に sensitive であることがわかる。  $T_2$  強調 Mode では 4.6 時間後でも 30~40% の差が表われている。我々の現在の装置の濃度分解能をテストサンプルを用いて調べた結果、約 10% の信号強度差が識別可能であることを確認されている。したがって図5の結果は  $T_2$  強調 Mode では血流再開後 45分程度で検査が可能であることを示している。検査の *in vivo* の早期発見に関して 2, 3 の報告<sup>(2)</sup> があるが、いずれも数時間後に検査されたもので、45分程度の超早期に検査可能であることを示したものは我々が初めてである。現在、更に細かい時間間隔で図5と同様の測定を進行中であり、実際には血流再開後 45分程度後に測定を行って画像も紹介する予定である。

図5に示すもう一つの注目すべき結果は Cortex とそれ以外の部位について左右信号強度比の時間変化に差異が認められることである。特に  $T_2$  強調 Mode においてその傾向が顕著に見られ、Cortex に比べ、それ以外の部位の変化がより長時間のうちに起こる。この原因については現在検討中である。

## References

- 1) A.N. Garraway, P.K. Grannell, and P. Mansfield, J. Phys. C 7, L457 (1974)
- 2) 佐々木 F.S. Buonanno et al. Proceeding of an International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance Imaging (North Carolina) P147 (1981)

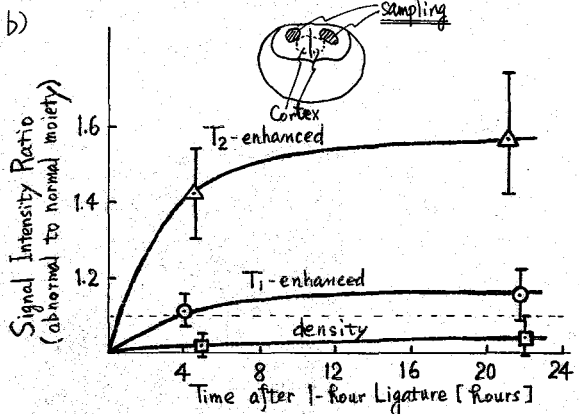
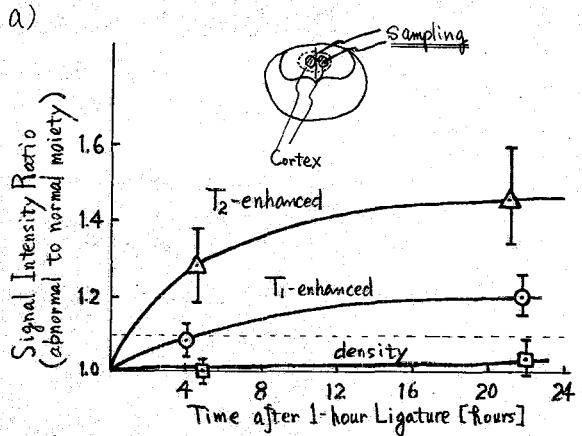


図5. 部位別の左右信号強度比の時間変化

a) Cortex      b) cortex以外

## 70. NMRによる病態解析 (IV) — 遅延型アレルギー反応の解析 —

山崎政城 (熊本大・医・生化学)

### 細胞性免疫へのn.m.r.によるアプローチ

免疫機構は体液性免疫と細胞性免疫の二つに大別される。体液性免疫は“血清中の免疫グロブリン”が体液中を流れて異物抗原と特異的に反応する機構で、抗体である免疫グロブリンが単離・精製されて分子レベルでの解析が可能となっている。すでにn.m.r.によるアプローチのところが知られている。

一方、細胞性免疫は“生きている感作リンパ球”が特異的に抗原と直接反応する免疫機構で、遅延型アレルギー症・同種移植反応・感染防禦免疫などの免疫現象は細胞性免疫によると考えられている。この細胞性免疫反応のメカニズムについては、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とらえられるのは現状から不明な点が多く、“生きているリンパ球”から“分子レベル”の話へ進づいていない。

われわれはこの分野、細胞性免疫反応のメカニズムの解析にn.m.r.によるアプローチをこのところ、炎症局所の病態について明らかにすることがある。

### 細胞性免疫の病変局所のpHの意義

一般に、細胞性免疫の反応局所では単核球(マクロファージとリンパ球)の浸潤が強いのが特徴である。細胞性免疫のひとつである遅延型アレルギー皮膚病変の解析でも、すでに病変局所から数種のマクロファージ遊走因子と数種のプロテアーゼが見いだされている。本反応の発現機構を解明する過程で、これらのマクロファージ遊走因子やプロテアーゼなどの活性物質の活性発現に病変部のpHが重要な意味をもつことから、病変局所の正確なpHを知る必要性が生じた。

本研究では次に示す3つの系 ① BGG(牛血清グロブリン)感作・BGG惹起による遅延型アレルギー皮膚反応局所 ② BCG(結核菌)感作・PPD惹起による遅延型アレルギー皮膚反応局所 ③ 熱傷(やけど)による皮膚反応局所の各病変のpHについて明らかにし、病態との関連について考察した。

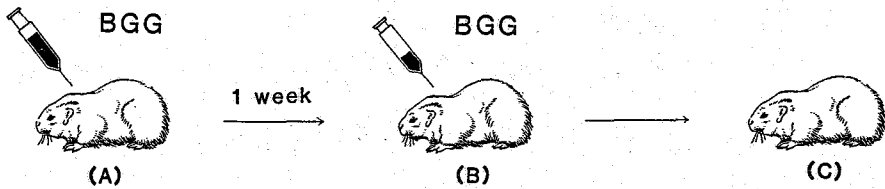
### BGGを抗原とする遅延型炎症反応について

本炎症系は、抗原としてBGGを用い、感作には完全フロイド・アジュバントとしてKモルモット(300~350g, ♀)の両足蹠の皮肉に接種した(A)。感作1週後、背却皮肉にBGGで惹起した(B)、一定時間後に採血した(C)、 $^1\text{H-NMR}$ の $P_i$ の

Studies on Delayed Hypersensitivity Skin Reactions by NMR.

Masaki Yamasaki

Department of Biochemistry, Medical School Kumamoto University.



ケミカル レフトより pH を求めた。すなわち ① 正常モルモット皮膚組織の pH および ② BGG を抗原とする 遅延型アレルギー反応皮膚病巣の炎症が最大になる 24 時間後の pH について明らかにした (第 20 回 NMR 討論会, 1981 年)。すなわち、正常皮膚組織の  $p_i$  のシグナルは経時的に高磁場側へシフトし、その 1 次反応プロットが直線性を示し、この直線からの時間の化学シフトを対換して pH を求めると、正常皮膚組織の pH は 7.14 であること。BGG を抗原とする病巣の炎症が極期になる 24 時間後の病変局所では、その 1 次反応プロットが正常皮膚とは異なり 2 相性を示し、炎症局所における pH は 7.40 であることを明らかにした。

今回、BGG を抗原とする遅延型炎症巣の pH の時間的推移を求めた。惹起 9 時間後の炎症巣は pH 7.48, 19 時間後 pH 7.27, 24 時間後 pH 7.38, 36 時間後 pH 7.08 と 2 峰性を示し、病態生理からのアプローチで得られた結果と一致した。

従来病理学の世界では、「炎症巣の pH は酸性になる」と言われて、それは乳酸の蓄積によるかと考えられていた。しかしこれは主として助腺渗出液の pH の成績であり、また組織では色素吸収法や微小電極を用いて測られたもので、その感度、再現性や、また組織障害性であるといふ点で肉眼の多いものであった。

BGG を抗原とする遅延型炎症巣では、今まで永い間論じられてきた「炎症局所の pH の酸性化」とは全く逆の結果を得たが、すなわち本炎症巣よりアルカリ性プロテアーゼが精製されたこと、本病巣の局所の pH がアルカリ性側になることとは妥当だと思われる。

### BCG を抗原とする遅延型炎症巣について

本炎症巣は、モルモットを青山 B 株 (H2 型結核菌・BCG) 死菌乾燥粉末を抗原として感作し (次頁 A), 5~6 週間後感作成立の確認を行った後背脊皮下に PPD を注射して惹起し (次頁 B), 炎症を伴った遅延型アレルギー反応で、いわゆるワベルフリン型アレルギー反応と言われているものである。

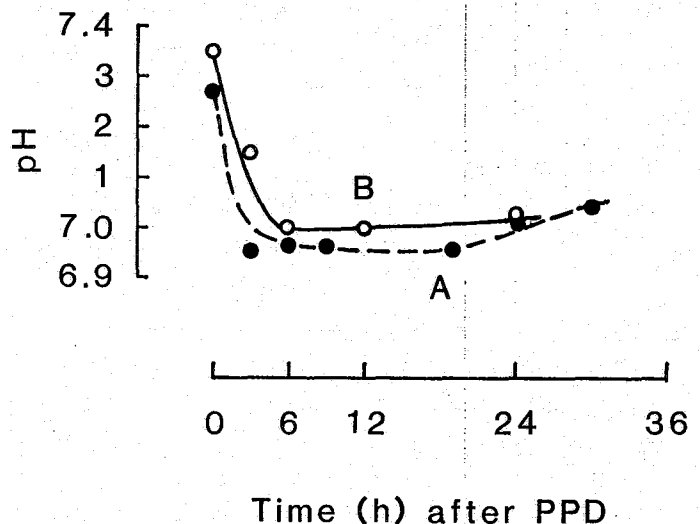
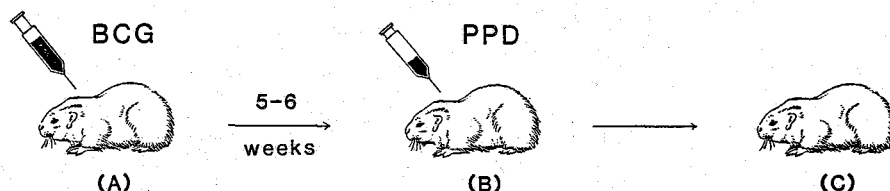


図1. BCG を抗原とする遅延型炎症巣における pH の時間的推移

このツベルフリン型アレルギー反応は、遅延型アレルギーの典型的モデルとして多くの知見が得られており、惹起24時間後の皮膚病巣部からの抽出液には *pseudoglobulin* 成分に単核球に対する遊走活性因子が見い出され、さらにその産出にあたる局所のプロテアーゼ (pH 3.6 にそれぞれ活性のピークを示す) が見い出されている。

ツベルフリン反応の pH の時間的推移を図1に示す。惹起直後の炎症部位では pH 7.27 と正常皮膚組織の pH よりも高い値を示す。惹起後3~19



時間の炎症巣では pH 6.95~6.97 と“酸性化”を示す (図1-A参照, Bは免疫作動物に PPD をよる惹起の操作をおこなった系での pH の時間的推移を示す)。炎症が最大に達するとよめる24時間後では pH 7.03 を示し、30時間以降正常皮膚の pH 値に近づいた。

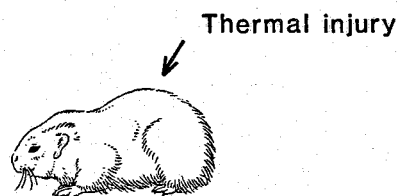
BCG を抗原とした遅延型炎症巣の病変局所 (24時間後) では pH 7.38 とアルカリ性側にかたよった pH 値を示し、一方 BCG を抗原とした遅延型炎症巣では pH 6.95~6.97 と酸性側にかたよった pH 値を示す。このような結果、病変局所の pH は炎症の種類により“酸性化”を示すものと、逆のものがあることが明らかになった。

### 熱傷による炎症巣について

一般に熱傷時の生理学的変化は、熱傷以外の損傷時にくらべてはるかに激烈で長時間つづくもので、血管内容量は熱による物理的な変化よりむしろ、機能的変化によるものが大量に血管外へ移動するといわれている。

モルモット背部皮膚を脱毛したのち、熱により (57°C, 20s) 炎症をおこした。この程度の熱傷による炎症巣では、皮膚の紅斑・皮内血管の拡張が認められるが、熱による細胞障害や水疱形成は認められなかった。ヒト熱傷の分類にあてはめると (ヒトとモルモットでは皮膚の厚さなどの相違により熱による組織障害に差があるが)、才I度と才II度との中間ぐらいの熱傷と解される。

この熱傷にあいとも、熱傷部局所に透過性亢進がみられ、血漿蛋白の血管外への逸脱が認められた。炎症局所での毛細管透過性亢進ともなり血漿たんぱく質の滲出は図2の IVP 曲線 (エバンスブルーを静注し、皮膚に透過してくる色素量から炎症部位にみえる血漿たんぱく質を定量) から明らかになり、受傷直後の30分後と、さらに遅期の滲出とを23時間後の2相が区別され



て観測された。熱傷の5~6時間後には回復があらはれはじめていることが認められた。炎症巣の範囲(MLD)は一定にもかかわらず、炎症巣の厚さ(DT)および体積(VOL)もIVP曲線と同様の相性を示した。

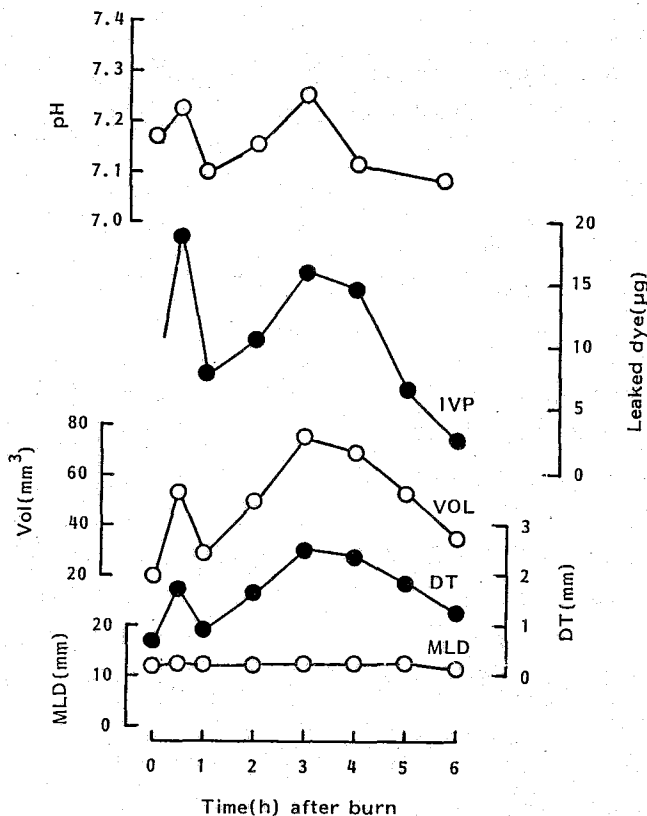


図2. 熱傷による炎症巣の時間的推移

この炎症巣におけるpHの時間的推移は、受傷直後から30分後にかけて、病巣のpHは7.23とアルカリ性側に大きく、1時間後には正常値のpHを示すが、受傷3時間をピークとしてアルカリ性側に大きく上昇性を示した。熱傷6時間後、毛細血管透過性が回復される時期に合わせて、炎症巣のpHも正常値に近づく。この熱傷の系から、急性炎症のパターンにおける炎症巣の組織学的知見とpHのうごきとの関連について明らかになった。

# 71. $^1\text{H}$ および $^{31}\text{P}$ -NMRによるP5'N欠損赤血球の解析 (熊本大医短\*, 熊本大医)

檜垣 強\*, 鎌本 忠, 永田 浩一, 棚瀬 純男,  
森野 能昌, 高月 清.

