β -シクロデキストリン包接による 7 位置換クマリン誘導体の蛍光挙動

高館 明,^a 藤野博之,^a 合屋周次郎,^{a*} 平山文俊,^a 小田切優樹,^a 上釜兼人,^a 山口裕之^b

熊本大学薬学部,^a 熊本大学理学部^b

Fluorescence Behavior of 7-Substituted Coumarin Derivatives by Inclusion Complexation with β -Cyclodextrin

AKIRA TAKADATE,^a HIROYUKI FUJINO,^a SHUJIRO GOYA^{a*}, FUMITOSHI HIRAYAMA,^a
MASAKI OTAGIRI,^a KANETO UEKAMA,^a and HIROYUKI YAMAGUCHI^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1, Ohe-honmachi,
Kumamoto, 862, Japan,^a and Faculty of Science, Kumamoto University,
2-3-91, Kurokami, Kumamoto, 860, Japan^b

(Received July 30, 1982)

The inclusion complexes of 7-substituted coumarin derivatives (7-hydroxy-, 7-amino-, 7-dimethylamino-, 7-methoxy-, and 7-ethoxy-4-methylcoumarins) with β -cyclodextrin in aqueous solutions were formed. The equilibrium constants of these complexes were obtained by fluorescence and circular dichroism spectrophotometric methods. Fluorescence enhancement or quenching was observed upon inclusion of coumarin derivatives with β -cyclodextrin. The fluorescent behavior was discussed from the standpoint of the solvent effect of coumarin derivatives and of the geometry of the inclusion complexes assumed from their ^1H nuclear magnetic resonance spectra.

Keywords—7-substituted 4-methylcoumarin; β -cyclodextrin inclusion complex; fluorescence enhancement and quenching; equilibrium constant; CD; ^1H -NMR; geometry

シクロデキストリン類は種々の有機分子と反応して包接複合体を形成することが知られている。¹⁾ また、シクロデキストリン包接化によって蛍光強度が増大することがナフタレン、²⁾ ベンゼン³⁾ およびクマリン誘導体⁴⁾ などにおいて報告されている。このようなシクロデキストリン包接による効果は分析試薬の感度および反応性の向上、安定化、水への可溶化など種々の応用が期待される。Kinoshita らはダンシルクロリドの β -シクロデキストリン (β -CyD) 複合体と蛋白との反応など、 β -CyD の蛍光分析への応用について報告している。⁵⁾

著者らはシクロデキストリンの包接効果を分析試薬の改良、開発等に应用することを目的として、7 位置換クマリン誘導体の蛍光性におよぼす β -CyD 包接化の影響を調べることによって、クマリン誘導体と生体成分との相互作用等に必要なる知見を得るために、基礎的な検討を行った。

実験の部

試料 7 位置換クマリン誘導体 (I—V) はそれぞれ文献記載の方法⁶⁾に従って合成した。I—V の構造は融点、元素分析および ^1H 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルにより確認した。スペクトルの測定に用いた試料は薄層クロマトグラフィーにより単一スポットが得られるまでくり返し再結晶を行い精製した。 β -CyD は市販品を水より数回再結晶したものを用いた。

スペクトルの測定 紫外可視 (UV) 吸収スペクトルは日立 556 s 型二波長自記分光光度計を用いて測定した。蛍光スペクトルは日立 650-60 型分光蛍光光度計を用い、励起分光器および蛍光側分光器のスリット幅はいずれも 10 nm に固定し、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で測定した。蛍光スペクトル測定におけるクマリン誘導体の濃度は 10^{-6} mol/l とした。この濃度においてクマリン誘導体の吸光度はいずれも 0.02 以下であった。励起波長は I—III では 370 nm, IV および V は 330 nm とした。円偏光二色性 (CD) スペクトルは日本分光 DP-501 N 型データ処理装置を備えた日本分光 J-500 C 型自記円二色分散計を用い、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で測定した。CD スペクトル測定に用いたクマリン誘導体の濃度は 10^{-5} mol/l とした。 β -CyD 共存下のクマリン誘導体の ^1H -NMR スペクトルは日本電子

