

β -シクロデキストリン2級水酸基の β -アミノエチルアミノ基 による修飾とその誘導体の金属錯体について

持田 和男*・尾添 嘉久*・梶村 真弓*・松井 佳久**

Kazuo MOCHIDA, Yoshihisa OZOE, Mayumi KAJIMURA,
and Yoshihisa MATSUI
Modification of a *sec*-Hydroxyl Group of
 β -Cyclodextrin with a β -Aminoethylamino Group
and the Metal Complexes with the Derivative

緒 言

β -シクロデキストリン (CD) は7個のグルコピラノースが α -1, 4結合によって環状に配列した構造を持つ。そのため、CDの分子中央部には疎水性の空洞部(直径約7.5 Å)が生じ、またその空洞の一端にはグルコピラノースの2級水酸基が合計14個環状に配列することになる。これらはCDが酵素様機能を発揮する際に、それぞれ基質取り込み部位および触媒部位として役立っている¹⁾。しかしながら、CDの2級水酸基の触媒能はその酸解離領域($pK_a \approx ca. 12$)に限られているため、比較的高いpH領域でしか発揮されないという欠点を持つ。

他方、金属イオンはこれと結合する基質に対して大きな触媒効果を示す。金属イオンの有するこの触媒能とCDの基質取り込み能とを合せ持つ化合物を合成すれば、CDの触媒効果の増大と共に金属酵素モデルとしてのCDの新たな利用面が期待できる。

触媒部位であるCDの2級水酸基側に金属イオンを配位させた錯体としてはこれまで2例知られている。その1つは、アルカリ溶液中において銅(II)イオンがCDの2級水酸基に配位して形成される $Cu:CD=2:1$ 型の錯体である²⁾。この場合、導入した2個の銅(II)イオンがCDの2級水酸基側に蓋をしてしまうため、その触媒効果はこれまで抑制効果しか見出されていない³⁾。他方錯形成能を有する官能基でCDの2級水酸基を置換し

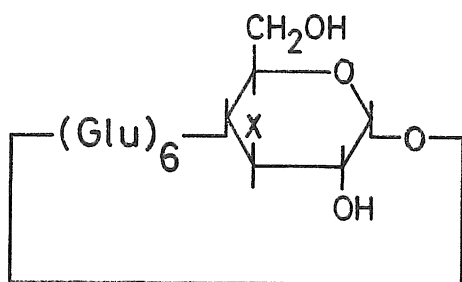
た誘導体も合成されており、これにニッケル(II)イオンを導入したものは、中性付近でカルボン酸エステルの加水分解を著しく促進する⁴⁾。しかしながら、その官能基はエステル結合によって導入されているため、この錯体の使用pH領域が制限されるという欠点を持っている。


これらのことから、本研究ではCDの2級水酸基の1個をアミノエチルアミノ基で置換したモノ-(β -3-アミノエチルアミノ-3-デオキシ)- β -シクロデキストリン(CD-3-en)を合成し、これに金属イオンを配位結合させることによって、CDへ金属イオンを導入することを試みた。エチレンジアミン(en)は銅、コバルト、ニッケルなどの金属イオンと安定度の高い錯体を形成する脂肪族二座配位子として著名である。

CD-3-enの合成法としては、次の経路が考えられる。まずCDの存在下で α -トルエンシルホニルクロライド(TsCl)のアルカリ加水分解反応を行うと、CDを構成するグルコピラノースのC-3位の水酸基がCD空洞内に取り込まれたTsClに対して求核攻撃を行ないトシル化シクロデキストリン(CD-3-OTs)を生成する。次いでこれをenと反応させ、CD-3-enを得る。この場合、enによる置換反応は SN_2 反応と考えられるので、導入したアミノエチルアミノ基の配向は元のCDの水酸基のそれとは異なっていると考えられる。したがって、アミノエチルアミノ基を元の水酸基⁵⁾の配向と同じにするには、服部らがCDのヒスチジンやヒスタミン誘導体⁶⁾を合成した際に行った様に、CD-3-OTsのトシル基をヨウ素で置換してヨウ化シクロデキストリン(CD-

