

[研究ノート] L-アスコルビン酸とフェニルボロン酸との 反応挙動の評価

武田唯子・森川浩

工学部応用化学科

Study on the reaction behavior of L-ascorbic acid and phenylboronic acid

Yuiko TAKEDA, Hiroshi MORIKAWA

Abstract

This study shows reaction behavior of L-ascorbic acid (AA) and phenylboronic acid (PB) in DMSO-*d*₆ (50 mM at 30°C) to form the corresponding boronic acid ester. For the purpose of restriction of the reactive moieties, two AA derivatives, in which diols at 2,3- or 5,6-position are protected, were selected and evaluated as the reference for AA. Compared among their ¹H NMR spectra of the boronic acid ester from the protected AA with PB, unmodified AA was reacted with PB mainly at not the 2,3-position but the 5,6-position of AA. When equimolar AA and PB were mixed in DMSO-*d*₆, it was found that approximately a half of AA was converted to the boronic acid ester.

Keywords: L-Ascorbic acid, Phenylboronic acid, Ester, Reaction behavior, Diol

1. まえがき

ビタミン C である L-アスコルビン酸 (Fig. 1, 以下 AA と略す) は、抗酸化物質として知られ、生体内外で作用する。低い安定性の一方で、その高い抗酸化能を活かすために、化学修飾による誘導体の合成研究が行われている。一例として、AA の 2 位ヒドロキシ基にグルコースを結合させた L-アスコルビン酸 2-グルコシドが挙げられる¹⁾。高い安定性、水溶性、酵素反応で AA が再生するといった特徴を有し、化粧品の添加剤としても用いられる。このように、AA のヒドロキシ基を化学的に修飾することは、その高機能化につながる。

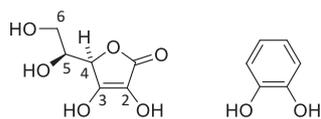


Fig.1. (左) L-アスコルビン酸 AA (右) カテコール

近年、Chakraborty らは、ナノ粒子を用いたグルコース応答型の AA の放出制御システム、及びそのナノ粒子の細胞への取り込みについての結果を報告している²⁾。この中で、AA が μM レベルでは抗酸化能を発揮すること、逆に、高濃度の mM レベルでは反対の機能、すなわち、 H_2O_2 など過酸化物質の生成を助け、細胞死を導く方向で機能して

いることを報告している。ここで、鍵となる物質は、ナノ粒子表面に固定化されたフェニルボロン酸 (PB) 部位である。PB はジオール類位 (2 つのヒドロキシ基) と五員環を形成して高選択的に結合する、つまりボロン酸エステルを生成することが広く知られている (Scheme 1)³⁾。

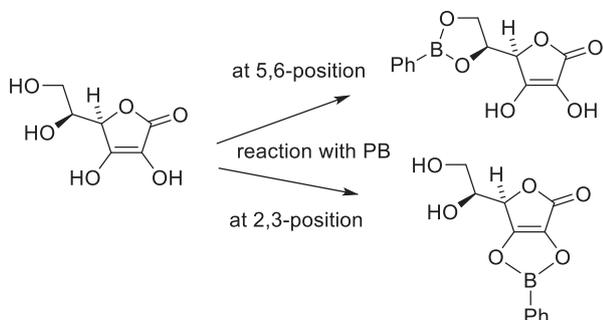


Scheme 1. フェニルボロン酸 PB とジオールとの
エステル形成反応

Chakraborty らの報告例の場合も AA のジオール部位と共有結合化している。しかし、ボロン酸エステルの結合は可逆的であるために、ここにグルコースが存在すると、AA とグルコースが交換する形で、AA の遊離とボロン酸-グルコース結合の生成が起こるという仕組みである。

同じジオール誘導体であるカテコール (Fig.1) と PB とのエステル化及びその機能化は、広く研究されている⁴⁾。一方で、AA と PB のエステル化の研究例は、ほとんどない。前述の Chakraborty の研究でも、AA の 4 つ有るヒドロキシ基のうち、2,3 位のヒドロキシ基 (ジオール部位) と結合するように書かれているが、明確な根拠は記載されていない。

そこで、本研究では、AA とフェニルボロン酸のエステル形成反応について検討した。特に、AA の4つ有るヒドロキシ基のうち、2,3位、または5,6位のどちらとエステル結合を形成するのかを評価した (Scheme 2)。ここでは、まず、有機溶媒中の反応を検討するために $\text{DMSO-}d_6$ を溶媒とし、核磁気共鳴スペクトル (NMR) を用いて評価した。



