

有機チオリン酸エステル類の加水分解反応に及ぼす シクロデキストリン-銅(II)錯体の影響

持田和男*・尾添嘉久・岩崎 均**・松井佳久***

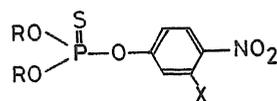
Kazuo MOCHIDA, Yoshihisa OZOE, Hitoshi IWASAKI,
and Yoshihisa MATSUI

Effect of Cyclodextrin-Cu(II) Complexes on the Hydrolysis
of Phosphorothionate Esters

緒 言

6～8個のグルコピラノースが α -1,4結合した環状少糖類であるシクロデキストリン(CD)は、分子内に疎水性の空洞を持つ。CDはその空洞に種々の化合物を取り込むだけでなく、取り込んだ化合物の化学反応性にも変化を与える。従来、CDを用いた研究は、主としてこの疎水性の内部空洞への有機分子取り込みとそれに伴う触媒作用に関連したものであった¹⁾。他方、筆者らはCDがアルカリ水溶液中で銅(II)イオンと配位結合し、1:2型錯体(CD-Cu₂)を形成することを見出した²⁾。この錯体は、楕円形に歪んでいてと推定されるCD環と銅(II)との二種類の基質結合部位を一分子内に持つため、CD自身とは異なった分子認識や触媒作用を行う可能性がある。本研究では1M水酸化ナトリウム水溶液中で形成されるこの1:2型錯体が有機チオリン酸エステル類の加水分解反応に及ぼす影響を検討した。取り扱った有機チオリン酸エステル類はdimethyl 3-methyl-4-nitrophenyl phosphorothionate (fenitrothion), diethyl 4-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) および dimethyl 4-nitrophenyl phosphorothionate (methyl parathion) で、その構造を下に示す。これらのチオリン酸エステル類は、有機リン系農薬としてかつては大量に使用されていたものであり、その一部は現在でもなお使われている。これらチオリン酸エステル類の化学反応性は、生体内や環境中における挙動と関連する重要な一要因であり、それを明確にすることは、これらの問題を考察する上で重要である。これらのチオリン酸

エステル類とCDとの系における反応性については、既に詳細な検討を行った³⁾。なお、上記のようなCDの金属錯体は生体内で重要な働きをしている金属酵素のモデル化合物としても興味ある対象である。



Fenitrothion : R=CH₃, X=CH₃
Parathion : R=C₂H₅, X=H
Methyl parathion : R=CH₃, X=H

実験材料と方法

1) 材料

α -および β -CDは、LaneおよびPirtの方法⁴⁾に従って澱粉の*Bacillus macerans* amylase処理によって合成し、CramerおよびHengleinの方法⁵⁾に従って精製したものを用いた。Fenitrothion, parathion および methyl parathion は、住友化学工業K.K.より恵与されたものであり、純度はそれぞれ97%, 95%および94%であった。Potassium dimethyl phosphorothioate および potassium diethyl phosphorothioate は、Mastinらの方法⁶⁾で合成した、その他の試薬は市販特級品をそのまま用いた。

2) 反応速度(k_{obsd})の測定法

反応速度は、基質のアルカリ加水分解によって生成するフェノレートアニオンが示す410 nmにおける吸光度を分光光度計で追跡することによって求めた。典型的な操作手順は以下の様である。一定濃度のCD(a mM)とその2倍濃度の硫酸銅(2a mM)とを含む1.0 M水酸化ナトリウム水溶液(以下a mM CD-Cu₂錯体溶液

* 生物汚染化学研究室

** 赤穂市農協(旧専攻生)

*** 農芸化学工学研究室

と記す) (3 ml) を一対の石英セル (d=1.0 cm) に入れ, 循環水で $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に保ったセルホルダーに置く. 一対のセルのうち, 1つは試料用セル, 他方は対照用セルとして使用する. セル内の温度が平衡に達した後, 試料用セルにエステルのエタノール溶液 (25–35 mM) の5–7 μl を添加し, 日立 200-20 型分光光度計で上記波長における吸光度変化を追跡し, 記録する. 反応速度定数は, 各反応時間に対する吸光度を通常の一次速度式に従って解析して求めた. シクロヘキサノール, potassium dimethyl phosphorothioate (MP) あるいは potassium diethyl phosphorothioate (EP) の存在下における反応速度は, これら化合物を一定濃度添加した 10 mM CD-Cu₂ 錯体溶液を上記と同様な操作をすることによって求めた. またメチル α -D-グルコピラノサイド (MGP) は銅(II)と1:1型錯体を形成するため, 当量の MGP と硫酸銅とを含む 1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液をグルコピラノサイド-銅(II)錯体溶液 (以下 MGP-Cu 錯体溶液と記す) とし, 同様の操作を行った. 反応は, CD-Cu₂ 錯体, MGP-Cu 錯体およびシクロヘキサノール等の添加物の存在の有無にかかわらず全て一次速度式に良好に従った.

