

2置換 β -および γ -シクロデキストリンにおける アントラニル酸修飾残基の 二次元 $^1\text{H-NMR}$ および吸収スペクトル挙動

成田美雪*・濱田文男*

Studies on Two-Dimensional $^1\text{H-NMR}$ and Absorption Spectra of Anthranilate Moieties in Modified β - and γ -Cyclodextrins

Miyuki Narita* and Fumio Hamada*

Abstract

Two-dimensional $^1\text{H-NMR}$ spectra (2D- $^1\text{H-NMR}$) of 6^A,6^B-; 6^A,6^C-; and 6^A,6^D-bis anthranilate β -cyclodextrins (β -1, β -2, and β -3, respectively) and 6^A,6^B-; 6^A,6^C-; 6^A,6^D-; and 6^A,6^E-bis anthranilate γ -cyclodextrins (γ -1, γ -2, γ -3, and γ -4, respectively) have been measured to consider the interaction of two anthranilate moieties. 2D- $^1\text{H-NMR}$ of those compounds obtained by H-H cosy method indicated that the interaction of two appended moieties is interacted each other, because 2D- $^1\text{H-NMR}$ of those hosts showed that degree of overlap of two appended moieties was extended in the order β -1> β -2> β -3 and γ -1> γ -2> γ -3> γ -4. It suggests that two appended moieties depended on how much far away each other can move easily toward inside or outside of cavity of cyclodextrin. The UV-Vis spectra of those hosts with the guest such as bile acid are changed with isosbestic points. The results obtained from 2D- $^1\text{H-NMR}$ and UV-Vis spectra describe that the binding mechanism of those hosts are undergoing with induced-fit type of host-guest complexes.

1. はじめに

シクロデキストリンはグルコース単位が α -1,4-グリコシド結合により環状に連なり, ドーナツ型を呈した化合物であり, ホストとして自らの不斉空孔内にゲストである種々の有機分子を取り込み, 包接化合物を形成する⁽¹⁾. しかし, シクロデキストリン自体は分光的に不活性であるのでゲスト化合物を取込み, 包接化合物を形成しても光学的吸収や蛍光発生などの変化を示さないために, 化合物検出に適用できず, 検出対象となる化合物自体が分光的な活性を有する必要がある. 分光的に包接形成を

検討するためには分光的に活性な分子を修飾することが必要である. 分光的に活性な分子を修飾したシクロデキストリンは種々の有機分子との包接形成における分光的挙動の変化を示し, このことから有機分子に対する分子センシングが明らかになる. 近年, 我々はシクロデキストリンにナフタレン⁽²⁾, アントラセン⁽³⁾, フェロセン⁽⁴⁾, スピロピラン⁽⁵⁾, アゾベンゼン⁽⁶⁾, ダンシルグリシン⁽⁷⁾, フルオレスカミン⁽⁸⁾, テルフェニル⁽⁹⁾, アントラニル酸⁽¹⁰⁾を化学的に修飾した修飾シクロデキストリンを合成し, その包接挙動について検討した. その結果, ゲスト包接に伴い修飾シクロデキストリンの円二色性あるいは蛍光スペクトルが変化することを報告してきた. これらの変化のパターンはゲスト分子により異なることから, 修飾シクロデキストリンの分子認識センサーとしての可能性を意味するものである. 特に,

1999年6月16日受理

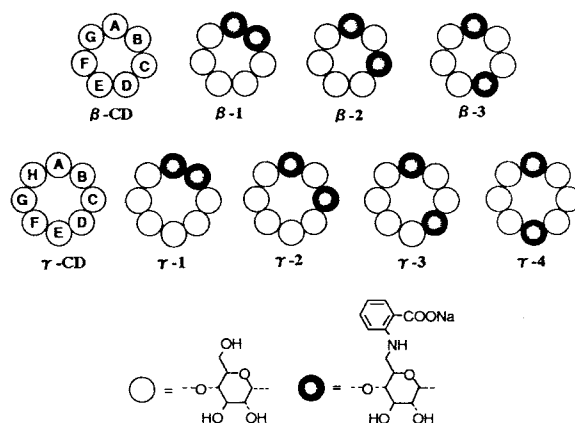
* 秋田大学工学資源学部環境物質工学科.
Department of Materials-process Engineering &
Applied Chemistry for Environments, Faculty of
Engineering & Resource Science, Akita University.

