

CODEN : KDCHEW
ISSN 0916-0892

九州大学中央分析センター報告

— 第16号 —

REPORT

OF

THE CENTER OF ADVANCED INSTRUMENTAL ANALYSIS
KYUSHU UNIVERSITY

NUMBER 16

1998

九州大学
中央分析センター

目 次

機器分析学の進歩

1. 酸素分子活性化を行う酵素反応のモデル錯体 によるシミュレーション	成田 吉徳	2
1. 配向性黒鉛の欠陥および水素とその熱的挙動	佃 昇	5

研究報告

1. フシコッカジエン誘導体のフシコクシン生産菌 による代謝変換	張 長山、加藤 修雄 森 章、田島 直人 佐々 武史	10
2. 方位像顕微鏡による Cu-Mo 人工積層材料の 結晶方位解析	吉田 冬樹、久保田 誠 池田 賢一、中島 英治 阿部 弘	16
3. 天然モルデナイトとイオン交換処理を施した H型モルデナイトへの炭酸ガスの吸着	福松 輝城、宗像 健三 山月 聰、西川 正史	23
4. ミクロバブル超臨界二酸化炭素法による タンパク質二次構造の崩壊	石川 洋哉、下田 満哉	29
5. ポリヒドロキシフェノール化学発光における カルボジイミド類による増感効果	山下真理子、中園 学 大庭 義史、財津 潔	35
6. 酸性水溶液中でのアルミニウムイオンと フルボ酸の相互作用	横山 拓史	42

「酸素分子活性化を行う酵素反応の モデル錯体によるシュミレーション」

有機化学基礎研究センター 成田吉徳

地球上には酸素分子が希薄な(嫌気的)環境で生命が発生し、その後植物や藻類による光合成により大気中の酸素濃度が上昇することにより、好気的環境に適合した生体反応系が確立された。とりわけ、この過程で酸素分子を用いた様々な酸化反応を触媒する酵素が誕生している。この機能は酵素における分子認識機構の働きと協同することにより、ステロイドの特異的な水酸化反応やプロスタグランジン類の合成など有用な生理活性化合物合成の機能を有するものも、いわば生体内での「高性能酸化触媒」となっている。

一方、酸素は有機化合物に対して一般に反応性が低いために、酸素分子を用いた酸化反応を行うには酵素分子あるいは基質のいずれかを活性化が必要である。すなわち、酸素分子は基底状態では安全な3重項状態をとっており、それぞれの酸素原子上に不対(ラジカル)電子が存在する構造であるために、不対電子を持たない通常の有機分子との反応は困難である。逆に酸素の存在下においても有機分子が安定に存在できるのもこのためである。このような好気的環境において、生物は酸素を様々な用途に利用するために酸素分子を活性化する方法論を、人類が化学反応を行うはるか以前に発見して利用していた。この原理は遷移金属イオンの大部分はd軌

道に不対電子を含むことから、酸素分子と遷移金属それぞれの不対電子が電子対を作ることにより、酸素分子の配位した金属錯体が生成する、これを手がかりに様々な方法用いて酸素—酸素結合を切断し反応活性の高い金属酸素錯体の生成を生物は行っている。これが生物無機化学

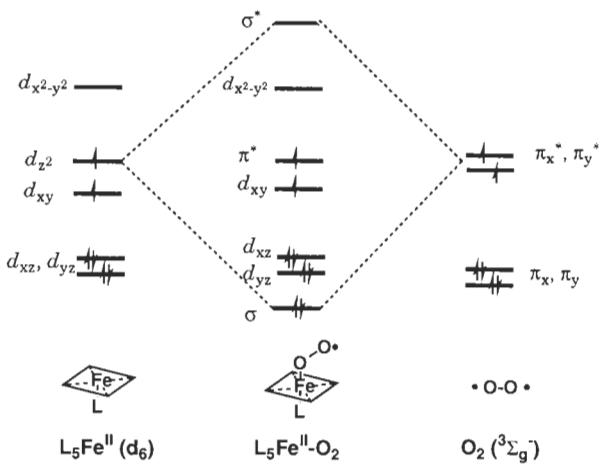


図1. 鉄(II)ポルフィリン酸素錯体形成の分子軌道

における、金属酵素の中でも重要な酸素添加酵素や酸化酵素の主要な働きである(図1)。例えば、チトクロームP-450は酸素分子一ヘム(鉄ポルフィリン)錯体を2電子還元と末端水素へのプロトン化により酸素原子間の不均等開裂を行っている。この様な機構をとることにより、元来ラジカル的な反応を好む酸素分子をイオン反応が可能な活性中間体へと変換している。これにより生体内では危険な酸素ラジカル種(いわゆる活性酸素、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{OOH}$ など)がむやみに発生しないようになっている。この様なヘムを反応中心に含む金属酵素は多種類存在しており、過酸化水素を酸素源とするものも知られている。

その他、動物の筋肉組織やバクテリア中などミトコンドリア膜中には末端酸化酵素と呼ばれるチトクロームc酸化酵素が存在している。この金属酵素は有機物から得た還元体を用いて酸素分子を水へと4電子還元する反応を触媒しているが、その際に、膜間に生じるプロトン濃度勾配を利用して生体内の高いエネルギー物質であるアデノシン3リン酸(ATP)を生産して化学エネルギーを得ている。この酸素代謝活性中心には1個の銅イオンと1個のヘムが含まれており、この金属イオンへ酸素分子が反応することによりチトクロームP-450において見られたものと同様の高酸化活性中間体の生成が考えられる。

そこでこれらの反応を詳しく解明し、酸素を用いた酸化反応として利用するために、酵素の代わりに化学合成したモデル分子を用いて検証することが極めて有力な方法である。モデル分子を用いて行う研究は、複雑な構造を持ち水中でしか扱えない酵素自身を用いた研究と異なり、柔軟性に富んでいることから様々のメリットがある。また、酵素の活性中心を構成する分子、特に配位子は有機分子であることからモデル分子を作る研究は無機・錯体化学よりは有機合成の世界に近いものである。そこで酸素分子の活性化に関与している重要な2種類の酵素、チトクローム

P-450およびチトクロームc酸化酵素のそれぞれの活性中心モデル、1および2、を合成した。1においては分子上に2つのキャビティを持ち、酸素分子配位置、軸配位部位がそれぞれ立体保護され

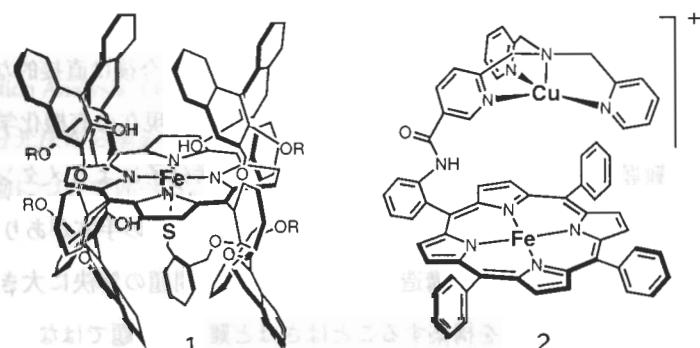


図2. チトクロームP-450、チトクロームc酸化酵素活性中心の化学合成モデル

るようになっている(図2)。

一般にチオレート配位鉄(Ⅲ)ポルフィリンはチオレートから鉄イオンへの強い電子供与があり、酸素分子共存下では容易に自動酸化を受けチオレートが酸化されて分子間で結合することによりジスルフィドとなり錯体の分解を起こしてしまう。たとえ室内光であろうとこの反応は加速され瞬く間に分解する。ところが1の様に立体保護を行うと非常に安定となり、何等特別な工夫をすることなく空気中で取り扱え、正に酵素と同等の分子構造が構築できたものと云える。さらに還元体においても自動酸化を起こすことなく酸素分子の可逆的な吸脱着を行うことが実証された。これにより長年、この分野で懸案となっていた酸素活性化の問題の一つを解決するための道筋が出来たことになる。

またチトクロームc酸化酵素モデル2においては、その還元体は酸素と分子内でペルオキソ型の付加体を室温で形成することが明らかとなった。過酸化水素が脱プロトン化し、酸化体の金属イオンに配位した構造を持つ、この様な銅(Ⅱ)-O-O-鉄(Ⅲ)の構造が室温で安定に存在することは驚きでもあった。この報告を行った直後に酸化体の酵素のX線結晶構造解析がなされ、モデル錯体と同様なペルオキソ型の構造があることが提唱された。すなわち、この様な一見不安定と思われるペルオキシド構造が安定に存在する可能性をモデル分子を用いた研究により予言したことになる。また、このような錯形成が酸素活性化の第1段階であり新たな酸素分子の活性化反応が組めるのではないかと考えている。また、このモデル研究を通して酵素では依然として解明できていない酸素分子の活性化の機構が提唱できる。

今後の展望として、酸化反応の分野において当面の重要な課題の一つは天然ガスの主成分であるメタンを、酸素分子を酸素源とした直接酸化によるメタノールへの選択的酸化である。メタノールを燃料とする燃料電池は内燃機関よりもエネルギー効率が高く排出する炭酸ガス量も少なく、今後の自動車用燃料として注目を集めてきている。しかし、これまでの工業的なメタノール合成反応はエネルギー的には不利な反応である、メタンの水熱反応と発生したCOの水素添加反応の組み合わせであるため、今後は直接的な酸化触媒反応経路によるメタノール合成へと向かわねばならない。これは現在の有機化学、触媒化学において未解決の難題の一つである。一方、このような酸素分子によるメタンの酸化反応は、メタンを基質として利用するバクテリア(メタン資化菌)にその手本があり、これに関与する酵素(メタン一酸素添加酵素)の構造と反応様式はこの問題の解決に大きなヒントを与えていることから、化学モデルを構築することはさほど難しい課題ではない。この様な地球的大規模でのエネルギー源のパラダイムシフトを促すような重要な問題の解決が今後の化学における大きな課題の一つであり、それに対する社会的要請も極めて大きいことに改めて注目すべきである。

配向性黒鉛の欠陥および水素とその熱的挙動

九州大学応用力学研究所 佃 昇

1. はじめに

黒鉛は、その昇華点が3500°Cという高温であるので、耐熱材料として広く用いられている。また、近年、核融合を目指した高温プラズマ装置のプラズマ対抗材料の表面被覆材として使用されている。それは、黒鉛はこの耐熱性と共に、その原子番号が小さくいため、スパッタリングによって生じた炭素原子のプラズマへの影響が他の材料よりも小さいためである。エネルギーをもったプラズマ中の水素は欠陥をつくりながら黒鉛中に進入、内部にとどまる。プラズマによる加熱で対抗壁表面は高温になり、内部に蓄積された水素は再びプラズマ中に放出される。この再放出過程は黒鉛材料の組織、注入条件、温度、損傷欠陥などによって律則されている。

この水素のリサイクリング過程の制御はプラズマ・壁相互作用の研究にとって重要であり、これまで多くの研究がある。しかしながら、いまだその機構は十分に解明されているとはい難い。このためには、とくに原子レベルでの理解が不可欠である。応用力学研究所プラズマ・材料学講座ではいくつかの特徴的方法を組み合わせてこの機構の総合的理解を目指している。

炭素は、知られているように、非晶質、フラー・レン、ナノチューブ、ウィスカ、等方性黒鉛、層間化合物、配向性黒鉛、など多様な構造、組織がある。黒鉛中の欠陥や水素のintrinsicな性質を研究するにはこの中で最も組織の影響をみない高配向性黒鉛(HOPG)であるので、これを中心に研究した。まず、X線回折法による結晶学的評価を行った。次に反跳粒子検出法(Elastic Recoil Detection Analysis: ERDA)による黒鉛中の水素濃度の深さ分布について述べる。さらに、ラマン分光法から黒鉛中の欠陥について述べる。最後に、陽電子消滅寿命測定から欠陥の回復挙動について述べる。

2. X線回折

用いた試料は UNION CARBIDE社の HOPG である。最も配向性の高い(mosaic spreadの小さい)ZYAからその低いZYHまでについて a, c 軸の格子定数、mosaic spread、結晶子の大

きさを測定した。測定は4結晶モノクロメータとSi回折モノクロメータを組み合わせたものである。4結晶モノクロメータを用いることにより入射X線の単色性、平行性は格段に向上する。またSiモノクロメータを用いることにより、スリット幅に依っていた角度分解能から開放される。その結果高精度の測定が可能となる。格子定数についてはZYAからZYHまで同じである($a=0.24613\text{ nm}$, $c=0.67086\text{ nm}$)。このことは原料炭素、熱処理(作製温度)が同じであることを示している。mozaic spreadはgradeに対応しては大きくなっている($0.42^\circ - 2.47^\circ$)、結晶子の大きさは小さくなっている(a 軸方向 $300 - 230\text{ nm}$, c 軸方向 $1360 - 370\text{ nm}$)。

3. 反跳粒子検出法

この方法は加速器を用いた軽元素(いまの場合重水素D)の濃度測定法である。重水素は低エネルギーイオン注入装置を用いて D^{2+} を注入した。注入方向がbasal面に垂直(normal)および平行(edge)の場合を $HOPG_\perp$ 、 $HOPG_\parallel$ と記す。この $8\text{ keV }D^{2+}$ は注入の際欠陥を生成する。欠陥生成量と蓄積原子量の深さ分布のTrim Codeによる計算によると重水素の最大蓄積位置は約 100 nm 、損傷のそれは約 80 nm である。もっとも、この計算は結晶性を一切考慮していない、ひとつの目安である。いま、黒鉛中に重水素がある濃度深さ分布をもって存在するとする。ERD法は高エネルギーイオン(いまの場合 $3\text{ MeV }He^{2+}$)を注入すると He^{2+} はエネルギーを失いながらある深さである重水素Dと衝突する。このDは質量がHeのそれよりも小さいため衝突で得たある運動エネルギーをもって前方に散乱され、物質を通過する際に同様にエネルギーを失いながら表面から飛び出す(図1)。