FT-100 型スペクトルメーター (100 MHz) を用い、テトラメチルシラン (TMS) を外部基準として、 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ で測定した。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定の溶媒は $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1 v/v) を用い、クマリン誘導体と $\beta\text{-Cyd}$ の濃度はいずれも 10^{-2} mol/l とした。なお、化学シフトの精度は ± 0.002 ppm 以内である。

蛍光量子収率および平衡定数の算出 蛍光スペクトルの補正は和光純薬社製分光蛍光光度計用ローダミン B 試液を用いて行った。蛍光量子収率は Parker と Rees⁷⁾ の方法により、Merhuish⁸⁾ の硫酸キニーネの室温での値 0.55 を用いて算出した。蛍光および CD スペクトル法からの平衡定数はそれぞれ Hoshino らが用いた式³⁾ および Scott らの式⁹⁾ を用い、グラフ上の切片と勾配との関係より求めた。その際、 $\beta\text{-Cyd}$ の濃度は蛍光および CD スペクトル法とも 10^{-3} – 8×10^{-3} mol/l の範囲内で変化させた。

結果 および 考察

$\beta\text{-Cyd}$ 溶液中におけるクマリン誘導体の UV, CD および $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

まず、Chart 1 に示されたクマリン誘導体 (I–V) と $\beta\text{-Cyd}$ との包接複合体形成を明らかにするために、UV

- I : R=OH
II : R=NH₂
III : R=N(CH₃)₂
IV : R=OCH₃
V : R=OCH₂CH₃

Chart 1

および CD スペクトル法による検討を行った。Table I に $\beta\text{-Cyd}$ 溶液中の I–V の UV および CD スペクトルの測定結果を示す。I–V の UV スペクトルにおいては $\beta\text{-Cyd}$ の存在または非存在下で吸収極大波長および吸光度のいずれにも有意の変化は認められなかった。一方、 $\beta\text{-Cyd}$ 溶液中の I–V は 318–370 nm 領域に正の符号をもつ CD スペクトルを示した。 $\beta\text{-Cyd}$ は本条件下において 210 nm より長波長側に CD バンドを示さないことから、これらの新しいバンドは $\beta\text{-Cyd}$ と I–V との包

接複合体形成に基づく誘起バンドであると推定された。また、UV および CD スペクトルの極大波長を比較した場合、I および II の CD 極大波長は UV のそれに比べてわずかに長波長側へシフトし、III–V の場合は短波長側へシフトした。このことから、I および II と III–V とでは $\beta\text{-Cyd}$ との包接様式が異なることが示唆された。したがって、この点をさらに明らかにするために、I および V について $^1\text{H-NMR}$ スペクトル法による検討を試

TABLE I. UV Absorption and Induced CD Spectral Data of 7-Substituted 4-Methylcoumarin Derivatives in Aqueous $\beta\text{-Cyd}$ Solutions^{a)}

Compd. No.	UV		Induced CD	
	λ_{max} (nm)	$\epsilon (\times 10^3)$	λ_{max} (nm)	$[\theta] (\times 10^3)^{b)}$
I	322	15.83	323	5.40
II	345	15.60	350	5.40
III	373	16.83	370	8.83
IV	322	14.40	318	4.75
V	322	15.75	320	5.90

a) Concentrations of 7-substituted coumarin derivatives and $\beta\text{-Cyd}$ were 1.0×10^{-5} M and 8.0×10^{-3} M, respectively.

b) Molar ellipticity ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$).

TABLE II. $\beta\text{-Cyd}$ Induced $^1\text{H-NMR}$ Chemical Shifts Change of 7-Hydroxy-(I) and 7-Ethoxy-4-methylcoumarin (V)^{a)}

Compd. No.	$\Delta\delta$ (ppm) ^{b)}						
	C ₃ -H	C ₅ -H	C ₆ -H	C ₈ -H	C ₄ -CH ₃	C ₇ -OCH ₂ CH ₃	C ₇ -OCH ₂ CH ₃
I	0.006	0.001	0.002	0.005	0.008		
V	-0.005	-0.015	-0.006	-0.010	-0.004	-0.004	0.000

a) Concentrations of coumarin derivatives and $\beta\text{-Cyd}$ were 10^{-2} M in $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1 v/v).

b) $\Delta\delta$ is the difference in chemical shift of each coumarin derivatives in the presence and absence of $\beta\text{-Cyd}$ ($\Delta\delta = \delta_{\text{with additives}} - \delta_{\text{without additives}}$).

