

シクロデキストリンによる メチルオレンジ同族体の包接作用に関する研究

伊 原 靖 二

Inclusion Complex Formation of Methyl Orange and its Homologs with Cyclodextrins

Yasuji IHARA

Summary

The inclusion complex formation of methyl orange and its homologs having alkyl chain groups of different length with α -, β -, and γ -cyclodextrins(CDs) in aqueous solution was investigated by spectrophotometric measurements at different temperatures. From a continuous variation method, it was found that α - and β -CDs formed 1:1 complexes, but γ -CD formed a 1:2 complex with dye molecules. The increases of the alkyl chain length in the dye molecules increased the binding constant. The fitness of the dye to the cavity of CD was suggested to affect the binding constant. Based on the temperature dependence of the binding constants at different temperatures, the entropy and enthalpy changes were calculated for the complex formation and contribution of entropy to the process was discussed. Molecular modeling studies were also performed in order to determine the preferred complex formation of cyclodextrins and dye molecules.

1. 緒 言

シクロデキストリン (CD, 1) は、グルコース単位が α -1,4 結合で環状に数個つながった、非還元性の環状オリゴ糖であり、代表的なものは 6, 7, 8 個のグルコース単位で構成され、 α -, β -, γ -CD のように区別されている。この環状分子の外側周辺部には親水性を示す -OH 基が並んでおり、一方、空洞内部には疎水性を示す -CH 基が並んでいる。このため、空洞内に脂肪族、芳香族の炭化水素のような疎水性化合物を取り込み、包接化合物を形成することが知られている。このように、シクロデキストリン (CD) は、その特異な構造とホスト機能が注目されて活発な研究が展開されてきた^{1,2)}。その内、各種染料と CD との相互作用の研究は数多く報告されており^{3,4)}、種々の複合体を生成することが見出されている。原田らは⁵⁾ メチルオレンジのナトリウム及びカリウム塩との包接化合物の結晶解析を試み、アゾ基とベンゼン間は空洞内に、ジメチルアミノ基とスルホン酸は空洞外に位置していることを示した。

本研究においては、特に染料分子の選択的包接作用を検討する目的で、系統的に疎水性を変化さ

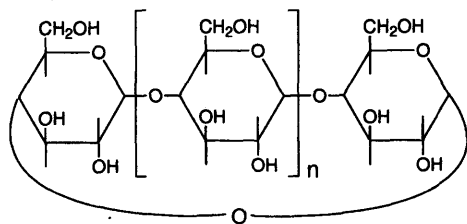
せた染料 (2) と CD との相互作用を試み、疎水性側鎖の包接作用に及ぼす影響について検討を行なった。すなわち染料として側鎖のアルキル鎖長の異なるメチルオレンジ及びその同族体を用い、 α -, β -, 及び γ -CD との包接作用を吸収スペクトル変化法より検討した。そして、包接に及ぼす CD と染料の疎水性及び分子サイズの影響を考察した。さらに温度を変化させ、結合定数の温度依存性から熱力学パラメーターを算出することによりその相互作用の機構を考察した。また、一部、分子モデル計算により、CD と染料の包接作用で得られる分子複合体の安定構造を推定した。

2. 実 験

2-1 試 料

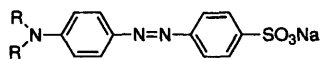
シクロデキストリン (CD, 1) は市販試薬 (GR) を十分乾燥しそのまま用いた。メチルオレンジ同族体 (2) はアルキル鎖の異なる 4 種を用いた。その内 2a 及び 2b は市販試薬をエタノール-水混合溶媒より繰り返し再結晶することにより精製して使用した。2c 及び 2d はスルファニル酸と相当する N,N'-ジアルキルアニリンをカップリ

ングして合成した。その後、得られた粗生成物から活性アルミナカラムクロマトグラフィーにて不純物を分離し、さらにエタノール-水混合溶媒で再結晶して精製した。



1

- 1a; n = 4 (α -CD)
- 1b; n = 5 (β -CD)
- 1c; n = 6 (γ -CD)



2

- 2a: R=CH₃ (MO)
- 2b: R=CH₂CH₂ (EO)
- 2c: R=CH₂(CH₂)₃ (BO)
- 2d: R=CH₂(CH₂)₅ (HO)