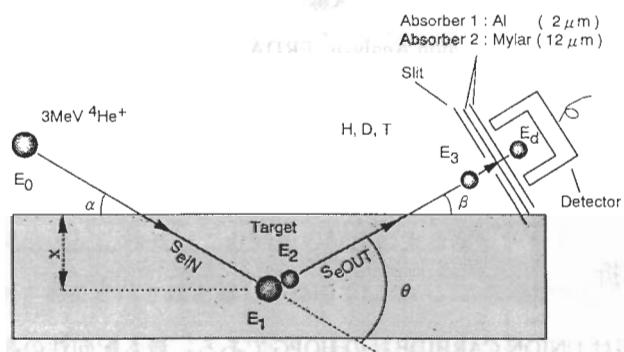


図1 反跳粒子検出法

入射イオンの質量、エネルギー、反跳粒子の質量は既知であるので、この粒子の数とそのエネルギーがわかれば濃度の深さ分布がわかる。

図2に等方性黒鉛、 HOPG_{\perp} 、 HOPG_{\parallel} 重水素濃度を示す。 HOPG_{\perp} ではDの分布はTrim Codeの計算値と同程度の深さに高濃度で局在しているが、等方性黒鉛と HOPG_{\parallel} では更に奥まで重水素が存在している。このことはDがbasal面の間を拡散することを示している。図3に昇

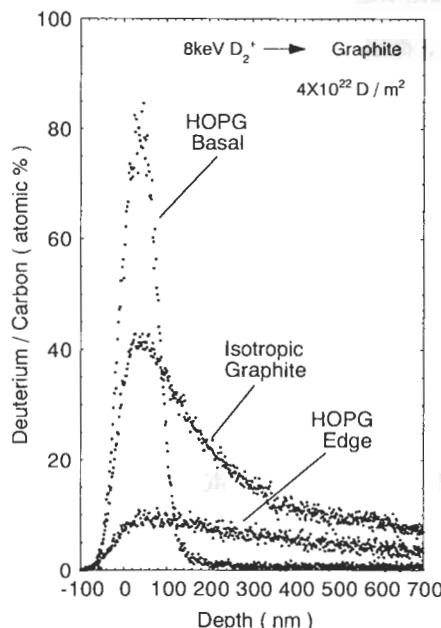


図2 等方性黒鉛、 HOPG_{\perp} 、 HOPG_{\parallel} についての重水素の深さ分布

温による水素の濃度変化の結果を示す。等方性黒鉛、 HOPG_{\perp} では650 Kに小さなステージがあり、1000 KではほとんどのDは放出されてしまうが、 HOPG_{\parallel} ではこの温度でも存在する。これは、Dのトラップサイトが照射欠陥ではないためである。

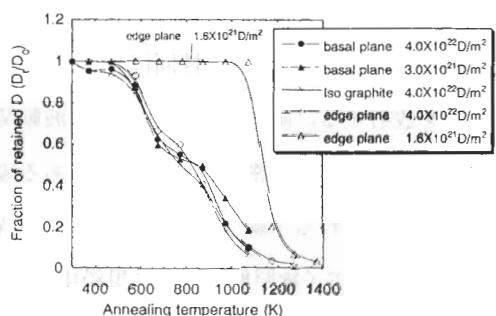


図3 等方性黒鉛、 HOPG_{\perp} 、 HOPG_{\parallel} についての全重水素蓄積量の昇温による変化

4. ラマン分光法

ラマン散乱法は、分子に電磁波を照射すると双極子モーメントが誘起され、その放射する電磁波のスペクトルから分子内振動状態を調べる方法である。この方法は欠陥に敏感であるため黒鉛の評価に広く使用されている。黒鉛構造である場合、 1580 cm^{-1} にGバンドと呼ばれるバンドがあり、ダイヤモンド構造では 1360 cm^{-1} にDバンドと呼ばれるバンドがある。黒鉛化度が低かったり、欠陥が導入されるとこのDバンド付近にブロードなピークが現れる。このピー

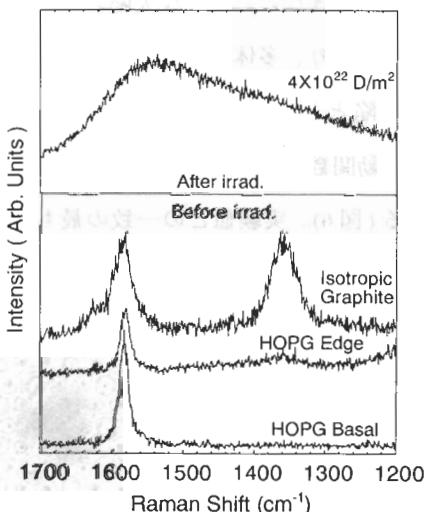


図4 等方性黒鉛、 HOPG_{\perp} 、 HOPG_{\parallel} 重水素未注入、注入($1 \times 10^{22}/\text{cm}^2$)の試料のラマンスペクトル

クは欠陥の周りの sp^2 結合の破れに基づく局在した振動と言われている。照射などによって欠陥濃度を高くしていくとやがて非常にブロードなアモルファスピークになる。図4に $HOPG_{\perp}$, $HOPG_{\parallel}$, 等方性黒鉛の未注入試料のラマンスペクトルを示す。 $HOPG_{\perp}$ では G band のみしかみられないが $HOPG_{\parallel}$ は D band ピークが若干存在する。*edge* 面は非常に弱いため完全にその面を得ることは難しく、若干の乱れが非黒鉛構造としてとらえられているためである。等方性黒鉛では G band, D band 共に存在する。微細な (\sim 数 μm) 結晶粒の粒界は非黒鉛構造で終端化されているためである。いづれの試料も $1 \times 10^{22}/cm^2$ の重水素注入によりほとんどのアモルファスピークになる。

5. 陽電子消滅

陽電子は Na^{22} のような放射性同位元素から β 崩壊で放出される。物質中で電子と対消滅して γ 線を放射する。陽電子の寿命はその波動関数と電子のそれとの重なりで決まる。したがって、空孔など電子密度の低い位置にある陽電子の寿命は長い。 β 崩壊で放出される時に同じく放射される γ 線と対消滅時の γ 線の時間差を測定するのが陽電子消滅寿命測定法である。77Kで電子線照射によって黒鉛中に導入された空孔型欠陥の熱的安定性を調べるために室温から焼鈍温度 $2500^{\circ}C$ までの測定を行った(図5)。陽電子寿命の詳細な理解は物質中の電子、陽電子の正しい波動関数を知ることなしにはできない。可能な欠陥の配置のモデルをつくり、多体ポテンシャルを用いてその欠陥とその周囲の緩和された原子配置、波動関数を計算し、それから寿命を計算する(図6)。実験値との一致の最もよいものが最適の配置である。

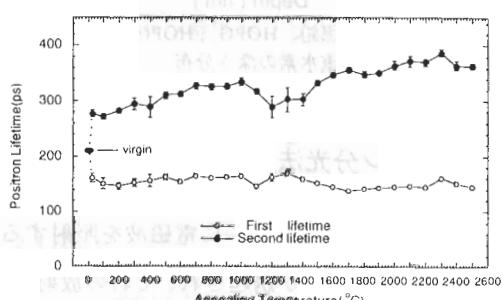


図5 電子線照射された HOPG の陽電子寿命の焼鈍による変化

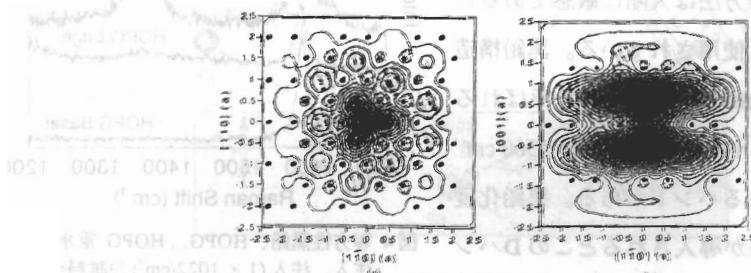


図6 黒鉛中の原子空孔付近の陽電子波動関数、(a)basal面中央での断面、(b)(11.0)断面

6. まとめ

配向性黒鉛の basal 面、edge 面、等方性黒鉛について重水素の濃度深さ分布、その熱的回復挙動を調べた。重水素のトラップ状態、拡散の特徴的差異が明瞭に示された。また、重水素注入による非晶質化、電子線照射による空孔型欠陥の生成とその回復挙動を調べた。しかしながら、水素と炭素との結合、非黒鉛構造への変化の機構の解明は未だ不十分であり、今後の課題である。

本報告は応用力学研究所、大塗秀明博士、藏元英一教授、竹中稔技官と九州工業研究所、高瀬晃博士との共同研究に基づくものである。

Studies on the Physical Properties of Polyisobutylene

Investigations of Physicochemical Differences in the Growing

Rate of the Polyisobutylene Producing Fungi, *Fuscocon-*

sphaeroides, *Fuscocon-sphaericus*, *Asteromyces* sp., *Aspergillus* sp.

Mucorales sp., *Penicillium* sp., *Trichocomaceae* sp.

Trichocomaceae sp., *Aspergillus* sp.

diffusion

polyisobutylene, polyisobutylene-1,10-diene-1,10-diene,

1,10-diene-1,10-diene polyisobutylene, *Fuscocon-sphaericus*, *Fuscocon-*

sphaeroides, *Fuscocon-sphaericus*, *Asteromyces* sp., *Aspergillus* sp.

co-cultivation, co-cultivation, *Fuscocon-sphaericus*, *Fuscocon-sphaericus*, *Asteromyces* sp., *Aspergillus* sp.

polyisobutylene, *Fuscocon-sphaericus*, *Fuscocon-sphaericus*, *Asteromyces* sp., *Aspergillus* sp.

異性体である *fuscocon-sphaericus*, *Fuscocon-sphaericus*, *Asteromyces* sp., *Aspergillus* sp.

polyisobutylene, *Fuscocon-sphaericus*, *Fuscocon-sphaericus*, *Asteromyces* sp., *Aspergillus* sp.

polyisobutylene, *Fuscocon-sphaericus*, *Fuscocon-sphaericus*, *Asteromyces* sp., *Aspergillus* sp.

polyisobutylene, *Fuscocon-sphaericus*, *Fuscocon-sphaericus*, *Asteromyces* sp., *Aspergillus* sp.

フシコッカジエン誘導体のフシコクシン生産菌による 代謝変換

—フシコクシン生合成初期過程に対する考察—

九州大学機能物質科学研究所 張 長山, 加藤 修雄, 森 章
山形大学農学部生物資源学科 田島 直人, 佐々 武史

Studies on the Early Stage of the Biosynthesis of Fusicoccin. Transformations of Fusicoccadiene Derivatives in the Growing Culture of the Fusicoccin-Producing Fungus, *Fusicoccum amygdali*

Chang-Shan Zhang, Nobuo Kato, Akira Mori, Naoto Tajima, and Takeshi Sassa

Institute of Advanced Material Study, Kyushu University,

Department of Bioresources, Faculty of Agriculture, Yamagata University

Earlier studies on the biosynthesis of fusicoccins, diterpenoid glycosides having plant growth-regulating activities, have postulated fusicocca-1,10(14)-diene as the hydrocarbon intermediate. However, we have recently isolated fusicocca-2,10(14)-diene, a double bond isomer of the putative hydrocarbon, from the fusicoccin-producing fungus, *Fusicoccum amygdali*, as a main hydrocarbon constituent. This fact called our attention to the initially-forming fusicoccane hydrocarbon in the fusicoccin biosynthesis. To clarify the genuine hydrocarbon intermediate and the early stage of the biosynthetic pathway of fusicoccin, we have carried out the feeding experiments of synthetic derivatives of these fusicoccadienes.

Fusicocca-2,10(14)-dien-19-ol was converted into fusicocca-2,10(14)-diene- $8\beta,16,19$ -triol by its feeding into the growing culture of *F. amygdali*. This result strongly suggests that the hydroxylation of the C8 position occurs at a very early stage of the fusicoccin biosynthesis.

1. 緒 言

Fusicoccin類は、アーモンド、ピーチの萎凋病菌, *Fusicoccum amygdali* が生産する非宿主特異的毒素として単離され,¹⁾その後、類縁の cotylenin類²⁾と同様の強力な植物ホルモン様活性³⁾と機能調節タンパクである 14-3-3 タンパクを受容体とする⁴⁾ことで注目されている。⁵⁾

生合成的に Fusicoccin 類のジテルペン骨格 (fusicoccane) は geranylgeranyl diphosphate から dolabellane 骨格を経由して形成される。同位体標識実験から、dolabellane からの環化は、C-3 位へのプロトトン化に始まり、連続する二度の 1,2-ヒドリド転移を伴うことが証明され、初期 fusicoccane 炭化水素として、fusicocca-1,10(14)-diene (1) が提唱されてきた。⁶⁾しかし、その二重結合の位置に関しては、最終代謝物である fusicoccin 類の構造から推定されたにすぎない。抗癌剤として期待されている taxol® の生合成前駆炭化水素の構造が、最近 taxa-4(20),11(12)-diene から taxa-4(5),11(12)-diene へ訂正された⁷⁾ことでも明らかなように、最終代謝物の構造からの類推で生合成中間体の構造を議論することは危険である。

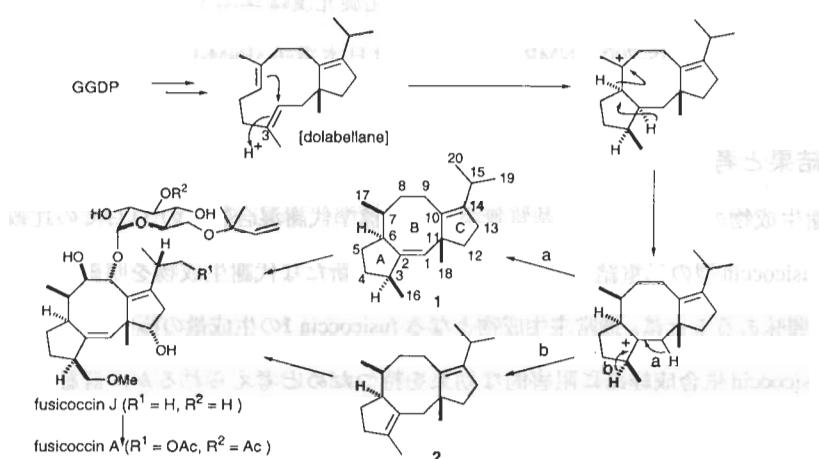


Figure 1. Biogenesis of fusicoccins from geranylgeranyl diphosphate (GGDP)

実際、最近我々は、*F. amygdali* 菌体のアセトン浸漬抽出物を精査することで、1ではなく、その二重結合位置異性体である fusicocca-2,10(14)-diene (2) を炭化水素分画の主成分として単離し、全合成によってその構造を確定した。⁸⁾この事実は、fusicoccin 生合成前駆体として 2 を考慮対象とすべきことを示している。

そこで、初期炭化水素に対する知見を得る目的で、1, 2 の合成中間体である 3, 4⁹⁾の *F. amygdali* による代謝実験を行うことを計画した。これらは、19位に水酸基を有するが、真