## 1 はじめに

$^{31}\text{P}$ -NMRが生体系、とりわけintact cellにおける燐酸代謝物の検索に有用であることは周知のとおりである。ヒト赤血球のpyrimidine 5'-nucleotidase (P5'N)欠損症<sup>1)</sup>は常染色体劣性遺伝の家族性溶血性貧血であり、赤血球中にpyrimidine nucleotidesの蓄積を伴うのを特徴とするが、その溶血の機序についてはまだ明らかでない。従来より、我々は $^{31}\text{P}$ -NMRを用いてP5'N欠損赤血球の解析を行って来たが<sup>2)</sup>今回は蓄積するpyrimidine nucleotidesについて更に同定した結果と、これら赤血球内での代謝的安定性について報告するとともに、 $^{31}\text{P}$ -NMRおよび $^1\text{H}$ -NMRの本疾患の診断上の意義について論ずる。

## 2 方法

試料 P5'N欠損赤血球は軽度の貧血と黄疸を呈する女性ホモ接合体から得られた。P5'N活性はTorranceらの方法<sup>3)</sup>により、基質CMPに對して $0.64 \mu\text{mol Pi/gHb/hr}$ 、UMPに對して $1.55 \mu\text{mol Pi/gHb/hr}$  (正常赤血球では各々 $10.6 \sim 14.3 \mu\text{mol Pi/gHb/hr}$ ,  $14.1 \sim 22.1 \mu\text{mol Pi/gHb/hr}$ )であった。血液学的所見は、赤血球 $3.2 \times 10^6/\text{ml}$ , ヘモグロビン濃度 $11\text{g/dl}$ , 網状赤血球は $6 \sim 7\%$ であった。

P5'N欠損および正常赤血球はヘパリン下採血液を $1,000 \times \text{g}$ , 10分間遠沈後、血漿、白血球、血小板を除去して分離したものである。他方、ホモジナイズした赤血球に同量の20%過塩素酸(PCA)を加えて攪拌し、 $3,000 \text{rpm}$ , 10分間遠沈して得た上清を更に氷水中の試験管に移し、これに等モル量のKOHを加えて中和する。更に過塩素酸カリウムの白色沈澱物を遠心除去し、その上清を赤血球除蛋白分画(PCA抽出液)とする。

NMR測定 NMR装置はJEOL, JNM-FX 200を使用し、 $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトルは、共鳴周波数 $80.76 \text{MHz}$ ,  $45^\circ$ パルス, パルス間隔2秒, 測定温度 $21^\circ\text{C}$ で $1,000$ 回(intact赤血球),  $4,000$ 回(PCA抽出液)で得た。試料は $15 \text{mm}$ 中NMR試料管に入れ、外部基準として85%リン酸を封入した微小管をNMR試料管の中心に挿入した。 $^1\text{H}$ -NMRスペクトルは共鳴周波数 $199.5 \text{MHz}$ ,  $60^\circ$ パルス, パルス間隔2秒,  $5 \text{mm}$ 中試料管で $1,000$ 回積算により得た。

高速液体クロマトグラフィーによる分析 高速液体クロによるPCA抽出液の測定はHitachi gel 3013-Nカラムを用いた。カラム温度 $70^\circ\text{C}$ , initial bufferは6%(%) $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0.06 \text{M}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0.01 \text{M}$ -燐酸カリウム, final bufferは6%(%) $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0.3 \text{M}$ - $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0.05 \text{M}$ -燐酸カリウムによりlinear gradientで溶出した。PCA抽出液のシグナルの同定は、既知の標準nucleotides試料の溶出時間との比較で行い、定量はシグナル領域を切り抜いた記録紙の秤量で行った。

ひがきつよし, かきもと ただし, なかた こういち, たなせすみお, もりの よしまさ, たかつき きよし.

### 3 結果

図1は intact な正常赤血球(A), P5'N欠損赤血球(B)およびP5'N欠損症の全血(C)を示すものである。スペクトル(A), (B)を比較してみると, nucleoside triphosphates (NTP) の $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -位の磷のシグナル強度がP5'N欠損赤血球(B)では, 正常赤血球(A)のおよそ2倍になっている。試料管中の赤血球数は(A)(B)ともに同等に調整し, 同一条件で得たスペクトルであるので, 各成分の信号強度はそのまま濃度を反映すると思われる。更に, diphosphodiester 領域(-10~-12 ppm)に異常なシグナルが観察される。シグナルb(-11.0 ppm)およびc(-11.9 ppm)はCDP-choline, UDPGの高磁場側の磷のシグナルを示し, シグナルa(-10.3 ppm)はCDP-choline, UDPGの低磁場側の磷の他にCDP-ethanolamine, NADの寄与が考えられる。シグナルの同定はPCA抽出液の $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトルの化学シフトと既知試料をPCA抽出液に加えることにより行った。2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG)のシグナル強度はP5'N欠損赤血球(4.3 ppmと3.5 ppm)と正常赤血球(4.0 ppmと3.2 ppm)の間に差異は認められない。

図2はP5'N欠損赤血の経時変化を示したものである。下方4つのスペクトルは最初25時間の变化(21°C)を示し, 4°Cで1週間保冷した後に同一条件で得たスペクトルが最上段の図である。ここで興味深いことは, NTP, NDPが分解されても, 向題のピークa, b, cは残存している。

図3はintactな

P5'N欠損赤血球(A), 凍結して溶血させた1時間後(B), 2時間後(C)のスペクトル

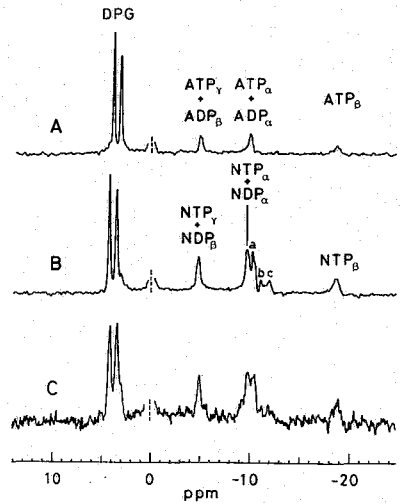


図1. 正常(A), P5'N欠損赤血球(B), P5'N欠損症全血(C)のスペクトル

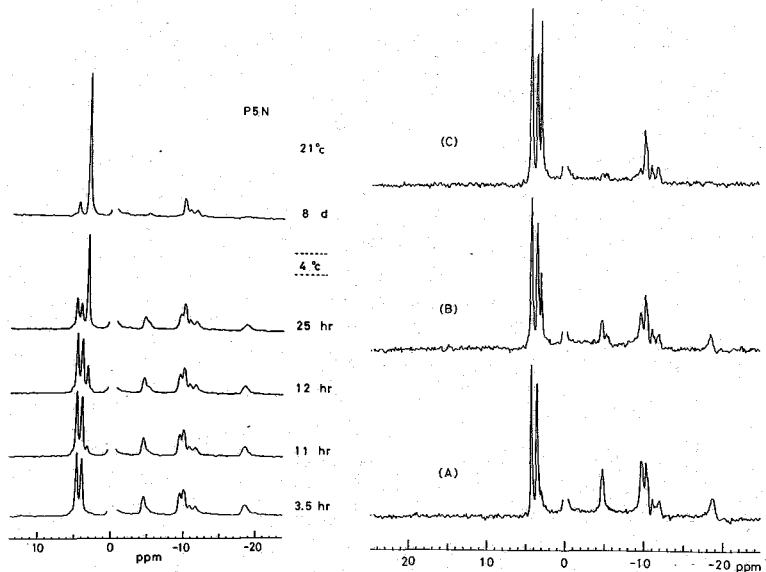


図2. P5'N欠損赤血球の経時変化

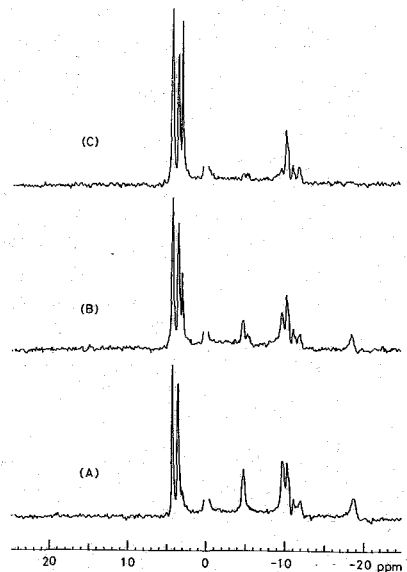


図3. P5'N欠損 intact cells (A), 溶血1時間後(B), 2時間後(C).

ルを示している。ここでも向題のピークa, b, c  
 に関してスペクトル(A)(B)(C)間で殆んど変化  
 を認めない。

図4は intact な P5'N 欠損赤血球の -4 から  
 -13 ppm までの  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルを示し  
 ている。NTP は分解しているが (NDP はま  
 だ残存している)、向題のシグナル a, b, c に  
 関しては図1(B), 図2の最下段, 図3(A)のそれと  
 同等である。シグナル  $\beta$  ( $\text{NDP}_\beta$ ) と  $\alpha$  ( $\text{NDP}_\alpha$ )  
 の面積はほぼ同じであるので NTP は存在しな  
 いと考えられる。シグナル b および c は、前述  
 のとおり CDP-choline, UDPG の高磁場側の  
 燐 1 個ずつに対応している。又、それらの低磁  
 場側の燐はシグナル a に含まれる。面積 a は面  
 積 (b + c) よりもはるかに大きく、その差は別の燐化合物の存在を示している。すな  
 わち CDP-ethanolamine と微量の NAD の寄与によるものと考えられる。これらの  
 存在は高速液体クロマトグラフィーの結果より示唆される。

図5は P5'N 欠損赤血球の PCA 抽出液の  $^{31}\text{P}$ -NMR スペクトルを示している。  
 図5(A)に示す -5 ppm 附近のスペクトルは  $\text{ATP}_\gamma$ ,  $\text{CTP}_\gamma + \text{UTP}_\gamma$  および  $\text{NDP}_\beta$  を反  
 映し、互いによく分離している。ここで CTP と UTP の和は ATP にほぼ等しい。  
 このことは高速液体クロマトグラフィーによる定量分析結果とよく一致している(表1)。  
 図5(B)は diphosphodiester 領域を示している。  $\text{ATP}_\alpha$ ,  $\text{CTP}_\alpha$ ,  $\text{UTP}_\alpha$ ,  $\text{ADP}_\alpha$   
 $\text{CDP}_\alpha$ ,  $\text{UDP}_\alpha$  が混在しているためブロードなシグナル ( $\text{NTP}_\alpha + \text{NDP}_\alpha$ ) となっている。

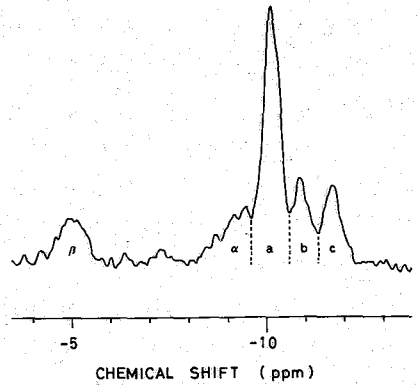


図4. NTPが分解したP5'N  
 欠損赤血球のスペクトル

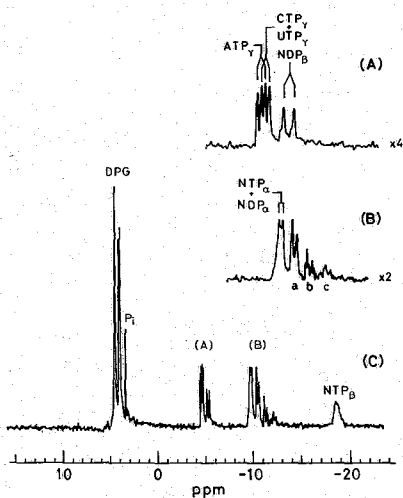


図5. P5'N 欠損赤血球の  
 PCA抽出液のスペクトル

Nucleotide contents of normal and pyrimidine  
 5'-nucleotidase deficient erythrocytes.

Nucleotides	normal	proposita
CDP-choline	-	15.86*
CDP-E.A.	-	10.39*
NAD	2.38	-
CMP	-	2.40
UMP	-	3.88
AMP	1.83	2.75*
UDPG	-	15.49*
CDP	-	5.68
UDP	-	4.18
ADP	9.94	9.37
CTP	-	14.92
UTP	-	13.67
ATP	26.16	24.45

\* ) Values were calculated by NMR method.