2-2 方法

染料基質の包接作用はpH7.0, 0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液中にて染料濃度を固定して行ない、包接複合体の結合定数 (K_b) は、CD濃度に伴う基質の吸光スペクトル変化からBenesi-Hildebrandの式を用いることにより算出した。温度は15-40℃の範囲で $\pm 0.05^\circ\text{C}$ に保って行った。

2-3 分子モデル計算

分子モデル計算はWindows95上で動作するHypercube社の分子設計支援プログラムHyperChemの経験的分子力場計算プログラムMM+を用いて行った。複合体形成の全エネルギー変化はそれぞれ単独で得られた最適化エネルギー変化の差として算出した。

3. 結果及び考察

3-1 CDによるメチルオレンジ同族体の包接作用

はじめに、CDに対するアルキル鎖長の異なる4種類のメチルオレンジ同族体 (2a-d) のpH7.0緩衝溶液中、25℃における包接作用を検討した。

すなわち、CDの濃度変化に伴う各染料の極大吸収波長における吸収スペクトルの変化の一例を図1に示す。この図において、横軸はCD濃度 [C] (mol/l), 縦軸は530nmにおける吸光度変化 ΔE を示す。これらの吸光度変化より明らかなように、いずれの場合もCD濃度の増加とともに増加し、ある濃度になるとほぼ一定となり平衡に達するようである。特に側鎖アルキル基を比較するとHO(2d)を除いて側鎖アルキル基が増加するにつれて低濃度で変化が大きく又早く平衡に達していることが認められた。他のCDとメチルオレンジ同族体の包接実験においても同様な結果が得られた。この変化はCDと染料とのなんらかの相互作用の結果であると考えられる。一般にMO(2a)及びEO(2b)と α -CDや β -CDとの包接作用は1:1の複合体を、 γ -CDとは2:1の複合体を生成することが報告されている^{12,13}。BO(2c)及びHO(2d)についても同様と推定される。

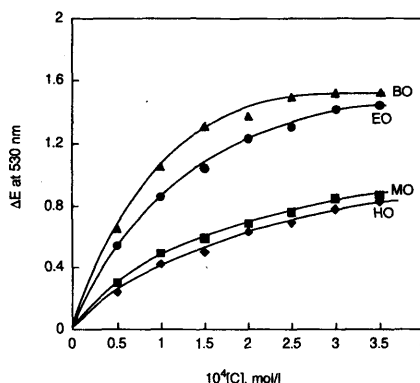


Figure 1 Plot of Adsorption Changes of MO, EO, BO, and HO on Complexation with α -CD at 25 $^\circ\text{C}$.

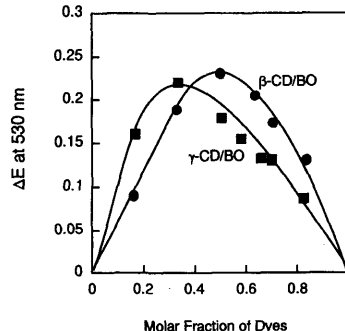


Figure 2 Continuous Variation Plot for Complex Formation of BO with β -CD and γ -CD at 25 $^\circ\text{C}$.

そこで、このことを明らかにするために、結合体のモル比を連続変化法により決定した。すなわち、 β -及び γ -CDと染料の合計の濃度を一定に保って、そのモル比を変化させたところ、図2の結果が得られ、結合体の生成量が最大の時のCDと染料のモル比は結合対のモル比に等しくなる。この図から明らかなように、 β -CDとBOとのモル比は0.5で極大値をとり、 γ -CDでは0.33で極大値を示した。この結果、 β -CDとの包接は1:1で γ -CDとのそれは2:1であることがわかった。以下、本研究ではそれぞれ上記のモル比で結合すると考え実験値を処理することにした。そこでBenesi-Hildebrandの式¹⁴⁾(1-2式)を適合して結合定数を算出した。

$$\text{CD} + \text{Dye} = \text{Complex}$$

$$\Delta E^1 = (\alpha [\text{Dye}]/\text{Kb}[\text{CD}])^1 + \alpha [\text{Dye}]^1 \quad (1)$$

$$\text{CD} + 2\text{Dye} = \text{Complex}$$

$$\Delta E^1 = (\alpha [\text{Dye}]2\text{Kb}[\text{CD}])^1 + 2\alpha [\text{Dye}]^1 \quad (2)$$