の生合成におけるこの位置の水酸化は fusicoccin J⁹ から fusicoccin Aへの変換、すなわち最終段階で起こることからして、もしこれらが生合成経路に乗った代謝を受けるとすると、酸化過程中間体として生じる代謝生成物は天然由来のものとは異なるはずであり、容易に単離可能であると考えられる。

2. 実験

イタリアから入手した Fusicoccin 生産菌、*Fusicoccum amygdali* F6 株¹⁰⁾ を、8.0% の市販砂糖、1.0% のコーンスティーピリカ、0.5% のペプトン、0.5% の食塩を含む 100 ml の培地を用い、500 ml の坂口フラスコ中、25 °C、3 日間振盪培養した。この十分に生育した菌体培養液の 6 本のフラスコ中に、少量の EtOH に溶解した 3 もしくは 4 を 10 mg づつ、計 60 mg を添加し、さらに同条件下 3 日間培養を継続した。菌体を濾別して得られる 6 本分の培養液を 5% Na₂CO₃ によって pH 9.0 に調整し、EtOAc で抽出した。後述する 4 からの代謝生成物は SiO₂ カラムクロマトグラフィーによって精製した。比旋光度はユニオン技研・PM-101、マススペクトルは日本電子・JMS-700、NMR スペクトルは日本電子・JNM-LA600 で測定した。

3. 結果と考察

代謝生成物の解析は、まず基質無添加での標準代謝混合物との TLC での比較により行った。Fusicoccin 型の二重結合を持つ 3 の投与は、新たな代謝生成物を明確には生成しなかったが、興味あることに、通常主生成物となる fusicoccin J の生成量の極端な減少が認められた。3 が fusicoccin 生合成経路に阻害的な効果を持つためと考えられるが、詳細は今後の検討課題である。

一方 4 は、TLC 解析の結果、明確に新たな物質に変換された。SiO₂ カラムクロマトグラフィーによる分離精製の結果、60 mg の投与基質に対して、14.8 mg の amorphous solid {5, $[\alpha]_D^{22} +35.8$ (c 0.30, CHCl₃) } が得られた。

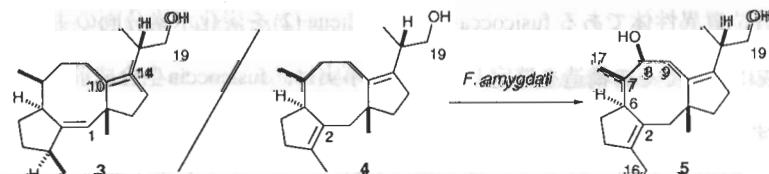


Figure 2. Feeding substrates and the new metabolite 5 from 4.

まず、その分子量 [HREIMS, Found: m/z 320.2343 (M^+); Calcd for $C_{20}H_{22}O_3$: 320.2351] から 4 に更に二個の水酸化が起こった fusicoccadienetriol であることが推定された。室温下における¹H, ¹³CNMR スペクトルはブロードなシグナルを与える、その解析は困難であったが、これは中央の 8員環の立体配座に由来する配座異性体の存在を示唆する結果である。そこで、低温下での測定を検討したところ、-30 °Cにおいて 2つの配座異性体 (~4 : 1) に由来するシグナルに分離できた。以下、優先配座異性体に帰属できるシグナルのみを根拠に論じる。

磁場勾配パルスを併用した H-H COSY (COrelation SpectroscopY), HMQC (Heteronuclear Multi Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Mutiple Bond Connectivity) の各二次元測定を行い、以下の事実を考え合わせることで、¹H, ¹³C の各シグナルを Table 1 に示すように帰属した。

Table 1. ¹H and ¹³CNMR assignments for the major conformer of 5 at -30 °C in $CDCl_3$ (¹H/600 MHz and ¹³C/150 MHz)

position	δ H (ppm)	coupling constants (Hz)	δ C (ppm)
1	2.25 2.37	br d, 14.5 d, 14.5	36.68
2	—		140.21
3	—		139.45
4	2.30 2.35	m m	31.70
5	1.40 1.94	m dt, 12.5, 8	31.40
6	2.65	br dd, 10, 8	47.71
7	2.00	m	42.18
8	3.82	dt, 12.5, 4	76.26
9	2.22 2.47	dd, 13, 12.5 br dd, 13.4	27.89
10	—		142.46
11	—		49.88
12	1.36-1.42	2H, m	32.53
13	2.11-2.18	2H, m	26.69
14	—		136.51
15	2.87	d quint., 9.5, 6.5	35.55
16	4.16 4.22	d, 12 d, 12	59.31
17	0.95	3H, d, 7	6.41
18	0.96	3H, s	27.32
19	3.41 3.49	dd, 10.5, 9.5 dd, 10.5, 6.5	65.79
20	1.01	3H, d, 6.5	14.96

1) 2 個の二重結合が存在するが、オレフィン水素は存在せず、投与基質 4 の二重結合位置が保持されている。2) 4 に存在した C16-Me が消失し、代わって δ H 4.16 (d, $J=12$ Hz), 4.22 (d, $J=12$ Hz) の AB型の水酸基の付け根に帰属されるアリルメチレン水素が出現した。3) もう一個の水酸化に由来する 3.82 (dt, $J=12.5, 4$ Hz) のメチン水素は、COSY スペクトルにおいて、C17-Meとの相関で確定できる H-7 と相関を持ち、H-6 が 2.65 (br dd, $J=10, 8$ Hz) に残存するので、H-8 と帰属される。以上のことから、新たに得られた代謝生成物 5 の構造は fusicocca-2,10-diene-8,16,19-triol であると結論した。新たに生じた 8位の立体化学は、H-6 を照射することで、H-8 に nuclear Overhauser effect (NOE) が誘起されることが、差 NOE スペクトルから明らかであり、H-8 が α 配置、すなわち 8 β -OH であると確定できた。
 5において、C2-C3二重結合位置は保持され、fusicoccin型の C1-C2二重結合への異性化は起こっておらず、この結果が真の生合成経路によって生じたものであるとするのは早計だが、

8位の立体化学を含め水酸化位置は fusicoccin と合致している。さらに、休止菌体を用いた代謝実験を行ったところ、**5**の生成量が極端に減少し、新たな代謝生成物を生じた。その構造は未だ明確ではないが、全く異質の酸化を受けた可能性が高く、もっぱらアリル酸化が進行したと推定している。すなわち、**5**は生育菌体によってより効率的に生成されることを意味し、眞の酸化経路と無縁ではないと考えられる。その観点に立つと、アリル位の9位メチレンが残存 [2.22 (dd, $J=13, 12.5$ Hz), 2.47 (br dd, $J=13, 4$ Hz)] し、飽和な8位メチレンが単独に水酸化を受けている点が特に注目され、fusicoccin の 8,9-グリコールが段階的水酸化で生成することを示唆し、同時に、fusicoccadiene から fusicoccinへの酸化過程にあって、8位水酸化が早い段階で起こっていることを推測させる。したがって、今後**3**, **4**の $\beta\beta$ 水酸化体を合成し、その代謝実験によって、初期炭化水素を特定すべく検討する予定である。

4. 謝 辞

Fusicoccin 生産菌 [*Phomopsis (Fusicoccum) amygdali*] の入手にご協力いただいた、Antonio Graniti 教授 (University of Bari, Italy) に謝意を表したい。

5. 参考文献と注釈

- 1) A. Ballio, M. Brufani, C. G. Casinovi, S. Cerrini, W. Fedeli, R. Pellicciari, B. Santurbano, A. Vaciago, *Experientia*, **24**, 631 (1968); K. D. Barrow, D. H. R. Barton, E. B. Chain, U. F. W. Ohnsorge, R. Thomas, *Chem. Commun.*, 1198 (1968).
- 2) T. Sassa, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1415 (1971); T. Sassa, M. Togashi, T. Kitaguchi, *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1735 (1975); T. Sassa, A. Takahama, *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 2213 (1975).
- 3) E. Marr'e, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 273 (1979).
- 4) H. A. A. J. Korthout, A. H. De Boer, *Plant Cell*, **6**, 1681 (1994).
- 5) B. De Boer, *Trends Plant Sci.*, **2**, 60 (1997).
- 6) A. Banerji, R. B. Jones, G. Mellows, L. Phillips, K.-Y. Sim, *Chem. Commun.*, 2221 (1976); G. Randazzo, A. Evidente, R. Capasso, F. Colantuoni, L. Tuttobello, A. Ballio, *Gazz. Chim. Ital.*, **109**, 101 (1979).
- 7) A. E. Koeppe, M. Hezari, J. Zajicek, B. S. Vogel, R. E. LaFever, N. G. Lewis, R. Croteau, *J. Biol. Chem.*, **270**, 8686 (1995).

- 8) N. Kato, C.-S. Zhang, T. Matsui, H. Iwabuchi, A. Mori, A. Ballio, T. Sassa, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2473 (1998).
- 9) A. Ballio, C. G. Casinovi, V. D'Alessio, G. Grandolini, G. Randazzo, C. Rossi, *Experientia*, **30**, 844 (1974); K. D. Barrow, D. H. R. Barton, E. Chain, D. Bageenda-Kasujja, G. Mellows, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 877 (1975).
- 10) *Fusicoccum amygdali* の F6 株は、fusicoccin 類の高生産菌株で、本研究に用いた条件においては、fusicoccin J を主代謝生成物として与える。

方位像顕微鏡による Cu-Mo 人工積層材料の結晶方位解析

吉田 冬樹[†], 久保田 誠^{††}, 池田 賢一^{††}, 中島 英治[†], 阿部 弘[†]

Analysis of crystallographic orientation in Cu – Mo Lamellar composite by Orientation Imaging Microscopy

F. Yoshida , M. Kubota , K. Ikeda , H. Nakashima and H. Abe

Abstract

It is well known that an interface sliding strongly affects strength of composite materials at high temperatures. However, the mechanism has not been clarified because the crystallographic orientation of each layer has been difficult to measure by X – ray technique and transmission electron microscopy.

Recently, a new crystallographic orientation measuring technique based on electron back – scatter diffraction (Orientation Imaging Microscopy : OIM) has been developed. OIM has high space resolution and, can measure crystallographic orientation of crystalline materials by submicron step and can cover an area as large as several millimeters. Accordingly, it is considered that this technique is a suitable technique to measure the crystallographic orientation of composite materials.

In this paper, the results of electron back – scatter diffraction measurement of crystallographic orientation of each layer of Cu – Mo artificial lamellar composite which could not be clarified by X – ray technique and transmission electron microscopy is described.

†九州大学大学院総合理工学研究科物質理工学専攻

Department of Molecular and Material Sciences Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University

††九州大学大学院

Graduate Student, Kyushu University

1. はじめに

複合材料は常温では優れた強度特性を示すが、高温になるとその強度が著しく低下することが知られている。この主な原因は高温で母相と強化相の間で界面すべりが発生するためであり、この界面すべりを防止することができれば複合材料の活躍の場はさらに拡大するものと考えられる。ところが、界面すべり機構についての理解はほとんど得られていないのが現状である。これは、双結晶等の試料の作製が困難であることに加え、機構を検討する際に必要となる各層間の結晶方位に関する情報が、従来のX線回折や透過型電子顕微鏡を用いる方法では、空間分解能や試料の調整の問題から得られにくいという点にも問題があるようと思われる。

最近、後方電子線回折(EBSP: Electron Back-scatter Diffraction)⁽¹⁾⁽²⁾を用いて結晶の方位解析を行う新たな装置、方位像顕微鏡(OIM: Orientation Imaging Microscopy)が開発された。この装置の方位の測定精度は高く、結晶方位を数ミリメータの広い領域からサブミクロン単位で測定できる。さらに、この装置は後方電子線回折が得られる結晶性材料であればその構造によらず全ての材料に適用でき、その解析用試料として薄膜を用いる必要がないため、その調整も比較的容易であるという利点も有している。このように方位像顕微鏡は、複合材料の方位関係を知るためには最適の解析装置である。

そこで本論文では、これまでX線回折や透過型電子顕微鏡では困難であったCu-Mo人工積層材料中の銅とモリブデン層間の結晶方位関係を、方位像顕微鏡を用いて測定した結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 装 置

本実験に用いた方位像顕微鏡は、TexSEM社製のwindows versionのOIMである。ここでは、この装置の特徴について述べる。

方位像顕微鏡は、Fig.1に示すように、走査型電子顕微鏡(タンゲステンフィラメント型の電子銃を装着した日本電子社製JSM-5310)、EBSDパターンを観察する高感度カメラおよび電子線と高感度カメラの制御と得られたEBSDパターンの指紋付け等を行うパーソナルコンピュータによって構成される。この装置構成で得られる方位の測定精度は通常 2° 以下、空間分解能は約 $0.2 \mu\text{m}$ で、観察領域はミリメートルオーダーである。結晶方位の測定精度は装

置の構成によってほとんど変化することはないが、空間分解能は電界放射型の走査型電子顕微鏡を用いることによって約 $0.05\text{ }\mu\text{m}$ まで高めることができる⁽³⁾。また、解析に要する時間は、用いるパーソナルコンピュータの性能に著しく依存するが、233MHzのCPU搭載のコンピュータを用いている本装置では、通常1秒以内である。さらに方位像顕微鏡では、EBSDパターンが結晶構造によって異なることを利用し、結晶構造の同定と方位解析を同時にを行うことが可能である。この特性は、複合材中の強化相と母相の結晶方位関係を測定する際に非常に有効であり、本研究においても、面心立方格子(fcc)と体心立方格子(bcc)の二つの結晶データを用いて結晶構造の識別と指数付けを行った。

本研究で設定した観察条件は、観察領域 $0.55\text{mm} \times 2\text{mm}$ 、ステップ間隔 $50\text{ }\mu\text{m}$ 、加速電圧 25kV である。

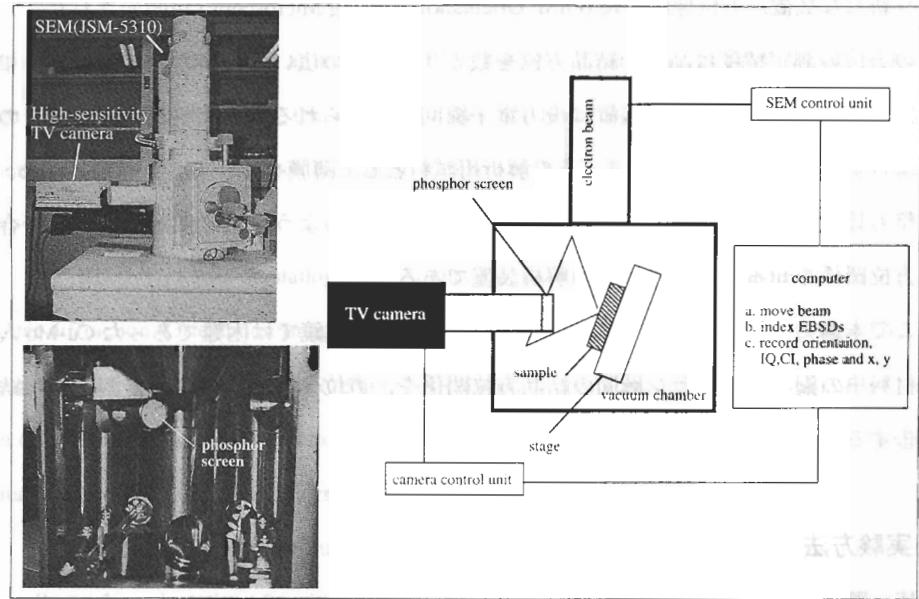


Fig.1 Schematic illustration of the configuration of Orientation Imaging Microscopy .