表1 正常およびP5'N欠損赤血球中の  
 核酸含有量(採血後2時間)



図6はP5'N欠損赤血球および正常赤血球のPCA抽出液の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル(21°C, pH 7.2)である。低磁場に注目すると、正常赤血球ではアデニン・ヌクレオチドのH-2, H-8, H-1'が低磁場側に見られるが、P5'N欠損赤血球ではアデニン・ヌクレオチドの他にピリミジン・ヌクレオチド由来のシグナルが観察される。3.2 ppmの卓越したピークはCDP-cholineの3個のメチル基、都合1分子あたり9個のプロトンを反映している。4.18から4.36 ppmの盛り上がったシグナルはCDP-choline, CDP-ethanolamine等のリボースのプロトンによるものである。

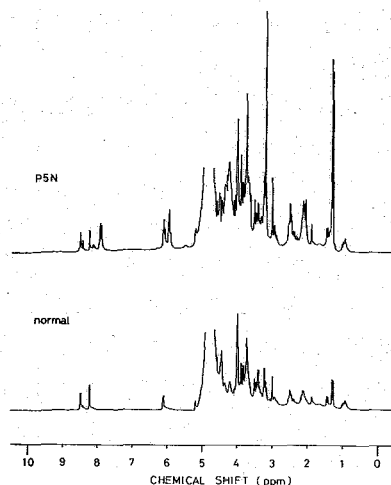


図6. 正常およびP5'N欠損赤血球の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

ピリミジン・ヌクレオチドとプリン・ヌクレオチドの隣を<sup>31</sup>P-NMR上区別するのは困難であるので、高速液体クロマトグラフィーによって各々のヌクレオチドの同定・定量を行った。

正常およびP5'N欠損赤血球中の採血後2時間の核酸含有量を表1に示す。CDP-ethanolamineとNADは高速液体クロマトグラフィーによる分離に成功していない。P5'N欠損赤血球では正常赤血球と同量のアデニン・ヌクレオチドを含むと同時に、更にウラシル・ヌクレオチド、シトシン・ヌクレオチドが残存蓄積している。

#### 4 考察

P5'N欠損赤血球の<sup>31</sup>P-NMRスペクトルの特徴は、1) NTPのα-, β-, γ-位の隣のシグナル強度が正常より大きい、2) diphosphodiester領域のスペクトルが複雑である、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの特徴は、1) アデニン・ヌクレオチドのH-2, H-8, H-1'と同時にピリミジン・ヌクレオチド由来のプロトンのシグナルが観察される、2) 3.22 ppmにCDP-cholineのメチル基3個の顕著なピークが認められる、3) 核酸のリボースの位置のスペクトルが盛り上がっている、に要約される。これらの特徴は病因論的にP5'N欠損と異なる他の溶血性貧血の赤血球には見られない所見である(未発表データ)。UDPG, CDP-choline, CDP-ethanolamineは温和な条件下で安定である(図2.3)。これらUDPG, CDP-choline, CDP-ethanolamineの蓄積はUTP, CTPの蓄積の二次的なものと考えられる。

以上、<sup>31</sup>P-NMRがP5'N欠損症の迅速診断ときの代謝産物の検索に、又、<sup>1</sup>H-NMRは本疾患に対する微量採血診断法として極めて有用であることを示している。

#### REFERENCES

1. Valentine, W.N., Fink, K., Paglia, D.E., Harris, S.R. and Adams, W.S. (1974) J.Clin. Invest. 54, 866-879.
2. Kagimoto, T., Higaki, T., Nagata, K., Tanase, S., Morino, Y. and Takatsuki, K. Xth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems. (1982) P11.
3. Torrance, J., West, C. and Beutler, E. (1977) J.Lab.Clin.Med. 90, 563-568.

## 72. $^{31}\text{P}$ NMRによる筋収縮の研究

— 高エネルギー磷酸結合の収縮後分解 —

(大分医大・生理) ○山田和廣・田之倉 優

(はじめに)

筋肉が収縮するとき、クレアチン磷酸(PCr)が分解してそのエネルギーが消費され、無機磷酸( $\text{P}_i$ )が遊離される。収縮の弛緩後、酸素の供給が十分であればこれらの変化は回復する。これらの事実は、これまでに化学分析の他NMRを用いた研究によって明らかにされているが、その時間的経過を調べると、方法上の制約が大きかった。そこで我々は、できるだけ多量の筋組織を用いることにより $^{31}\text{P}$ NMRの感度、ひいては測定的时间分解能を向上させ、筋肉の収縮に伴うPCrおよび $\text{P}_i$ の変化の経時的変化を調べた。その結果、筋肉のPCrレベルは筋肉が収縮から弛緩した後1~3分間さらに分解が続いて減少した後回復に転じるこ、また一方 $\text{P}_i$ は筋肉の収縮弛緩後に遊離量が最大となり、直ちに回復が開始してそのレベルが増大することが明らかとなった(4°C)。このような結果は、筋肉の収縮によるPCr(従ってATP)の消費は収縮の経過中だけに生じている筈とする考えと合致せず、収縮の機構を明らかにする上で重要である。

(方法)

できるだけ多量の筋組織を用いてNMRの感度を向上させる方法の詳細については、すでに報告した(山田、田之倉と米谷, 1982; Yamada & Tanokura, 1983)。外径25mmの試料管を筋チンバーとして用いた。筋組織としては、ウシガエル(*Rana catesbeiana*)の縫工筋を摘出し、最大16の縫工筋(総重量約10g)を1回

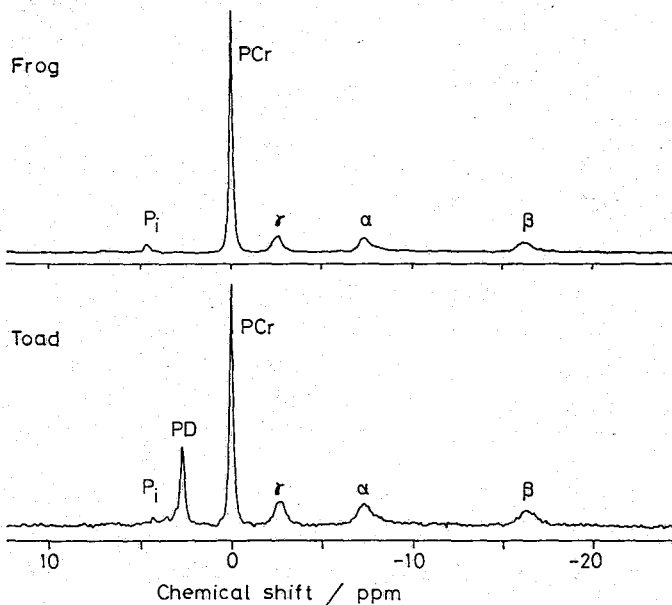


図1. ウシガエル(frog)およびヒキガエル(toad)の縫工筋16本より得た $^{31}\text{P}$ NMRスペクトル。ウシガエルの筋については合計352、ヒキガエルについては256のFIDを積算した。

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ; ATPの $\alpha$ -,  $\beta$ -および $\gamma$ -磷酸。

PD; 磷酸ジエステル。

やまだかずひら, たのくらまさる

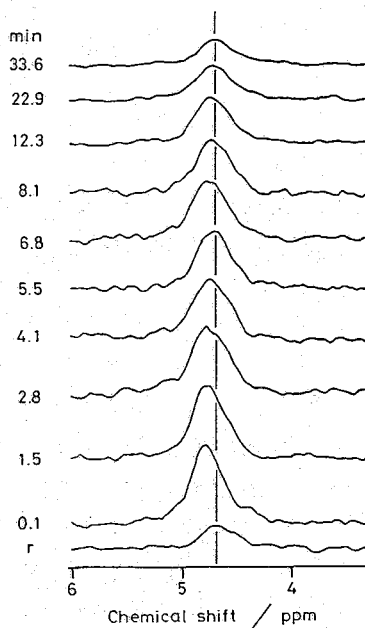
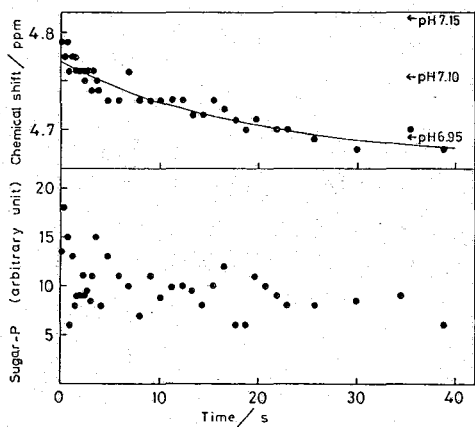
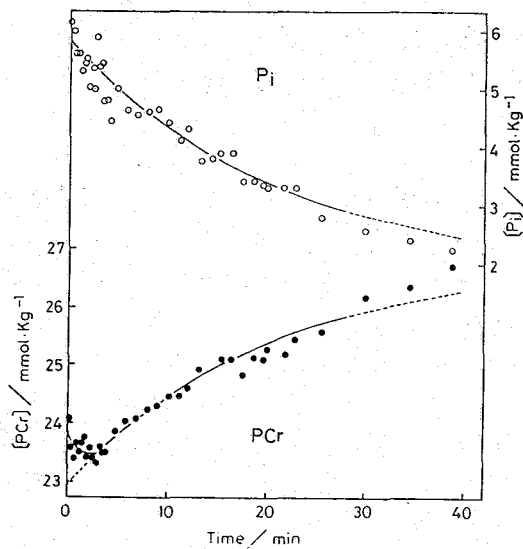


図3. 図2中段に対応する  $P_i$  ピークの化学シフト。数字は収縮弛緩後からの時間を示す。rは判散前(可なり収縮からの回復時)に得られた。5秒間の強縮により、 $P_i$  ピークは約0.1 ppm低磁場側へシフトし、 $P_i$  レベルの回復に伴って元に戻る。

図2. 上段; 5秒間持続する収縮より弛緩した直後からのPCrと $P_i$ ピークの強度の変化の時間経過(ウニガエル縫工筋, 4°C)。静止時のカエル縫工筋の化学分析より得られるPCr濃度(27 mmol kg<sup>-1</sup>; Dawsonら, 1977)から、それぞれの絶対値を求めた。60°RFパルスをも2秒おきに照射し、8ヶのFIDを積算して測定単位とした(最小時間分解能16秒)。実線は $P_i$ の測定値に最もよく一致する時定数(18.7分)を持つ指数曲線。中段; 同時に測定することできる $P_i$ ピークの化学シフト。実線は $P_i$ 強度変化と同じ時定数の指数曲線。下段; 糖燐酸の強度変化。

の実験に用いた。ヒキガエル縫工筋を用いた同様の実験結果については、すでに報告している(山田, 田之倉と米谷, 1982; Yamada & Tanokura, 1983)。Pipesを用いたRinger液(pH7)を5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>で飽和し、4°Cに調節して、筋4エンターを灌流した(17 ml/分)。60°RFパルスをも2秒おきに照射し、8ヶのFIDを積算して、測定単位とした。収縮からの筋の回復を待って、30~60分おきに筋を判散

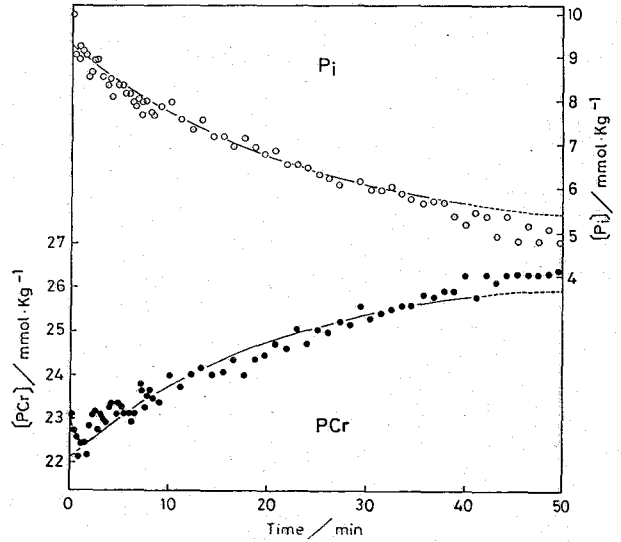
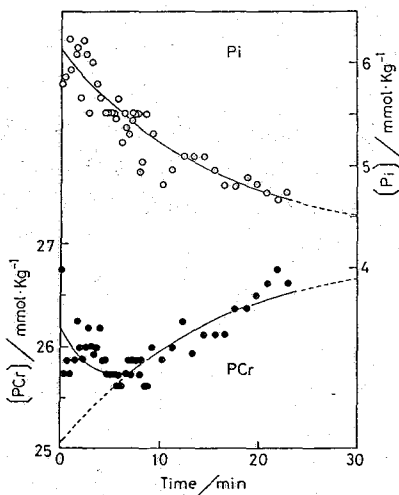


図4. 左, 2 筋繊維に持続する収縮(強縮)より弛緩した直後から測定を開始した、PCr 及び Pi ピークの強度の変化の時間経過。右, 10 筋繊維の強縮についての同様の測定結果。実線による曲線は、Pi の変化の経過に最も良く一致する時定数(2 筋繊維の強縮, 14.8 分; 10 筋繊維の強縮, 22.8 分)を持つ指数曲線。PCr の変化については、弛緩直後の数分間にこの曲線と一致しない相がみられる。

し、刺激と同期した FID をさらに積算して S/N 比の向上を計った。2 筋おきに RF パルス (60°) を照射することによって生じるスファトル強度の飽和については、別途に飽和の程度を測定して飽和補正のためのファクターを求めた。補正ファクターは、PCr については 1.33, Pi については 1.49 であった。筋の刺激は 1 組の Pt 電極を用いて行ない、発生張力はストレインゲージを用いて測定した。

#### (結果と考察)

図 1 はウシガエル及びヒキガエルの経工筋を用いて得られた <sup>31</sup>P NMR スペクトルを比較して示したものである。両者共に、5 筋繊維の強縮刺激後 1 時間経過した後測定した。この図が示すように、PCr と ATP の量比には種間間にも相違がみられる。また、磷酸ジエステルのピーク (PD) はヒキガエルに特徴的であり、ウシガエルではこのピークが認められないために Pi 強度の測定をより正確に行うことができる。

図 2 及び 4 が示すように、Pi は収縮の弛緩直後に遊離量が最も大きく、その後次第に減少して行く。Pi レベルの回復過程の大部分は一つの指数曲線によって表わされる。一方 PCr は、収縮の弛緩後さらに数分間減少が持続した後、回復過程によって収縮前のレベルに向かって増大して行く。このごく初期の相を除くと、PCr の回復過程の経過は Pi の回復過程とよく一致する。

図 5 に示す結果は、収縮の弛緩直後の 16 筋繊維における測定の平均として求められる Pi の遊離量と PCr の分解量を、収縮の持続時間についてプロットして得られたものである。以上の結果は、Pi 遊離量と一致するまで、収縮弛緩後にさらに

