

β-シクロデキストリンのポリアミン誘導体 触媒によるエステル分解反応

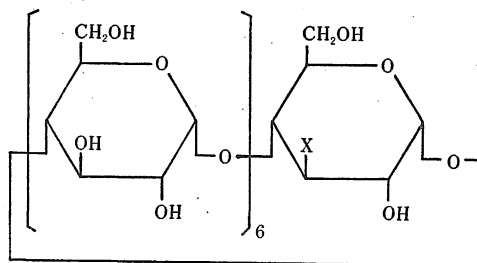
持田和男*・中村利家*・山本道範*・柳井晃司*・塩月孝博*・松井佳久**

Kazuo MOCHIDA, Toshiie NAKAMURA, Michinori YAMAMOTO,
Koji YANAI, Takahiro SHIOTSUKI and Yoshihisa MATSUI
Cleavage of Organic Esters Catalyzed by Polyamine
Derivatives of β-Cyclodextrin

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残基が α-1, 4 結合で連なった環状オリゴ糖である。分子内には疎水性の空洞 (直径約 7.5 Å) が存在し、その両端にはそれぞれ7個の1級水酸基と14個の2級水酸基が配列している。この特異な構造から引き起こされる最大の特徴は、多種類の化合物をその空洞内に取り込んで包接複合体を形成するだけでなく、取り込んだ化合物の化学反応性にも変化を与えることである。そのため、CD を酵素モデルとして利用した研究が盛んである^{1,2)}。しかし加水分解酵素モデルとして CD を利用しようとする場合、CD の2級水酸基の触媒能がその酸解離領域 (pK_a≒12) に限られるため比較的高い pH 領域でしか発揮されず、しかも弱い。これら CD の欠点を改善するために、触媒官能基を導入した CD 誘導体が合成されてきている³⁾。しかし CD の多数の等価な2級水酸基のうち1つに望む官能基を導入することはかなり困難であり、自ずから制約を受ける。現在では、CD が触媒する α-トルエンシルホニルクロライドのアルカリ加水分解反応の中間体として得られるトシル化 CD (CD-3-OTs) を経て触媒官能基を導入する方法が採られている⁴⁾。著者らは先にこの CD-3-OTs の簡便な単離方法を確立すると共に、トシル基をエチレンジアミン(en)で置換したエチレンジアミノ CD (CD-3-en) を合成した⁵⁾。今回さらにジエチレントリアミン (dien) で置換したジエチレントリアミノ CD (CD-3-dien) を合成すると共に、これら CD ポリアミン誘導体によるカルボン酸エステル類およびリン酸エステル類の加水分解能、

とくに末端アミノ基の位置の相異と触媒性の関係について検討した結果を報告する。



CD : X = -OH
 CD-3-OTs : X = -OSO₂CH₃
 CD-3-en : X = -NHCH₂CH₂NH₂
 CD-3-dien : X = -NHCH₂CH₂NHCH₂CH₂NH₂

実験材料および方法

1) 材料

CD は市販品を水から再結晶して用いた。en および dien は水素化カルシウムで乾燥後蒸留して用いた。CD-3-OTs、CD-3-en は先に報告した方法により合成した⁵⁾。CD-3-dien もこの方法に準じて次のようにして合成した。CD-3-OTs 5 g を dien 50 ml に加え、窒素ガス気流中で 70°C で 2 時間反応させた。反応終了後、過剰の dien を減圧下で留去した。残渣をアセトン 350 ml に懸濁させた後滷集し、P₂O₅ 上で真空乾燥(室温)した。この試料の一部を 0.02 M NH₄HCO₃ 溶液で平衡化した CM-セルロースカラム (φ 5 cm×63 cm) に充填し、同濃度の NH₄HCO₃ 溶液 (300 ml) で洗浄した後、0.02 M から 0.10 M の NH₄HCO₃ 溶液 (各

* 生物汚染化学研究室
 ** 土壌物理化学研究室

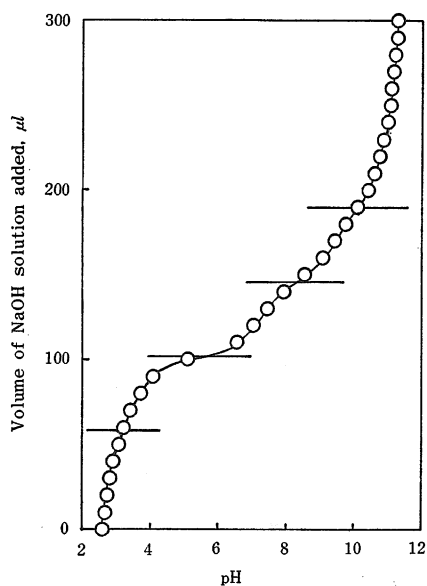


Fig. 1. pH titration of an acidic CD-3-dien solution with 90 mM NaOH solution at 25°C.