Scheme 2. AA の異なるジオール部位での反応

この目的のため、AAに加えて、その5,6位を保護したAA誘導体 (5,6-bAA)、2,3位を保護したAA誘導体 (2,3-bAA) を対象化合物とした (Fig.2)。Fig. 2に示すように、それぞれ余った2,3位、または5,6位のジオールが反応点となりうる。

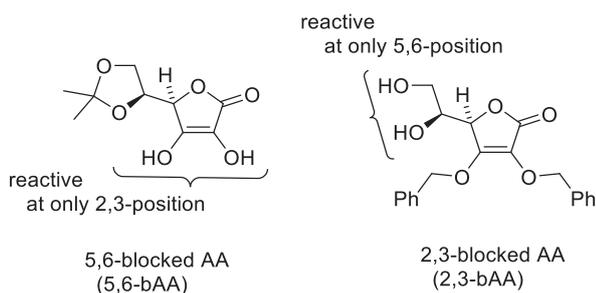


Fig. 2. (左) 5,6位を保護したAA (5,6-bAA)
(右) 2,3位を保護したAA (2,3-bAA)

2. 実験試薬および手順

試薬: PB (東京化成)、AA (和光純薬、または大東物産)、 $\text{DMSO-}d_6$ (AldrichまたはMerck) は、市販品をそのまま用いた。その他の試薬も、市販品をそのまま用いた。機器: NMR測定では、JEOL JNM-ECA 400 NMR (^1H : 400 MHz)を用いた。テトラメチルシランを含む $\text{DMSO-}d_6$ を溶媒として、 30°C で測定した。

誘導体の合成: 既報⁹⁾に従い、AAと塩化ベンジルを出発原料として、やや黄色を帯びた無色液体として2,3-bAAを得た (収率9%)。同様に、既報⁹⁾に従い、AAとアセトンを出発原料として、白色固体として5,6-bAAを得た (収率74%)。

PBとのエステル化反応の評価 (典型例): AA 17.6 mg (0.10 mmol) を2.0 mLの $\text{DMSO-}d_6$ に溶かし (50 mM)、そこにPBを1当量 (12.2 mg) または10当量 (122.1 mg)

を加えた。 30°C で18時間攪拌し、その後、 30°C で ^1H NMRを測定した。AAの代わりに、2,3-bAA 0.10 mmolまたは5,6-bAA 0.10 mmolを用いたときも、AA同様にPBと混合し、 ^1H NMRを 30°C で測定した。

3. 実験結果と考察

3-1. 2種の誘導体とPBのエステル形成反応の評価:

$\text{DMSO-}d_6$ 中、2,3-bAAにPBを添加後、経時変化を考慮して1時間後と18時間後の ^1H NMRスペクトルを比較した (50 mM 2,3-bAA)。十分に反応したと判断した18時間後のスペクトルをFig. 3に示す。

2,3-bAAのみのスペクトル(1)では、5,6位のピークが約3.5 ppmにあることが分かる。2,3-bAAに対して、PBを1当量加えると、ボロン酸エステルを形成したことによる新たなピークが、5.2~4.2 ppmに現れた (スペクトル(2))。特に、詳細な解析の結果、4.5, 4.2 ppmのピークは6'位のピークであった。環形成に伴って、axial位とequatorial位のメチレンプロトンが違うケミカルシフトに観測されたといえる。スペクトル(3)に示すように、PBを10当量加えると約3.5 ppmのピークは完全に消失し、ほぼ定量的にボロン酸エステルを形成した。