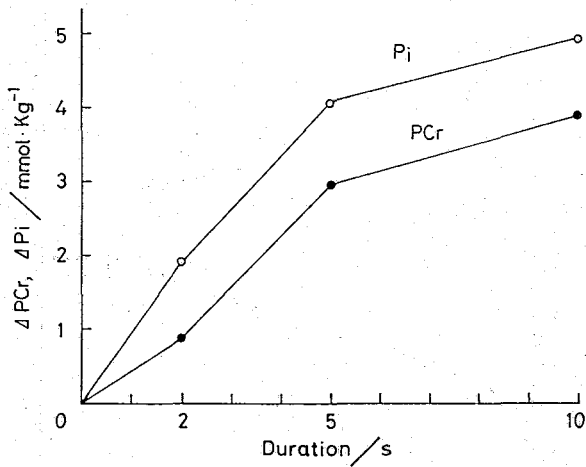


図5. 収縮の持続時間にたいする、収縮の弛緩直後におけるPiの遊離量とPCr分解量。

1~数分間PCrの分解が持続することを示している。このような結果は、収縮開始2秒後の定常状態において、収縮タンパクであるアクトン(A)とミオシン(M)及び基質であるATPとの反応中間体がA-M·ADPであるとすると最も良く説明することができる。この中間体はすでにPiを遊離しているが、収縮の弛緩直後の静止状態における中間体M·ADP·Piに定着するためには、さらに1分子のATPを必要とする。遅延性のATP(したがってPCr)分解量は筋のミオシン含量(活性サイト0.3 mmol kg⁻¹)に近い値を示している。

このような収縮弛緩後のPCr分解については、Lundsgaard (1934)がすでに報告しているが、それを否定する化学分析結果もある。遅延性のPCr分解によって、収縮のエネルギー収支において見出されているくいらかいが解決されると考えられる。遅延性PCr分解の起源については、この他にいくつかの可能性がある。その一つは収縮弛緩後のCaポンプ活性によるものであり、他の一つはミオシン(1)リン酸化反応である。しかし、これら二機序は上記の結果を説明することが困難である。その他グルコースの利用が収縮によって刺激されると考えられるが、糖酵解のほゞまりした増大は認められない(図2)。

また、図2の結果が示すように収縮によって筋細胞内部のアルカリ化が生じる。このことは、PCrの分解反応によってH⁺が実際に吸収されることを示している( $\text{PCr}^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Cr} + \text{P}_i^{16-} - 0.4 \text{H}^+$ , pH 7)。

### (文献)

- Dawson, M.J., Gadian, D.G. & Wilkie, D.R. (1977) J. Physiol. Lond., 267, 703-735.  
 Lundsgaard, E. (1934) Biochem. Z., 269, 308-328.  
 山田、田之倉、米谷 (1982) 第21回NMR討論会講演要旨集 133-136.  
 Yamada, K. & Tanokura, M. (1983) Jpn. J. Physiol. in press.

# 73. 植物細胞の<sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P-NMR

(国立公害研) 〇三森 文行, 伊藤 治

〈序〉さまざまな植物細胞を intact な状態で NMR フローブ内に導入し、それが営むさまざまな生命現象を NMR を用いて観測する方法の開発を行っている。第 21 回本討論会において intact なワロレラの基本的な炭素代謝が <sup>13</sup>C-NMR により解析できることを示した。今回は <sup>31</sup>P-NMR の植物細胞への応用法の検討、フローブ内での照射法の試み、<sup>13</sup>C-NMR の組織内物質移動測定への応用等について報告する。

〈実験〉ワロレラ試料の調製や O<sub>2</sub> バブリングについては昨年の報告とほぼ同一条件で行なった。NMR 測定は JEOL GX-400 分光計を用い、<sup>31</sup>P は 161.8 MHz、<sup>13</sup>C は 100.5 MHz で測定した。<sup>13</sup>C の測定時はプロトンのバイレベルデカップリングを行っているが、<sup>31</sup>P はノンデカップリングで測定した。<sup>13</sup>C シフト基準は neat メチルキャピラリの化学シフト値を 49.96 ppm とし、<sup>31</sup>P シフト基準はメチレンジホスホン酸 (MDP) キャピラリの中央ピークを 0 ppm とした。測定中の試料温度は 25°C。

〈結果〉A. ワロレラの <sup>31</sup>P-NMR スペクトルと常磁性イオン：植物細胞への <sup>31</sup>P-NMR の応用例は動物や微生物に比べて圧倒的に少ない。これは植物細胞の <sup>31</sup>P-NMR は種々が広く、有機リン化合物の細胞内濃度も低いことが大きな原因である。本実験では、ワロレラの培養液中の常磁性イオン、Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> を規制することにより良好なスペクトルを得ることができた。

図 1 に通常の培養液 ([Mn<sup>2+</sup>] = 9 μM, [Cu<sup>2+</sup>] = 0.3 μM) と、Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 濃度を 1/10 にした培養液で育てたワロレラの <sup>31</sup>P-NMR スペクトルを示す。常磁性イオンの規制によりスペクトルの質が飛躍的にあがっていることがわかる。

図 2 に培養液中の [Mn<sup>2+</sup>]、[Cu<sup>2+</sup>] をさまざまに変えたときの、ポリリン酸ピークの線幅と、細胞内の Mn<sup>2+</sup> 濃度の関

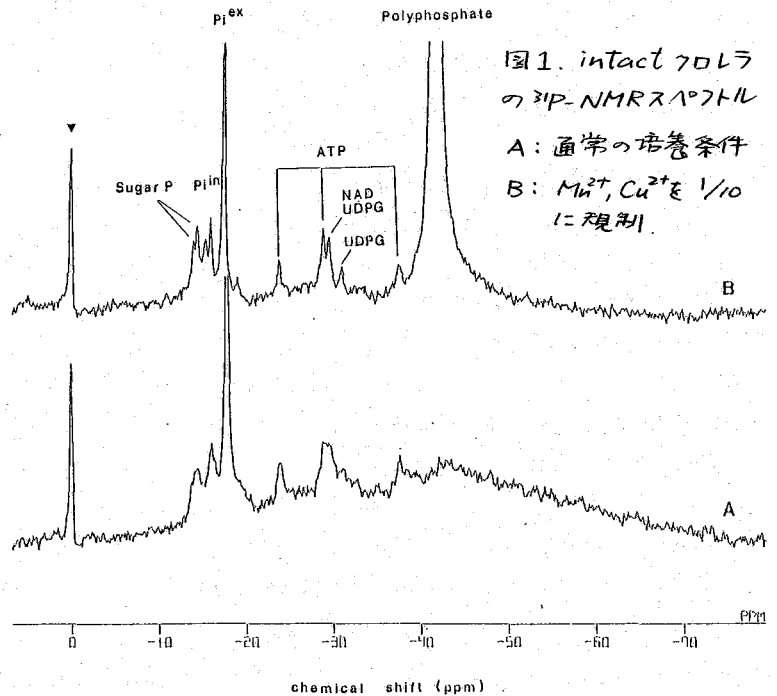


図 1. intact ワロレラの <sup>31</sup>P-NMR スペクトル  
A: 通常の培養条件  
B: Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> を 1/10 に規制

みつもり ふみゆき, 11とう おじむ

係を示す。両者には明らかなる相関がみられ、細胞内の $Mn^{2+}$ が $^{31}P$ スパクトルの線中のブロードニングをひきおこしていることが示された。さらに、培養液中の $[Mn^{2+}]$ ,  $[Cu^{2+}]$ を $1/10$ 程度に稀釈したときに最適な測定条件が得られることがわかった。以下の測定にはこの条件で培養した細胞を用いた。また、このようにして得たフロレラの細胞内での各リン酸化合物の $T_1$ を inversion recovery 法により測定した。この結果、 $P_i$ ,  $ATP \beta$ ,  $UDP$  グルコース、ポリリン酸の $T_1$ の回復が単一指数関数で表わされ、それぞれ、0.8秒、0.3秒、0.7秒、0.16秒の $T_1$ 値を得た。

**B. プローブ内での光照射法の検討：**  
植物細胞の最も特徴的な生命現象は、ほとんど光照射下で観測される。従ってNMR測定中に何らかの方法で試料に光照射を行う必要がある。通常、超伝導磁石のプローブ内で光照射を行う場合は、プローブ下部より石英ロッド等を用いて光を導入する専用プローブが用いられる。我々はこの方法の他に、集光したキセノンランプの光を光ファイバーを用いて磁石上部に導き、これよりボア内に設置した石英ロッドを通してサンプル上部より光照射する方法を考案した。この結果、サンプルの上端で30万Lux以上の光照射量が得られた。本法によれば、専用プローブでなくても光照射を行うことができる。この方式で、通常のマルチプローブを用いてフロレラの $^{31}P$  NMR測定を行い、光の点滅に対応するATPの増減を観測することができた(図3)。  
**C. pHと細胞内コンパートメント：**  
フロレラ試料にアニカアラであるCCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) を加えると図4に示すように細胞内外の $P_i$ の序々にシフトしはじめ、3時間

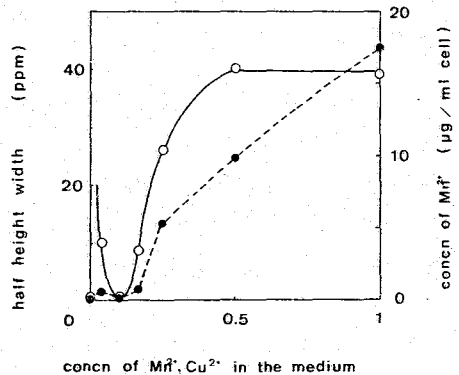
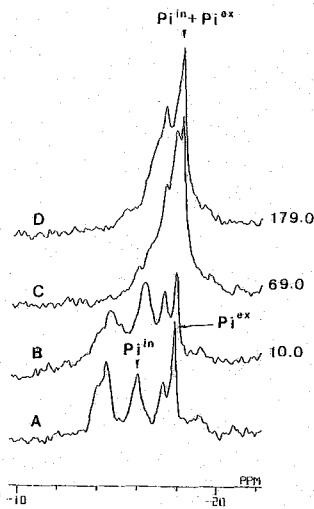
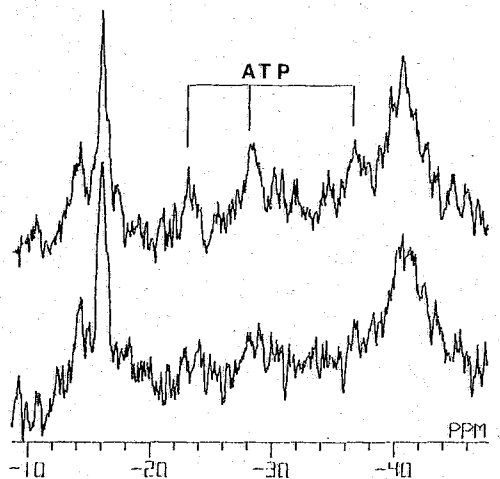


図2. 培養液の $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ 濃度(無視値のときを1とする)に対する細胞内 $Mn^{2+}$ 濃度 ---- および、ポリリン酸の線中 —



↑ 図3. 光照射時のフロレラの $^{31}P$ -NMRスパクトル(上)下は照射停止時. 光強度を測るため、細胞濃度をmediumの $1/10$ ( $1/10$ )にしてある. 積算時間: 9.4分.

→ 図4. CCCP添加後のフロレラの $P_i$ のシフトの変化(B-D), Aは添加前. 数字は経過時間(分).

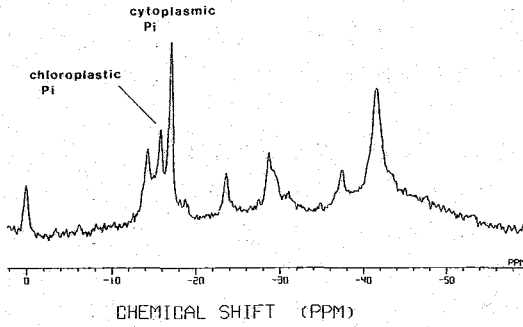


図5. 光照射下でCO<sub>2</sub>培養したクローラの<sup>31</sup>P-NMRスペクトル. 光照射停止25分. 積算9.4分.

後には完全に重なる。この状態でpH滴定を行い、細胞内P<sub>i</sub>のpH滴定曲線を得た。得られた滴定曲線は0.1M KCl中のP<sub>i</sub>の滴定曲線に近く、pK<sub>a</sub>は6.9であった。以後、このpH滴定曲線を用いて細胞内pHの推定を行なった。グルコース培養で得られたクローラでは細胞内P<sub>i</sub>が1本だけ観測され、そのpHは7.8であった。一方、光照射下でCO<sub>2</sub>培養したクローラでは、光照射停止後約70分まで2本の細胞内P<sub>i</sub>が観測され(図5)、これは細胞内の2つのコンパートメントを示すものと考えられる。光照射停止後25分での<sup>31</sup>P-NMRスペクトルの低磁場側P<sub>i</sub>はpH 8.1、高磁場側P<sub>i</sub>はpH 6.8に相当する。以下に示す実験結果から、低磁場側P<sub>i</sub>は細胞内の光合成サイトである葉緑体のP<sub>i</sub>、高磁場側P<sub>i</sub>は細胞質のP<sub>i</sub>に対応すると結論した。その理由は、(1) 暗黒下では、2本のP<sub>i</sub>向にみられるΔpHは図6に示すように次第に小さくなり、遂には1本のP<sub>i</sub>しか観測されなくなる、(2) 光照射時に光化学系IIの阻害剤であるDCMU(3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) 10μMを共存させると、高磁場側ピークはほとんど変化しないのに低磁場側ピークは高磁場シフトし、そのpHが7.8と約0.3低下した、という2点である。またDCMUとのincubation時間を

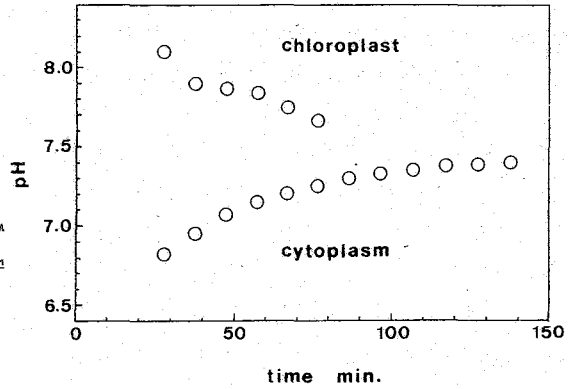


図6. 光照射停止後のクローラの2つのコンパートメントのpHの変化。

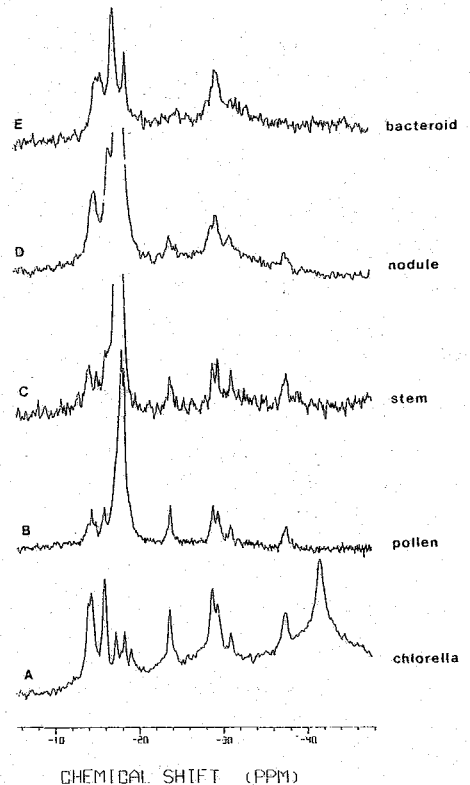


図7. さまざまな植物組織の<sup>31</sup>P-NMRスペクトル. A: クローラ 積算9.4分. B: クローラの花粉(15分) C: ヒマワリの茎(132分) D: マメズ根粒(40分) E: 根粒内のバクテリア(40分)