2.2 方位像顕微鏡用試料の調整

本測定に用いた試料は、モリブデン単結晶からなる積層体と純度4Nの無酸素銅を用い、溶浸法⁽⁴⁾により作製したCu-Mo人工積層材料である。ここで、用いたモリブデンの積層体は3層で、Fig.2に示すようにモリブデン層の界面は(010)で、中央と両外側の[001]軸の方向が 70° 傾いている。また、Cu-Mo人工積層材料の内側の銅とモリブデン層の厚さは約 $400\text{ }\mu\text{m}$ である。

方位像顕微鏡用試料は、Cu-Mo人工積層材料の界面が観察面と垂直になるようにダイヤモンドカッターを用いて厚さ約1mmに切り出した。次に、この試料の表面をダイヤモンドペーストを用いて鏡面仕上げした。この状態でのモリブデン層のEBSDパターンの観察結果をFig.3(a)示す。図より、EBSDパターンがまったく得られていないことが分かる。これは、銅層についても同様であった。

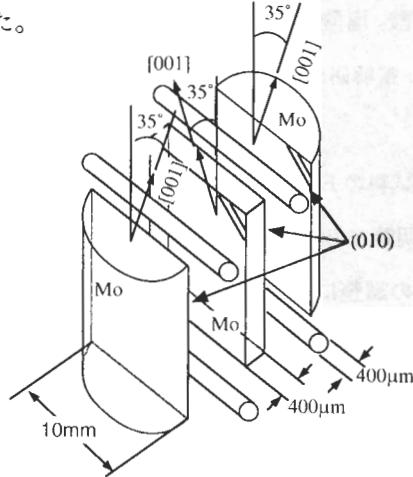


Fig. 2 Schematic illustration of laminated block.

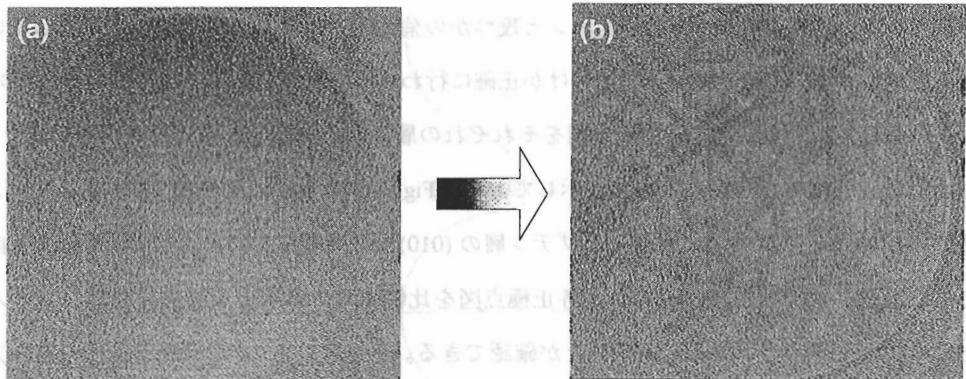


Fig. 3 Results of observation of EBSDs before (a) and after (b) electropolishing.

ところで、EBSDパターンの形成機構は透過型電子顕微鏡で観察される菊池線⁽⁵⁾と同じであり、菊池線の出現はひずみに敏感である。すなわち、ひずみの大きな試料では菊池線は観察されない。さらに、方位像顕微鏡では試料表面が電子線に対して70°傾斜して装着されているために、電子線は試料の深さ方向に対して0.05 μm程度しか入らないことが知られている。したがって、本試料でEBSDパターンが観察されなかったのは、機械研磨によって試料のごく表面に導入されたひずみの影響による可能性が高い。そこで、本研究では表面の加工層を取り除くために次のような処理を施した。

まず銅層表面の加工層を取り除くことを目的に、 HNO_3 と H_2O の容積比が1:3の水溶液を用いて10分間腐食を行った。この時、マニキュアを用いてモリブデン層を保護し、モリブデン層の硝酸水溶液による腐食を防止した。腐食後、メチルアルコールを用いてマニキュアを除去し、さらにモリブデン層表面の加工層を取り除くための電解研磨を行った。研磨にはメチルアルコール:硫酸:塩酸の容積比が73:20:7の電解研磨液を用い、研磨条件は30V, 1A, 30sである。この時、電解研磨液を液体窒素を用いて冷却し、液温を研磨液の融点直上とした。

腐食と電解研磨を行った試料のEBSDパターンの観察結果をFig.3(b)に示す。図より、加工層を取り除くことにより明瞭なEBSDパターンが観察されていることが分かる。この結果より、方位像顕微鏡用試料の調整に際しては、試料表面の加工層を除去することが重要であることが明らかになった。

3. 解析結果

Fig.4は、得られたEBSDパターンよりfccとbccの識別と指数付けを同時に行つた結果の一例である。観察されたEBSDパターンと幾つかの菊池線より求めた菊池図形が一致していることから、結晶構造の識別と指数付けが正確に行われることが分かる。Fig.5は、CI値⁽⁶⁾0.3以上の条件で作製した{001}正極点図をそれぞれの層について示す。ここで、図中のX, YおよびZはそれぞれ材料系の方向を示しており、Fig.5(f)に示したように、Xはモリブデン層の(010)面に平行な方向、Yはモリブデン層の(010)面に垂直な方向およびZは観察面方向である。モリブデン層より得られた各正極点図を比較すると各層とも方位の分散はほとんどなく、全ての層で単結晶であることが確認できる。さらに、A, CおよびE層間の結晶方位関係は約4°の範囲内でFig.2に示した積層体の方位関係を満足しており、積層体が正しく方位制御されていることが分かる。また、BとDの銅層の正極点図においても方位の分散ではなく方位も同じであることから、銅層も溶浸法によって作製したにもかかわらず共に結晶方位の等しい単結晶となっていることが分かった。これらの正極点図を用いて、銅とモリブデン層の結晶方位関係の解析を行つた結果、モリブデン層の[010]方向と銅層の[25 $\bar{7}$ 8]方向が一致し、さらにモリブデン層の[001]方向と銅層の[1 $\bar{1}$ 4]方向が35°の関係にあることが明らかになった。

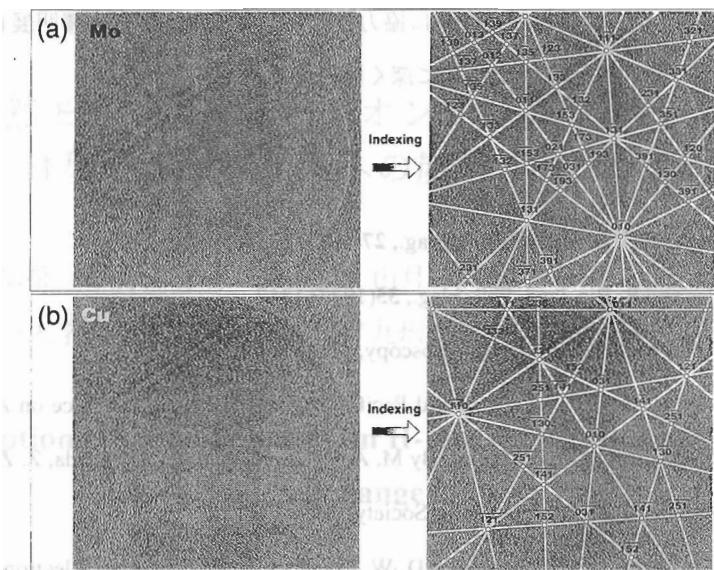


Fig.4 EBSDs from (a) a body-centered cubic material, molybdenum , and (c) a face-centered cubic material, copper. Typical indexing EBSDs molybdenum and copper.

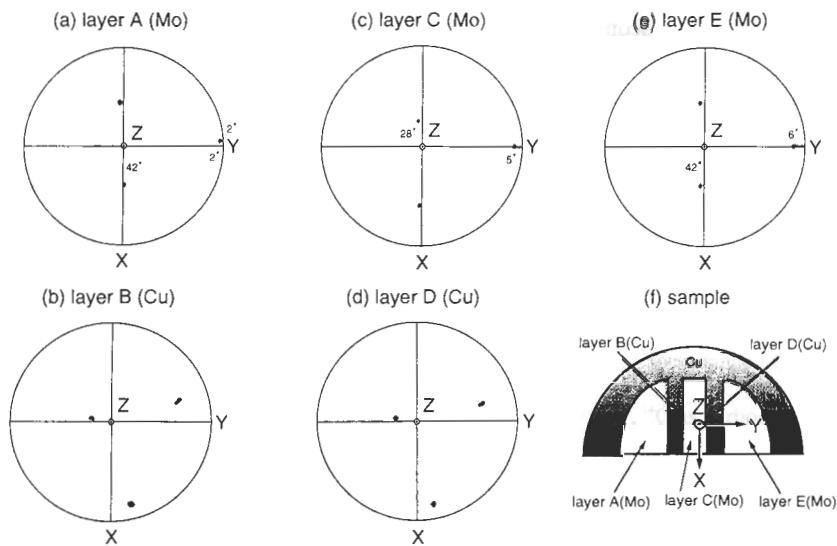


Fig.5 {001} pole figures from each phases of Cu-Mo lameller composite and sample

4. まとめ

以上の結果から知られるように、方位像顕微鏡を用いることによって、方位制御を行った複合材料の結晶方位の確認や母相と第2相の結晶方位関係の解析を比較的簡単にを行うことが可能となった。

今後は、この装置を用いて得られた結晶方位の情報をもとに界面すべり機構についての理解をより深めていきたい。

終わりに、Cu-Mo人工積層材料の作製に協力された、本学大学院生吉澤明展(現:新日本製鐵)氏と宮本聰(現:トヨタ自動車)氏に深く感謝する。

5. 参考文献

- (1) J. A. Venables and C. J. Harland, Phil. Mag., **27**(1973) 1193.
- (2) J. A. Venables and R. Bin-Jaya, Phil. Mag., **35**(1977) 1317.
- (3) T. C. Isabell and V. P. David, Ultramicroscopy, **67**(1997) 59.
- (4) F. Yoshida and H. Nakashima, The Third Pacific Rim International Conference on Advanced by Materials and Processing(PRICM3) ed. By M. A. Imam, R. DeNale, S. Hanada, Z. Zhong and C. N. Lee, The Minerals, Metals&Materials Society, (1998) 417.
- (5) P. B. Hirsh, A. Howie, R. B. Nicholson, D. W. Pashley and M. J. Whelan, Electron Microscopy of Thin Crystals, Butterwonths, London, (1965) 119.
- (6) D. P. Field, Ultramicroscopy, **67**(1997) 1.



図5-1 Cu-Mo人工積層材料の電子顕微鏡写真

図5-1はCu-Mo人工積層材料の電子顕微鏡写真である。この像は、Cu-Mo人工積層材料の断面構造を示すものである。

図5-1はCu-Mo人工積層材料の電子顕微鏡写真である。この像は、Cu-Mo人工積層材料の断面構造を示すものである。

図5-1はCu-Mo人工積層材料の電子顕微鏡写真である。この像は、Cu-Mo人工積層材料の断面構造を示すものである。

天然モルデナイトとイオン交換処理を施した H型モルデナイトへの炭酸ガスの吸着

福松 輝城*, 宗像 健三**, 山月 聰*, 西川 正史**

*九州大学大学院工学研究科, **九州大学大学院総合理工学研究科

Adsorption of carbon dioxide on H-mordenite obtained by ion exchange

Teruki Fukumatsu[†], Kenzo Munakata[‡], Satoshi Yamatsuki[†]

and Masabumi Nishikawa[‡]

[†]Graduate school of engineering, Kyushu University

[‡]Interdisciplinary graduate school of engineering sciences, Kyushu University

Abstract

Reprocessing of spent nuclear fuel produces nuclear off-gases that contain various radioactive gases. Emission of these radioactive gases to the environment must be prevented as low as possible not only for protection against radioactivity but also for the advancement of public acceptance of the nuclear energy. The nuclear off-gases contain tritium as $^3\text{H}_2$ or tritiated water vapor, ^{14}C as carbon dioxide, ^{85}Kr and ^{133}Xe as chemically inert gases, ^{129}I as I_2 or CH_3I and so forth. At present, these radioactive gases are released into the atmosphere except Iodine. Thus, an efficient recovery system of these gases needs to be developed. The adsorption process could be one candidate to achieve this purpose. In this work, we studied the application of the adsorption process to the treatment of the off-gas. Natural mordenite and H-mordenite was used as adsorbents and we investigated adsorption behavior of carbon dioxide on these adsorbents.

