

シクロデキストリン-銅(II)錯体による有機リン酸エステル類の加水分解抑制反応における基質特異性

持田 和男*・尾添 嘉久*・宮崎 洋*・松井 佳久**

Kazuo MOCHIDA, Yoshihisa OZOE, Hiroshi MIYAZAKI,
and Yoshihisa MATSUI

Substrate Specificity in the Cyclodextrin-Cu(II) Complex-retarded
Cleavage of Organic Phosphates

緒 言

アルカリ水溶液中においてシクロデキストリン(CD)は、それを構成する α -D-グルコピラノースの2級水酸基に銅(II)イオンを配位させ、1:2型錯体(CD-Cu₂錯体)を形成する¹⁾。この場合2個の銅(II)イオンは、Cu(OH⁻)₂CuあるいはCu(OH⁻)(O²⁻)Cuイオンブリッジを形成して、CDの分子内空洞の一端を塞いでいると推定されている。

著者らは先にこのCD-Cu₂錯体が、有機チオリン酸エステル類のアルカリ加水分解を著しく抑制することを見出し、その抑制反応機構を調べた²⁾。反応の抑制は、基質の反応部位が錯体中のCD空洞内に取り込まれることによって、遊離の水酸イオンの求核攻撃から保護されるために起る。

他方、弱アルカリ性水溶液中において、遊離のCD自体はチオノ型リン酸エステルの加水分解反応を抑制するのに対して、オキシソノ型リン酸エステルのそれを促進する³⁾。CDの触媒作用におけるこのような著しい基質特異性は、CDの疎水性空洞に取り込まれた基質の配向に依存しており、疎水性の比較的高いS原子を持つチオノ型リン酸エステルの反応部位が、空洞内の比較的中央部に位置するのに対して、疎水性の比較的低いO原子を持つオキシソノ型リン酸エステルの反応部位は、空洞の一端に存在するグルコピラノースの2級水酸基(触媒部位)の近傍に位置するためである。

本研究では、オキシソノ型リン酸エステル類の加水分解

に及ぼすCD-Cu₂錯体の影響を調べ、対応するチオノ型リン酸エステル類へのCD-Cu₂錯体の触媒効果と比較検討すると共に、CD自身の触媒効果とも比較検討することを目的とした。

実験材料および方法

1) 材 料

α -CDはLaneおよびPirtの方法に従って⁴⁾澱粉の*Bacillus macerans* amylase処理によって合成し、CramerおよびHengleinの方法に従って⁵⁾精製したものをを用いた。 β -CDは市販品を水から再結晶して用いた。O, O-Dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphate (フェニトロオキシソノ)はジメチルクロロホスフェートと3-メチル-4-ニトロフェノールとの反応によって合成し、⁶⁾シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製したものをを用いた。O, O-Dimethyl O-(4-nitrophenyl) phosphate (メチルパラオキシソノ)は同様にジメチルクロロホスフェートと4-ニトロフェノールとの反応によって合成したものをを用いた。O, O-Diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphate (パラオキシソノ)は住友化学工業KKから恵与されたものを精製せずに用いた。これらの有機リン酸エステル類の純度は、アルカリ加水分解反応によって生成するフェノレートイオンを吸収スペクトル法で定量することによって求めた。その結果は、フェニトロオキシソノが95%、メチルパラオキシソノが100%、パラオキシソノが95%であった。ジエチルリン酸はPlimmerらおよびTsuboiらの方法に従って⁷⁾合成し、バリウム塩として単離した。⁸⁾ジメチルリン酸は東京化成品(純度50%)を先の文献に従って精製し、バリウ

* 生物汚染化学研究室
** 土壌物理化学研究室

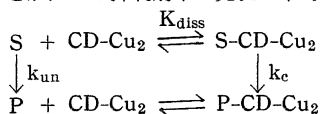
ム塩として単離した。これらのリン化合物中のリン含量を King の方法に従って定量した結果、それぞれ 14.2% (理論値 14.0%) および 16.2% (理論値 16.0%) であった。なお、これら 2 つのリン化合物は使用に際してあらかじめ強アルカリ性溶液に加え、 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ の沈殿を遠心分離によって取り除いた後用いた。その他の試薬は市販最上級品をそのまま用いた。