1200 ml) による linear gradient 法で溶出した。分取した各画分 (15 g) について反応物 ($R_f=0.15$) を TLC (シリカゲルG, 酢酸/クロロホルム/水 (8/1/3, v/v/v)) で確認した後, 該当画分を集め減圧乾固した。この残渣を再度同条件の CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにかけて, 精製 CD-3-dien (収量 2.2g) を得た。

O,O-Dimethyl *O*-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphate (fenitroxon, 純度95%) および *O,O*-dimethyl *O*-(4-nitrophenyl) phosphate (methyl paraxon, 純度95%) は住友化学工業株式会社から恵与されたものをそのまま用いた。*m*-, *p*-Nitrophenyl acetate (*m*-, *p*-NPA) およびその他の試薬は市販最上級品を精製せずに用いた。

2) CD-3-dien 塩酸性水溶液の電位差滴定

電位差滴定にはオリオン社製デジタル式 pH/mV メーター (801A型) を用いた。25°C の恒温水槽中で 2 mM の CD-3-dien を含む 8.5 mM HCl 水溶液 2 ml に窒素ガスで脱気しながら, 90 mM 水酸化ナトリウム水溶液を 10 μ l ずつ注加し, その都度溶液の pH を測定した。

3) 反応速度の測定

pH 11, 25°C における反応速度は, 先に報告した分光学的方法 (日立 200-20型分光光度計使用) によって測定し, 擬一次反応速度定数 (k_{obsd}) として得た。

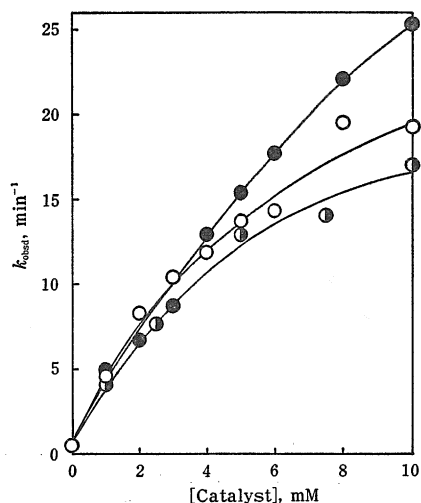


Fig. 2. Effect of the concentration of catalyst ([Catalyst]) on k_{obsd} for the hydrolysis of *m*-nitrophenyl acetate.
○ : CD; ● : CD-3-en; ◐ : CD-3-dien

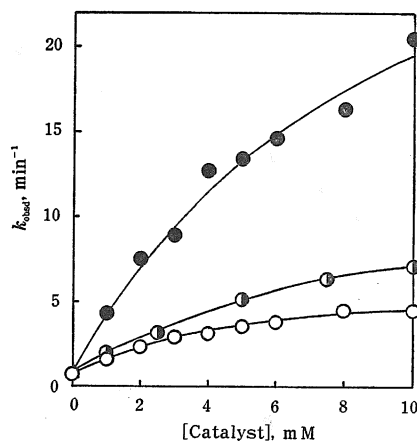


Fig. 3. Effect of [Catalyst] on k_{obsd} for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate.
○ : CD; ● : CD-3-en; ◐ : CD-3-dien

実験結果および考察

新たに合成した CD-3-dien の塩酸性水溶液の電位差滴定曲線を第 1 図に示した。その曲線は, 最初の段階がやや不明瞭になっているが 4 段階からなり, 第 1 段階は過剰の塩酸の中和過程に相当する。第 2, 第 3 および第 4 段階でそれぞれに必要なとした水酸化ナトリウム水溶液の滴定量は, いずれも 44 μ l であり, 1 分子の CD の水酸基が 1 分子の dien によって置換されている場合の各理論滴定量 44.4 μ l とほぼ一致した。すなわち目的とするものが得られていることを示している。