アントラニル酸は他の修飾基よりも分子サイズが小さいことからゲスト分子包接時にはシクロデキストリンの空孔の内外を比較的自由に動くことができ、異なる修飾位置による分子認識能の相違が顕著に現われている。本研究では位置選択二分子アントラニル酸修飾シクロデキストリン(Scheme 1)の修飾位置の相違によるアントラニル酸の分子間の相互作用を検討することを目的とし、 $2D-^1H-NMR$ の測定からアントラニル酸の分子間の重なり具合について検討し、さらにゲスト分子包接に伴う紫外可視吸収スペクトルの変化を測定し、その吸収スペクトル変化からゲスト分子に対する結合定数を求めたので報告する。

2. 実験

2.1 合成

位置選択二分子アントラニル酸修飾シクロデキストリンは既知の方法により合成した⁽¹⁰⁾。



Scheme 1 Structures of anthranilate β - and γ -cyclodextrins

2.2 $2D-^1H-NMR$ および吸収スペクトルの測定

$2D-^1H-NMR$ の測定はバリアン社製Mercury-300を使用した。測定溶媒は重水素化ジメチルスルホキシ

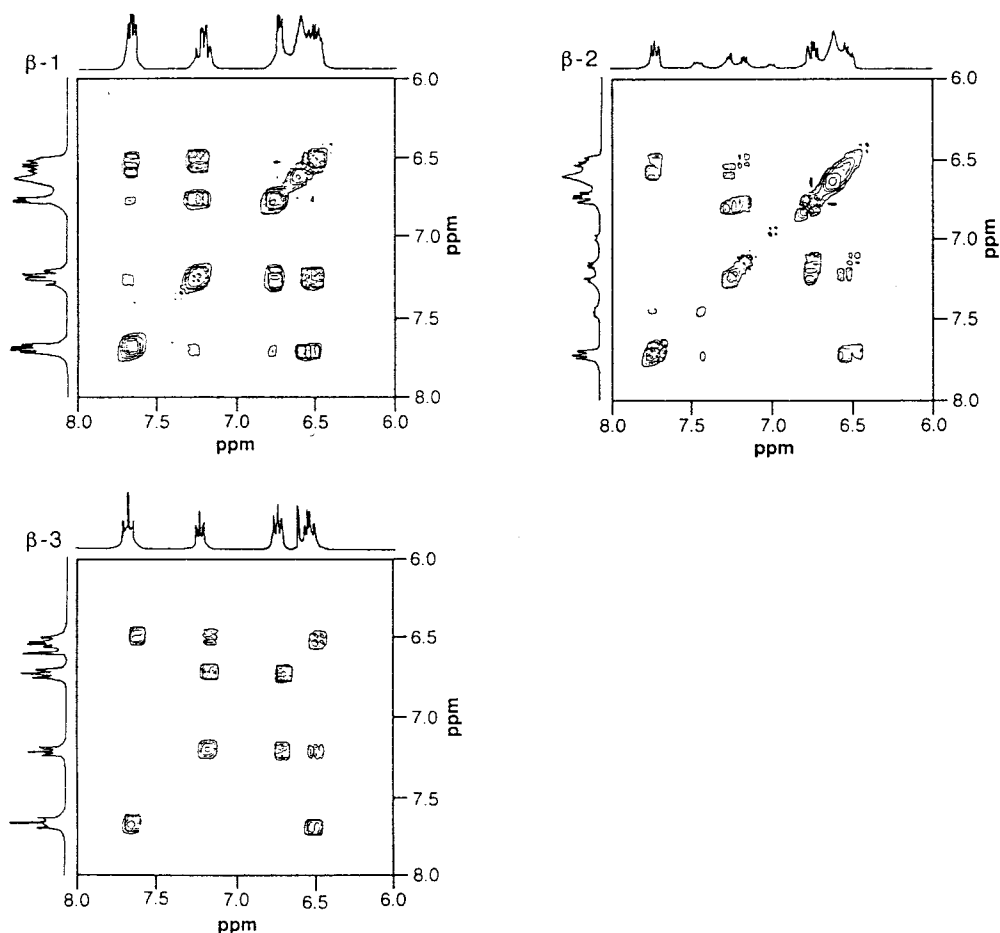


Fig. 1 $2D-^1H-NMR$ spectra of β -1, β -2, and β -3.

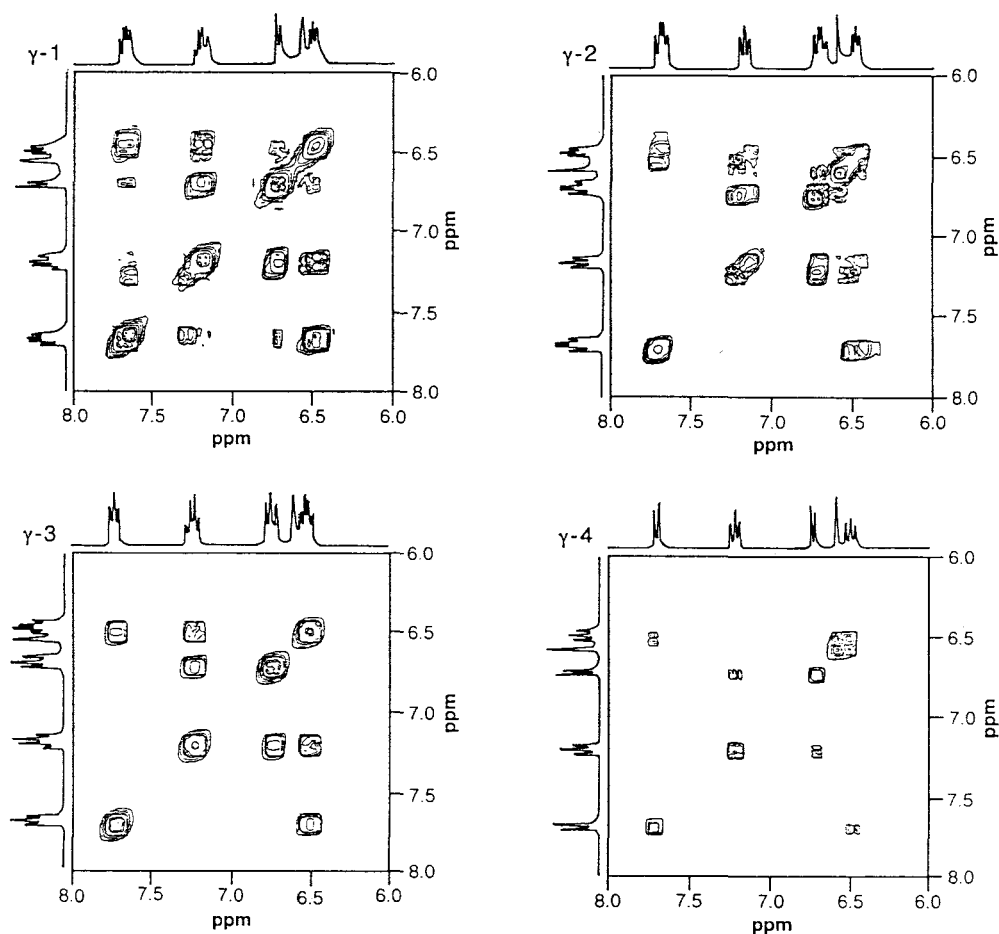


Fig. 2 2D- $^1\text{H-NMR}$ spectra of γ -1, γ -2, γ -3, and γ -4.