ここで ΔE はシクロデキストリンを加えたときの吸収スペクトルの変化であり、 $[\text{Dye}]$ は染料の初期濃度、 $[\text{CD}]$ はシクロデキストリン濃度、 α は定数である。 ΔE と $[\text{CD}]$ の逆数の直線関係から結合定数 Kb を求めることが出来るが、本研究においては非線形最小自乗法を用いて Kb を算出した。表1に包接複合体形成の結合定数(Kb)を示した。この表より明らかなように、 α -及び β -CDを比較すると、 β -CDは内径が大きく包接複合体の安定性が減少し、その結果 Kb 値は小さくなった。さらに基質の疎水性鎖長が増加するに従って、 Kb 値は大きくなる傾向にある。しかし、HOは取り込みの仕方が他の3種と異なるためか Kb 値が再び小さくなった。結合にはアルキル鎖長が影響し、 α 、 β 、 γ -CDそれぞれにおいて、側鎖アルキル基の鎖長の増加につれてその結合定数が増加したがHOでは減少した。 Kb 値は α -CDについては

$\text{BO} > \text{EO} > \text{MO} > \text{HO}$ で β -CDでは $\text{BO} > \text{EO} > \text{HO} > \text{MO}$ で、 γ -CDでは $\text{BO} > \text{MO} > \text{HO}$ である。

また興味深いことに、 α -CDではMOとEOであり差がないがBOの値が2倍程度大きい。 β -CDではEOとBOの値にあまり差がなくMOは2.5倍程度多くな値を示した。 γ -CDではMOとBOの差が見られなかった。これらの結果はCDの口径と関連して興味深い。この結果からアルキル基のかさ高さやCDの空洞の大きさとの適合性が示唆される。ブチル基のかさ高さは α -CDの空洞径に対する包接結合に有利に働き β -CDの場合は適合性に欠け緩い結合となったと考えられる。

3-2 包接に伴う熱力学パラメーター

次に、包接作用に対する熱力学パラメーター、すなわち、結合エンタルピー(ΔH)、結合エントロピー(ΔS)、及び自由エネルギー(ΔG)を15-40℃での各温度における結合定数の温度依存性から求めた。複合体形成の ΔH と ΔS は温度を変化させその結合定数を求めることにより得られる。図3に示すように、 RTlnK 対 $1/T$ のファントホッフプロットは直線関係を示し、この研究で用いた温度範囲において ΔH と ΔS は実質的の定数であることがわかる。包接化合物の形成は一般にエンタルピー的に有利で、エントロピー的には不利な過程であり、この有利なエンタルピー変化の素過程は、(1)疎水性相互作用、(2)複合体の水和、(3)CD空洞内の不安定な水分子の放出、(4)CDの分子間のひずみエネルギーの解放であるとされている。表1の結合定数の温度変化から、ファントホッフの式を用いて ΔH 、 ΔS が得られる。これらの熱力学データを表2に示した。ここで用いた系の包接作用はすべて発熱反応であり、そのうえエントロピー増大による付加的な安定化を伴う。このエントロピー増加から、空洞内の水の放出、染料のアルキル基の回りの構造化された水の解放が推定される。表2に見られる結合エントロピーの大きな負値は、前記の空洞への緊密は適合に起因し、自由エネルギー(ΔG)としてはその関係により、緊密な適合に伴う大きな発熱により補間されるのであろう。疎水性相互作用は効果的な正のエントロピー変化($S > 0$)とわずかな正のエンタルピー変化($H > 0$)を伴う。しかしながら、本実験での結果、包接過程は正のエントロピー変化よりもむしろ正のエントロピー変化によって補間されている。エ

Table 1 Binding Constants of Inclusion Complex Formation of Methyl Orange and its Homologues with Cyclodextrin in Aqueous Solution at 25 °C^a