* 生物汚染化学研究室
** 土壌物理化学研究室

3-I) を合成した後、このヨウ素を更にアミノエチルアミノ基で置換する方法も考えられる。これら2つの CD-3-en を CPK 分子模型で組立てると、前者のアミノエチルアミノ基が CD 空洞軸の中心部の近くに位置するのにに対して後者のそれはやや外側に位置している。このようなアミノエチルアミノ基の配向が相異した誘導体を合成し、その化学反応性の相異を調べることは、酵素類似様機能を有する CD の構造-活性相関を解明する上からも興味のあるところである。今回は CD-3-OTs のトシル基をアミノエチルアミノ基で直接置換する前者の方法を検討したので報告する。



CD	: X = -OH
CD-3-OTs	: X = -OSO ₂ - 
CD-3-I	: X = -I
CD-3-en	: X = -NHCH ₂ CH ₂ NH ₂

実験材料と方法

1) 材料

CD は市販品を水から再結晶して用いた。en は水素化カルシウムで乾燥後蒸留して用いた。その他の試薬は市販最上級品をそのまま用いた。

2) 装置と一般的方法

TLC にはシリカゲル G (Merck 社製)、層厚 0.50 mm のガラスプレートを用い、上昇法により展開した。展開溶媒には酢酸/クロロホルム/水 (8/1/3, v/v/v)、発色剤にはジフェニルアミン溶液 (1% のジフェニルアミン、1% のアニリンおよび10% の濃リン酸を含むアセトン溶液) および0.3% ニヒドリン・*n*-ブタノール溶液を用いた。DMSO-*d*₆ 中の PMR スペクトルは TMS を基準にして日本電子製核磁気共鳴装置 (JNM, MH-100 型) で測定した。吸収スペクトルは日立製分光光度計 (200-20 型) を用い、25°C で測定した。電位差滴定はオリオン社製デジタル式 pH/mV メーター (801 A 型) を用いて、25°C の恒温水中で行った。

3) CD-3-OTs の合成

CD 10g (8.81 mmol) を 0.25 M NaOH 500 ml に溶解し、これによく粉砕した TsCl 16.8 g (88.1 mmol) を加え、室温 (約20°C) で5分間激しく攪拌した。反応液を濾過後、濾液を濃塩酸で直ちに中和した。この溶液を室温に一夜放置した後、生じた白色沈殿 (CD-3-OTs) を濾集し、冷水で洗浄した。得られた沈殿は、必要ならば水から再結晶し、P₂O₅ 上で真空乾燥 (60°C 以下) した。CD-3-OTs の収量 4g。

4) CD-3-en の合成

CD-3-OTs 5g を en 50 ml に加え、窒素ガス気流中で70°C に1時間保った。反応後、過剰の en は減圧下で除去した。残渣をアセトン 20 ml に懸濁させた後濾過する操作を2度行い、さらに同様の操作をエチルエーテル 20 ml で2度行った後、P₂O₅ 上で真空乾燥 (室温) した。この残渣を 0.02 M 重炭酸アンモニウム溶液で平衡化した CM-セルロースカラムに充填し、同濃度の重炭酸アンモニウム溶液で洗浄した。吸着物質は 0.02 M から 0.10 M の重炭酸アンモニウム溶液による linear gradient 溶出法で脱離させた。分取した各画分は TLC で確認し、該当画分を減圧乾固後、残渣 (CD-3-en) を P₂O₅ 上で真空乾燥 (室温) した。CD-3-en の収量 3g。

5) CD-3-en の塩酸酸性水溶液の電位差滴定

CD-3-en 17.7 mg を 6 mM HCl 水溶液 5 ml に溶かした溶液 2 ml を窒素ガスで脱気した。この溶液に pH 測定用複合電極を浸し、0.095 M 水酸化ナトリウム水溶液をマイクロシリンジで適量注加しながらその都度溶液の pH を測定した。