ド(DMSO- d_6)を用い、H-H cosy法によって測定を行い、その温度は25 $^{\circ}\text{C}$ とした。

紫外可視分光計はパーキンエルマー社製Lambda 40型を使用し、測定は以下の条件で実施した。温度は25 $^{\circ}\text{C}$ 、最大吸収波長は334 nm、ホスト濃度は 1×10^{-4} M 10%エチレングリコール-水(v/v)、ゲスト濃度はリトコール酸を除き0.05 M、リトコール酸は0.005 Mに調整したジメチルスルホキシドあるいはメタノール溶液を添加した。

3. 結果と考察

3.2 2D- $^1\text{H-NMR}$ による考察

本来、シクロデキストリンの包接化合物形成は水溶液中で最も高いとされている。しかしながら、NMRスケールにおける濃度域では重水に対する溶解性に問題があった。そこで本研究ではこの溶解性を考慮し重水素化dimethylsulfoxide(DMSO)を溶媒として用いた。DMSO中では水溶液中と比較すると疎水相互作用の減少が考えられるが、DMSO中にお

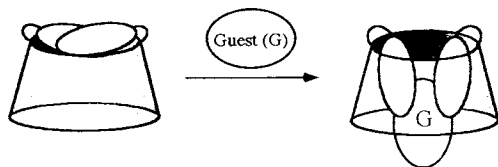
いてもシクロデキストリンの包接化合物形成が行われことは既に報告してあり^(4b)、DMSO中におけるアントラニル酸の挙動から水溶液中における挙動について推定できるものとする。

Fig. 1,2に β -1 \sim β -3および γ -1 \sim γ -4の2D- $^1\text{H-NMR}$ を示す。 β -1ではアントラニル酸に帰属するシグナルが6.55, 6.79, 7.30および7.66 ppmに現れた。6.55 ppmのシグナルは7.30および7.66 ppmのシグナルと、6.79 ppmのシグナルは7.30 および7.66 ppmのシグナルと、7.30 ppmのシグナルはさらに7.66 ppmのシグナルとそれぞれ交差ピークを形成した。このことにより β -1において交差ピークが10個存在することから二分子のアントラニル酸は互いに強い相互作用を及ぼしていることがわかる。 β -2ではアントラニル酸に帰属するシグナルが6.53, 6.75, 7.09-7.41, および7.74 ppmに現れたが、6.53 ppmのシグナルは7.09-7.41および7.74 ppmのシグナルと、6.75 ppmのシグナルは7.09-7.41 ppmのシグナルと、7.74 ppmのシグナルは7.09-7.41 ppmのシグナルと交差ピークを形

成した。このことは β -2において二分子のアントラニル酸は強い相互作用を及ぼしているが交差ピークの数に8個であり、 β -1よりも少ないことから β -1よりはその相互作用は弱いことを示している。 β -3ではアントラニル酸に帰属するシグナルが6.52, 6.75, 7.24, 7.72 ppmに現れた。6.52 ppmのシグナルは7.24および7.72 ppmのシグナルと、6.75 ppmのシグナルは7.24 ppmのシグナルと交差ピークを形成したが、その強度は全体的に小さかった。このことは β -3において二分子のアントラニル酸は交差ピークが6個と少なく、さらにその強度が低いことから β -1および β -2と比較するとその相互作用は弱いことを示唆している。

γ -1では交差ピークの数に強度の大きなものが8個、小さなものが6個形成され、 γ -2および γ -3では強度が大きいものが6個、 γ -4では強度が小さいものが4個形成された。このことから二分子のアントラニル酸の相互作用は γ -1において最も大きく、 γ -4では最も小さくなることが示唆された。