3) β -CD-Cu₂ 錯体-シクロヘキサノール 複合体の解離平衡定数 (K_1) の分光学的測定

β -CD-Cu₂ 錯体溶液にシクロヘキサノールを添加すると, 760 nm における吸光度が減少する. これはシクロヘキサノールが β -CD-Cu₂ 錯体に包接され, 1:1型包接複合体を形成するためである. したがって, シクロヘキサノールの添加量 ($[I]$) とこの吸光度の減少量 (ΔE) との関係を解析することによって, K_1 を求めることができる. すなわち, 5 mM の β -CD-Cu₂ 錯体溶液 (2 ml) に, マイクロシリンジで一定体積 (0–9 μl) のシクロヘキサノールを添加して $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に保った後, その混合物の吸収スペクトルを分光光度計で測定した. 得られた吸収スペクトルを次式 (Hildebrand-Benesi の式)⁸⁾に従って解析した.

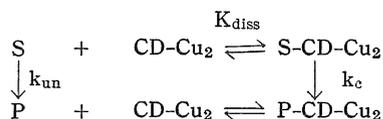
$$\frac{[\beta\text{-CD-Cu}_2][I]}{\Delta E} = \frac{K_1}{\Delta \epsilon} + \frac{[\beta\text{-CD-Cu}_2]}{\Delta \epsilon} \quad (1)$$

ここで, $[\beta\text{-CD-Cu}_2]$ は β -CD-Cu₂ 錯体の全濃度, $\Delta \epsilon$ は β -CD-Cu₂ 錯体の遊離型と包接型との間の分子吸光係数の差を示している. この式は $[\beta\text{-CD-Cu}_2][I] / \Delta E$ vs. $[\beta\text{-CD-Cu}_2]$ のプロットが直線となることを示しており, その直線の勾配と切片とから K_1 を求めた.

実験結果および考察

チオリン酸エステル類のアルカリ加水分解反応は CD

によって抑制されるが, CD-Cu₂ 錯体によっても著しく抑制された. この場合, その抑制度は CD 自身によるそれよりも大きかった (第1表3および8行). しかしながら, 包接能を有しない MGP-Cu 錯体では, チオリン酸エステル類の加水分解は抑制されず, むしろわずかに促進された (第1表2行). また抑制度は CD-Cu₂ 錯体の濃度の増加につれて最大値に漸的に達するという飽和現象を示した (第1表4–8行). これらのことは, CD-Cu₂ 錯体はその CD 環内に基質を取り込んで包接複合体を形成することがこの抑制効果発現に不可欠であることを示唆している. 今この複合体が1:1型であると仮定すると, 以下の反応機構が推定される.



ここで, SおよびPはそれぞれ基質および生成物. S-CD-Cu₂ および P-CD-Cu₂ はそれぞれSおよびPとCD-Cu₂ 錯体との複合体を示している. また k_{un} および k_c はそれぞれSおよびS-CD-Cu₂ の加水分解速度定数, K_{diss} は S-CD-Cu₂ の解離平衡定数を示している. この機構に基づき, CD-Cu₂ 錯体の全濃度 ($[\text{CD-Cu}_2]$) がSの全濃度 ($[S]$) に比べて大過剰であるという条件下で解析すると, 次式が得られる.

$$k_{\text{obsd}} = K_{\text{diss}} \frac{k_{\text{un}} - k_{\text{obsd}}}{[\text{CD-Cu}_2]} + k_c \quad (2)$$

この式は, k_{obsd} vs. $(k_{\text{un}} - k_{\text{obsd}}) / [\text{CD-Cu}_2]$ プロットが直線となることを示している. 事実, 第1表の結果を

Table 1. Pseudo first-order rate constants for the hydrolysis of fenitrothion in the absence and in the presence of β -CD-Cu₂ at 1.0 M NaOH solution and 25°C