長くすると低磁場側 $P_i$ の高磁場シフトはさらに大きくなる。なお、ここに観測された葉緑体と細胞質との間の $\Delta pH$ は光照射による葉緑体からの $H^+$ 放出によるものと考えられる。

図7にタバコの花粉、ヒマワリの莖、ダイズの根粒、および根粒内に共生するバクテロイドの $^{31}P$ -NMRスペクトルを示す。いずれもATP等の有機リン化合物を含むスペクトルが得られる。細胞内コンパートメントという観点から、無機リンピークに注目すると、花粉では2本の $P_i$ が観測され、2つのコンパートメントの存在を示唆するが、具体的に何に対応するかは現在のところ不明である。莖の巨大な $P_i$ は細胞内の液胞に由来すると思われる。また、根粒の場合も2本の $P_i$ が観測されるが、リン欠乏の結果や、バクテロイドのスペクトルから、低磁場側は細胞質およびバクテロイド、高磁場側は液胞に由来すると推定される。

#### D. $^{13}C$ -NMRによる代謝産物の転流の測定：

高等植物では葉で同化された代謝産物は葉柄、莖を經由して若い葉や根など他の部位に転流される。ヒマワリの葉に $^{13}CO_2$ を供与し、葉柄部位をそのまま $^{13}C$ -NMR測定し、転流を観測した。

$^{13}C$ 供与後45分から225分の葉柄の $^{13}C$ -NMRスペクトルを図8に示す。時間とともに葉柄内のショ糖が $^{13}C$ 標識されている様子が明らかに捉えられる。この時間に葉内では、多数のアミノ酸、有機酸、糖類が $^{13}C$ 標識され、 $^{13}C$ -NMRで観測されることはすでに報告した。従って $CO_2$ の同化産物の主要な転流形態はショ糖であることがわかる。また、同じヒマワリの葉にvacuum infiltration法により10mMの2- $^{13}C$ -グリシンを供与し、葉での代謝および葉柄での転流を観測した。葉内ではまずセリンのC-2, C-3が標識され、次いでアラニンのC-2, C-3, アスパラギン酸のC-2が標識される。さらに30~60分の後リンゴ酸、グルコース、ショ糖への標識が認められた。この時、葉柄では、セリンおよびグルコースのみが標識された。このことは、葉内では、2分子のグリシンからセリンが生成し、これが解糖系の上下両方向へ代謝されているのに、転流されるのはセリンおよびグルコースのみであることを示している。

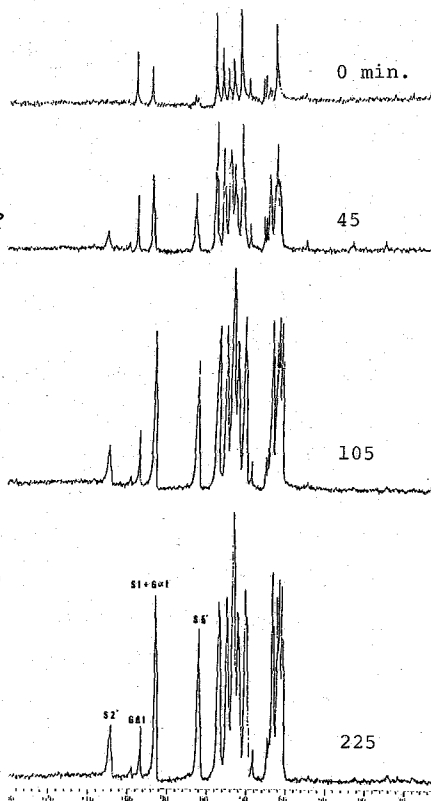


図8. ヒマワリの葉に $^{13}CO_2$ を与えたときの葉柄部位の $^{13}C$ -NMRスペクトル。

<謝辞> 実験に使用したタバコの花粉は、筑波大学、京正晴氏より、また根粒、バクテロイドは豊後研、米山忠夫博士より提供を受けた。記して謝意を表す。

## 74. 水溶性シフト剤を用いた $^1\text{H}$ , $^{23}\text{Na}$ -NMRの生体試料への応用

(京都府立医科大学・一生理, ※脳外科)

○西川弘恭, ※成瀬昭二, 瀬尾芳輝

はじめに

近年, R. K. Guptaら<sup>(1)</sup>とM. M. Pikeら<sup>(2)</sup>は水溶性化学シフト剤を開発し、前者はヒト赤血球浮遊液及び、カエル筋組織中の細胞内外の $^{23}\text{Na}$ -NMRスペクトルを示し、後者はレシチン小胞内外の $^{23}\text{Na}$ -NMRスペクトルとその膜を介する $\text{Na}^+$ イオンの動きを示した。今回、我々は、Guptaらの用いた水溶性化学シフト剤 Dysprosium (III) triphosphate, Dy (PPPi) $_2^{7-}$ を $^1\text{H}$ -NMRに適用し、ヒト赤血球浮遊液中の水の化学シフト値より、赤血球膜を介する交換可能な水の赤血球内外の分画を求めた。また、同シフト剤を $^{23}\text{Na}$ -NMRに適用し、カエル筋及びカエル神経組織中の細胞内外の $^{23}\text{Na}$ -NMRスペクトルを得、その分画と細胞内濃度を算出した。

試料と方法

ヒト赤血球浮遊液の調製：採血後、生理的食塩水で血漿成分を除去し、遠心分離の沈渣の一部 (Hct 97%) を赤血球の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル測定用とし、残りを3mM Dy(PPPi) $_2^{7-}$ を含んだ等張食塩水にて洗い、ヘマトクリット (Hct) = 68, 45, 18%の赤血球浮遊液を3mM Dy(PPPi) $_2^{7-}$ 等張食塩水にて調製した。

カエル筋と神経：カエル筋は縫工筋を用いた。神経は坐骨神経を用いた。筋又は神経は分離後 Frog Ringer's solution 中に保ち、 $^{23}\text{Na}$ -NMR測定後、3mM又は4mM Dy(PPPi) $_2^{7-}$ を含む Frog Ringer's solution 中で平衡させた。また、下行大動脈からの下肢の局所環流によるシフト剤の筋組織内平衡も行った。

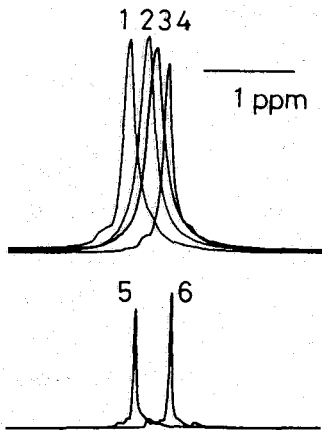
NMR測定：装置はJEOL PFT-100NMR spectrometer ( $^1\text{H}$ : 100MHz)を用いた。 $^1\text{H}$ -NMR測定条件はスペクトル幅は1000Hz, データポイントは4096, パルス繰返し時間は10sec, 積算回数は10回であった。化学シフトの基準としてTMSを用いた。 $^{23}\text{Na}$ -NMR測定条件はスペクトル幅は1000Hz, データポイントは1000, パルス繰返し時間は600 msec, 積算回数は400回であった。スペクトルの面積は画像解析装置 (MOP-AM-03型) で得た。試料の水分量は (wet weight - dry weight) で求め、試料のNa濃度は wet ashing の後、炎光光度計 (Corning 480) で求めた。

結果と考察

ヒト赤血球浮遊液におけるシフト剤を用いた細胞内外の交換可能な水の分画。

細胞膜を介する細胞内外のNaの交換は遅いため、R. K. Guptaらによる $^{23}\text{Na}$ -NMRスペクトルではシフト剤の存在する細胞外液中のNaとシフト剤の存在しない細胞内液中のNaは別々の共鳴線として観測されたが、同じシフト剤によるヒト赤血球浮遊液の水の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルではFig. 1 に示したように赤血球膜を介する細胞内外の水の交換が速いため、水の共鳴線は一つとなり、その共鳴位置はシフト剤の存在する細胞外液シフト位置と存在しない細胞内液のシフト位置についての各々内外水分区画の重みつき平均値を示した。Fig. 1 にDy(PPPi) $_2^{7-}$ を含まないHct=97%, 含むHct=68, 45, 18%の赤血球浮遊液の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル (各々Fig. 1 の1, 2, 3, 4) 及び、生理的食塩水と3mM Dy(PPPi) $_2^{7-}$ を含む生理的食塩水の $^1\text{H}$ -NMRスペクトル (各々Fig. 1 の5, 6) を示した。Hctに対し観測され

にしかわ ひろやす, なるせ しょうじ, せお よしてる



	Hct (%)	chemical shift (Hz)	$f_{in}$	$f_{out}$
suspension of erythrocytes in a saline	97	529.8		
suspension of erythrocytes in a saline containing 3mM $Dy(PPPi)_2^{7-}$	68	513.7	0.64	0.36
	45	503.4	0.42	0.58
	18	490.2	0.13	0.87
saline containing 3mM $Dy(PPPi)_2^{7-}$		484.4		
plasma		522.4		
water		521.0		

TMS was used as external reference.

Fig. 1 ヒト赤血球浮遊液の $^1H$ -NMR スペクトル。  
説明は本文。

Table 1 ヒト赤血球浮遊液のHctと化学シフト及び交換可能な水の細胞内外の分画。

化学シフト値 ( $\Delta\omega_{obs}$ ) をプロットした場合、両者の間には直線性が見られた。Table 1 から細胞内水のシフト値は529.8 Hz、3mM  $Dy(PPPi)_2^{7-}$  を含む生理的食塩水のシフト値は484.4 Hzである。これらの数値を用いた細胞膜を介する交換可能な水の細胞内外の分画 (各々  $f_{in}$ ,  $f_{out}$  とする) は化学交換と同様に次式で表わされる。

$$\begin{cases} \Delta\omega_{obs} = 484.4 \times f_{in} + 529.8 \times f_{out} \\ f_{in} + f_{out} = 1 \end{cases}$$

3種類のHctの赤血球浮遊液について求めた  $f_{in}$ ,  $f_{out}$  をTable 1 に示した。

カエル筋におけるシフト剤を用いた細胞内外のNa。

Fig. 2にカエル縫工筋について、処理前と4mM  $Dy(PPi)_2^{7-}$  を含むFrog Ringer's solutionにて平衡させた後、口紙で軽く溶液を除去して測定された $^{23}Na$ -NMRスペクトルを示した。平衡に達する時間は筋の大きさに依存し、用いた0.5~0.6gの筋では約100 minを要した。Fig.2から得られた細胞内外のNaの信号強度は各々面積より、

$$\begin{cases} Na_{in} = 218 \\ Na_{out} = 1864 \end{cases}$$

であった。カエル筋細胞内Na濃度を  $[Na]_{in}$  とし、細胞間スペースを20%とすると、

$$\frac{0.8 \times [Na]_{in}}{0.2 \times [Na]_{out}} = \frac{Na_{in}}{Na_{out}}$$

と表わされる。蛍光光度計で得られたmediumのNa濃度 =  $[Na]_{out} = 135mM$  と上記面積より  $[Na]_{in} = 3.9mM$  が得られた。この値は Conwayらの値にほぼ等しい。

カエル神経におけるシフト剤を用いた細胞内外のNa。

Fig.3にカエル坐骨神経を筋と同様にFrog Ringer's solution及び4mM Dy(PPPi)<sub>2</sub><sup>7-</sup>を含むFrog Ringer's solutionで平衡させて得た<sup>23</sup>Na-NMRスペクトルを示した。平衡まで約120minを要した。Fig.3から得られた細胞内外Naの信号強度は各々面積より、

$$\begin{cases} \text{Na}_{in} = 379 \\ \text{Na}_{out} = 532 \end{cases}$$

であった。

筋と同様にして神経細胞内Na濃度  $[\text{Na}]_{in}$  を細胞間スペースを20%として計算すると  $[\text{Na}]_{in} = 22\text{mM}$  が得られた。

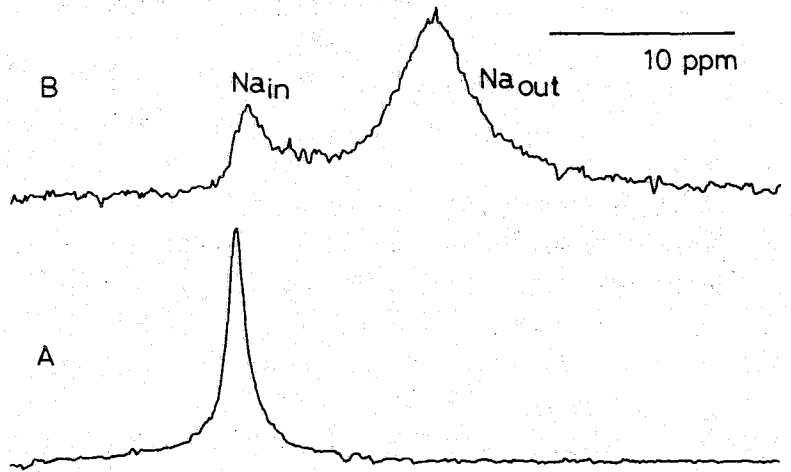


Fig. 2 カエル縫工筋の<sup>23</sup>Na-NMR スペクトル。A: Frog Ringer's solution 中で平衡させた筋, B: 4mM Dy(PPPi)<sub>2</sub><sup>7-</sup> Frog Ringer's solution 中で平衡させた筋,  $\text{Na}_{in}$ ,  $\text{Na}_{out}$  は各々筋細胞内, 外のNaによる共鳴線を示す。

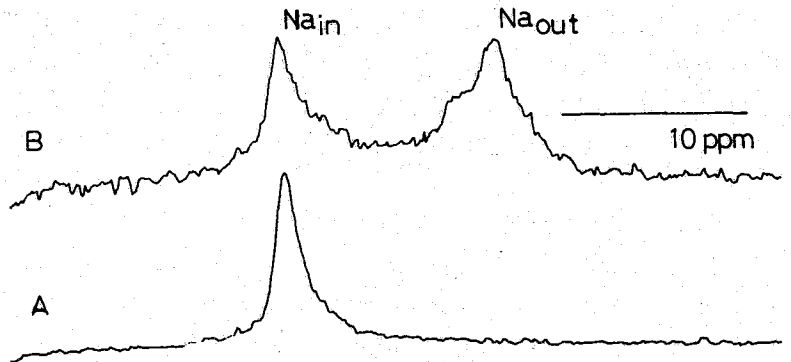


Fig. 3 カエル坐骨神経の<sup>23</sup>Na-NMRスペクトル。A, BはFig.2 のカエル筋と同様の条件でのスペクトルを示す。

文献

- (1) R.K. Gupta & P. Gupta, J. Mag. Res., 47, 344, 1982.
- (2) M.M. Pike et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 810, 1982.