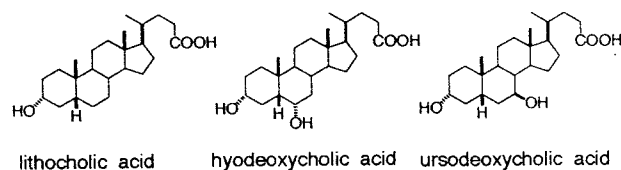
2D- ^1H -NMRの結果から二分子のアントラニル酸の修飾の位置に近い程アントラニル酸のフレキシビリティの減少が示唆された。このことはゲスト分子包接時において二分子のアントラニル酸は修飾位置が遠い程シクロテキストリン空孔内外における移動が容易になることを意味する。すでに我々は位置選択二分子アントラニル酸修飾シクロデキストリンの分子センシングシステムを報告している⁽¹⁰⁾が、このことは胆汁酸に対する分子センシング能が β -誘導体では β -1 < β -2 < β -3の順に、 γ -誘導体では γ -1 < γ -2 < γ -4 < γ -3の順に大きくなった結果を支持している。但し、 γ -3と γ -4の順位の逆転が起こる理由としては修飾位置が最も遠い γ -4では二分子のアントラニル酸の相互作用が小さいために修飾残基が空孔内に入ることによってその空孔を狭くし、ジャストフィット機能が減少したことが考えられる。以上のことから、ゲスト分子取込みにより移動がより容易な修飾残基はフレキシブルな疎水性残基として機能し、ゲスト包接を行う誘導適合型包接化合物形成機構(Scheme 2)を取ることがわかる。



Scheme 2 Induced-fit type of host-guest complexation of bis anthranilate cyclodextrin

3.2 吸収スペクトル変化

Fig. 3および4に β -2および γ -4のウルソデオキシコール酸添加によるアントラニル酸の吸収スペクトル



Scheme 3 Guest molecules.

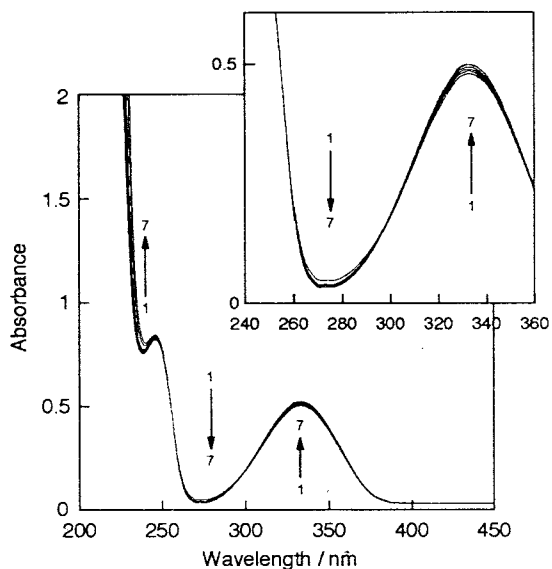


Fig. 3 Absorption spectra of β -2 (10^{-4} M) in a 10 vol.% ethylene glycol aqueous solution at various concentration of ursodeoxycholic acid (1: 0, 2: 2.0×10^{-5} , 3: 4.0×10^{-5} , 4: 6.0×10^{-5} , 5: 8.0×10^{-5} , 6: 1.0×10^{-4} , 7: 2.0×10^{-4} M).

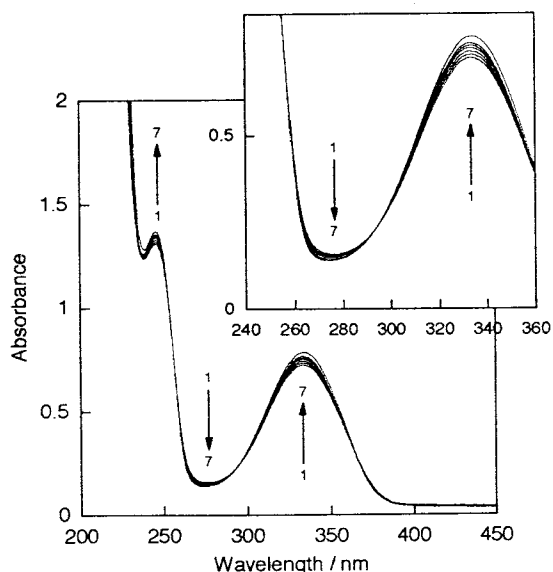


Fig. 4 Absorption spectra of γ -4 (10^{-4} M) in a 10 vol.% ethylene glycol aqueous solution at various concentration of ursodeoxycholic acid (1: 0, 2: 2.0×10^{-5} , 3: 4.0×10^{-5} , 4: 6.0×10^{-5} , 5: 8.0×10^{-5} , 6: 1.0×10^{-4} , 7: 2.0×10^{-4} M).