2) 錯体の調整法および反応速度の測定法

錯体の調整および反応速度の測定は、先に報告した方法に従った。反応速度は、反応生成物に由来する 410 nm における吸光度の経時変化を一次速度式に従って解析し、擬一次反応速度定数 (k_{obsd}) として得た。

実験結果および考察

CD-Cu₂ 錯体は、チオノ型リン酸エステルと同様オキソノ型リン酸エステルに対しても、その加水分解反応を著しく抑制した (第 1 図)。しかもその抑制度は CD-Cu₂ 錯体の濃度 ($[\text{CD-Cu}_2]$) の増加につれて最大値に近づくという飽和現象を示した。このことは、この錯体の存在下におけるチオノ型リン酸エステルの加水分解反応の機構として提示した次の反応式が、この場合にも適用しうることを示唆している。すなわち、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、この抑制効果の発現に不可欠である。



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

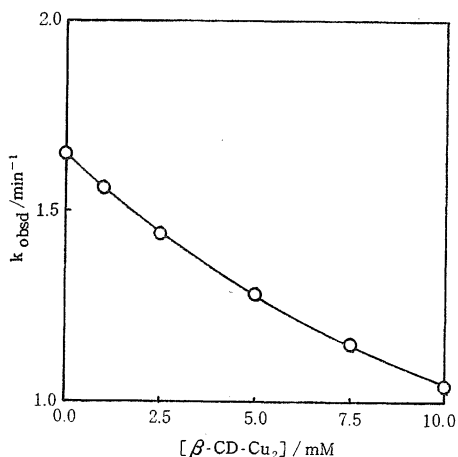


Fig. 1. Plot of k_{obsd} vs. $[\beta\text{-CD-Cu}_2]$ for a fenitroxon- $\beta\text{-CD-Cu}_2$ system.

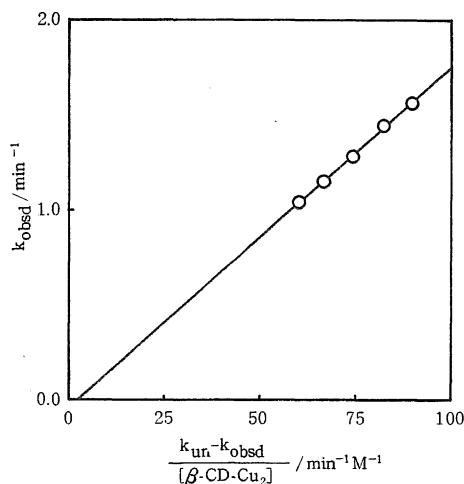


Fig. 2. Plot of k_{obsd} vs. $(k_{\text{un}} - k_{\text{obsd}}) / [\beta\text{-CD-Cu}_2]$ for a fenitroxon- $\beta\text{-CD-Cu}_2$ system.

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を、 K_{diss} は S-CD-Cu₂ の解離平衡定数を示している。この機構において、CD-Cu₂ 錯体の全濃度が基質の全濃度 ($[\text{S}]$) に比べて大過剰であるという実験条件を考慮すれば、次式が導かれる。

$$k_{\text{obsd}} = K_{\text{diss}} \frac{k_{\text{un}} - k_{\text{obsd}}}{[\text{CD-Cu}_2]} + k_{\text{c}}$$

この式は k_{obsd} vs. $(k_{\text{un}} - k_{\text{obsd}}) / [\text{CD-Cu}_2]$ のプロットが直線となることを示している。第 1 図の結果を k_{obsd} vs. $(k_{\text{un}} - k_{\text{obsd}}) / [\text{CD-Cu}_2]$ プロットしたものは、良好な直線となり、チオノ型リン酸エステルの場合と同様オキソノ型リン酸エステルの場合にも、この機構が適用しうることがわかった。同様のことは測定した他の全ての系においても成立した。得られた直線の勾配と切片から、それぞれ K_{diss} および k_{c} を求め、その結果を第 1 表にまとめた。複合体型基質と遊離型基質の加水分解速度の比 ($k_{\text{c}}/k_{\text{un}}$) から明らかな如く、測定された全ての系において CD-Cu₂ 錯体の添加は反応の著しい抑制を引起した。その効果は $\alpha\text{-CD-Cu}_2$ 錯体系よりも $\beta\text{-CD-Cu}_2$ 錯体系において著しく、CD-Cu₂ 錯体中の CD 環内に取り込まれた基質の加水分解は完全に阻害されている。

この抑制効果が CD-Cu₂ 錯体中の CD 環内への基質の取り込みによって引起される現象であることを確認するために、CD-Cu₂ 錯体中の CD 環内に取り込まれることが知られているシクロヘキサノールを反応系に添加

Table 1. Rate constants and dissociation constants for CD-Cu₂-organic phosphate systems in 1.0 M NaOH solution at 25°C.