75. glucocorticoid投与条件下軟骨細胞内エネルギー代謝の環流下<sup>31</sup>P-NMRによる研究  
(京都府立医科大学・整形外科・第一生理\*) ○日下 義章  
西川 弘恭\*, 山下 文治, 榊田 喜三郎

目的

軟骨組織はproteoglycan やcollagen など高分子より成る豊富な基質と、この基質の間に比較的粗に散在する軟骨細胞より構成される、無血管組織である。そして、軟骨細胞は細胞外液の浸潤、拡散による酸素および栄養の供給を受けながら、基質を産生している。また、基質の産生のために軟骨細胞は活発な代謝を行っており、特にウリジンヌクレオチドはproteoglycanの合成に直接関与するとされている。

glucocorticoid はステロイドホルモンであるが、本剤は軟骨細胞の基質産生を抑制して<sup>1)</sup>軟骨細胞の変性を来たすとされている。しかし、この抑制に対応する軟骨細胞のエネルギー代謝については不明な点が多い。われわれは、前回の本討論会にて、<sup>31</sup>P-NMRを環流条件下の軟骨組織に適応し、糖リン酸(sugar P)、無機リン酸(Pi)、クレアチンリン酸(PCr)、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 位のヌクレオチドのリン酸( $\alpha$ -P、 $\beta$ -P、 $\gamma$ -P)、NAD<sup>+</sup>を示す<sup>31</sup>P-NMRスペクトルを得、そのエネルギー代謝に検討を加えて報告した。今回、本法を用いてglucocorticoidが軟骨細胞のエネルギー代謝に与える影響を検討した。さらに、<sup>31</sup>P-NMRのみでは化学シフトが一致し、ヌクレオチドの分離が困難であるため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、これらも、分画、定量し、<sup>31</sup>P-NMRスペクトルと比較検討した。一方、glucocorticoidが基質産生速度に与える影響を調べるために、液体シンチレーション法による<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>のとりこみ速度を測定した。

方法

試料としては家兔(体重約1kg)の耳介軟骨を用いた。ペントバルビタールの腹腔内投与麻酔下に耳介を切除し、直ちに氷温のKrebs-Ringer氏液中にて軟骨周囲の組織を除去した。得られた軟骨組織は、<sup>31</sup>P-NMR測定では約1mm<sup>2</sup>、HPLC、液体シンチレーションでは約1cm<sup>2</sup>の小片として使用した。glucocorticoid投与群(12羽)にはリン酸テキサメサゾンナトリウム(16mg/kg体重/day)を7~10日間連日筋肉内注射し、control(14羽)との比較を行なった。また、一部の家兔に関しては、glucocorticoid投与後の回復を検討するため、10日間のglucocorticoid投与後、片側の耳介を試料として第1回目の<sup>31</sup>P-NMRスペクトルを得、その後投与を中止して14日間の経過の後にもう一方の耳介を試料として第2回目の<sup>31</sup>P-NMRスペクトルを得た。

A) <sup>31</sup>P-NMR測定 NMR試料管(10mmφ)内の試料(乾燥重量約200mg)は測定中Krebs Ringer氏液(HEPES-NaOH, pH7.3, 25℃, 7%O<sub>2</sub>)にて持続環流された。なお、glucocorticoid投与群の測定に関しては、環流液にも80mg/lのテキサメサゾンを加えた。装置はJEOL-PFT-100NMRを<sup>31</sup>Pで40.29MHzにて用いた。測定はproton decoupling下に行なわれ、試料は測定中分解能向上のためにspinningされた。スペクトル幅は

くさか よしあき, にしかわ ひろやす, やました ふみはる, まかきた きさぶる

2kHz, テータポイントは4096とした。1.5秒の繰り返し時間で65°パルスを照射し、スペクトルは1000回FID加算平均毎にフーリエ変換し、10000~15000加算平均にて得られた。測定温度は25°とし、化学シフトの基準としてPcrを用いた。

B) HPLC測定 軟骨組織を摘出後、NMR測定時と同一の条件下に置き、その後直ちに凍結乾燥して、乾燥重量を測定した。この軟骨組織の酸可溶成分を0.6N PCAにて抽出、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を加えてpHを6.0~6.5に調整したものを試料とした。HPLCのシステムはすべてWaters社製を用いた。カラムは逆相分配( $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>)および陰イオン交換( $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub>)の2種類を用い、それぞれ1% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0.4% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.01M, pH 3.0 → 0.25M, pH 5.0) を溶媒として流出。紫外線吸収検出器(254nm)にて検出した。2種類のカラムを用いたのは、一方のカラムのみではスクレオチドが十分に分離されなかったためであり、2種類のカラムのデータと相補的に解析することにより、これらの分離、定量が可能であった。ピークの同定、定量は個々のスクレオチドの標準品を用いて行ない、得られたデータは、軟骨乾燥重量1mgあたりの含有量として算出された。また、ピークの面積計算は<sup>31</sup>P-NMR, HPLC共に画像解析装置(KONTRON)を用いて行なわれた。

C) 液体シンチレーション <sup>31</sup>P-NMR測定と同条件のKrebs-Ringer氏液に25  $\mu$ (Ci/ml)のNa<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub>を加えた溶液中で軟骨組織を4時間incubationした。ラベルされた組織はMankin<sup>1)</sup>の方法に従って処理し、scintillation spectrometer(Packard Tricarb)によりRIのactivityを測定。軟骨乾燥重量1mgあたりの<sup>35</sup>SO<sub>4</sub>のとりこみ量を算出した。

結果および考察

controlのスペクトル(Fig. 1-上)ではA: sugarP(-6.86ppm), B: Pi(-5.16ppm), C: Pcr(0 ppm), D:  $\alpha$ -スクレオチドリン酸(2.26, 2.64ppm), E:  $\beta$ -スクレオチドリン酸(7.32, 7.73ppm), F: NAD<sup>+</sup>(8.37ppm), G:  $\beta$ -スクレオチドリン酸(15.8, 16.2, 16.6ppm)の共鳴線が認められた。 $\alpha$ -スクレオチドとしてはアデニン, グアニシン, ウリジン $\alpha$ -スクレオチドなどが含まれるが、<sup>31</sup>P-NMRではこれらの化学シフトの差が小さいため、分離して測定することはできなかった。

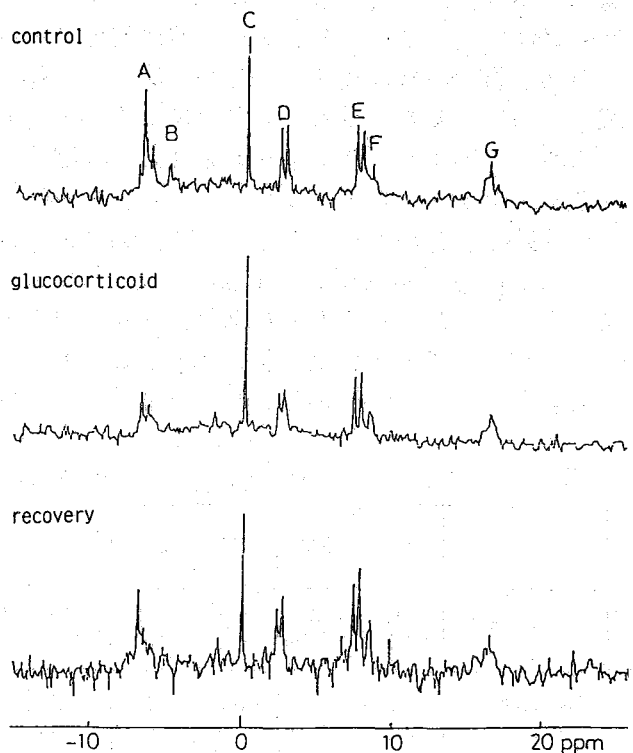


Fig. 1

環流条件下軟骨組織の<sup>31</sup>P-NMRのスペクトル

glucocorticoid投与群のスペクトル(Fig. 1-C)ではcontrolのスペクトルに比して、Pcrに対するsugar Pの共鳴線の信号強度比が、著明に低下している。これに対して、回復過程のスペクトル(Fig. 1-F)ではPcrに対するsugar Pの共鳴線の信号強度比が、controlのそれに近づいているのがわかる。

Table 1に<sup>31</sup>P-NMRより得られた共鳴線の面積比を示す。sugar P/Pcrはglucocorticoid投与群で有意に低下しているのがわかる。

β-P/Pcrはglucocorticoid投与群でわずかに低下しているが、有意差は認められなかった。またγ-P/β-Pは両群ともに1に近い値を示し、<sup>31</sup>P-NMRではヌクレオチド

2リン酸はほとんど観測されていないことが示唆された。

HPLCによるヌクレオチドの分析結果をTable 2に示す。これから明らかのように、ヌクレオチドの分画ではglucocorticoid投与群において、GTP、UTPの減少が著明であり、ATPおよびヌクレオチド2リン酸は有意の変化を示さなかった。また、<sup>31</sup>P-NMRではヌクレオチド2リン酸は観測できなかったのに対し、HPLCにおいてこれらが観測された理由としては、第一に、蛋白質に結合したヌクレオチド2リン酸が、<sup>2)</sup><sup>31</sup>P-NMRでは幅の広い共鳴線となって計測されないこと、第二にHPLC測定のために組織よりヌクレオチドを抽出、分離する過程において、ヌクレオチド3リン酸が一部ヌクレオチド2リン酸とPiに分解されることに由来すると考えられる。

Table 2にて示されたATP、GTP、UTPの合計量の平均値、すなわち、control群5.18nM/mg dry weight、glucocorticoid投与群4.18nM/mg dry weightが<sup>31</sup>P-NMRスペクトルにおけるβ-Pの共鳴線的面積に対応すると考えられるため、Table 1に示される<sup>31</sup>P-NMRの共鳴線的面積比をもとにして、軟骨組織単位乾燥重量あたりのsugar P、Pcr、γ-Pの量を算出することが可能である。これをTable 3に示す。

Table 1 <sup>31</sup>P-NMRスペクトル、共鳴線的面積比

	*sugar P Pcr	β-P Pcr	γ-P β-P
control (n=8)	1.69±0.39	1.61±0.25	0.97±0.14
glucocorticoid (n=6)	1.07±0.39	1.39±0.40	1.06±0.09

\*p < 0.02

mean±SD

Table 2 HPLCによる軟骨細胞内ヌクレオチドの分画、定量成績

	ATP	ADP	*GTP	GDP	**UTP	UDP	ATP GTP UTP	ADP GDP UDP
control (n=6)	3.43 ±0.87	0.26 ±0.06	1.01 ±0.31	0.20 ±0.06	0.74 ±0.18	0.18 ±0.08	5.18 ±1.17	0.64 ±0.16
glucocorticoid (n=6)	3.42 ±0.80	0.21 ±0.09	0.49 ±0.04	0.19 ±0.11	0.23 ±0.14	0.20 ±0.10	4.18 ±0.98	0.60 ±0.11

\*p < 0.01

\*\*p < 0.001

mean  
±SD

nM/mg dry weight

<sup>31</sup>P-NMR, HPLC のデータより算出された軟骨細胞内  
Pcr, sugar P, γ-P の濃度

Table 3

	Pcr	sugar P	γ-P	(β-P)
control (n=8)	3.46±0.83	5.81±1.76	5.03±0.72	( 5.18 )
glucocorticoid (n=6)	3.03±0.87	3.26±1.32	4.42±0.35	( 4.18 )

\*p < 0.02

mean±SD nM/mg dry weight

これより、glucocorticoid 投与群では sugar P が有意に減少することかわかる。Pcr, γ-P も減少傾向を示すか、有意差は認められなかった。

<sup>31</sup>P-NMR にて生体組織内のリン化合物を測定する場合、これら化合物の組織内濃度を知ることが困難である。しかし本実験のように HPLC を併用すると、これが可能となり、加えて、ヌクレオチドの分画、定量を行なうことができる。このように、生きたままの組織内のリン化合物を測定できるという利点を有する <sup>31</sup>P-NMR に HPLC のデータを合わせて解析することにより、一層有意義な生体組織エネルギー代謝に関する情報を得ることができた。

一方、液体シンチレーション法によ

Table 4 軟骨細胞による <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> のとりこみ

り求められた軟骨細胞の <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> のとりこみは、諸家の報告に一致して、glucocorticoid 投与群で有意に抑制されており、その値は平均値で control 群の 25% であった。(Table 4) このような基質産生の抑制は対応したエネルギー代謝の変化として、Baloch<sup>3)</sup>, Meyer<sup>4)</sup> らは glucocorticoid による解糖系酵素活性の低下を報告しており、また Ariyoshi<sup>5)</sup> らは rat の ear strip を試料として glucocorticoid が glucose の細胞膜通過を抑制すると報告している。今回 <sup>31</sup>P-NMR に HPLC を併用して行なった実験では、sugar P, GTP, UTP が glucocorticoid 投与群で有意に減少すること、そして ATP, Pcr, ヌクレオチド 2 リン酸は有意の変化を示さないことが明らかとなった。sugar P は proteoglycan 合成の材料となるものであり、また UTP, GTP はこの合成のエネルギー源として重要である。このように今回の実験で得られた軟骨細胞内エネルギー代謝に関する情報は、glucocorticoid による基質産生の抑制機序にかかわる可能性が強いと思われた。

	CPM/mg dry weight
control (n=5)	29406 ± 6511
glucocorticoid (n=6)	7403 ± 3753

p < 0.01

mean±SD

文献

- 1) Mankin, H.J. et al., J. Bone and Joint Surg., 51-A, 1951-1600, 1969.
- 2) Hashimoto, T. et al., J. Biochem., 90, 1141-1150, 1981.
- 3) Baloch, K., Jr. et al., Lab. Inv., 15, 794-800, 1966.
- 4) Meyer, W.L., et al., Arch. Biochem. Biophys., 129, 431-437, 1969.
- 5) Ariyoshi, Y. et al., ACTA Endocrinol., 74, 723-731, 1973.