6) CD-3-en -金属錯体形成に伴う吸収スペクトル変化の測定

一定濃度の CD-3-en を含む重炭酸ナトリウム-水酸化ナトリウム系緩衝溶液 (pH 10.5) 2 ml を石英セルに入れ、これに一定濃度の金属塩水溶液をマイクロシリンジで一定量 (0-200 μl) 添加した。溶液を攪拌後5分間放置してから吸収スペクトルを測定した。用いた金属塩水溶液は 50 mM CuSO₄ 水溶液、25 mM CoSO₄ 水溶液および 500 mM NiSO₄ 水溶液であり、その際用いた CD-3-en 溶液の濃度はそれぞれ 5、2.5 および 50 mM である。

実験結果および考察

CD-3-en は CD を構成するグルコピラノースの3位の2級水酸基の1個をまずトシル化し、次いでこれをアミノエチルアミノ基で置換することによって得た。その収率は CD に対して約20%であった。前者の CD-3-

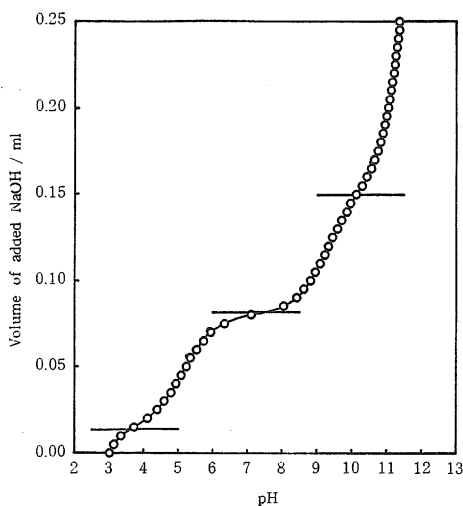


Fig. 1. The pH titration of an acidic CD-3-en solution with 0.095 M NaOH at 25°C.

OTs 合成法は服部らの方法⁷⁾に順じたものである。彼らは反応中和液を Amberlite MB-3 カラムを通して脱塩した後、Sephadex G-15 を用いたゲル濾過法によって CD-3-OTs を分離した。著者らは中性の水溶液における CD と CD-3-OTs との間にある溶解度（それぞれ、約1.9%および0.05%）の大きな差を利用することによって、簡単に CD-3-OTs を得ることができた。得られた CD-3-OTs の TLC は CD のスポット ($R_f = 0.57$) と明確に区別できる単一のスポット ($R_f = 0.70$) を与えた。他方、得られた CD-3-en の TLC はジフェニルアミン発色剤およびニンヒドリン発色剤にそれぞれ陽性な単一のスポット ($R_f = 0.42$) を与えた。また PMR スペクトルは CD のアノメリックプロトンに基づく吸収 ($\delta = 4.48$ ppm) とアミノ基に基づくと思われる2つの吸収 ($\delta = 1.12, 1.84$ ppm) を示した。後者の吸収は重水添加によって消失した。CD-3-en の塩酸酸性水溶液の水酸化ナトリウム水溶液による電位差滴定は、3段階からなる中和曲線を与えた（第1図）。第1段階は過剰の塩酸の中和過程であり、これに要した水酸化ナトリウムの滴定量を差し引き、第2段階および第3段階までの中和に要した水酸化ナトリウムの滴定量を求めると、それぞれ 0.068 および 0.136 ml であった。これらの値は1分子の CD の水酸基が1分子の en によって置換されている場合の水酸化ナトリウム溶液の理論滴定量（それぞれ 0.063 および 0.126 ml）とはほぼ一致した。その曲線から CD-3-en 中の2つのアミノ基の pK_a として 5.18 および 9.25 なる値を得た。これらの値は、CD の1級水酸基をアミノエチルアミノ基

で置換したモノ-(6- β -アミノエチルアミノ-6-デオキシ)- β -シクロデキストリン (CD-6-en) の pK_a 値（それぞれ 5.6 および 9.2⁸⁾）とかなりよく一致している。これら2つの CD-3-en の pK_a 値は、いずれも対応する en 自身の値（それぞれ 6.85 および 9.93⁹⁾）よりかなり小さく、CD-3-en におけるアミノエチルアミノ基がかなり疎水的雰囲気にあることを示唆している。