Run No.	Concn. of β -CD-Cu ₂ , mM	Additive (concn.)	k_{obsd} , min ⁻¹
1	0.0	none	0.134
2	0.0	MGP ^{a)} -Cu (10 mM)	0.177
3	0.0	β -CD (10 mM)	0.045
4	1.0	none	0.058
5	2.5	none	0.041
6	5.0	none	0.027
7	7.5	none	0.023
8	10.0	none	0.022
9	10.0	MP ^{b)} (100 mM)	0.024
10	10.0	EP ^{c)} (87 mM)	0.024

a) Methyl α -D-glucopyranoside

b) Potassium dimethyl phosphorothioate

c) Potassium diethyl phosphorothioate

k_{obsd} vs. $(k_{un}-k_{obsd})/[\text{CD}-\text{Cu}_2]$ プロットしたものはほぼ良好な直線となった(第1図)。このことは推定した反応機構の妥当性を裏付けるものである。その直線の勾配と切片から、 K_{diss} および k_c としてそれぞれ 0.54 mM および 0.015 min^{-1} なる値を得た。同様のことが他の全ての系においても成立した。これらの解析結果を第2表にまとめた。表中の k_c/k_{un} 値は、複合体形成に伴う基質の加水分解の抑制度あるいは促進度を示している。調べられた反応系のうち、 α -CD- Cu_2 錯体-fenitrothion 系の1例を除いて、いずれも加水分解反応が著しく抑制されていることがわかる。CD- Cu_2 錯体は二級水酸基側が銅(II)で架橋され、所謂キャップされた構造をしているため、CD で見られる二級水酸基の触媒作用への寄与は困難と思われる。したがって、CD- Cu_2 錯体による加水分解反応の抑制効果は、基質の反応部位が CD- Cu_2 錯体の歪んだ CD 空洞内に取り込まれることによって bulk 水中の水酸イオンから保護されるためと考えられる。このような場合、遊離の水酸イオンからの遮蔽度は CD 空洞内に取り込まれた基質の反応部位が空洞内に深く取り込まれるほど大きくなるため、CD 系では基質の取り込み力 ($1/K_{diss}$) と反応の抑制度との間に相関が認められている。本研究の場合にも、4-ニトロフェニル基を持つ parathion および methyl parathion 系においてそのような関係が認められ、取り込み力の大きい基質ほど受ける抑制効果も大きい。しかしながら、3-メチル-4-ニトロフェニル基を持つ fenitrothion- β -CD- Cu_2 錯体系の場合には、対応する methyl parathion 系に比べて取り込み力が大きいにもかかわらず反応の抑制度が小さくなっている。このこと

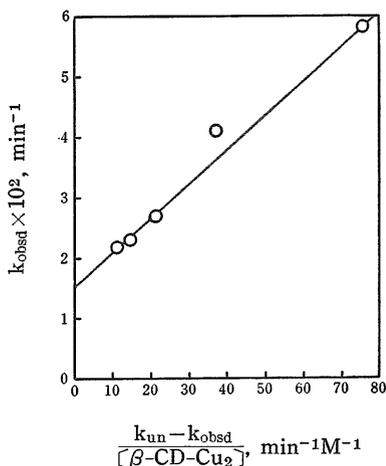


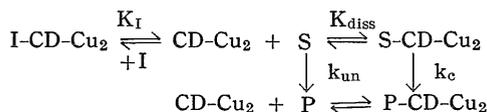
Fig. 1. Plot of k_{obsd} vs. $(k_{un}-k_{obsd})/[\text{CD}-\text{Cu}_2]$ for a fenitrothion- β -CD- Cu_2 system

Table 2. Rate constants and dissociation constants for CD- Cu_2 -phosphorothionate ester systems

Thiophosphate	k_{un}, min^{-1}	k_c, min^{-1}	k_c/k_{un}	K_{diss}, mM
α -CD- Cu_2				
Fenitrothion	0.134	0.162	1.21	0.87
Methyl parathion	0.221	0.041	0.19	2.71
Parathion	0.039	0.016	0.41	5.06
β -CD- Cu_2				
Fenitrothion	0.134	0.015	0.11	0.54
Methyl parathion	0.221	0.004	0.02	1.29
Parathion	0.039	0.006	0.15	2.43

は、CD 空洞内への基質の取り込みがニトロフェニル基部分であることを示唆していると同時に、取り込まれた fenitrothion の配向が、3位のメチル基の立体障害によって、parathion および methyl parathion の場合と著しく異なることを示唆している。一般に、 β -CD- Cu_2 錯体系の取り込み力および反応の抑制度が対応する α -CD- Cu_2 錯体系のそれより大きいのは、錯体中の CD 環空洞の大きさに起因するものであろう。本研究において唯一の例外である fenitrothion- α -CD- Cu_2 錯体系の加速現象については、その原因は不明であるが、基質がフェニル基の3位にメチル基を持つことと α -CD- Cu_2 錯体中の CD 環空洞が β -CD 環のそれに比べて小さいことから、抑制効果を示す場合とは異なった部位の取り込みを行っている可能性が考えられよう。