	α -CD(1a) ^b	β -CD(1b) ^b	γ -CD(1c) ^b
MO(2a)	5780	2200	8060000
EO(2b)	7140	6060	-
BO(2c)	12300	6410	85500000
HO(2d)	3880	5880	2920000

^a At pH 7.0, 0.05 M phosphate buffer, ^b L/mol, ^c L²/mol²

ントルピーの安定化はゲスト分子脱水和過程のより低いエネルギー放出で説明出来る。

Table 2 Thermodynamic Quantities for Complex Formation

		$\Delta H(\text{kcal/mol})$	$\Delta S(\text{cal/mol}\cdot\text{K})$	$\Delta G(\text{kcal/mol})$
α -CD	MO	4.02	-63.45	22.94
	EO	6.21	-55.38	22.72
	BO	4.02	-63.45	22.94
	HO	8.89	-45.11	21.85
β -CD	MO	3.00	-63.46	21.92
	EO	3.15	-65.26	22.61
	BO	1.44	-71.12	22.65
	HO	2.22	-67.82	22.44

一般に包接作用はエンタルピー的に有利であって、25℃でたとえば β CD-MO系では $\Delta H = 3.0\text{kcal/mol}$ 、 $T\Delta S = -19.3\text{kcal/mol}$ で β CD-BO系では $\Delta H = 1.4\text{kcal/mol}$ 、 $T\Delta S = -21.2\text{kcal/mol}$ である。これは取り込みは主としてエンタルピー的であるが側鎖の疎水性が増すにつれて増加しており、包接疎水性相互作用が関与しているものと考えられる。また図4に示すように、これらの系中では全体の値のエントロピー・エンタルピーは補償関係であることが示された。この補償則は水溶液中での反応でしばしば見出される関係であり、包接化合物の形成に溶媒の水が重要な働きをしていることを示唆している。

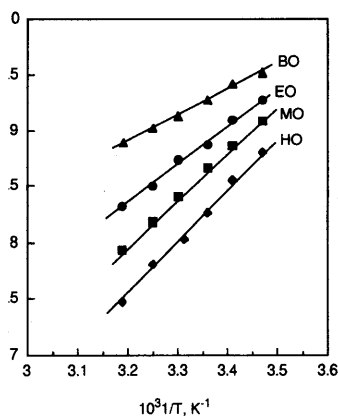
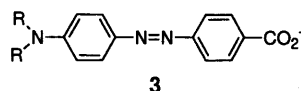


Figure 3 Van't Hoff's Plot of Binding Constants for Complex Formation.

3-3 分子モデル計算及び包接の様式

結合の様式を巨視的に把握するため、CDと染料の相互作用の分子モデル計算を一部試みた。計

算はWindows上で動作する分子設計支援ソフトHyperChemのMM+力場を用いた。CDとして、包接の結合定数の大きい α -CDを選択し使用した。また計算上のパラメーターの不足のために、実際の実験に用いた染料(2a, 2c)のモデルとして、親水性側鎖のスルホン酸基をカルボン酸基に換えたメチルレッド(3a)及びブチルレッド(3c)を用いた。



3

3a: R=CH₃ (MR)
 3c: R=CH₂(CH₂)₃ (BR)

前もって単独で最適化された各分子はHyperChem上で重ね合わせ、MM+力場で最適化後、分子動力学シミュレーションを試みた。シミュレーション温度は最初0から300Kまで立ち上げ、その後300Kにて100 ps 計算を試み、十分に安定化させた後、最終的にその複合体の極小化を同じMM+力場で行った。その最適化された分子複合体を図5に示す。図5の中で(a)及び(b)はそれぞれ α -CDと染料を正方向及び逆方向に重ね合わせた時の安定化した複合体形成図である。3aとの包接作用の場合は正逆両方ともほぼ中央に位置してベンゼン環及びアゾ基を空洞内に含んだ複合体形成の安定構造が得られた。3cとの相互作用では(a)の方が幾分疎水性側鎖に近づいた安定構造が認められた。