1. 緒 言

核燃料再処理工程に於て発生する溶解オフガス及び剪断オフガスには、ガス状及び水蒸気の形態で放出される³H、炭酸ガスの形態で放出される¹⁴C、分子状あるいは化合物の形で放出される¹²⁹I、⁸⁵Kr、¹³³Xeといった希ガスなどの放射性核種が含まれている。現在、これらの放射性核種のうち¹²⁹Iを除く全ての成分が環境中に放出されているが、これらの放射性核種を回収することが、放射線防護のためだけでなく原子力の社会的受容性のためにも必要になると考えられる。また、化石燃料の使用に伴って排出された炭酸ガスがもたらす温室効果による地球環境への影響も懸念されており、環境中への炭酸ガス放出抑制のための対策も急務となっている。以上の点から、炭酸ガスの回収システムを構築する必要がある。炭酸ガスの分離回収にはいくつかの手段があるが、再処理オフガスのように炭酸ガス存在比が少ないガスからも効率よく回収できる手段として、吸着法による回収が挙げられる。吸着法による回収システムに使用する吸着剤は、比較的安価なもので速やかに且つ大量のガスを吸着するものが望ましい。本研究では、天然モルデナイトに注目して炭酸ガスの吸着挙動を検討するとともに、既に報告されている窒素酸化物やアンモニアの吸着^{1), 2)}のように、炭酸ガスの場合も酸によるイオン交換により吸着量の向上が見られるかどうか検討した。

2. 吸着剤の調整と実験法

実験には、秋田県板戸産の天然モルデナイトと、これを酸性水溶液を用いたイオン交換によって調整したH型モルデナイトを吸着剤に用いた。モルデナイトは耐酸性の吸着剤であり、これを酸性溶液に浸すことにより、モルデナイト内に保持されていたアルカリ金属やアルカリ土類金属が溶出、水素イオンと交換することによりH型モルデナイトが得られる。^{1), 2)}このようにして得られるH型モルデナイトは、天然モルデナイトにくらべて、アンモニアや窒素酸化物の吸着量が大きくなることが報告されている。^{1), 2)}本研究では、天然モルデナイトを1Nの酸性水溶液もしくは1mol/lのアンモニア水溶液に72時間浸すことによりイオン交換させて、H型モルデナイトを調整した。イオン交換には、塩酸、硫酸、硝酸アンモニウム及びアンモニアを用いた。アンモニア水溶液はアルカリ性だが、アンモニア水溶液に天然モルデナイトを浸した後300℃～600℃で乾燥させると、水素イオンが残留しH型モルデナイトが得られる。¹⁾これらの水溶液のうち、弱酸である硝酸アンモニウムは、イオン交換操作の際に80℃で過熱し、その他の水溶液の場合は、室温で操作した。このようにして

得られたH型モルデナイトを吸着剤として用い、実験を行った。

実験は、流通式固定層充填塔を用いて行った。実験ではまず、乾燥ヘリウム気流中で吸着剤の乾燥と被吸着成分を脱離させた後、既知濃度のヘリウムキャリアーの炭酸ガスを導入し、出口濃度の経時変化をガスクロマトグラフで測定した。この時得られた出口濃度の経時変化を積算し、平衡吸着量を求めた。また吸着塔の温度は、恒温槽で一定温度に保つて実験を行った。

3. 解析

平衡吸着量を表現する式は、Langmuir式、Freundlich式など種々提案されている³⁾が、本研究では空孔溶液理論^{4), 5)}を用いて相関を行った。この理論は、熱力学的考察をもとに吸着質同士の相互作用を考慮したものであり、実際の平衡吸着量を表現することに適している。また多成分系の吸着への拡張も比較的容易に行うことができるという特徴を持つ。以下に空孔溶液理論による吸着式を示す。

$$P_i = \frac{q_i^{s,\infty}}{b_i} \frac{\theta}{1-\theta} \left\{ A_{i3} \frac{1-(1-A_{3i})\theta}{A_{i3}+(1-A_{i3})\theta} \right\} \exp \left\{ -\frac{A_{3i}(1-A_{3i})\theta}{1-(1-A_{3i})\theta} - \frac{(1-A_{i3})\theta}{A_{i3}+(1-A_{i3})\theta} \right\} \quad (1)$$

$$A_{3i} = \frac{V_i^l}{V_i^v} \exp \left(\frac{-(\lambda_{3i} - \lambda_{33})}{RT} \right) \quad (2)$$

$$A_{i3} = \frac{V_3^l}{V_3^v} \exp \left(\frac{-(\lambda_{i3} - \lambda_{33})}{RT} \right) \quad (3)$$

$$b_i = b_\infty \exp(-q_{sti}^\theta / RT) \quad (4)$$

$$\theta = \frac{q_i^s}{q_i^{s,\infty}} \quad (5)$$

4. 結果と考察

Fig.1に0℃における天然モルデナイトに対する炭酸ガスの平衡吸着量と、塩酸によってイオン交換を行ったH型モルデナイトに対する炭酸ガスの平衡吸着量を示す。図より、H型モルデナイトに対する炭酸ガスの平衡吸着量は、天然モルデナイトを吸着剤に用いた場合と比較して、およそ40パーセント程度小さくなかった。炭酸ガス分圧が100Pa以下の低分圧

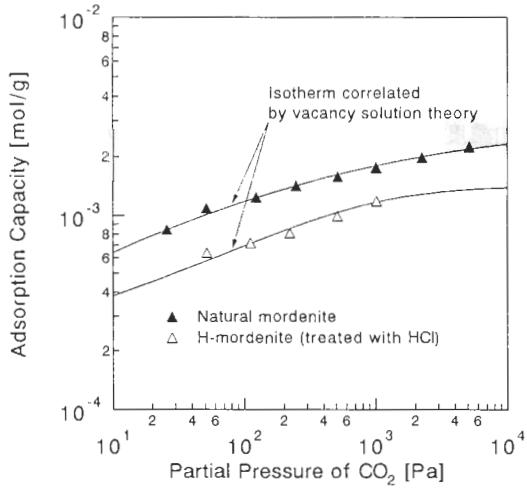


Fig. 1 Comparison of CO_2 adsorption capacities on natural mordenite and HCl-treated mordenite

領域では、天然モルデナイトへの炭酸ガスの平衡吸着量は、本研究室で同様の実験法で定量した合成ゼオライト5Aや合成ゼオライト13Xよりも大きいことがわかった。従って天然モルデナイトは合成ゼオライトより、再処理オフガス中の炭酸ガスを吸着法によって回収する際の吸着剤として利用することに適していると考えられる。また、炭酸ガス分圧に対する炭酸ガス吸着量の依存性は、天然モルデナイト、H型モルデナイトとも同様の傾向を見せた。図中に

示した実線は、空孔溶液理論を用いてそれぞれの吸着剤に対する炭酸ガスの平衡吸着量の相関を行ったものであるが、両者ともよく実験結果を表現することができた。塩酸以外の水溶液を用いて得られたH型モルデナイトについても同様に炭酸ガス吸着実験を行った。これらの吸着剤については、炭酸ガス分圧が1000Pa前後で実験を行った。その結果をTable1に示す。この結果から、酸を用いてイオン交換処理を行って得られたH型モルデナイトは、イオン交換に用いた水溶液の種類によらず、いずれも炭酸ガスの平衡吸着量が小さくなつた。そこで本研究においては、H型モルデナイトのBET比表面積の測定を行い、イオン交換処理により細孔が損なわれていないかどうか調べた。この測定には、島津—マイクロメリティックス比表面積自動測定装置2200形を用いた。また、この測定装置の被吸着成分ガスには、窒素を用いた。その結果、天然モルデナイトのBET比較表面積がおよそ200 m^3/g であったのに対して、H型モルデナイトは280 m^3/g とおよそ40パーセント大きくなっていることが確認された。さらにXRDを用いてH型モルデナイトと天然モルデナイトのX線回折パターンの違いを比較検討した。Fig.2の(a), (b)に天然モルデナイトとH型モルデナイトのそれぞれのX線回折パターンをピークデータの形で示す。Fig.2よりピークデータでは、最大の強度を持つピークはともにほぼ同一の角度で観測されたが、天然モルデナイトでは、二、三番目に大きなピークを観測した角度がH型モルデナイトでは逆順になって観測された。また、Fig.2の(a)に示した天然モルデナイトでは小さなピークが多く観測されているが、(b)に示したH型モルデナイトでは天然モルデナイトに較べ、観測されたピークデータの数は約

半分程であった。これは、天然モルデナイト内にカチオンとして存在した様々なアルカリ金属やアルカリ土類金属がイオン交換によって溶出し、水素イオンに置き換わったためと考えた。以上のことから、炭酸ガスの回収には他の吸着質回収の時のようにH型モルデナイトを用いる効果はないと考えられる。また、前述したように窒素を用いて測定したBET比表面積はH型モルデナイトの方が大きくなることが確認されたので、モルデナイトのイオン交換処理による炭酸ガス吸着量の低下は、天然モルデナイトに含まれるカチオンの流出によりモルデナイト表面での吸着の選択性が変化したことによると考えられる。

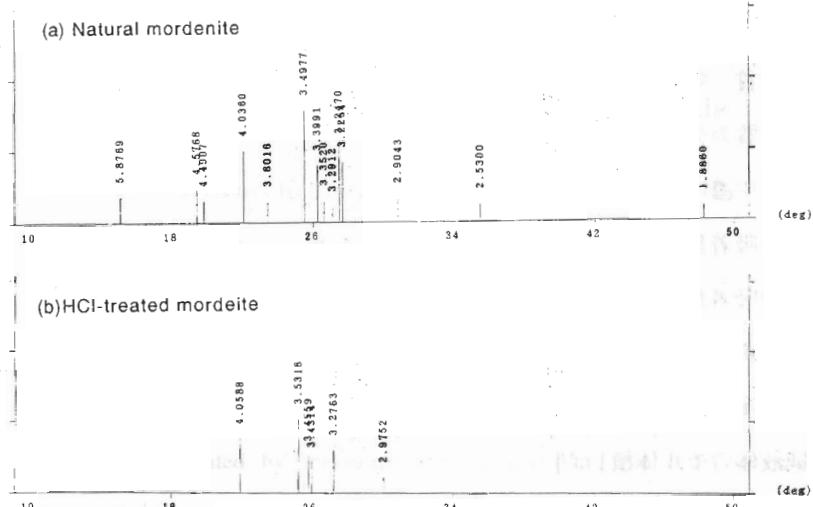


Fig. 2 Comparison of XRD peak data

Table 1 Comparison of CO_2 adsorption capacity

Adsorbent	Adsorption capacity
Natural mordenite	1.76×10^{-3} [mol/g]
HCl treated mordenite	1.19×10^{-3} [mol/g]
HNO_3 treated mordenite	1.14×10^{-3} [mol/g]
NH_4NO_3 treated mordenite	1.06×10^{-3} [mol/g]
NH_3 treated mordenite	1.44×10^{-3} [mol/g]

(CO_2 partial pressure: 1.01×10^3 Pa Exp. temp.: 273K)

5. 結 言

炭酸ガスの天然モルデナイト及びH型モルデナイトへの平衡吸着量を測定した。実験で得られた炭酸ガスの平衡吸着量は、空孔溶液理論を用いてよく相関することがわかった。

天然モルデナイトに対するイオン交換処理は、炭酸ガスの吸着量を増大させるには至らないことがわかった。

参考文献

- (1) 清水 博監修;“吸着技術ハンドブック”;NTS, Tokyo, Japan(1993)
- (2) 特許公報 昭 63-22181
- (3) D. M. Ruthven;“Principle of Adsorption and Adsorption Processes”;John Wiley and Sons, New York, United States of America (1984)
- (4) S. Suwanayuen and R. P. Danner;AIChE J.,26 (1980)
- (5) S. Suwanayuen and R. P. Danner;AIChE J.,26 (1980)

使用記号

b_i : 吸着質、吸着剤間の定数 [-]

P : 吸着質の分圧 [Pa]

q : 固相中濃度 [mol/g]

q^{∞} : 鮑和吸着量 [mol/g]

q^s : 平衡吸着量 [mol/g]

q_{st}^{θ} : 無限希釈時の等量吸着熱 [J/mol]

R : 気体定数 [J/mol•K]

V^L : 純液体のモル体積 [m³]

λ : 相互作用エネルギー [J/mol]

Λ : Wilson パラメーター [-]

θ : 被覆率 [-]

Subscripts

3 : 吸着剤に関する事象を示す

i : 吸着質に関する事象を示す

豊島平氏バナナ農園より譲り受け

開拓するため種田多蔵氏農務課長より譲り受けたもの

農業興業へ譲り受けた

ミクロバブル超臨界二酸化炭素法による タンパク質二次構造の崩壊

九州大学ベンチャービジネスラボラトリーグループ 九州大学農学部*

石川 洋哉, 下田 満哉*

Decomposition of secondary structure of proteins by microbubbles of supercritical carbon dioxide

Hiroya Ishikawa, Mitsuya Shimoda*

Venture Business Laboratory, Kyushu University

Faculty of Agriculture, Kyushu University*

The secondary structural changes of proteins treated by microbubbling of supercritical carbon dioxide(SC-CO₂) were investigated by measuring the circular dichroism (CD) spectra at far ultraviolet(UV) range. The decay of negative ellipticity of myoglobin(Mb), ovoalbumin(OVA), bovine serum albumin(BSA), and β -lactoglobulin(β -lg) were observed after the treatment at 35 °C and 25MPa for 30min. Alpha-helix structure of Mb and OVA were largely decomposed, but a little decomposition of α -helix was observed on BSA. Beta-structure of β -lg would be decomposed by the treatment. Alpha-helix contents of Mb decreased from 74% to 11% with increasing the pressure. The plots of α -helix contents against CO₂ density suggested that the direct protein-SC-CO₂ interaction would cause protein denaturation. The CD spectra of the denatured protein by microbubbling of SC-CO₂ could not reform, while reformed CD spectra was observed after heating at 80 °C.