上記の抑制効果が、CD- Cu_2 錯体中の CD 環内へ基質を取り込むことによって発現されることは、シクロヘキサノールの添加実験からも確認された。CD- Cu_2 錯体中の CD 環内にシクロヘキサノールが取り込まれることは既に知られている。第2図は、一定濃度の β -CD- Cu_2 錯体 (10 mM) 存在下における fenitrothion の系に、シクロヘキサノールを添加した際に観測された k_{obsd} の変化を示している。CD- Cu_2 錯体の添加によって低下した k_{obsd} はシクロヘキサノールの添加によって増加し、しかもシクロヘキサノールの増加につれて破線で示した遊離の fenitrothion が示す反応速度定数 (k_{un}) まで漸増し、その増加傾向は飽和型となった。このことは、シクロヘキサノールが CD- Cu_2 錯体の CD 環内に fenitrothion と拮抗して取り込まれることによって、包接されていた fenitrothion が遊離したためと考えられる。したがって、この場合の反応機構は次のようになる。



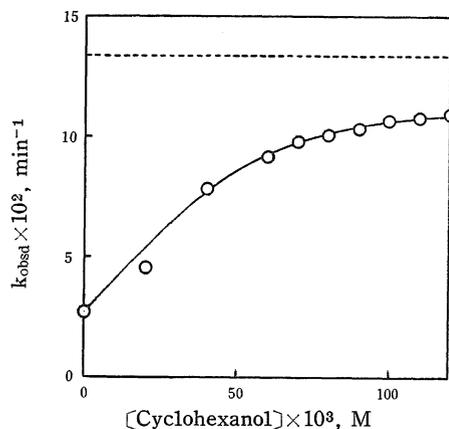


Fig. 2. Effect of cyclohexanol on the hydrolysis of fenitrothion in a fenitrothion- β -CD-Cu₂ system

この機構は前述の機構にシクロヘキサノール(I)の関与する $CD-Cu_2 + I \rightleftharpoons I-CD-Cu_2$ の包接平衡が加わっている。この平衡の解離平衡定数を K_I とし、 $CD-Cu_2$ 錯体の全濃度が基質の全濃度より大過剰に存在し、かつシクロヘキサノールの全濃度 ($[I]$) はそれよりも大であるという条件の下では次の式が誘導できる。

$$[I] = \frac{K_I [CD-Cu_2]}{K_{diss}} \left(\frac{k_{obsd} - k_e}{k_{un} - k_{obsd}} \right) - K_I \quad (3)$$

この式は、 $[I]$ vs. $(k_{obsd} - k_e)/(k_{un} - k_{obsd})$ プロットが直線となることを示している。事実、第2図の結果をプロットするとIの高濃度領域で直線となった(第3図)。Iの低濃度領域では直線からずれる傾向が見られたが、これは式の誘導にあたって設けた条件がそのような $[I]$ の範囲では満足されないためであろう。その直線部分の縦軸切片から K_I として $2.0 \times 10^{-3} M$ なる値を得た。一方、実験方法の部で述べた吸収スペクトル法から直接求めた β -CD-Cu₂-シクロヘキサノール複合体の K_I 値も $2.0 \times 10^{-3} M$ であり、前述の値に等しい。また第3図の直線の勾配から求めた K_{diss} の値は $6.4 \times 10^{-4} M$ であり、Iを含まない反応系で求めたそれ ($5.4 \times 10^{-4} M$, 第2表参照) とほぼ等しい。これらの結果は先の反応機構の妥当性を示すと同時に、チオリン酸エステル類が $CD-Cu_2$ 錯体中の CD 環内に取り込まれることによって、その加水分解反応が影響を受けるという先の推論を強く支持している。

$CD-Cu_2$ 錯体による基質の取り込み部位が基質のフェニル基部分であると推定されることは先に述べた。このことを確かめるために、基質の加水分解によって生成するMPおよびEPをfenitrothion- β -CD-Cu₂ 錯体系に大量に添加してその影響を調べた(第1表9および10