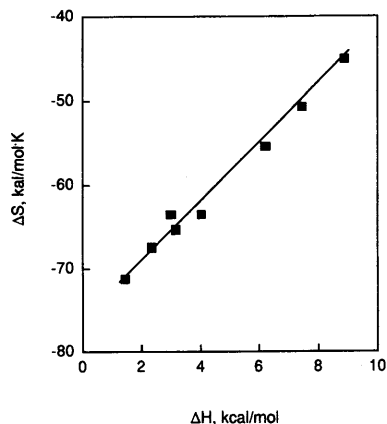
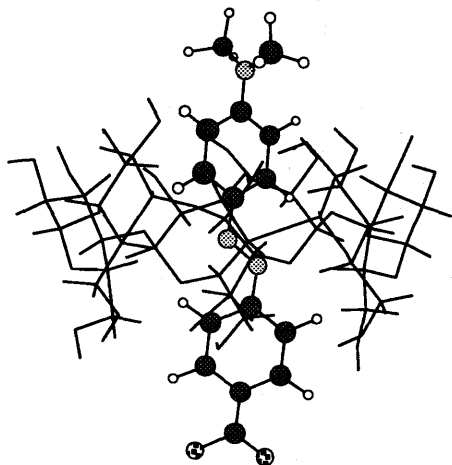
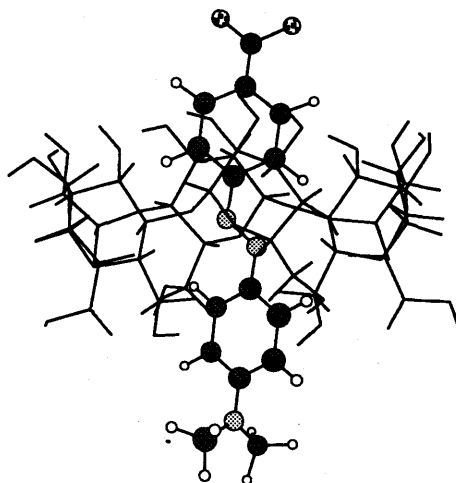


Figure 4 Entropy-enthalpy Compensation for Complex Formation.

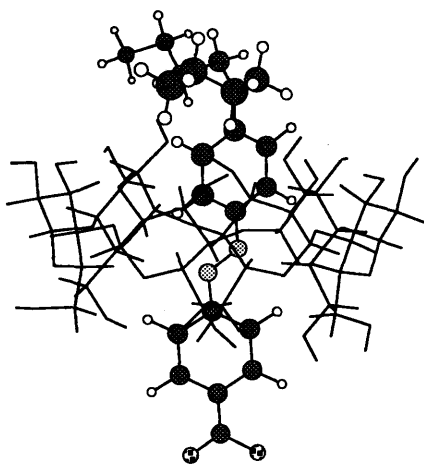
(1) α CD/3a(a)



(2) α CD/3a(b)



(3) α CD/3c(a)



(4) α CD/3c(b)

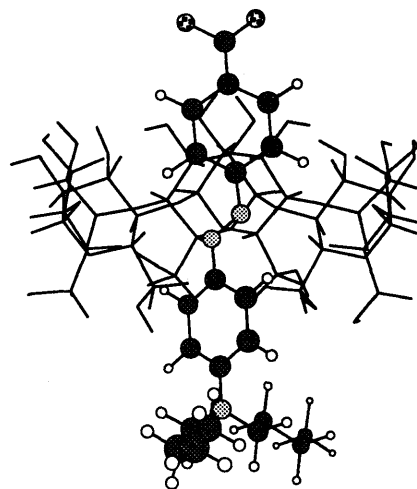


Figure 5 Computer-generated Molecular Models of Four Complexes Detected for the Cyclodextrin and Dye Defined Compound.

(1) α -CD/3a(a), (2) α -CD/3a(b), (3) α -CD/3c(a), (4) α -CD/3c(b)

また各コンポーネント別のエネルギー変化を表3に示す。表中、上からそれぞれ全エネルギー、結合、角度、二面角、ファンデルワールス力、伸縮ねじれ及び静電の各コンポーネントを示す。こ

の表から明らかなように、各複合体形成における安定化の全エネルギーは3aの場合(b)の方が安定であり、3cの場合(a)のほうが安定である。原田ら⁷⁾は、 α -CDとMOとのX線結晶解析において、(b)

Table 3 Change in the Energies and Their Components on the Formation of Cyclodextrin Inclusion Compounds*