Substrate	k _{un} , min ⁻¹	k _c , min ⁻¹	k _c /k _{un}	K _{diss} , mM
α-CD-Cu ₂ system				
Fenitroxon	1.60	1.03	0.64	9
Methyl paraoxon	2.52	0.35	0.14	7
Paraoxon	0.66	0.09	0.14	17
β-CD-Cu ₂ system				
Fenitroxon	1.60	-0.04	-0.03	18
Methyl paraoxon	2.52	-0.03	-0.01	9
Paraoxon	0.66	0.00	0.00	4

Table 2. Rate constants and dissociation constants for CD-Cu₂-phosphorothionate ester systems in 1.0 M NaOH solution at 25°C.¹⁾

Substrate	k _c /k _{un}	K _{diss} , mM
α-CD-Cu ₂ system		
Fenitrothion	1.21	0.87
Methyl parathion	0.19	2.71
Parathion	0.41	5.06
β-CD-Cu ₂ system		
Fenitrothion	0.11	0.54
Methyl parathion	0.02	1.29
Parathion	0.15	2.43

1) Ref. 2.

し、抑制効果が回復するか否かを調べた (第3図)。β-CD-Cu₂ 錯体の添加 (10 mM) によって低下したメチルパラオキシソンの k_{obsd} はシクロヘキサノールの添加 (0-120 mM) によって増加し、しかもシクロヘキサノール濃度の増加につれて破線で示した遊離のメチルパラオキシソンの示す反応速度定数まで漸的に増加した。これはシクロヘキサノールが CD-Cu₂ 錯体の CD 環内にメチルパラオキシソンと拮抗して取り込まれることによって、包接されていたメチルパラオキシソンが遊離したためと考えられる。他方、基質の加水分解によって生成するジメチルリン酸 (50 mM) およびジエチルリン酸 (50 mM) を対応する オキソン 型リン酸エステル-CD-Cu₂ 錯体系に添加してみた。この場合には、シクロヘキサノールで見られた k_{obsd} の回復は認められなかった。これらの結果は、チオノ型リン酸エステルの場合と同様、基質のフェニル部位が CD-Cu₂ 錯体中の CD 環内に取り込まれていることを示している。CD-Cu₂ 錯体は CD

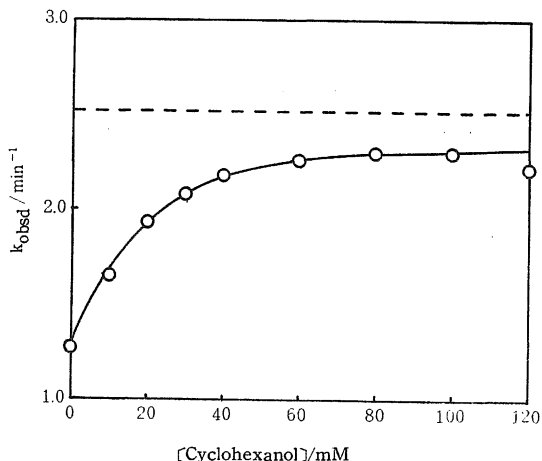


Fig. 3. Effect of cyclohexanol on the hydrolysis of methyl paraoxon in a methyl paraoxon-β-CD-Cu₂ system.