みた. Table II に β -Cyd 添加により誘起される I および V の化学シフトの変化を示す. Table II に示されるように, I のプロトンシグナルは β -Cyd 添加によりいずれも低磁場シフトしており, V のそれは高磁場シフトを示した. このような I と V のシグナルの相反するシフトから, 両者と β -Cyd との包接複合体はそれぞれ異った立体配座を有していることが示唆された. なお, I の低磁場シフトは β -Cyd による立体圧縮効果¹⁰⁾ の寄与が, また V の高磁場シフトは β -Cyd の磁氣的しゃへい効果の寄与がそれらの化学シフトの変化に主として反映されたものと思われる. さらに, 両者の化学シフトの変化から明らかなように, I においてはラクトン環部分 (C_3 -H, C_4 -CH₃) のシグナルがベンゼン環部分 (C_5 -H, C_6 -H, C_8 -H) のシグナルより大きなシフトを示した. 一方, V においてはベンゼン環部分のシグナルの方がラクトン環部分のそれより大きなシフトを示した. また V においてエチル基のメチルプロトンの化学シフトの変化がないのは側鎖のメチル基部分が β -Cyd の空洞外にあるものと考えられる. したがって, I はラクトン環部分が, また V はベンゼン環部分が β -Cyd との相互作用に他の部分と比べてより強く関与しているものと思われる. また, これらの事実は前述の UV および CD スペクトルからの予想と符合した.

平衡定数

クマリン誘導体 (I—V) は β -Cyd 溶液中において β -Cyd の濃度の増加にともなって蛍光強度に変化を生じることから, 蛍光および CD スペクトル法により I—V と β -Cyd との間の平衡定数を求めた. その結果を Table III に示す. 2つの方法で求めた平衡定数は良く一致し, $IV < I \leq II < V < III$ の順で大となった. Table III に示されるように, III および V の平衡定数が大となっており, これらのクマリン誘導体と β -Cyd との包接複合体形成には疎水の親和力が主な役割を演じていることが示された. しかし, V と構造が近似している IV が最も小さい平衡定数を示しているがこの点についてはさらに詳細な検討が必要であると思われる.

β -Cyd 包接化による 7 位置換クマリン誘導体の蛍光スペクトルと量子収率

クマリン誘導体の蛍光性は 7 位置換基の効果を敏感に反映することが知られており,¹¹⁾ 前述の実験からも β -Cyd 包接化がクマリン誘導体 (I—V) の蛍光性に影響を与えることが示されたので, 本節では I—V の β -Cyd 溶液中における蛍光挙動について詳述する. Fig. 1 に種々の濃度の β -Cyd を含む水溶液中での 7-ジメチルアミノ-4-メチルクマリン (III) の蛍光スペクトルを示す. Fig. 1 に示されるように, β -Cyd の濃度が増加するにつれて III の蛍光強度は増大し, 蛍光極大波長は短波長側へシフトした. このことから III と β -Cyd との包接複合体形成が支持された. また, III および V と β -Cyd との蛍光法による Job's プロット¹²⁾ (Fig. 2) からこれらのクマリン誘導体と β -Cyd との複合体の成分モル比は 1:1 であることが推定された. Table IV に I—V の水, β -Cyd, エタノールおよびシクロヘキサン溶液中の蛍光スペクトルの測定結果を示す.¹³⁾ I—III の β -Cyd 溶液中の量子収率はいずれも水溶液中のそれより増大した. とくに III は約 2 倍の増大を示した. 一方, IV および V の β -Cyd 溶液中の量子収率は水溶液中のそれより明らかに減少した. このように, β -Cyd 包接化によって異なった蛍光挙動が示されることはクマリン誘導体の溶媒効果や β -Cyd 複合体の立体構造等との関連において興味をもたれる. Table IV に示されるように, I および II は水, エタノールおよびシクロヘキサン溶液中の量子収率をそれぞれ比較するとき, 極性の高い水およびエタノール中において量子収率は大きく, 極性の低いシクロヘキサン中で小であった. 一方, β -Cyd の空洞内は疎水的環境にあり, I および II の溶媒効果から推測した場合に β -Cyd 溶液中の I および II の量子収率は低下することが予想されるが, 上記の結果はこの予想に相異した.