次いで、pH 10.5 における CD-3-en と各種金属(II)との錯形成反応について調べた。まず予備実験として次のような操作を行った。5 mM の CD-3-en を含む緩衝溶液（2 ml）と緩衝溶液のみ（2 ml）との2種類の溶液のそれぞれに、50 mM の金属塩水溶液（CuSO₄, CoSO₄, NiSO₄, FeSO₄, MnSO₄ および CdSO₄ 水溶液）50 μ l を添加し、よく攪拌した後室温に静置して沈殿形成の有無を観察した。CD-3-en を含まない場合、用いた金属塩はいずれも水酸化物を形成して沈殿した。しかしながら、CD-3-en を含む緩衝溶液に、CuSO₄, CoSO₄ および NiSO₄ を添加したものは沈殿の形成は認められずそれぞれの色調を呈する溶液となった。他の金属塩についてはこの差が明確でなかった。この金属塩の可溶性現象は CD-3-en が金属イオンと錯体を形成していることを示唆するものである。そこで錯体形成の明確な Cu(II), Co(II) および Ni(II) について、実験の部で述べた吸収スペクトル法によって錯体の組成比を調べた。得られた結果を第2, 3および4図に示した。いずれも金属塩を添加した際に観察される溶液の一定波長における吸光度変化を縦軸に、金属イオ

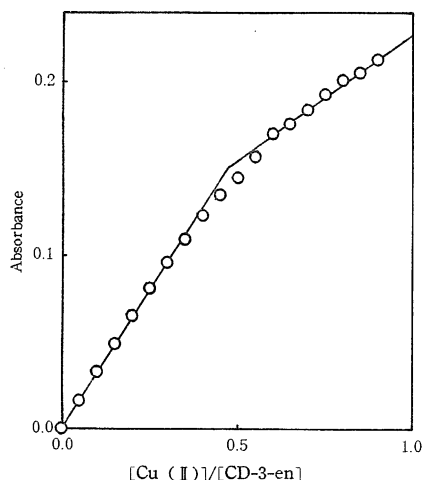


Fig. 2. Plot of absorbance at 550 nm vs. $[Cu(II)]/[CD-3-en]$.
 $[CD-3-en] = 5.0$ mM
 pH 10.5, $I_c = 0.067$ M, 25°C

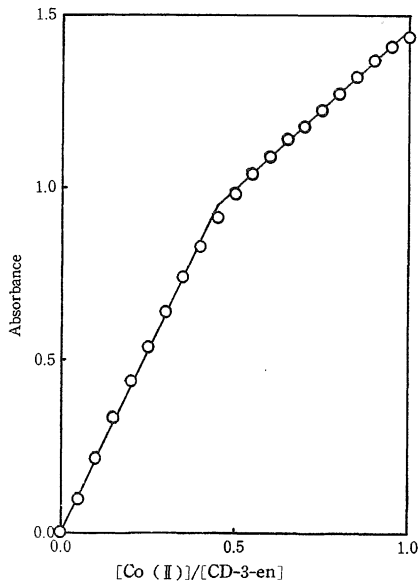


Fig. 3. Plot of absorbance at 360 nm vs. $[\text{Co}(\text{II})]/[\text{CD-3-en}]$.

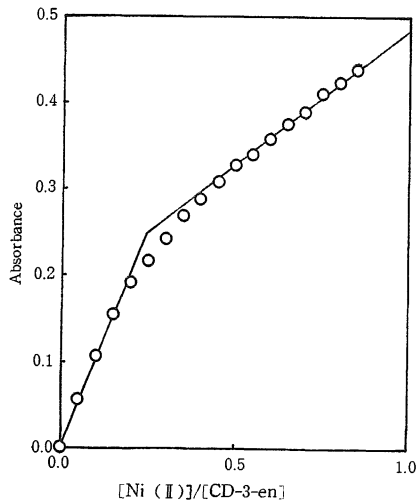


Fig. 4. Plot of absorbance at 380 nm vs. $[\text{Ni}(\text{II})]/[\text{CD-3-en}]$.