## 76. in vivo $^{31}\text{P}$ -NMRによる実験腫瘍の研究

(京府医大, 生理研) ○加藤欣士郎, 里見均, 成瀬昭二,  
堀川善治, 田中忠蔵, 西川弘恭, 巨弘\*

腫瘍に対する in vivo NMRの測定は  $^1\text{H}$ -NMRによる水の緩和時間の測定以来これまで数多くの報告があるが、近年NMR-CTの実用化に伴いNMRが腫瘍の臨床診断へも応用されるようになってきた。一方、 $^{31}\text{P}$ -NMRがその wide bore化と高磁場化の発達に伴って実験腫瘍のエネルギー代謝の in vivo測定法として用いることが可能となってきた。

今回、我々はマウスとハムスターの実験腫瘍に対して、TMR及び Surface coil-NMRを用いて in vivoに於る腫瘍組織内エネルギー代謝について解析し、さらに種々の抗腫瘍剤投与による腫瘍内エネルギー代謝に与える影響を経時的に測定し、投与量による変化の差異についても検討した。

### (実験材料と方法)

実験腫瘍としては C3H/Heマウスの Dunn 骨肉腫, C57BL/6マウスの Lewis 肺癌およびハムスターの神経芽細胞腫を用いた。マウスは体重約 20 gr, ハムスターは体重約 80 grの幼若なものと選び、腫瘍は背部皮下に移植した。移植された腫瘍は1~2週で直径に膨らみ、腫瘍径が7mm~10mm程度になったものを実験に供した。

麻酔はロントバルビタール 30~40 mg/kg 腹腔内注射でおこなった。

抗腫瘍剤はメソトレキセート(MTX), ドキソルビシン(ADM), シクロホスファミド(CP), ビンクリスチン(VCR)を用い、それぞれ少量(臨床常用量)および大量(常用量の約100倍量)を投与した。投与方法はマウスでは腹腔内注( ip ), ハムスターでは腹腔内注または静脈内注( iv )でおこなった。

TMR装置はTMR 32/200 (Oxford Research Systems社製, England)を使用した。観測周波数は  $^{31}\text{P}$  で 32.5 MHz, 磁場は横置き型超伝導磁石で 1.89 Tesla, Boreの径は 200 mm, Loop antenna は4回巻き 13 mm  $\phi$  とした。Parameter は、10  $\mu\text{s}$  中 15  $\mu\text{s}$  中 15  $\mu\text{s}$  中 1 sec,  $T_1$ -タポイント 4000, 積算 400回とした。

SC-NMRはJEOL FX-270 (日本電子社製, Japan) で、観測周波数は  $^{31}\text{P}$  で 109.14 MHz, 磁場は縦置き型超伝導磁石で 6.35 Tesla, Boreの直径は 57 mm, Loop antenna は 10 mm  $\phi$  で、parameter は、10  $\mu\text{s}$  中 16  $\mu\text{s}$  中 2 sec,  $T_1$ -タポイント 2048, 積算 400回とした。

測定に供した動物の腫瘍はNMR測定後屠殺し、腫瘍塊を摘出しホルマリン固定、パラフィン包埋、H-E染色し組織学的検索をおこなった。

かとうきんしろう さとみひとし なみせしやうじ ほりかわよしはる  
たなかちゆうぞう にしかわひるやす わたりひろし

NMRスペクトルの面積計算は画像解析装置MOP-AM03(KONT-RO N, Germany)でおこなった。

(結果及び考察)

1) マウス腫瘍の $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトル

図1はDunn骨肉腫とLewis肺癌の腫瘍 $^{31}\text{P}$ -NMRスペクトルである。低磁場側より、Sugar phosphate (SP), inorganic phosphate ( $\text{P}_i$ ), 同定されない物質(?), phosphocreatine (PCr), nucleotide triphosphate  $\gamma$ -P と nucleotide di-phosphate of  $\beta$ -P ( $\delta$ -P), nucleotide triphosphate と di-phosphate of  $\alpha$ -P ( $\alpha$ -P), nucleotide triphosphate of  $\beta$ -P ( $\beta$ -P)であった。両腫瘍ともにほぼ同様の基本的な spectrum pattern

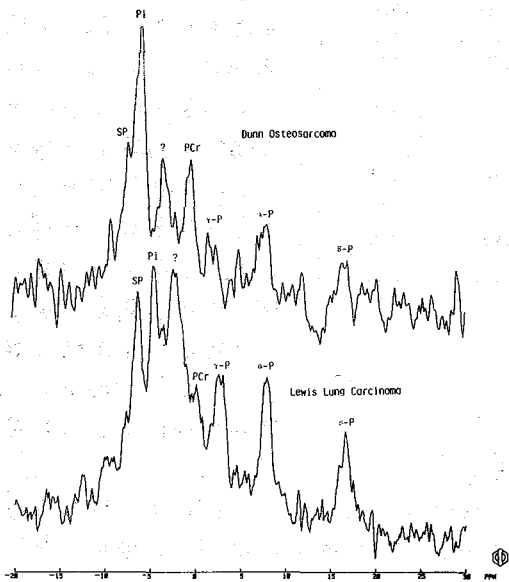


図1

を示す。Dunn 骨肉腫は  $\text{P}_i$  が非常に多く、PCr がやや多く、nucleotide triphosphate が少ないのに対して、Lewis 肺癌では SP,  $\text{P}_i$  が多く二峰性のピークとなり、PCr は少なく、nucleotide triphosphate はやや多くなっている。これらの腫瘍を組織学的に検討すると、Lewis 肺癌は腫瘍の周辺から中心部まで腫瘍細胞が密に配列しているが、Dunn 骨肉腫では中心性壊死を強くみとめる。図示したスペクトルは移植後10日目頃、径10mmの腫瘍のものであるが、腫瘍は経時的に中心性壊死を拡大、腫瘍細胞の実質部分は周辺部に局限してくる傾向があり、移植後の日数と壊死部分対実質部分の容積比にしたがって、 $\text{P}_i$  が増加し、nucleotide triphosphate が減少することを認めた。

2) マウス腫瘍に対する抗腫瘍効果

Dunn 骨肉腫及び Lewis 肺癌マウスに MTX 大量 (4mg) または少量 (0.04mg) 投与した。Dunn 骨肉腫に於ける MTX

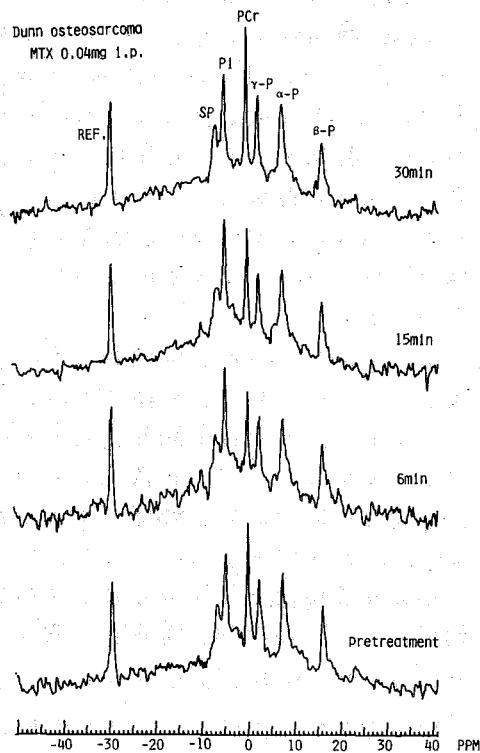


図2

	Sugar-P/PCr	Pi/PCr	$\beta$ -P/PCr	$\gamma$ -P/ $\beta$ -P
pretreatment	0.34	0.68	0.52	1.1
7min post-treatment	0.38	1.0	0.59	1.1
15min post-treatment	0.34	0.65	0.39	1.4
30min post-treatment	0.30	0.61	0.48	1.0

TUMOR : DUNN OSTEOSARCOMA

TREATMENT : MTX, ip, 0.04 mg

表 7

を測定ではこの様な変化はみとめなかった。

MTX 大量投与(図3)ではこのような初期の変化はみなかったが、投与3時間、5時間後には  $P_i$  の増加が生じ、8.5時間から 13.5時間には  $P_i$  の極めて著しい増加をみとめた。

Lewis 肺癌の MTX 少量投与では、Dunn 骨肉腫に投与したと至の様な初期の PCr の減少、 $P_i$  の増加する変化はみとめなかったが、大量投与では投与15分、1.5時間、3時間と PCr の消失と  $P_i$  の著しい増加をみとめた。

Dunn 骨肉腫マウスへの VCR 少量(0.001mg)投与では、15分、30分、3時間後で PCr の漸減と nucleotide triphosphate の減少がみられた。ADM 少量(0.04mg)投与では、初期のこの様な変化はみなかったが、Lewis 肺癌への VCR (0.001mg) あるいは ADM (0.04mg) 投与でもこの様な初期の PCr、 $P_i$  の変化はみとめられなかった。

### 3) ハムスター-神経芽細胞腫の $^{31}P$ -NMR スペクトルパターンと抗腫瘍効果

ハムスターの神経芽細胞腫の  $^{31}P$ -NMR スペクトル(図4)は低磁場側より、SP、 $P_i$ 、同定されない物質、PCr、 $\alpha$ -P、 $\beta$ -P のピークをみとめる。スペクトルの各共鳴線の面積より求めた神経芽細胞腫のリン化合物の濃度比(表2)より筋の  $^{31}P$ -NMR スペクトルに比し、PCr が少なく SP が多い。 $P_i$  が多いこと、また  $\alpha$ -P/ $\beta$ -P  $\approx$  1 であることから nucleotide diphosphate がみられない

少量投与(図2)では投与後6分で、PCr の減少、 $P_i$  の増加がみとめられた。これをスペクトルの各共鳴線の面積より求めたリン化合物の濃度比として表わすと表1の様になるが、この変化は投与後15分で投与前のスペクトルに復し、可逆的現象であることがわかる。以後14時間後までの経時的

Dunn osteosarcoma  
MTX 4mg i.p.

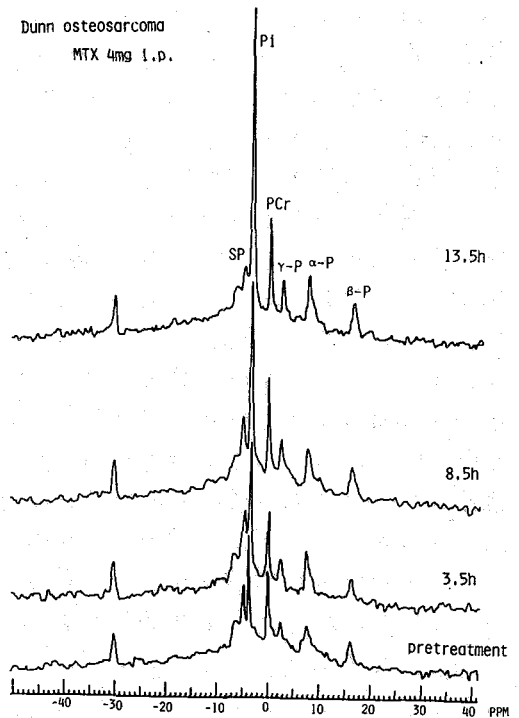
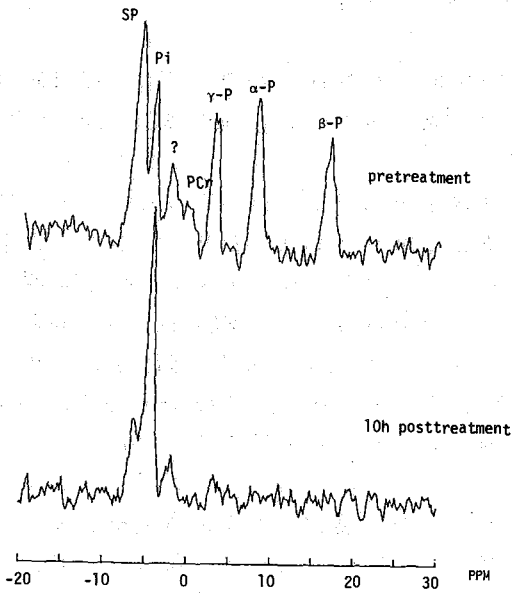


図 3



TUMOR : NEUROBLASTOMA  
TREATMENT : CYCROPHOSPHAMIDE, iv

図 4

を算出すると(表2), 神経芽細胞腫のエネルギー代謝は可逆的に PCr の減少, Pi の増加, nucleotide triphosphate の減少がみられ, また  $\gamma\text{-P}/\beta\text{-P} \approx 1$  であることから nucleotide diphosphate の増加がみられないことがわかった。

	Sugar-P/PCr	Pi/PCr	$\beta\text{-P}/\text{PCr}$	$\gamma\text{-P}/\beta\text{-P}$
pretreatment	7.3	4.0	5.5	1.1
30min post-treatment	<u>39.5</u>	<u>26.8</u>	<u>11.8</u>	0.9
40min post-treatment	10.0	6.5	4.9	1.0
60min post-treatment	8.0	4.2	3.7	1.1

Tumor : Neuroblastoma  
Treatment : Cyclophosphamide, ip

表 2

(参考文献)

- 1) Weisman, I. D, et al, Science, 178 : 1288, 1972
- 2) Ackerman, et al, Nature, 283 : 167, 1980
- 3) Ng, T. C, et al, J. Magnetic Resonance, 49 : 271, 1982
- 4) Evanochko, W. T, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 80 : 334, 1983

ことがわかる。またこれをマウスの腫瘍と比べてもほぼ基本的に同様のパターンを示し、動物の種類や腫瘍の種類によっても、腫瘍の  $^{31}\text{P}$ -NMR の基本的なパターンは他の臓器と容易に識別できることがわかった。