の2級水酸基側が銅(II)のイオンブリッジによって蓋をされているため、CDで見られる2級水酸基の触媒作用への寄与は困難である。したがって、CD-Cu₂ 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-Cu₂ 錯体中の CD 環内に取り込まれることによって、遊離の水酸イオンの求核攻撃から保護されるために生じたと考えられる。また、空洞の小さな α-CD-Cu₂ 錯体より空洞の大きな β-CD-Cu₂ 錯体の方が抑制効果が大い。このことは、基質の反応部位が空洞深く入り込むほど、遊離の水酸イオンの求核攻撃から保護される程度が大きくなることを示していると思われる。

第2表に α-CD-Cu₂- および β-CD-Cu₂-チオノ型リン酸エステル系における k_c/k_{un} 値および K_{diss} 値を示した。第2表と第1表を比較することによって、オキソン型リン酸エステルの加水分解に対する CD-Cu₂ 錯体の触媒作用の特徴が浮ぶ。すなわち、オキソン型リン酸エステルの加水分解に対する CD-Cu₂ 錯体の抑制効果は、対応するチオノ型リン酸エステルに対するそれより大きい。しかも、CD-Cu₂ 錯体によるオキソン型リン酸エステルの取り込み力 (1/K_{diss}) は対応するチオノ型リン酸エステルのそれより全般的に低下している。チオノ型リン酸エステルに比べ、オキソン型リン酸エステルは分子の大きさにおいて若干小さく、それだけ α-CD-Cu₂ 錯体あるいは β-CD-Cu₂ 錯体の空洞に深く侵入し、遊離の水酸イオンの求核攻撃から保護され易くなると考えられる。また前者に比べ後者は疎水性が小さく、

それだけ疎水性の CD 空洞に保持されにくくなるものと推定される。遊離 CD 系では、チオノ型リン酸エステルの方がオキシソノ型リン酸エステルよりも遊離の水酸イオンの求核攻撃は受けにくい傾向が見られた。これは CD-Cu₂ 錯体系でみられる傾向とは逆である。このような差異は、両系における CD 空洞の構造上の違いや、空洞に取り込まれた基質の配向上の違いを反映しているものと推定されるが、その詳細については本研究では明確にすることができなかった。

要 約

1.0 M 水酸化ナトリウム溶液中における有機リン酸エステル類（フェニトロオキシソノ，メチルパラオキシソノおよびパラオキシソノ）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。上記リン酸エステル類の加水分解反応は、シクロデキストリン-銅(II)錯体によって著しく抑制された。基本的には、反応は先ず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リン酸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。この反応機構はチオリン酸エステル-シクロデキストリン-銅(II)錯体系におけるそれと同じである。しかし、シクロデキストリン-銅(II)錯体がリン酸エステルの加水分解を抑制する程度は、対応するチオリン酸エステルに比べて大き

く、遊離のシクロデキストリン系で観察された基質特異性とは逆の特異性が発現した。

引 用 文 献

1. MATSUI, Y., KURITA, T., YAGI, M., OKAYAMA, T., MOCHIDA, K., and DATE, Y. : Bull. Chem. Soc. Jpn. **48** : 2187-2191, 1975.
2. 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.
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. LORENZ, W. and SCHRADER, G. : Chem. Abstr. **58** : 11402e, 1963.
7. PLIMMER, R. H. A. and BURCH, W. J. N. : J. Chem. Soc. **1929** : 292-300.
8. TSUBOI, M., KURIYAGAWA, F., MATSUO, K., and KYOGOKU, Y. : Bull. Chem. Soc. Jpn. **40** : 1813-1818, 1967.
9. KING, E. J. : Biochem. J. **26** : 292-297, 1932.

Summary

The effect of α - and β -cyclodextrin-Cu(II) (1:2) complexes on the hydrolysis of organic phosphates such as fenitroxon, methyl paraoxon, and paraoxon was examined in 1.0 M NaOH solution at 25°C. The hydrolysis of these phosphates was remarkably retarded by the cyclodextrin-Cu(II) complexes. The reaction proceeds *via* the prior formation of an adduct between the phosphate and the complex, followed by the nucleophilic attack of the hydroxide ion on the reaction site of the phosphate included within the void space of the complex. The reaction mechanism is the same as that for the phosphorothionate ester-cyclodextrin-Cu(II) complex systems. However, the observed substrate specificity in the cyclodextrin-Cu(II) complex catalysis, which retards the hydrolysis of organic phosphates to a greater extent than that of the corresponding phosphorothionate esters, was opposite to that in the cyclodextrin catalysis.