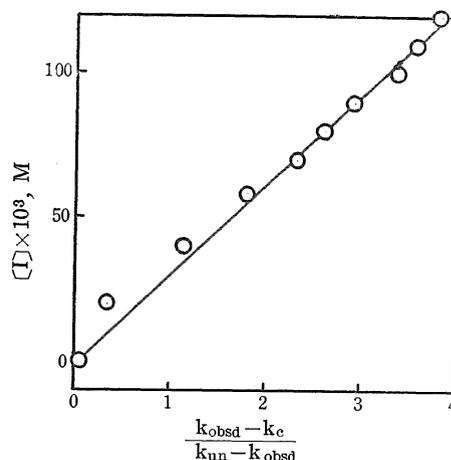


Fig. 3. Plot of $[I]$ vs. $(k_{obsd} - k_e)/(k_{un} - k_{obsd})$ for a cyclohexanol-fenitrothion- β -CD-Cu₂ system

行)。いずれも、 β -CD-Cu₂ 錯体によるfenitrothionの加水分解反応の抑制効果にはほとんど影響を及ぼさなかった。このことから、 $CD-Cu_2$ 錯体によるチオリン酸エステルの取り込みは、基質のアルキル基部分ではなく、ニトロフェニル基部分であると結論できよう。

最後に、反応の測定に際して協力いただいた梶村真弓嬢に感謝の意を表する。

要 約

1.0 M 水酸化ナトリウム溶液中における有機チオリン酸エステル類の加水分解反応に及ぼす α - および β -シクロデキストリン-銅(II) (1:2) 型錯体の影響を調べた。 β -シクロデキストリン-銅(II)錯体は、fenitrothion, methyl parathion および parathion の加水分解反応を著しく抑制した。一方、対応する α -シクロデキストリン錯体は、methyl parathion および parathion の加水分解反応を抑制するが、fenitrothion のそれはわずかに促進した。いずれの反応も、先ず有機チオリン酸エステルと錯体との間に複合体が形成され、引続いて錯体中の空洞に取り込まれたエステルの反応部位が遊離の水酸イオンの求核攻撃を受けることによって進行する。反応の抑制は、この水酸イオンの求核攻撃が錯体中のシクロデキストリン環によって妨害される時に起る。この反応機構における平衡および動力学的パラメータの測定結果に基づいて、錯体中に取り込まれたエステル類の配向を考察した。

引用文献

1. GRIFFITHS, D. W. and BENDER, M. L. : Adv. Catal. **23** : 209-261, 1973.
2. MATSUI, Y., KURITA, T., YAGI, M., OKAYAMA, T., MOCHIDA, K., and DATE, Y. : Bull. Chem. Soc. Jpn. **48** : 2187-2191, 1975.
3. MOCHIDA, K., MATSUI, Y., OTA, Y., ARAKAWA, K., and DATE, Y. : Bull. Chem. Soc. Jpn. **49** : 3119-3123, 1976.
4. LANE, A. G. and PIRT, S. J. : J. Appl. Chem. Biotechnol. **21** : 330-334, 1971.
5. CRAMER, F. and HENGLEIN, F. M. : Chem. Ber. **91** : 308-310, 1958.
6. MASTIN, T. W., NORMAN, G. R., and WEILMUNSTER, E. A. : J. Amer. Chem. Soc. **67** : 1662-1664, 1945.
7. 松井佳久・持田和男 : 第6回酵素類似有機反応研究会要旨集, **1978**, pp.51-52
8. HILDEBRAND, J. H. and BENESI, H. A. : J. Amer. Chem. Soc. **71** : 2703-2707, 1949.

Summary

The effect of α - and β -cyclodextrin-Cu(II) (1 : 2) complexes on the hydrolysis of phosphorothionate esters was examined in 1.0 M NaOH solution at 25°C. The β -cyclodextrin-Cu(II) complex remarkably decelerated the hydrolysis of fenitrothion, methyl parathion, and parathion. The corresponding α -cyclodextrin complex also remarkably decelerated the hydrolysis of methyl parathion and parathion, although it slightly accelerated the reaction of fenitrothion. Each reaction proceeds *via* the prior formation of an adduct between the phosphorothionate ester and the complex, followed by the nucleophilic attack of the hydroxide ion on the reaction site of the ester included within the void space of the complex. The deceleration of the reaction may be caused by the retardation of the nucleophilic attack of the hydroxide ion by the cyclodextrin-ring in the complex. On the basis of the observed equilibrium and kinetic parameters involved in the present reaction mechanism, the orientation of the esters within the complex cavity was discussed.