1. 緒言

物質は気-液臨界点(臨界温度・圧力)を超えると気体とも液体とも呼べず、いくら加圧しても液化しない非凝縮性の流体となる。これが超臨界流体である。超臨界流体は、液体に近い密度と気体に近い粘度・拡散係数を有することから、抽出分離操作における理想的な媒質として注目された。中でも超臨界二酸化炭素(SC-CO₂)は、臨界点が31.1°C・7.2MPaと扱いやすいこと、人体に対する毒性がないこと等の利点を有し、その利用が食品・医薬の分野を問わず多角的に検討された。しかしながら、SC-CO₂の水に対する分散(溶解)性の低さから水系試料への適用が不可能であり、SC-CO₂法の適用範囲は極めて狭い範囲に限定されてきた。著者らは、SC-CO₂を多孔質ミクロポアフィルターにより微細化して試料中に供給するミクロバブルSC-CO₂法(ミクロバブル法)を案出することにより水系試料への適用を初めて可能にした。¹⁾この一連の研究の中で、本ミクロバブル法により常温領域(35~60°C)での殺菌・酵素失活が可能であること、すなわちバイオテクノロジーにおける最重要課題である非加熱殺菌・酵素失活技術の確立が可能であることを新たに見いだした。^{2,3)}さらに、本法による酵素タンパク質の触媒機能の低下が酵素二次構造の一つであるα-ヘリックス構造の不可逆的崩壊に起因する特異的なタンパク質変性機構に従うことを明らかにしている。⁴⁾

本研究では、ミクロバブル法によるタンパク質変性機構の解明を目的として、円二色性(CD)スペクトルの測定及びその解析を行い、ミクロバブル法によるタンパク質二次構造の崩壊挙動を検討した。

2. 実験方法

ミクロバブル処理

ミクロバブル処理装置は、Milton Roy社製のModel-X10を使用した(Fig.1)。なお、本処理装置のCO₂供給部には孔径10 μmの多孔質円筒状フィルター(Φ15 × 20mm)を装着した。ミクロバブル処理は0.1mg/mLのタンパク質溶液100mLを処理槽に充填した後、設定温度・圧力条件下で一定時間放置することにより行った。

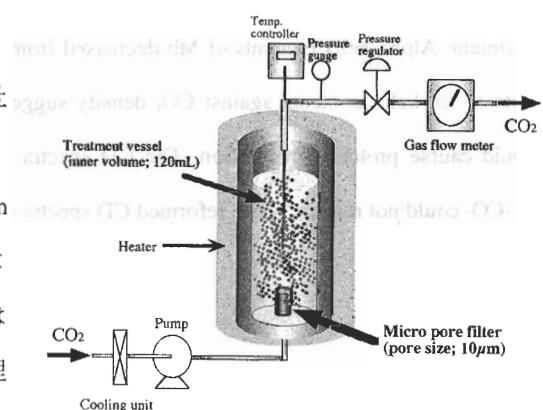


Fig. 1 Apparatus for microbubbles supercritical CO₂ treatment

円二色性分散計は、中央分析センターに設置された日本分光製の JW-720 を使用した。CD スペクトルの測定は、遠紫外領域(200~250nm)で行い。タンパク質の α -ヘリックス含量は、スペクトルより得られた分子楕円率(θ)_{208nm} を用いて、Greenfield らの方法⁵⁾に準じて算出した。

3. 実験結果及び考察

ミオグロビン(Mb), オボアルブミン(OVA), 牛血清アルブミン(BSA), β -ラクトグロブリン(β -Lg)のミクロバブル処理前後の CD スペクトルを Fig. 2 に示す。ミクロバブル処理は、温度 35 °C, 壓力 25MPa の条件で 30 分間行った。Mb,OVA,BSA は、 α -ヘリックス含量が高いと推定されているタンパク質であり、本実験においても CD スペクトル(未処理)の 208,222nm に α -ヘリック構造特有の double minimum と呼ばれる 2 つの負の極値が認められた。これらタンパク質のミクロバブル処理後のスペクトルでは、いずれも (θ) 値が増加し負の楕円性的減少すなわち二次構造の崩壊が認められた。この時、Mb 及び OVA で

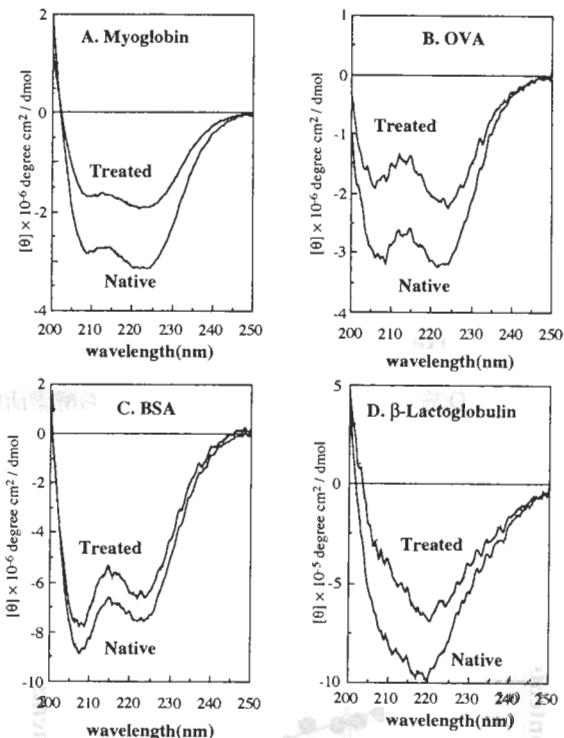


Fig. 2 Circular dichroism (CD) spectra of the proteins after microbubbles supercritical CO₂ treatment at 25MPa and 35 °C for 30min.

The concentrations and the pH of the proteins were 0.01mg/ml and 7.0, respectively.

は α -ヘリックス含量が未処理の 50~60% にまで減少していると見積もられたが、BSA では 10% 程度の減少にすぎなかった。BSA は分子内に 17 のジスルフィド結合を有していることから水溶液中での立体構造の安定性が高くミクロバブル処理の処理効果を受けにくかったものと推察された。一方、 β -Lg は α -ヘリックス構造が少なく、ほとんどが β 構造により構成されていると推定されている。 β -Lg の未処理の CD スペクトルには double minimum が

現れず 218nm 付近にスペクトルの負の極値が認められたことから、このスペクトルは主として β 構造を反映しているものと考えられた。ミクロバブル処理後のスペクトルでは、他のタンパク質と同様に (θ) 値が増加し負の楕円性の減少すなわち二次構造の崩壊が認められた。CD スペクトルから β 構造の含量およびミクロバブル処理による減少量を推定することは困難であるが、スペクトルの形から判断すると、 β 構造もかなり減少しているものと推察された。

続いて、ミクロバブル処理による α -ヘリックス構造の崩壊挙動を処理圧力を変化させて詳細に検討した。Mb を圧力 8~30MPa, 温度 35°C で 30 分間ミクロバブル処理して得られた CD スペクトルより算出した α -ヘリックス含量を Fig.3 に示す。Mb の α -ヘリックス含量は、最も温和な処理条件である 8MPa のミクロバブル処理によっても 74%(未処理) から 47% まで減少した。8~20MPa までは緩やかな減少傾向を示したが、圧力が 30MPa まで増加することによりヘリックス含量が 11% まで急激に減少した。この結果は、タンパク質の構造変化が見かけ上圧力依存的であることを示唆しているが、圧力 300MPa 以下ではタンパク質の圧力変性は起こらないとされている。⁶⁾著者らは、ミクロバブル法による酵素失活が、ある一定の CO₂ 密度以上で起こること、すなわち酵素活性の低下が圧力の単独作用ではなく温度・圧力に支配される CO₂ 密度に大きく依存することを報告している。²⁾そこで、Fig.3 で得られたデータを CO₂ 密度に対して再プロットすることにより α -ヘリックスの構造変化に対する

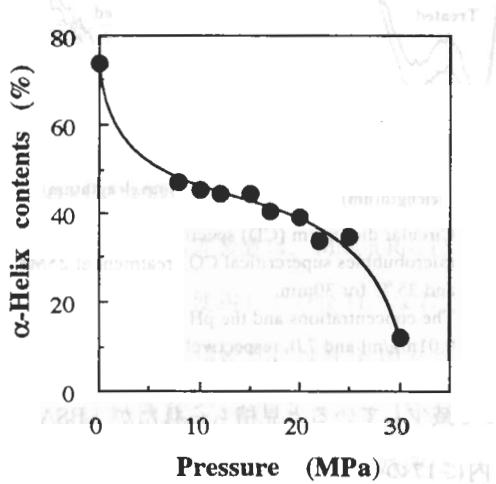


Fig. 3 Effect of pressure on the decomposition of α -helix structure of myoglobin by microbubbles of supercritical CO₂. Treatment temperature and time were set at 35°C and 30min, respectively.

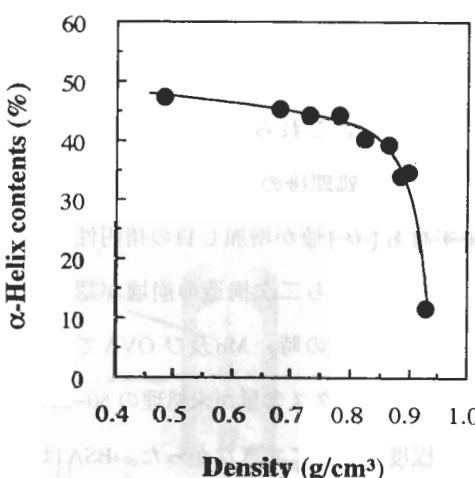


Fig. 4 Effect of CO₂ density on the decomposition of α -helix structure of myoglobin by microbubbles of supercritical CO₂. Treatment temperature and time were set at 35°C and 30min, respectively.

CO₂密度の影響を検討した(Fig.4)。密度0.5~0.8g/c m³までは、ヘリックス含量の変化はほとんど認められなかったが、0.8g/c m³以上の密度領域で急激な活性の低下が認められた。通常、温度,pHを変化させた場合、タンパク質はある点を越えると急激に構造が変化する。この急激な変性過程を協同現象と呼ぶ。CO₂密度をパラメーターにとった場合にこの協同現象が認められたことは、CO₂とタンパク質分子との間の相互作用により変性が起こることを唆するものである。すなわち、ミクロバブル処理では分子運動性の高い超臨界状態のCO₂がタンパク質分子に接触することにより、水溶液中でのタンパク質のゆらぎが激しくなり高次構造が崩壊するものと考えられた。

ミクロバブル法によるタンパク質の変性は、熱やpHの変化による変性とは異なり不可逆的である。Mbを80℃で加熱した場合には、処理時間の経過に伴いCDスペクトルの負の楕円性は減少し、α-ヘリックス構造が崩壊するが、処理後に試料を冷却し一定時間放置することによりスペクトルは元の形に復帰する(Fig.5)。同様に、pHを7から3まで低下させると一時的にスペクトルはランダム構造特有の形を示すがpHを7に戻すことによりスペクトルは復帰する。これに対してミクロバブル処理では、処理後もスペクトルは復帰せず負の楕円性が崩壊したままである。この不可逆的変性は、水溶液中に存在するCO₂あるいは重炭酸イオン(HCO³⁻)が変性状態にあるタンパク質に吸着(結合)することにより元の構造への復帰が不能になるためであると現在のところ推察している。

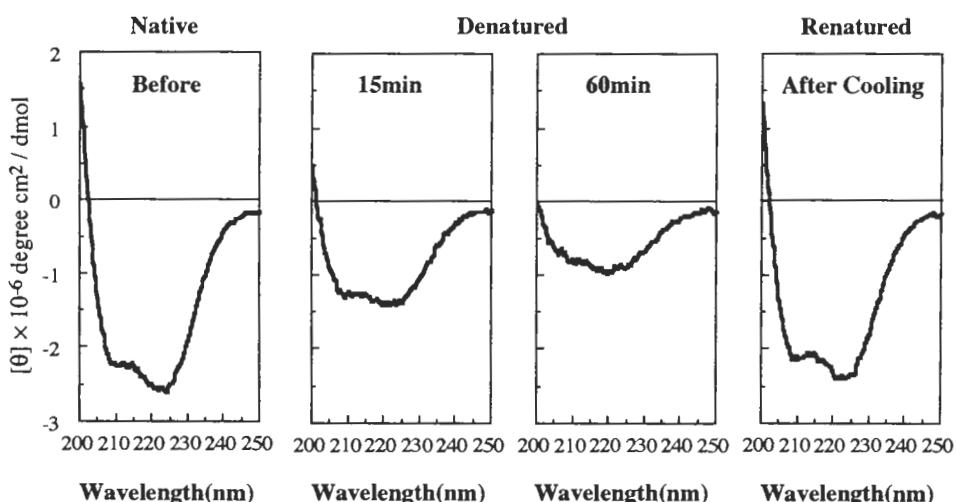
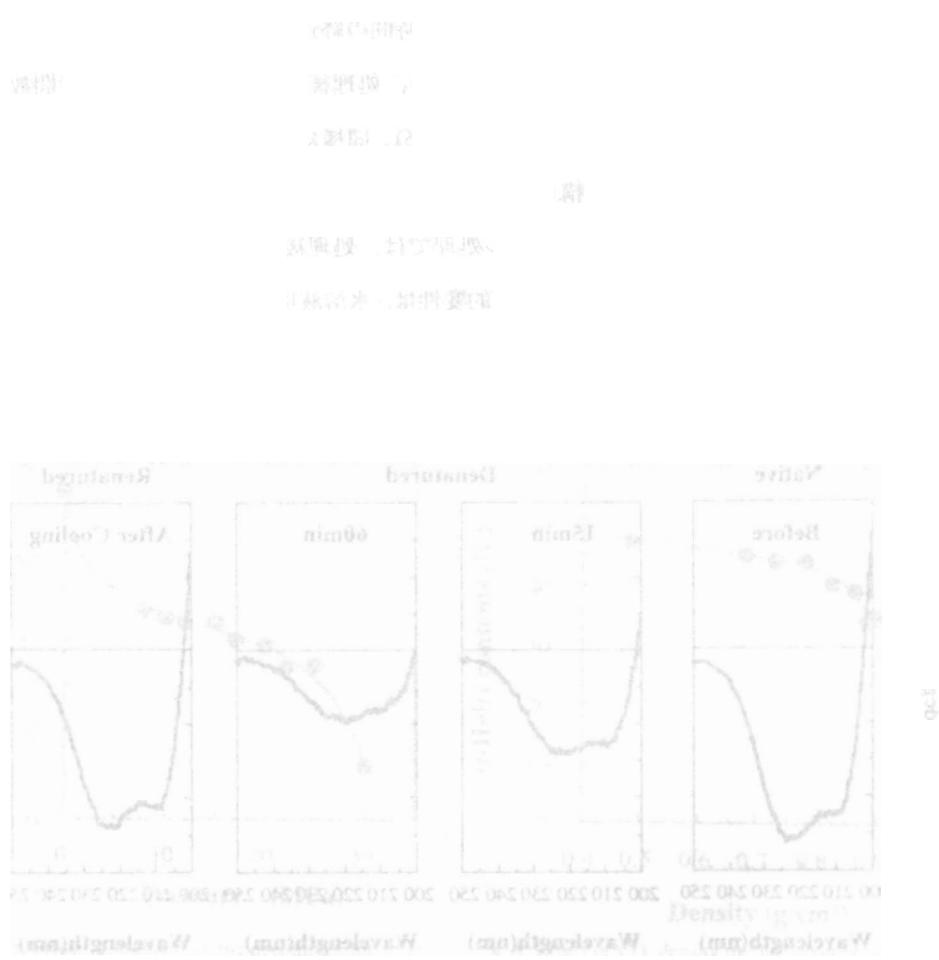


Fig. 5 Changes of CD spectra of myoglobin treating at 80 °C.

The concentrations and the pH of the protein solution were 0.01mg/ml and 7.0, respectively.