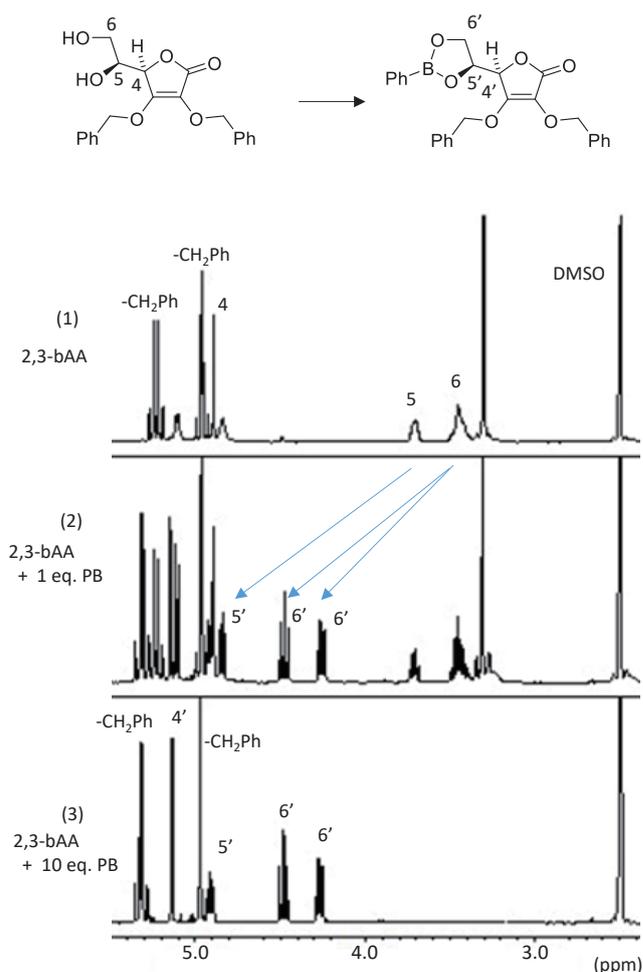


Fig.3. ^1H NMR スペクトル (50 mM of 2,3-bAA in $\text{DMSO-}d_6$) (1) 2,3-bAA, (2) 2,3-bAA に1当量のPBを添加し、18時間後、(3) 2,3-bAA に10当量のPBを添加し、18時間後

スペクトル(2)において、ピーク 6 と 6' の面積比は、そのまま 2,3-AA と 2,3-AA ボロン酸エステルとの比率になる。したがって、PB を 1 当量加えたとき、およそ 2,3-AA ボロン酸エステルは 59% 生成すると見積った (41% は 2,3-bAA のまま)。また、この比率と Scheme 1 の正・逆反応を考慮すると、5,6 位ジオールの反応における濃度平衡定数は下記式(1)で求められ、およそ $2.4 \times 10^{-1} \text{ M}$ と見積もった。

$$K = \frac{[2,3\text{-bAA} \cdot \text{PB ester}] \times [\text{H}_2\text{O}]^2}{[2,3\text{-bAA}] \times [\text{PB}]} \quad (1)$$

以上のような 2,3-bAA を用いた時と同様な手法を用いて、5,6-bAA と PB のボロン酸エステル化反応を評価した。

Fig.3 と同様に、5,6-bAA に対して、PB を 1 当量と 10 当量加えたときの $^1\text{H NMR}$ スペクトルを Fig.4 に示す。スペクトル(2)から、1 当量の PB 添加ではほとんど新しいピークは見られなかった。このことから、2,3 位のジオールとはエステル形成しにくいといえる。10 当量の PB を加えたとき、ボロン酸エステル由来のピークが現れた (スペクトル(3)) が、元の 5,6-bAA 由来のピークは明確に残った。特に、反応点近傍の 4 位プロトン由来の低磁場シフトが比較的が大きかった。

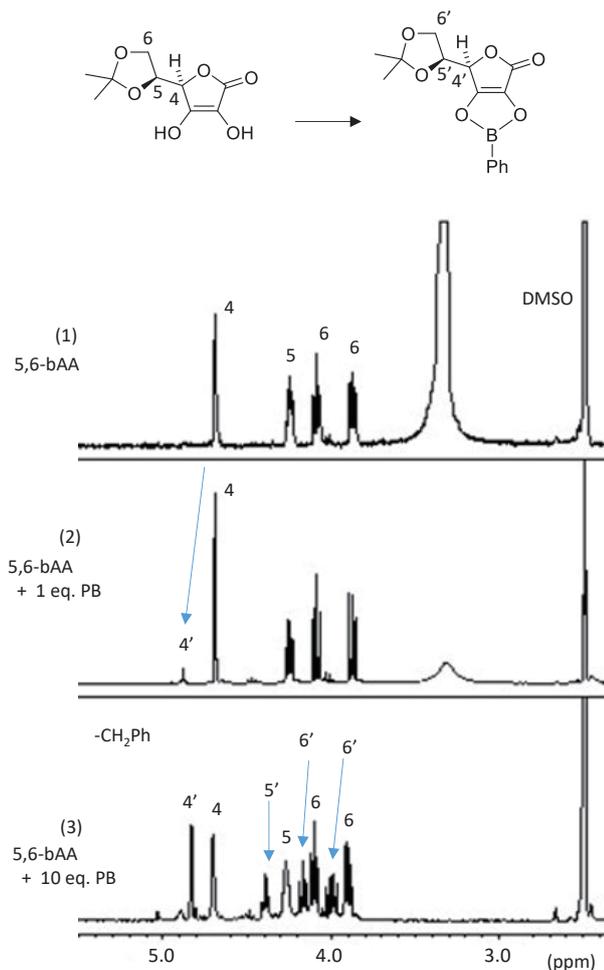


Fig.4. $^1\text{H NMR}$ スペクトル (50 mM of 5,6-bAA in $\text{DMSO-}d_6$) (1) 5,6-bAA, (2) 5,6-bAA に 1 当量の PB を添加し、18 時間後、(3) 5,6-bAA に 10 当量の PB を添加し、18 時間後