TABLE III. Equilibrium Constants obtained with Fluorescence and CD Spectrophotometric Methods

Compd. No.	K (fluorescence) M^{-1}	K' (CD) M^{-1}
I	110	139
II	164	139
III	893	864
IV	80	97
V	342	365

Fig. 1. Fluorescence Spectra of III (1.0×10^{-6} M) in the Presence of β -Cyd

β -Cyd concentration: a: 0 M, b: 1.0×10^{-3} M, c: 2.0×10^{-3} M, d: 5.0×10^{-3} M, e: 8.0×10^{-3} M.

Fig. 2. Job's Plots for 7-Substituted 4-Methylcoumarin Derivatives (III: O, V: ●) β -Cyd Interaction

The total concentration of [β -Cyd] + [III] (or [V]) was kept at 1.0×10^{-5} M.

TABLE IV. Fluorescence Spectral Data of Coumarin Derivatives in Various Solvents and β -Cyd Aqueous Solution^{a)}

Compd. No.	$F\lambda_{\max}$ nm (Quantum yield: ϕ) ^{b)}				
	H ₂ O	β -Cyd	EtOH	Cyclohexane	$\phi_{\beta\text{-Cyd}}/\phi_{\text{H}_2\text{O}}$
I	450 (0.43)	449 (0.48)	384 (0.28)	380 (0.01)	1.12
II	443 (0.82)	438 (0.98)	431 (0.87)	400 (0.38)	1.20
III	470 (0.16)	456 (0.30)	450 (0.70)	392 (0.85)	1.88
IV	385 (0.36)	385 (0.25)	379 (0.07)	370 (0.01)	0.69
V	385 (0.31)	382 (0.15)	370 (0.09)	370 (0.02)	0.61

a) Concentrations of 7-substituted coumarin derivatives and β -Cyd were 1.0×10^{-6} M and 8.0×10^{-3} M, respectively.

b) I—III: ex. at 370 nm. IV and V: ex. at 330 nm.

一般にシクロデキストリンによる包接複合体形成に関与する結合力は水素結合、ファンデルワールス力および疎水結合などがあり、これらが単独または協力して作用するものと考えられており、¹⁴⁾ とくに I および II のような極性官能基を有する化合物の β -Cyd 包接化による蛍光性を単に溶媒効果のみから推定することは当然のことながら困難であると思われる。一方、I および II の水酸基およびアミノ基をメチルまたはエチル基で置換した III—V の溶媒効果において、III はシクロヘキサン中で、IV および V は水溶液中で最も高い量子収率を示した。このことから、III は疎水的環境下において、IV および V は親水的環境下においてそれぞれ量子収率の増大することが予想された。事実、III—V の水溶液中と β -Cyd 溶液中の量子収率を比較すると、III は包接化により量子収率の増大を示し、IV および V は減少を示した。このことは III—V の溶媒効果からの予想と良く対応しており、III—V の場合には β -Cyd の疎水的寄与が主としてそれらの蛍光性に反映されたものと思われる。他方、 β -Cyd 溶液中の I および II の蛍光挙動がそれらの溶媒効果からの予想と一致せず、III—V の場合と相異なることを前述したが、この I および II の蛍光挙動は次のように考えられる。すなわち、さきの I および V の β -Cyd 溶液中の ¹H-NMR スペクトルにおいて、I の包接複合体の立体構造は V のそれと異なることが推定され、この構造上の相異に基づく効果がクマリン分子の電子状態に主として反映されたものと考えられる。