- 1) M.Shimoda, H. Ishikawa, T.Kawano & Y.Osajima: J.Food Science, **59**, 231(1994).
- 2) H. Ishikawa, M.Shimoda, T.Kawano & Y.Osajima: Biosci. Biotech. Biochem., **59**, 628(1995).
- 3) 石川洋哉・篠島 豊 : 化学と生物, **35**, 632 (1997).
- 4) H. Ishikawa, M.Shimoda, A. Yonekura & Y.Osajima: J. Agric. Food Chem., **44**, 2646(1995).
- 5) N. Greenfield & G. D. Fasman : Biochem., **8**, 4108(1969).
- 6) K.Suzuki, & Y. Taniguchi : "The Effect of Pressure on Organisms",
M. A. Sleigh & A. G.Macdonald, Eds, Academic Press, New York, p103(1972)



ポリヒドロキシフェノール化学発光における カルボジイミド類による増感効果

九州大学薬学部 山下真理子，中園 学，大庭 義史，財津 潔

Enhancement effect of carbodiimides on polyhydroxyphenol chemiluminescence

Mariko Yamashita, Manabu Nakazono, Yoshihito Ohba and Kiyoshi Zaitsu

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

ABSTRACT

The enhancement effect of various carbodiimides (*N*-cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl) carbodiimide, 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinylethyl)carbodiimide, dicyclohexylcarbodiimide, 1, 3-di-*tert*-butylcarbodiimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and *N*, *N*-diisopropylcarbodiimide) during polyhydroxyphenol chemiluminescence (CL) development is described. When pyrogallol, gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, butyl gallate and purrogallin were used as model polyhydroxyphenol compounds, EDC•HCl was the most effective and it enhanced the polyhydroxyphenol CL 20-380-fold in alkaline medium and 140-3600-fold in the absence of alkali.



1. 序 論

Gallic acid, Pyrogallol, Purpurogallinなどのポリヒドロキシフェノールは、アルカリ溶液中、 H_2O_2 存在下において化学発光することが知られている¹⁾。これらの化学発光は、Co(II)やFormaldehydeにより触媒されることから、現在までにフローインジェクション-化学発光検出法によるそれらの測定が行われてきた^{2,3)}。ポリヒドロキシフェノールの発光は、化学発光分析で繁用される Luminol や Acridium ester 類と異なり血清アルブミンによる影響を受けないという優れた特徴を有していることから⁴⁾、生体成分の分析、特に血液中におけるポリヒドロキシフェノール構造を有する生理活性物質の分析、あるいはポリヒドロキシフェノール構造を発光母核として有する化学発光ラベル化試薬による生理活性物質の分析への応用等が期待される。しかし、ポリヒドロキシフェノールの化学発光は、Luminol や Acridium ester の化学発光の約 1,000 分の 1 以下であり、今までこのような分析法や試薬の開発は行われていない。

現在までに、ポリヒドロキシフェノールの発光強度を高める増感剤として、Hydroxylamine⁵⁾、Formaldehyde⁶⁾、また Peroxidase 存在下において 4-Biphenylboronic acid、Phenylboronic acid 誘導体⁶⁾等が報告されている。これらの増感剤により、ポリヒドロキシフェノールの化学発光は 4~300 倍増感された。しかし、生体試料中の生理活性物質の定量に応用できるほどの感度は得られていない。

最近、当研究室において水溶性カルボジイミド 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) が、ポリヒドロキシフェノールの化学発光において強い増感効果を示すことを見出した⁷⁾。EDCによる増感は、ポリヒドロキシフェノール化学発光反応の初期段階における中間体である 3,4-ジケト化合物の生成の促進に基づくと考えられる⁷⁾(Fig. 1)。また、通常ポリヒドロキシフェノールは、アルカリ非存在下で発光しないが、EDC添加によりアルカリ非存在下においても発光し増感効果を受けた。

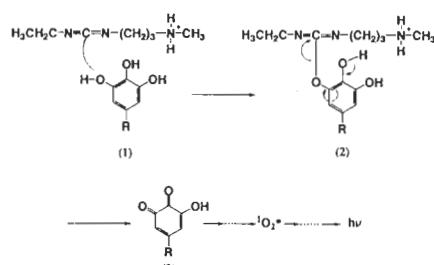


Fig. 1 Possible mechanism of EDC enhancement effect for chemiluminescence of pyrogallol derivatives

我々は、ポリヒドロキシフェノールの化学発光におけるより効果的なカルボジイミド型増感剤を見出すことを目的に、市販品又は合成品の7種のカルボジイミド(Fig. 2)について、6種のポリヒドロキシフェノール(Fig. 3)の化学発光における増感効果を比較検討した。なお、増感効果は、カルボジイミドを用いないアルカリとH₂O₂添加のみの条件におけるポリヒドロキシフェノールの化学発光量と比較した。

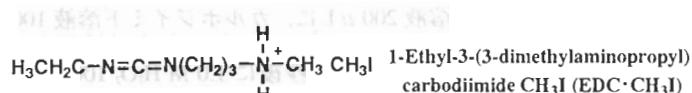
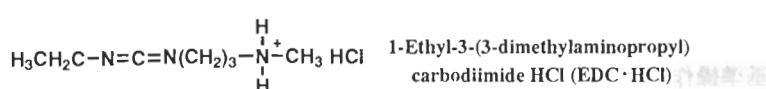
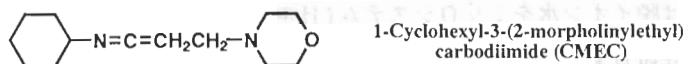
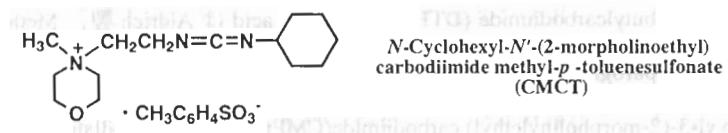
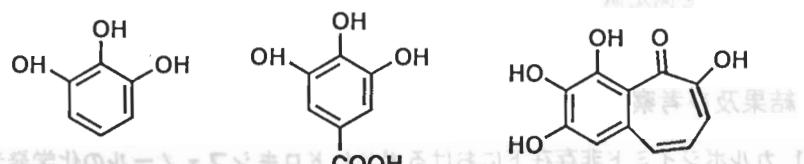


Fig. 2 Carbodiimides



Pyrogallol Gallic acid Purpurogallin

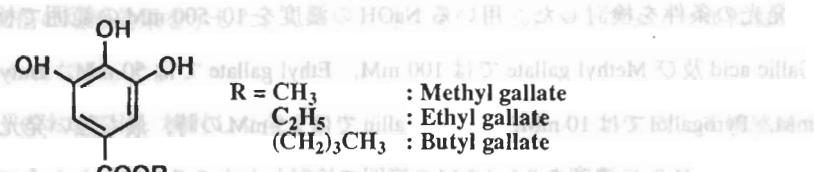


Fig. 3 Polyhydroxyphenols

2. 実験

2.1 試薬及び装置

EDC•HCl はナカライトスク製, EDC methiodide (EDC•CH₃I) 及び *N*-Cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl) carbodiimide methyl-p-toluenesulfonate (CMCT) は SIGMA 製, Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), *N,N*-Diisopropylcarbodiimide (NND) 及び Pyrogallol は和光純薬製, 1, 3-Di-tert-butylcarbodiimide (DTB) 及び Gallic acid は Aldrich 製, Methyl gallate, Butyl gallate 及び Purpurogallin は東京化成工業製, H₂O₂ は三菱瓦斯化学製を用いた。1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinylethyl) carbodiimide(CMEC) 及び Ethyl gallate は文献^{8,9)}に従って合成した。水は脱イオン水をミリQシステム(日本ミリポア社製)で精製したものを、他の試薬は市販の特級品あるいは得られる最上級品を使用した。

Pyrogallol, Gallic acid, Methyl gallate, Ethyl gallate 及び Butyl gallate は水に溶解し 10 mM とした。Purpurogallin は Methanol に溶解し 10 mM とした。

CMCT, EDC•HCl 及び EDC•CH₃I は水に溶解し用いた。CMEC, DCC, DTB 及び NND は Methanol に溶解し用いた。化学発光光度計は Lumat LB 9507型ルミノメーター (Berthold 社製) を使用した。

2.2 基準操作

10 mM ポリヒドロキシフェノール溶液 200 μL に、カルボジイミド溶液 100 μL を加え、直ちに NaOH 又は水 100 μL を自動注入した。25 秒後に 1.0 M H₂O₂ 100 μL を自動注入し、Lumat LB 9507 で化学発光を測定した。発光強度は 0~2 分の積算発光量とした。ポリヒドロキシフェノールの代わりに水を加えたものをブランクとし、サンプル値からブランク値を差し引いた値を測定値とした。

3. 結果及び考察

3.1 カルボジイミド非存在下におけるポリヒドロキシフェノールの化学発光条件の検討

カルボジイミドによる増感効果を比較するために、カルボジイミド非存在下における化学発光の条件を検討した。用いる NaOH の濃度を 10~500 mM の範囲で検討したところ、Gallic acid 及び Methyl gallate では 100 mM, Ethyl gallate では 50 mM, Butyl gallate では 250 mM, Pyrogallol では 10 mM, Purpurogallin では 2.5 mM の時、最も強い発光が得られた。また、用いる H₂O₂ の濃度を 0.1~1.0 M の範囲で検討したところ、検討した全てのポリヒドロキ

シフェノールにおいて 1.0 M を用いた時に発光が最大となった。カルボジイミドによる増感効果は、上記の条件におけるポリヒドロキシフェノールの化学発光量と比較して評価した。

3.2 カルボジイミド濃度による化学発光量の変化

カルボジイミドの濃度変化がポリヒドロキシフェノールの化学発光に与える影響を、アルカリ存在下及び非存在下条件について検討した。なお、NaOH の濃度は、カルボジイミド非存在下条件において最も強い発光強度を示した時の濃度を使用した。

(1) CMCT

添加する CMCT の濃度を 1~250 mM の範囲で検討した。NaOH 存在下では、Pyrogallol について最も強い増感効果(124 倍)を示した。他のポリヒドロキシフェノールにおいても 11~43 倍の増感効果を示した。

NaOH 非存在下においては、Pyrogallol について最も強い増感効果(44 倍)を示した。他のポリヒドロキシフェノールについても 2~34 倍の増感効果を示した。

(2) CMEC

添加する CMEC の濃度を 1~50 mM の範囲で検討した。NaOH 存在下においては、Pyrogallol と Butyl gallate で 2 倍の増感効果を示したが、他のポリヒドロキシフェノールに対してはほとんど増感効果を示さなかった。

NaOH 非存在下においては、Pyrogallol について 2 倍の増感効果を示したが、他のポリヒドロキシフェノールに対しては、アルカリ存在下と同様ほとんど増感効果を示さなかった。

(3) DCC

添加する DCC の濃度を 1~1000 mM の範囲で検討した。NaOH 存在下においては、Gallic acid について 2 倍の増感効果を示した。しかし、他のポリヒドロキシフェノールにおいては増感効果は示さなかった。

NaOH 非存在下においては、検討した全てのポリヒドロキシフェノールに対して増感効果を示さなかった。

(4) DTB

添加する DTB の濃度を 1~1000 mM の範囲で検討した。NaOH 存在下においては、Ethyl gallate について 2 倍の増感効果を示した。しかし、他のポリヒドロキシフェノールにおいては増感効果は得られなかった。

NaOH 非存在下においては、検討した全てのポリヒドロキシフェノールに対して増感効果を示さなかった。

(5) EDC•HCl

添加する EDC•HCl の濃度を 1~1000 mM の範囲で検討した。NaOH 存在下においては、Pyrogallol について最も強い増感効果(380倍)を示した。また、他のポリヒドロキシフェノールにおいても 20~180倍の強い増感効果を示した。

NaOH 非存在下においては、Gallic acid について最も強い増感効果(3600倍)を示した。他のポリヒドロキシフェノールにおいても 140~490倍の優れた増感効果を示した。

(6) EDC•CH₃I

EDC塩酸塩の増感効果との違いを比較するため、EDC•CH₃Iについて 1~1000 mM の範囲で検討した。NaOH 存在下においては、Pyrogallol について 67倍の増感効果を示した。他のポリヒドロキシフェノールにおいても 6~57倍の増感効果を示した。

NaOH 非存在下においては、Ethyl gallate について 57倍の増感効果を示した。他のポリヒドロキシフェノールにおいても 2~54倍の増感効果を示した。しかし、EDC•CH₃Iによるポリヒドロキシフェノールの増感効果は、EDC•HClと比べるとかなり低い。EDC•HClの場合、ポリヒドロキシフェノール溶液に NaOH 添加後も溶液の色が無色であるのに対し、EDC•CH₃Iでは NaOH 添加後発色した。その発色により、ポリヒドロキシフェノールの化学発光における発光種である一重項酸素の発光が妨げられている可能性が考えられる。

(7) NND

添加する NND の濃度を 1~1000 mM の範囲で検討した。NaOH 存在下においては、Pyrogallol について 18倍の増感効果を示した。他のポリヒドロキシフェノールにおいても 2~15倍の増感効果を示した。

NaOH 非存在下においては、Gallic acid について 15倍の増感効果を示した。しかし、他のポリヒドロキシフェノールでは増感効果を示さなかった。

3.2 7種のカルボジイミドの増感効果

検討した 7種のカルボジイミドのポリヒドロキシフェノールの化学発光における増感効果を Table 1 に示す。検討したカルボジイミドの中で EDC•HCl は最も大きな増感効果を示した。モデル化合物として用いたポリヒドロキシフェノール 6種全てに対し増感効果が見られた。また検討したカルボジイミドの多くは、アルカリ非存在下においてはほとんど増感効果を示さなかったのに対し、EDC•HCl はアルカリ存在下、非存在下共に増感効果が見られた。また、EDC•HCl には劣るが、CMCT も増感効果を示した。

4. 結 語

カルボジイミド類によるポリヒドロキシフェノール化学発光のスクリーニングを行った。その結果、既に増感効果を見出している⁷⁾ EDC・HClが、特に Pyrogallol 及び Gallic acid に対し、他のカルボジイミド類に比較して大きな増感効果を示した。今後、EDC・HCl による増感効果を利用したポリヒドロキシフェノール骨格を有する生理活性物質の高感度な定量法の開発が期待できる。

Table 1 Enhancement effect of carbodiimides on polyhydroxyphenol chemiluminescence

	Pyrogallo		Gallic acid		Methyl gallate		Ethyl gallate		Butyl gallate		Purrogallin	
	NaOH	H ₂ O	NaOH	H ₂ O	NaOH	H ₂ O	NaOH	H ₂ O	NaOH	H ₂ O	NaOH	H ₂ O
											a)	
							R	C	I			
CMCT	124	44	12	34	43	0	43	3	12	2	36	0
CMEC	2	2	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0
DCC	1	0	2	0	1	0	0	0	1	0	1	0
DTB	1	0	1	0	1	0	2	0	1	0	1	0
EDC•HCl	382	489	29	3608	27	140	24	219	23	160	180	187
EDC•CH ₃ I	67	22	40	54	28	28	57	57	14	24	6	2
NND	18	0	15	10	2	0	1	1	4	0	2	0

a) Relative chemiluminescence intensities (RCI) for polyhydroxyphenols in the absence of carbodiimides was taken as 1.