	(1) α CD/3a(a)	(2) α CD/3a(b)	(3) α CD/3c(a)	(4) α CD/3c(b)
Total Energy	-19.11	-22.85	-26.74	-20.60
Bond	-0.19	-0.14	-0.09	-0.25
Angle	-1.47	+0.07	-0.08	-3.03
Dihedral	+7.44	+3.73	+2.93	+7.93
Vdw	-24.59	-24.35	-29.16	-25.25
Stretch-bend	+0.03	+0.03	+0.09	0.00
Electrostatic	-0.35	-2.18	-0.42	-0.01

*Kcal/mol. Charge in the total energy [total energy of the inclusion compound (Host-Guest)]-[total energy of Guest]+[total energy of Host].

の安定構造が得られることを示しており、この計算結果と一致している。しかし3cの場合は逆の正方向の方が安定な結果が得られており、疎水性側鎖を有する染料との包接作用のときは、その可能性が考えれ興味深い。また両方ともほとんどファンデルワールス力による安定化であることを示している。ファンデルワールス力は主として分子間の疎水性相互作用から得られるものであり、各複合体形成には疎水性相互作用が大きく関与していることがわかった。

3-4 結論

水溶液からのアルキル鎖長の異なるメチルオレンジ同族体と α -、 β -、及び γ -シクロデキストリンとの相互作用を検討した結果、次のような知見が得られた。

- 1) メチルオレンジ同族体にCD濃度を変化させ加えることにより吸収スペクトルが変化し、いずれの場合もCD濃度の増加とともに増加し、ある濃度になるとほぼ一定となり平衡に達するようである。この変化はCDと染料とのなんらかの相互作用の結果であると考えられる。
- 2) 連続変化法によりこの系において染料とCDの結合は α -及び β -CDの場合1:1の包接体を、 γ -CDの場合は2:1の包接型であると考えられ、Benesi-Hildebrandの式を用いて結合定数を求めた。
- 3) それぞれの結合定数からすべての系において染料の側鎖の疎水性が増加するにつれてその結合定数は増加した。しかしHOの場合は結合形態が異なるため減少した。
- 4) 熱力学パラメーターの結果より、結合は発熱反応であり、結合のエンタルピーとエントロピーは補償関係にあることがわかった。
- 5) 分子モデル計算の結果において、 α -CDと3a

及び3cとの複合体形成の相違は顕著に認められ、結合にはアルキル鎖長が影響し、3aの場合は逆方向、3cの場合は正方向の包接のほうが安定なエネルギー値を示した。

本研究の遂行にあたり、実験に協力して下さった卒論生の木山幸子、吉岡裕子の諸氏に深く感謝致します。また試料の提供をいただいた日本食品化工株式会社に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は平成10年度文部省科学研究費(課題番号10680123)により行なわれた。

参考文献

- 1) M. L. Bender and M. Komiyama, "Cyclodextrin Chemistry" Springer-Verlag, New York(1977).
- 2) W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 344(1980).
- 3) L. J. Cline Love, M. L. Grayesky, and J. Novoski, *Anal. Chim. Acta*, **17Q**, 3 (1985).
- 4) F. Garcia Sanchez, M. Hernandez, and A. Heredia, *Anal. Chim. Acta*, **187**, 147 (1986).
- 5) H-J. Buschmann, D. Knittel, and E. Schollmeyer, *Melliand Textilber.*, **72**, 1012 (1991).
- 6) E. Junquera, G. Tardaios, and E. Aicart, *Langmuir*, **9**, 1213(1993).
- 7) K. Harada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 1493 (1976).
- 8) R. L. VanEttan et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3242 (1967). *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3253 (1967).
- 9) K. M. Tawarah, *Dyes Pigm.*, **19**, 59 (1992).
- 10) A. Hersey and B. H. Robinson, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **80**, 2039 (1984).
- 11) 軽部幸恵, 飯島俊郎, 繊維学会誌, **50**, 477 (1994).
- 12) Y. Matsui and K. Mochida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51**, 673 (1978).
- 13) R. J. Clarke, J. H. Coates, and S. F. Lincoln, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **82**, 2333 (1986).
- 14) H. Benesi and J. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2703 (1949).