ンの濃度と CD-3-en の濃度との比 ($[\text{Metal}]/[\text{CD-3-en}]$) を横軸にプロットした。それらのプロットは $[\text{Cu}(\text{II})]/[\text{CD-3-en}] \approx 0.5$, $[\text{Co}(\text{II})]/[\text{CD-3-en}] \approx 0.5$ および $[\text{Ni}(\text{II})]/[\text{CD-3-en}] \approx 0.25$ に屈折点を与えた。これは、Cu(II) あるいは Co(II) と CD-3-en との間に主として 1 : 2 型錯体が、また Ni(II) と CD-3-en との間に主として 1 : 4 型錯体が形成していることを示している。Cu(II), Co(II) および Ni(II) はそれぞれ

en と 1 : 2, 1 : 3 および 1 : 3 型錯体を形成する¹⁰⁾¹¹⁾ことが知られている。平面正方形配位をする Cu(II) の場合、CD-3-en と en とで同一組成比を示した。しかしながら正八面体型配位をする Co(II), Ni(II) では組成比が両配位子間で異なっていた。これは CD-3-en 分子中の CD 部の嵩高さのために、en 系で取られる正八面体型配位ができないためと考えられる。

ここに得られた金属イオンを持つ CD 二量体あるいは四量体は特異な触媒作用を行うものと期待されるが、これについては別に報告する。

要 約

β -シクロデキストリンの 2 級水酸基の 1 つをトシル化し、次いでそれをアミノエチルアミノ基で置換することによってモノ-(3- β -アミノエチルアミノ-3-デオキシ)- β -シクロデキストリン (CD-3-en) を合成した。この CD-3-en の共役酸の pK_a は 5.18 および 9.25 であり、そのいずれも対応するエチレンジアミンのそれ (それぞれ 6.85 および 9.93) よりかなり小さかった。

次いで、この CD-3-en の金属錯体形成反応を pH 10.5 および 25°C の緩衝溶液中で調べた。銅(II)、コバルト(II) およびニッケル(II) が CD-3-en とそれぞれ 1 : 2, 1 : 2 および 1 : 4 の錯体を形成することを示した。

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. 持田和男・尾添嘉久・岩崎均・松井佳久・島根大農研報 **13** : 190-194, 1979.
4. BRESLOW, R. and OVERMAN, L. N. : J. Am. Chem. Soc. **92** : 1075-1077, 1970.
5. 小野塚茂晴・小島政芳・戸田不二緒・服部憲治郎・藤沢道明 : 日本化学会第35秋季年会予稿集 II, 624, 1976.
6. 服部憲治郎・吉川昌知・高橋幾・小野塚茂晴・戸田不二緒 : 日本化学会第35秋季年会予稿集 II, 625, 1976.
7. 服部憲治郎・千賀正紀・小野塚茂晴・戸田不二緒・宇野敬吉 : 日本化学会第35秋季年会予稿集 II, 593, 1976.
8. MATSUI, Y., YOKOI, T., and MOCHIDA, K. :

- Chem. Lett. **1976** : 1037–1040.
9. PERRIN, D. D. : Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution Butterworths London 1965, p. 27.
10. ROBERT, G. L. and FIELD, F. H. : J. Am. Chem. Soc. **72** : 4232–4235, 1950.
11. BLOCK, B. P. and MCINTYRE, G. H., JR. : J. Am. Chem. Soc. **75** : 5667–5679, 1953.
12. WATANABE, T. and ATOJI, M. : Science (Japan) **21** : 301–302, 1951.

Summary

Mono-(3- β -aminoethylamino-3-deoxy)- β -cyclodextrin (CD-3-en) was synthesized by the tosylation of one of the secondary hydroxyl groups of β -cyclodextrin, followed by the substitution of the tosyl group with an aminoethylamino group. The pK_a values for the conjugate acids of CD-3-en were determined to be 5.18 and 9.25, each of which is significantly smaller than the corresponding value for ethylenediamine (6.85 and 9.93 respectively).

The complexation of CD-3-en with a few metal ions was examined in a buffer solution at pH 10.5 and 25°C. It was revealed that copper(II), cobalt(II), and nickel(II) form 1 : 2, 1 : 2, and 1 : 4 complexes, respectively, with CD-3-en.