以上のことから、 β -Cyd 包接化による 7 位置換クマリン誘導体の蛍光性について次のようなことが明らかと

なった。まず、クマリン分子の7位置換基の種類によって蛍光挙動は著しく異なり、今回使用した化合物の中では7-ジメチルアミノ体 (III) が約2倍の蛍光性増大を示した。また、7-ヒドロキシ体 (I) および7-アミノ体 (II) の蛍光性も増大したが微少であった。一方、7位 O-アルキル置換体 (IV, V) の蛍光性は消光することが明らかとなった。包接化による蛍光挙動は溶媒効果から推測可能な場合もあるが、I および II のような極性官能基を有する場合は困難であった。さらに、 β -Cyd とクマリン分子との包接様式の相異に基づく効果がそれらの蛍光性に反映されることが推定された。

謝辞 本研究に際し、元素分析および $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定をして頂いた熊本大学薬学部分析センターの諸氏に深謝する。

引用文献および注

- 1) M.L. Bender, M. Komiyama, "Cyclodextrin Chemistry," Springer-Verlag, New York, 1978.
- 2) F. Cramer, W. Saenger, H. Spatz, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 14 (1967); H. Kondo, H. Nakatani, K. Hiromi, *J. Biochem.*, **79**, 393 (1976); A. Ueno, K. Takahashi, T. Osa, *J. Chem. Soc. Commun.*, **1980**, 921; A. Ueno, K. Takahashi, Y. Hino, T. Osa, *ibid.*, **1981**, 194.
- 3) M. Hoshino, M. Imamura, K. Ikehara, Y. Hama, *J. Phys. Chem.*, **85**, 1820 (1981).
- 4) M. Otagiri, J.G. Fokkens, G.E. Hardee, J.H. Perrin, *Pharm. Acta. Helv.*, **53**, 241 (1978).
- 5) T. Kinoshita, F. Iinuma, A. Tsuji, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 666 (1973); *idem*, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 2413, 2421, 2735 (1974); *idem*, *Anal. Biochem.*, **61**, 632 (1974); *idem*, *ibid.*, **66**, 104 (1973); T. Kinoshita, F. Iinuma, K. Atsumi, Y. Kanada, A. Tsuji, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1166 (1975); K. Nakaya, M. Yabuta, F. Iinuma, T. Kinoshita, Y. Nakamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 760 (1975).
- 6) H. Pechmann, C. Duisberg, *Chem. Ber.*, **16**, 2119 (1883); R.L. Atkins, D.E. Bliss, *J. Org. Chem.*, **43**, 1975 (1978); H. Pechmann, M. Schael, *Chem. Ber.*, **32**, 3690 (1889); J. Chakravarti, *Indian Chem. Soc.*, **9**, 25 (1932); A.A. Levinson, U.S. Patent, 1934361 (1960).
- 7) C.A. Parker, W.T. Rees, *Analyst*, **85**, 587 (1960).
- 8) W.H. Merhuish, *New Zealand J. Sci. Technol.*, **37**, 2B, 142 (1955).
- 9) R.L. Scott, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **75**, 787 (1956).
- 10) B.V. Cheny, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5386 (1968); M. Suzuki, Y. Sasaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 607 (1979); K. Uekama, F. Hirayama, M. Otagiri, M. Yamasaki, *Int. J. Pharm.*, **10**, 1 (1982).
- 11) 安部郁夫, 古賀城一, 黒木宣彦, 日化, **1974**, 1774; 日野原忠男, 天野一雄, 松井弘次, 日化, **1976**, 247.
- 12) 細谷治夫, "実験化学講座(続) 11巻, 電子スペクトル," 日本化学会編, 丸善, 東京, 1965, pp. 528—530.
- 13) I—IV の水および有機溶媒中の量子収率は文献 (11) に記載されているが, 著者らの測定条件で再度測定した。
- 14) J.L. Hoffman, R.H. Bock, *Biochemistry*, **9**, 3542 (1970); E.S. Hall, J. Ache, *J. Phys. Chem.*, **83**, 1805 (1979).