ヒムスターに CP 大量 (35mg) を静注したところ、投与10時間後で、PCr と nucleotide triphosphate のピークの消失と Pi の増加及び SP の減少をみとめた(図4)。また同時間で対照として測定した同じヒムスターの筋のスペクトルにはほぼ変化をみとめなかった。さらに VCR 大量 (0.16mg) 静注投与でも、12時間後に CP 大量投与と同じ様に、PCr と nucleotide triphosphate の消失と Pi の増加、SP の減少をみとめた。また少量投与ではこの様な著しい変化はみなかった。

(CP投与時(C:P)のリン化合物濃度比

## 77. 虚血脳及び無酸素脳 of in vivo $^{31}\text{P}$ -NMR

(京府医大 脳外科, 第一生理\*, 麻酔科\*\*, 生理研\*\*\*) ○堀川義治, 成瀬昭二, 田中忠蔵, 平川公義, 西川弘恭\*, 横野諭\*\*, 巨 弘\*\*\*

脳虚血や無酸素症の病態解析や治療は臨床医学上重要なテーマとなっている。特に、これら病変時の脳内エネルギー代謝の研究は重要視されてきた。しかし、従来の生化学的手法では組織を抽出精製せねばならず、急変するエネルギー代謝の観察には問題があった。一方、最近、生体中の関心領域から  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum を得ることのできる Topical magnetic resonance (TMR) 法や、surface coil 法が開発され、生体のエネルギー代謝研究に新しい道が開かれた。そこで我々は、この in vivo  $^{31}\text{P}$ -NMR を、上記脳疾患のエネルギー代謝解析に適用し、その有用性を検討した。

【方法】1) TMR法による観察:

①脳虚血モデルとして、37匹のWistar rat に対し、主幹4動物結紮による大脳広範囲虚血を作成した。まず両側の椎骨動脈を電気凝固し、続いて両側総頸動脈を糸で結紮して大脳全域の虚血巣を作成した。虚血前後、虚血中、両側総頸動脈結紮解除後(再開通時)の in vivo  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum を経時的に観察した。虚血時間は30分、60分、120分、240分の群に分けた。同時に、頭皮上から脳波を記録し、脳の機能とエネルギー代謝の関係を観察した。さらに、虚血巣に対する治療薬剤の効果をみるため、Perfluorochemicals (PFC, Fluosol-DA<sup>®</sup>)を20ml/kg 投与し、 $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum の変化を観察した。

②無酸素脳症(anoxia)モデルのため、14匹のWistar rat に対し、気管切開を行ない、人工呼吸器で調節呼吸を行なった。95%  $\text{N}_2$  5%  $\text{CO}_2$  混合ガスを吸入させて anoxic anoxia を作成した。anoxia の時間は4~6分群(9匹)と8分群(5匹)に分けた。

③TMR測定は、TMR-32 spectrometer (Oxford Research Systems, England) を用いた。rat を上向きで台に固定し、 $\phi 20\text{cm}$  の水平開口超電導磁石内(1.8 Tesla)に入れ、profile coilで $\phi 1.8\text{cm}$ に絞り込んだ焦点磁場内にratの脳が入るように位置付けを行なった。 $\phi 1.3\text{cm}$ の4-turn surface coil を頭皮上に当て、32.5MHzの共鳴周波数で $^{31}\text{P}$ の信号を得た。(RFパルス幅は $10\mu\text{sec}$ , 1秒毎の繰返して、125~500回の加算を行なった。

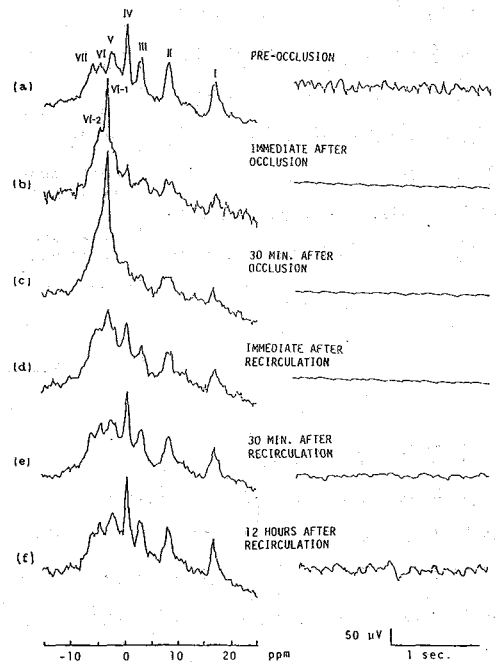


Fig.1 Sequential changes of  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra and EEGs in the rat brain before, during, and after the 30 minutes duration of ischemia.

2) surface coil 法による脳虚血病巣の観察:  
80g の Mongolian Gerbil の右側総頸動脈結紮による一側大脳半球虚血巣を作成し、左右大脳半球の in vivo  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum の経時的变化を観察した。

用いた装置は JEOL FX-270 (JEOL, Japan) で、 $\phi$  5.7 cm の縦置き超電導磁石 (6.35 Tesla) 内に Gerbil を入れ、 $\phi$  1.0 cm の surface coil を、右側大脳半球にあてがい、109MHz の共鳴周波数で  $^{31}\text{P}$  の信号を得た。パルス幅は  $16\mu\text{sec}$ 、2秒毎の繰返しで400回加算した。180分まで結紮側の spectrum を観察し、続いて反対側 (健康側) の spectrum を観察した。

【結果】1) TMR法による脳虚血巣の観察<sup>1) 2)</sup>

正常脳 (虚血前), 虚血中, 30分虚血後再開通後の各々の  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum の経時的变化と同一個体による脳波の経時的变化を Fig. 1 に示した。虚血前 (Fig. 1a)

には、I ~ VII の sharp な peak が認められた。高磁場側から、I;  $\beta$ -ATP, II;  $\alpha$ -ATP,  $\alpha$ -ADP,  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , III;  $\gamma$ -ATP,  $\beta$ -ADP, V; phosphocreatine (PCr), V; phosphodiester 又は 2, 3-DPG, VI; 無機リン ( $\text{P}_i$ ), VII; sugar phosphate と同定された。脳を虚血に陥らせると直ちに ATP, PCr の peak が低下し、 $\text{P}_i$  の peak が著明に上昇した (Fig. 1b)。30分間の虚血後には、これらの変化は最大となった (Fig. 1c)。両側総頸動脈を再開通させると、直後から  $\text{P}_i$  は減少し、ATP, PCr が回復し (Fig. 1d)、30分後にはほぼ正常のパターンに戻った (Fig. 1e)。脳波は、虚血直後に平坦化し

(Fig. 1b), 再開通を行なっても直には回復せず (Fig. 1d),  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum の回復した30分後も依然として回復せず (Fig. 1e), 12時間後ようやく回復した (Fig. 1f)。このように血流再開通後のエネルギー代謝と脳波の回復の間に時間的なずれがあることが同一の実験動物から明らかとなった。30分間虚血群すべてが同様の变化を呈した。60分間虚血群では、6例中3例で再開通後の  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum の回復が認められたが、残り半分と、120分虚血群6匹全例で、回復は認められなかった (Fig. 2)。しかし、PFCによる治療群では、120分虚血群でも8例全例に  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum の回復が認められた (Table 1)。

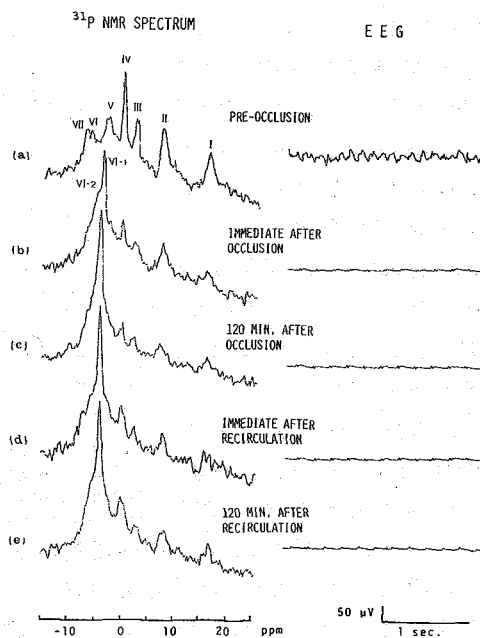


Fig.2 Sequential changes of  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra and EEGs in the rat brain before, during and after the 120 minutes duration of ischemia.

Table 1. CASES OF RECOVERY IN  $^{31}\text{P}$  NMR SPECTRUM

DURATION OF ISCHEMIA	UNTREATED	TREATED WITH PFC
30 MIN.	15 (15)	-
60 MIN.	3 (6)	-
120 MIN.	0 (6)	8 (8)
240 MIN.	-	0 (4)

PFC: Fluosol-DA 20ml/kg i. v. 30min. before C.C. occlusion  
( ) : examined cases

2) TMRによる anoxia 脳  
 の観察<sup>3)</sup>: anoxia  
 4~6分群は9例中4例に  
 Fig. 3 に示す如く <sup>31</sup>P-N  
 MR spectrum の回復が認  
 められた。しかし, anoxia  
 8分群では全例, <sup>31</sup>P-N  
 MR spectrum の回復は認  
 められなかった (Fig 4)。  
 3) Surface coil法による  
 脳虚血の観察:

正常脳 (虚血前) の <sup>31</sup>P-  
 NMR spectrum (Fig. 5a)  
 はTMRで得た正常 rat 脳と

同じ pattern を呈した。一側総頸動脈を結紮すると, 結紮側では ATP, PCr が減少し,  
 Piが増加した (Fig. 5b)。30分以後には ATP, PCr がほとんど減少し, Piの増大した  
 Peakが著明となった (Fig. 5c,d)。結紮側反対側の 大脳半球では <sup>31</sup>P-NMR spectrum  
 の変化は認められなかった (Fig. 5e)。surface coil法では左右大脳半球毎の <sup>31</sup>P-NMR  
 spectrum が区別して観察することができた。

【考察】脳のように特にエネルギー代謝の盛んな臓器では, in vivo <sup>31</sup>P-NMR 測定は  
 重要な新しい情報をもたらしてくれる。す  
 なわち, 同一の実験動物のエネルギー代謝  
 変化を経時的に観察でき, 同時に脳波等の  
 他の観察をも行ないうる利点がある。その  
 結果, 今回示したように, 脳虚血時及び再  
 開通時のエネルギー代謝変化は非常に  
 dynamic であること, また再開通時には脳  
 波の回復はエネルギー代謝の回復よりはる  
 かに遅れることが明確となった。また,  
 TFCの虚血脳に対する治療効果を, 明確に  
 示したことは, in vivo <sup>31</sup>P-NMR spectrum  
 測定が, 薬剤の効果判定の指標となりうる  
 可能性を開くものと考えられる。

TMR法と surface coil法との比較を行なう  
 とTMRでは①磁石が水平開口のため, 実験  
 動物の扱いが非常に容易である。②焦点磁  
 場を作成しているため, 理論的には深部臓  
 器の <sup>31</sup>P-NMR spectrum が観察できる。等  
 の利点がある。surface coil法では①測定範

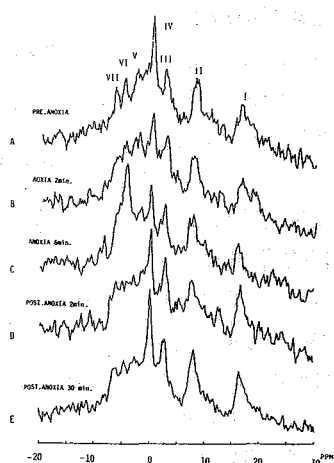


Fig.3 Sequential changes of <sup>31</sup>P-NMR spectra in the rat brain during anoxia for 6 minutes and resuscitation period.

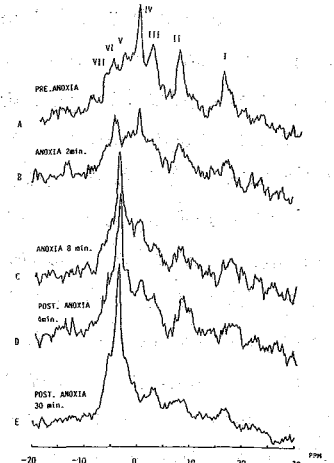


Fig.4 Sequential changes of <sup>31</sup>P-NMR spectra in the rat brain during anoxia for 8 minutes and resuscitation period.

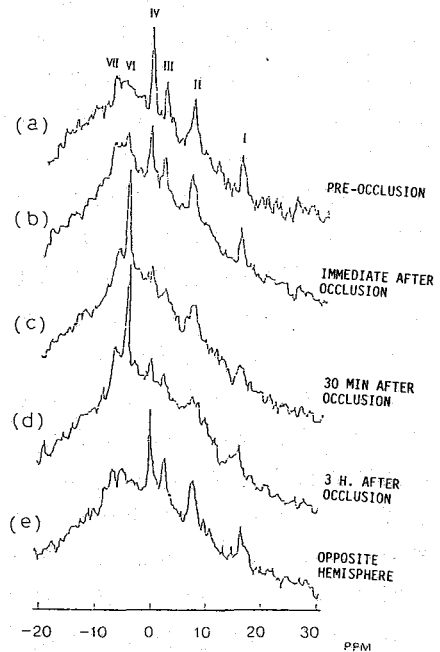


Fig.5 Sequential changes of <sup>31</sup>P-NMR spectra in the cerebral ischemia of the Mongolian Gerbil measured with surface coil method.

囲が狭いため、今回の Gerbil の実験で示されたように小さな部位別の測定が可能である。②従来の NMR 装置を改良したものであるため、本来の高分解能 NMR spectrometer としても使用できる等の利点がある。両者の利点を考えて、目的とする病変に合うように実験設定を行なうのが最良であろう。

*in vivo*  $^{31}\text{P}$ -NMR は緒に著いたばかりであり、今後、臨床方面への適用を含めて、大いに研究されていくと考えられる。

#### 【 References 】

1. Naruse, S., Takada, S., Koizuka, I., and Watari, H.; Jpn. J. Physiol. 33, 19. (1983)
2. 成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, 西川弘恭, 肥塚泉, 高田宗春, 亘 弘; 脳と神経, 35 卷, 603. (1983)
3. 横野 諭, 宮崎正夫, 小栗顕二, 亘 弘, 成瀬昭二; 京府医大誌, 92 卷, 1227. (1983)