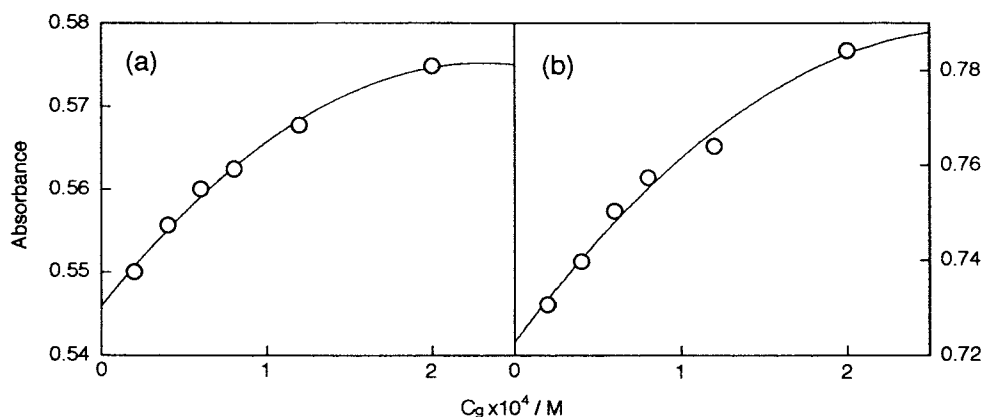


Fig. 5 The plots of absorbance (334 nm) of β -2 (a) and γ -4 (b) as a function of ursodeoxycholic acid concentration.

Table 1. Binding constants ($\text{K}/\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$) of β -1, β -2, and β -3 in a 10 vol-% ethylene glycol aqueous solution at 25°C .

Guest	β -1	β -2	β -3
lithocholic acid	17600	20700	16400
ursodeoxycholic acid	10600	12800	3980
hyodeoxycholic acid	9050	31700	4960

Table 2. Binding constants ($\text{K}/\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$) of γ -1, γ -2, γ -3, and γ -4 in a 10 vol-% ethylene glycol aqueous solution at 25°C .

Guest	γ -1	γ -2	γ -3	γ -4
lithocholic acid	29900	17800	32300	26700
ursodeoxycholic acid	13900	40000	24900	9030
hyodeoxycholic acid	39500	11600	28000	38800

変化を示す。 β -2および γ -4はともに250および334 nmに吸収極大を有し、ウルソデオキシコール酸の添加量増加に伴い吸光度の増加が観察された。さらに、 β -2では259および296 nm, γ -4では256および294 nmに等吸収点が認められた。 β -1, β -3, γ -1, γ -2および γ -3においても同様に250および334 nm付近に吸収極大を有し、ウルソデオキシコール酸の添加量増加に伴う吸光度の増加がみられ、等吸収点がそれぞれ264, 324, 256, 266と316, 261と295 nmに観察された。このことは β -および γ -誘導体はウルソデオキ

シコール酸と包接化合物形成を行い、その際には修飾残基が移動していることを示めている。さらに、 β -および γ -誘導体のこのような吸収スペクトル変化はリトコール酸やヒオデオキシコール酸添加によっても観察された。Tableに吸収スペクトル変化から求めた β -1~ β -3および γ -1~ γ -4のゲスト分子に対する結合定数(a)を示す。結合定数は式(1)を用い、非線形最小二乗法によって求めた(Fig. 5).

$$K = \frac{A_h - A_x}{(A_x - A_c) \left[C_g - C_h \frac{A_h - A_x}{A_h - A_c} \right]} \quad \text{Eq. 1}$$