文 獻 :

- 1) N. P. Evmiridis., Analyst, **112**, 825, (1987).
 - 2) S. Nakahara, M. Yamada and S. Suzuki, Anal. Chim. Acta, **141**, 255 (1982).
 - 3) D. Slawinska and J. Slawinski, Anal. Chem., **47**, 2101 (1975).
 - 4) T. Segawa, T. Oozumi, T. Matsubara, T. Kamidate and H. Watanabe, Anal. Sci., **11**, 209 (1995).
 - 5) M. Trautz and P. Schorigin, Z. Wiss. Photogr. Photochem., **3**, 121 (1950).
 - 6) O. Nozaki, X. Ji and L. J. Kricka, J. Biolum. Chemilum., **10**, 151 (1995).
 - 7) M. Nakazono, J. Ijichi, Y. Ohba and K. Zaitsu, Anal. Sci., **14**, 853 (1998).
 - 8) J. C. Sheehan and J. J. Hlavka, J. Org. Chem., **21**, 439 (1956).
 - 9) 中沢浩一, 有機化學合成法, 博報堂, 東京, **16**, 20 (1968).

酸性水溶液中でのアルミニウムイオンとフルボ酸の 相 互 作 用 : ^{27}Al NMR による研究

九州大学大学院理学研究科凝縮系科学専攻

横山 拓史

^{27}Al NMR study on the interaction between aluminium ion and fulvic acid in acidic aqueous solution

Department of Chemistry and Physics of Condensed Matter, Graduate School of Science,

Kyushu University

Takushi Yokoyama

The interaction between aluminium ion and Inogashira fulvic acid in acidic aqueous solution was investigated by ^{27}Al NMR. In order to estimate the binding constant for aluminium – fulvic acid complex, the calibration curve method for the determination of free aluminium ion concentration in sample solutions was developed. The binding constant for aluminium – fulvic acid complex at pH 3 was estimated to be $(0.7\sim 1.3)\times 10^3$ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$) In the ^{27}Al NMR spectrum for aluminium – fulvic acid complex, three peaks were observed at least. Based on the chemical shift values, chemical state of aluminium ions combined with fulvic acid was discussed.

1. はじめに

土壤

近年、酸性降下物による土壤の酸性化が進行し、土壤溶液や地下水中へ植物毒性を示すアルミニウムが溶出することが懸念され、このことが森林衰退の一つの要因ではなかろうかと考えられている。アルミニウムの植物毒性は、フリーのイオンやその加水分解種で強く、錯体ではかなり弱まることが知られている。¹⁾従って、酸性条件下におけるアルミニウムイオンと土壤溶液や地下水中に含まれる有機配位子との相互作用を研究することが環境化学上重要な課題となっている。土壤溶液や地下水中に存在する代表的な溶存有機物はフルボ酸である。²⁾

錯体の生成定数を見積もるのに通常 pH滴定法がよく用いられるが、アルミニウムイオンの場合 pHが 3.5 を超えると加水分解及び重合反応が起こり解析が極めて複雑となる。また、データ解析で用いることができる滴定領域が pH3.5 付近までと限られる。そこで、アルミニウム錯体については、酸性領域で錯体の結合定数が決定できる簡易な分析法が要望されている。

本報告では、²⁷Al NMR を用いて、フリーのアルミニウムイオン濃度を決定する簡便な方法について述べるとともに、アルミニウム-フルボ酸錯体の結合定数の算出例を紹介する。

2. 実験方法

2.1. 試料溶液の調製

アルミニウム溶液は、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ を $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 硝酸に溶かして調製した。アルミニウム濃度は EDTA 滴定により決定した。フルボ酸溶液は水に溶かして調製した。試料溶液はアルミニウム溶液とフルボ酸溶液を適当な割合で混合し、水酸化ナトリウム溶液を滴下して pH を 3 に調整した。イオン強度は 0.1 (NaNO_3) に調整した。

本研究で用いたフルボ酸は日本腐植物質研究会が調製した標準フルボ酸(猪の頭フルボ酸)である。

2.2. ²⁷Al NMR

²⁷Al NMR スペクトルは JEOL GX-400 NMR 分光器により測定した。観測周波数は 104.2 MHz, パルス巾 $20 \mu\text{s}$, 積算時間 0.328s, 待ち時間 0.4s, 積算回数 512 回。化学シフトの外部標準として $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 硝酸アルミニウム溶液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HNO}_3$) を用いた。試料溶液のスペクトルは 10 mm の NMR 用テフロン試料管を用いて、回転させずに測定した。NMR スペク

トルの測定は、試料溶液を調製後24時間以上経過してから行った。測定は室温で行った。

3. 結果と考察

3.1. アルミニウムの検量線の作成

試料溶液中のフリーのアルミニウマイオン、 $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ 、濃度を決定するためにFig.1に示すような二重の試料管を用いて ^{27}Al NMRスペクトルを測定した。内側は外径5mm、内径4mmのテフロン管で、アルミン酸ナトリウム溶液(Al濃度は $10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 、NaOH濃度は $0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)を入れた。外側は内径10mmのNMR用テフロン試料管で、検量線作成用のアルミニウムの標準溶液(硝酸アルミニウムを用いて調製、Al濃度: $10^{-4}\sim 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 、HNO₃濃度: $0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)を入れた。 ^{27}Al NMRスペクトルの一例をFig.2に示す。0 ppm付近のピークが $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ 、80 ppm付近のものが $[Al(OH)_4]^-$ に相当する。この2つのピークの強度比($I([Al(OH)_4])/I([Al(H_2O)_6]^{3+})$)を $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ 濃度を変えて測定することにより検量線を作成した。検量線の一例をFig.3に示す。直線性は良く、相関係数は0.998であった。

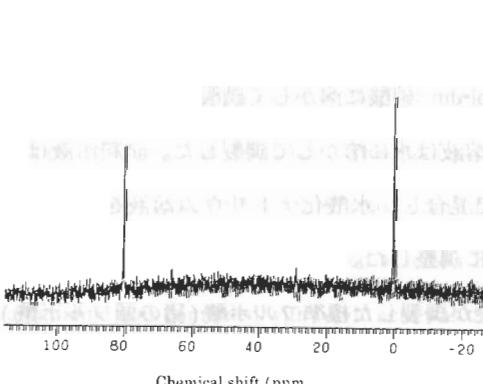


Fig. 2. An example of ^{27}Al NMR spectra for the determination of $[Al(H_2O)_6]^{3+}$.



Fig. 1. NMR tube for determination of $[Al(H_2O)_6]^{3+}$
Inner tube: sodium aluminate solution (Al concentration $10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, NaOH concentration $0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).
Outer tube: working solution of $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ (Al concentration $10^{-4}\sim 10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, HNO₃ concentration $0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) or sample solutions

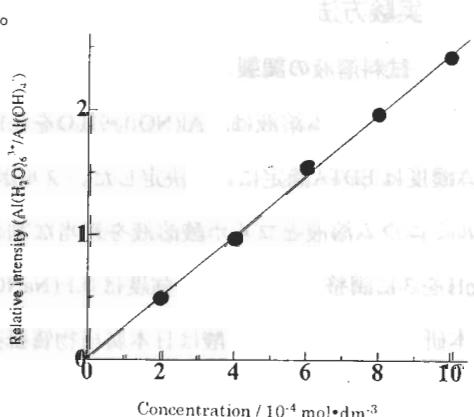


Fig. 3. Calibration curve for the determination of equilibrium $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ concentration in sample solutions.

3.2. ^{27}Al NMRスペクトル

Fig.4にフルボ濃度が一定($200\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$)で、アルミニウム濃度を変化させた時の ^{27}Al NMRスペクトル(この場合は二重管にしていない)を示す。0.2 ppm付近の鋭いピークは $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ 、

プロードなピークがアルミニウム-フルボ酸錯体のピークである。アルミニウム濃度が減少するにつれて、アルミニウム-フルボ酸錯体のピーク強度が増加した。これらの試料溶液中の $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ 濃度を Fig. 1 に示す二重管にして測定した。

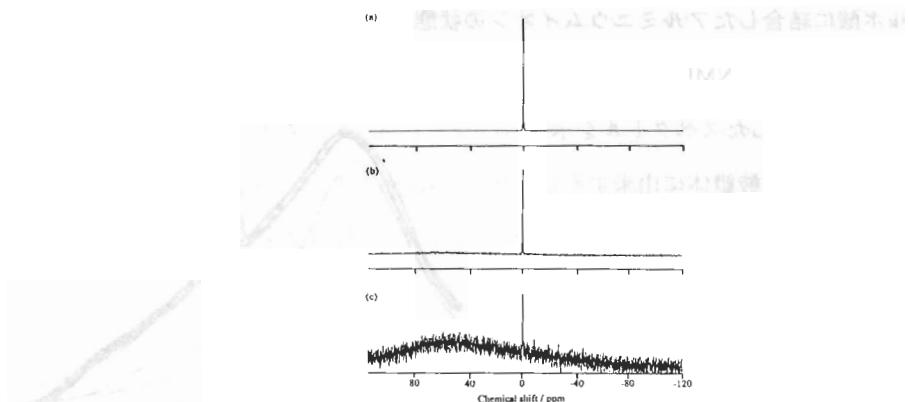
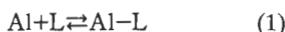


Fig. 4. ^{27}Al NMR spectra for sample solutions containing fulvic acid and aluminium ion with pH 3. Aluminium concentration: (a) 10^{-2} , (b) 10^{-3} , (c) $10^{-4} \text{ mol}(\text{dm}^{-3})$. Fulvic acid concentration: $200 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

3.3. pH 3におけるアルミニウム-フルボ酸錯体の結合定数

アルミニウムイオンの加水分解を考慮しないで測定するように、溶液の pH を 3 に調整した。トータルのアルミニウム濃度が $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ の場合、検量線法を用いて得られた試料溶液中の $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ 濃度 ($[Al]$) は $7.2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ であった。

試料溶液中のフリーの配位子濃度は、フルボ酸が高分子電解質であるために解離している官能基濃度と定義した。宮島と森²⁾によるポテンシオメトリーによる研究によれば、溶液のイオン強度が 0.01 から 1.0 では、pH 3 における猪の頭フルボ酸の解離度は 0.33 から 0.44 である。また、プロトンの交換容量は 7.2 meq/g である。従ってトータルの官能基濃度は $1.44 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ となる。アルミニウムイオンはフルボ酸の各官能基と単座又は 2 座で結合する。これらを考慮するとフリーの官能基濃度 ($[L]$) は $(2.9 \sim 5.3) \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ となる。アルミニウムイオンと猪の頭フルボ酸との反応およびアルミニウム-フルボ酸錯体 ($Al-L$) の結合定数 (K) を (1), (2) のように表すと



$$K = \{Al-L\} / \{[Al][L]\} \quad (2)$$

前記した数値用いて得られるアルミニウム-フルボ酸錯体の pH 3 における結合定数は $(0.7\sim1.3) \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3$ である。従って、pH 3 という酸性の強い条件下でもフルボ酸はアルミニウムイオンと安定な錯体を生成するものと考えられる。

3.4. フルボ酸に結合したアルミニウムイオンの状態

Fig.5 に Fig.4(c) の ^{27}Al NMR スペクトルを示す。

コンボリューションしたスペクトルを示す。アルミニウム-フルボ酸錯体に由来するピークは、見かけ上3つに分離された。それらのピークの化学シフト値は、それぞれ 52, 18, -20 ppm であった。酸素を配位原子とするアルミニウム化合物に対する化学シフトについての経験則によれば³⁾、18 と -20 ppm のピークは6配位アルミニウム、52 ppm のピークは4配位アルミニウムに帰属される。

モデル化合物を用いた研究から得られた化学シフト値にあてはめると、18 ppm は 1:1 のアルミニウム-イミノジ酢酸錯体⁴⁾、アルミニウム-タイロン錯体⁵⁾のものに近い。-20 ppm はイミノジ酢酸基をもつキレート樹脂に吸着したアルミニウムの ^{27}Al NMR スペクトルにも現れる。⁶⁾これは、6配位のアルミニウム核(おそらく単座でカルボキシル基に結合したもの)がベンゼン環の環電流効果を受けて高磁場側へシフトしたものと考えられている。提案されているフルボ酸のモデル構造によれば、どのモデルにおいてもかなりの数のベンゼン環が存在する。²⁾ 4配位のアルミニウムについては現在のところ結合サイトの推定はできていないが、Fig.5 のスペクトルから高分子の構造に規定された4配位のサイトがかなり存在することが示唆される。

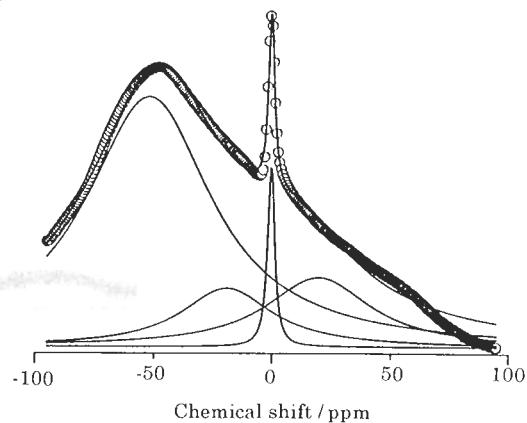


Fig. 5. Deconvoluted ^{27}Al NMR spectrum for that shown in Fig. 4(c)

謝 辞

本研究は日本生命財団の補助金により行われた。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) T. E. Lewis, "Environmental Chemistry and Toxicology", Lewis Publishers Inc., 1989.
- 2) 宮島徹, 森めぐみ, 分析化学, **45**, 369 (1996).
- 3) G. Engelhardt and D. Michel, "High -- Resolution Solid -- State NMR of Silicate and Zeolite", John Wiley & Sons, New York, 1987.
- 4) T. Yokoyama, H. Abe, T. Kurisaki and H. Wakita, Anal. Sci. , submitted.
- 5) T. Yokoyama, H. Abe, T. Kurisaki and H. Wakita, Anal. Sci., **13**, 425 (1997).
- 6) 阿部光, 修士論文(福岡大学理学部)(1996)