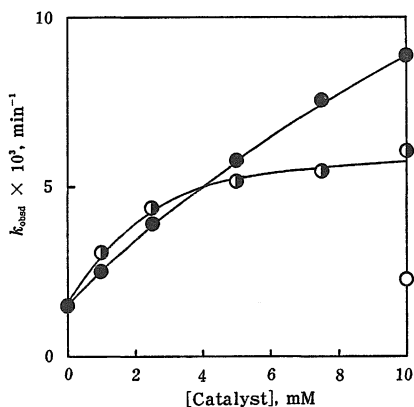


Fig. 4. Effect of [Catalyst] on k_{obsd} for the hydrolysis of fenitroxon.
○ : CD ; ● : CD-3-en ; ◐ : CD-3-dien

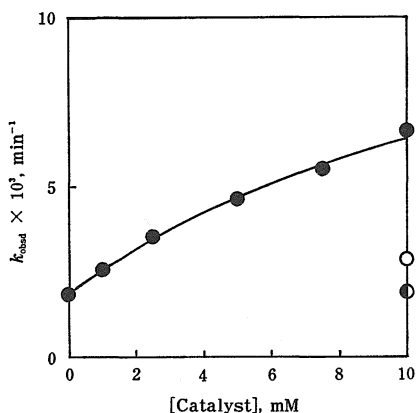


Fig. 5. Effect of [Catalyst] on k_{obsd} for the hydrolysis of methyl paraoxon.
○ : CD ; ● : CD-3-en ; ◐ : CD-3-dien in the presence of cyclohexanol (50 mM)

CD-3-dien の pK_a は 3.70(pK_1), 7.20(pK_2) および 9.39(pK_3) であった。CD-3-en の pK_a は、先に報告したとおり、5.18(pK_1) および 9.25(pK_2) であった。したがって、以下の反応速度の測定はいずれも pH 11 で行っているので、CD-3-en および CD-3-dien はいずれも大部分非プロトン化型で存在していることになる。

有機エステル類のアルカリ加水分解反応は CD によって加速されるが、CD-3-en あるいは CD-3-dien によっても加速された (第 2 図～第 5 図)。しかもその加速度は、CD の場合と同様、CD-3-en あるいは CD-3-dien の濃度が増加するにつれて漸近的に最大値に近づ

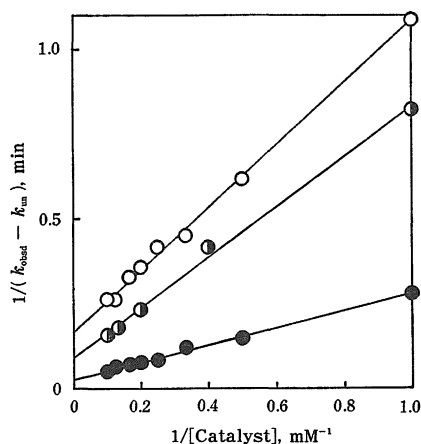
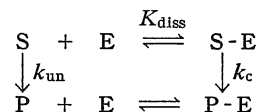


Fig. 6. Plot of $1/(k_{obsd} - k_{un})$ vs. $1/[Catalyst]$ in *p*-nitrophenyl acetate system.
○ : CD ; ● : CD-3-en ; ◐ : CD-3-dien

く所謂飽和現象を示した。このことは基質の加水分解に先立って、基質とこれら CD 誘導体との間に包接複合体が形成されていることを示していると同時に、この複合体の形成が速度加速発現に不可欠であることを示唆している。事実 CD の包接複合体形成能を拮抗的に阻害することが知られているシクロヘキサノールの添加は、いずれの系においても著しい加速度の低下を引き起こした (例えば第 5 図参照)。

この複合体が 1 : 1 型であると仮定すると、次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、E は触媒すなわち CD-3-en あるいは CD-3-dien、S-E および P-E はそれぞれ S および P と E との複合体を示す。また k_{un} および k_c はそれぞれ S および S-E の加水分解速度定数、 K_{diss} は S-E の解離平衡定数を示す。この機構において、E の全濃度 ([Catalyst]) が S の全濃度 ([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。

$$\frac{1}{k_{obsd} - k_{un}} = \frac{K_{diss}}{(k_c - k_{un})[Catalyst]} + \frac{1}{k_c - k_{un}}$$

この式は $1/(k_{obsd} - k_{un})$ に対する $1/[Catalyst]$ のプロットが直線となることを示している。例示した第 6 図から明らかのように、いずれの系においても相関係数が 0.972~1.000 の良好な直線となり、推定した反応機構の妥当性が裏付けられた。

Table 1. Equilibrium and kinetic parameters for hydrolysis of organic esters at pH 11 and 25°C.