ここで、 A は334 nmにおける吸光度 (A_x : ゲスト分子のみ, A_h : ホスト分子のみ, A_c : 包接化合物), C_h はホスト分子の濃度, C_g はゲスト分子添加総濃度を示している. 結合定数(a)は蛍光強度の変化から求めた結合定数(b)⁽¹⁰⁾と比較すると, β -誘導体では同様の傾向を示した. 一方, γ -誘導体ではその結合定数(a)と結合定数(b)はリトコール酸およびウルソデオキシコール酸では同様の傾向を示したが, ヒオデオキシコール酸では異なる傾向を示した. このことはホスト分子の濃度が結合定数(a)の測定では 1.0×10^{-4} M であるのに対して結合定数(b)の測定では 1.0×10^{-6} M であり, それぞれの測定濃度に対するゲスト分子の応答が異なることに起因すると考えられる.

4. まとめ

2D-¹H-NMRによって位置選択二分子アントラニル酸修飾シクロデキストリンは修飾残基のフレキシビリティがその修飾位置の相違によって異なることが明らかとなり, ゲスト分子に対して誘導適合型包接化合物形成を行うことが推定された. さらに, ゲスト分子との包接化合物形成時にはその吸収スペクトル変化から修飾残基が移動していることが証明され, 誘導適合型包接化合物形成を行うことが支持された.

参考文献

- (1) J. Szejtli, "Cyclodextrin Technology", Kluwer, Dordrecht (1988).
- (2) a) F. Hamada, S. Minato, T. Osa, and A. Ueno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 1339(1997). b) F. Moriwaki, H. Kaneko, A. Ueno, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 3619(1987). c) A. Ueno, F. Morikawa, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 3619(1986). d) A. Ueno, F. Morikawa, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 3339(1985).
- (3) A. Ueno, F. Moriwaki, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4323(1988).
- (4) a) A. Ueno, F. Morikawa, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 899(1985). b) A. Ueno, F. Moriwaki, T. Matsue, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **6**, 231(1985).
- (5) a) F. Hamada, M. Fukushima, T. Osa, and A. Ueno, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **14**, 279(1993). b) F. Hamada, R. Ito, I. Suzuki, T. Osa, and A. Ueno, *Macromol., Rapid Commun.*, **15**, 531(1994). c) F. Hamada, K. Hoshi, Y. Hoguchi, K. Murai, Y. Akagami, and A. Ueno, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, 2567(1996). (6) F. Hamada, M. Fukushima, T. Osa, H. Ikeda, F. Toda, and A. Ueno, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **14**, 287(1993).
- (7) a) A. Ueno, S. Minato, I. Suzuki, M. Fukushima, M. Ohkubo, T. Osa, F. Hamada, and K. Murai, *Chem. Lett.*, **1990**, 605. b) F. Hamada, Y. Kondo, R. Ito, I. Suzuki, T. Osa, and A. Ueno, *J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, **15**, 273(1993).
- (8) M. Narita, S. Koshizaka, and F. Hamada, *J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, **34**, 421(1999).
- (9) S. Ito, M. Narita, and F. Hamada, *Int. J. Soc. Mat. Eng. Resources*, **7**, 156(1999).3
- (10) a) M. Narita, F. Hamada, I. Suzuki, and T. Osa, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, 2751(1998). b) F. Hamada, I. Tamura, K. Murai, Y. Akagami, and A. Ueno, *Int. J. Soc. Mat. Eng. Resources*, **5**, 69(1997). c) F. Hamada, K. Ishikawa, R. Ito, S. Hamai, I. Suzuki, T. Osa, and A. Ueno, *J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, **20**, 43(1995). d) F. Hamada, K. Ishikawa, I. Tamura, and A. Ueno, *Anal. Sci.*, **11**, 935(1995). e) F. Hamada, Y. Kondo, K. Ishikawa, H. Ito, I. Suzuki, T. Osa, and A. Ueno, *J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, **17**, 267(1994).