| Substrate | Catalyst | k_c , min ⁻¹ | K_{diss} , mM | k_c/k_{un} |
|----------------|-----------|---------------------------|-----------------|--------------|
| <i>m</i> -NPA | CD | 28.23 | 5.58 | 61.9 |
| | CD-3-en | 34.09 | 7.31 | 74.8 |
| | CD-3-dien | 25.34 | 6.11 | 55.6 |
| <i>p</i> -NPA | CD | 5.28 | 5.51 | 7.3 |
| | CD-3-en | 34.44 | 8.87 | 47.6 |
| | CD-3-dien | 10.43 | 8.27 | 14.4 |
| Fenitroxon | CD-3-en | 23.00×10^{-3} | 23.23 | 15.3 |
| | CD-3-dien | 4.05×10^{-3} | 2.53 | 2.7 |
| Methylparaoxon | CD-3-en | 9.24×10^{-3} | 14.45 | 5.0 |

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 を求めた結果を第1表にまとめた。表中の k_c/k_{un} は複合体の形成によって生ずる基質の分解における最大加速効果を示している。最高74.8倍の加速効果が *m*-NPA-CD-3-en系で得られた。*m*-NPAに限らず他の基質でもCD-3-enの示す加速効果は、CDのそれに比べて常に大きかった。これに比し、CD-3-dienの示す加速効果はCDのそれとほぼ同等かやや上回る程度でしかなかった。基質の認識性、すなわち K_{diss} 値の振幅についても、CD-3-enがCD-3-dienより優れていた。これらのことより、この反応においては触媒部位であるCD-3-enやCD-3-dien中の末端アミノ基の位置が重要であり、CD-3-dienの場合は末端アミノ基が基質の求核部位から離れすぎていることが推測される。他方、NPAで見られるCDの著しいメタ特異性が、CDを誘導体化することで若干低下した。同じ基質に対しては K_{diss} 値が大きくなるほど触媒効果が増大する傾向があるので、包接部位がCDとこれら誘導体との間でわずかに異なり、それがメタ特異性を低下させた原因と考えられる。

Summary

The effect of ethylenediamine and diethylenetriamine derivatives (CD-3-en and CD-3-dien, respectively) of β -cyclodextrin on the hydrolysis of organic esters such as *m*-nitrophenyl acetate, *p*-nitrophenyl acetate, fenitroxon, and methyl paraoxon was examined at pH 11 and 25°C.

The cleavage of these esters was accelerated by CD-3-en and CD-3-dien. Each reaction proceeds *via* the prior formation of an inclusion complex, followed by the nucleophilic attack of the terminal amino group of CD-3-en or CD-3-dien on the reaction site of the included substrate.

On the basis of the observed equilibrium and kinetic parameters involved in the reaction processes, the relation between the catalytic effect and the position of the terminal amino group in CD-3-en and CD-3-dien was discussed.

以上から、CDの2級水酸基に代わるアミノ基の触媒性はかなり大きいですが、基質の包接部位と共にその末端アミノ基の存在部位が加速効果の発現に重要であると結論できる。

要 約

有機エステル類 (*m*-, *p*-ニトロフェニルアセテート、フェニトロオキソンおよびメチルパラオキソン)の加水分解反応に及ぼす β -シクロデキストリン(CD)のエチレンジアミンおよびジエチレントリアミン誘導体(それぞれCD-3-enおよびCD-3-dien)の影響を調べた。

これらエステル類のpH 11, 25°Cにおける分解反応は、CD-3-enおよびCD-3-dienによって加速された。いずれの反応も、まず基質がこれらCD誘導体と包接複合体を形成した後、CD誘導体中の末端アミノ基の求核攻撃を受けることによって進行すると考えられた。

この反応過程における動力学的および平衡論的パラメーターを求め、CD誘導体中の末端アミノ基の位置と触媒性との関係について考察した。

引用文献

1. GRIFFITHS, D. W. and BENDER, M. L.: Adv. Catal. **23**: 209-261, 1973.
2. BENDER, M. L. and KOMIYAMA, M.: シクロデキストリンの化学 学会出版センター, 東京, 1979.
3. 小島政芳・戸田不二緒: 化学と生物 **18**: 702-709, 1980.
4. 服部憲治郎・戸田不二緒: 有機合成化学 **40**: 1180-1188, 1982.
5. 持田和男・尾添嘉久・梶村眞弓・松井佳久・島根大農研報 **14**: 162-166, 1980.