スペクトル(3)において、ピーク 4 と 4' の面積比から、およそ 5,6-AA ボロン酸エステルを 36% と見積もった (64% は 5,6-bAA のまま)。また、この比率と Scheme 1 の正反応・逆反応を考慮すると、2,3 位置における濃度平衡定数を、およそ $1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ と見積もった。

この値は、5,6 位における値 (2.4×10^{-1}) のおよそ 1/160 であり、2,3 位の反応性が極端に低い。Fig.5 に示すように、2,3 位は sp^2 混成軌道を取っており、平面性が高い。したがって、ボロン酸エステルを生成した場合に、この平面性が安定な五員環形成に不利なためと考えられる。

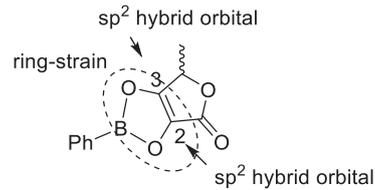


Fig.5. AA 誘導体の 2,3 位における五員環構造

3-2. AA と PB のエステル形成反応の評価と比較:

前項同様に、 $\text{DMSO-}d_6$ 中、無置換 AA に PB を 1 当量と 10 当量添加後、 $^1\text{H NMR}$ スペクトルを測定した (Fig.6)。

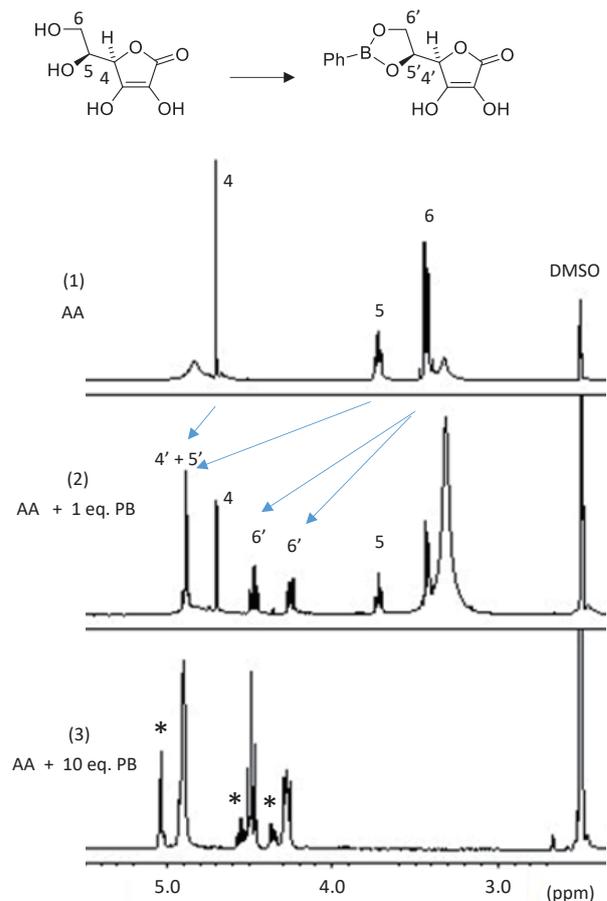


Fig.6. $^1\text{H NMR}$ スペクトル (50 mM of AA in $\text{DMSO-}d_6$) (1) AA, (2) AA に 1 当量の PB を添加し、18 時間後、(3) AA に 10 当量の PB を添加し、18 時間後

スペクトル(2)の結果から、PB を 1 当量加えたとき、AA ボロン酸エステルに伴うシングナルが観測できた。ピーク 4+5 の面積とピーク 4'+5' の面積の比較をすることで、ボロン酸エステルの生成率をおよそ 52% と見積もった (48% は AA のまま)。前項と同様に、濃度平衡定数をおよそ $1.2 \times 10^{-1} \text{ M}$ と見積もった。

PB を 10 当量加えたとき、AA に基づくピークは完全に消失し、全ての AA が PB と反応したといえる (スペクトル(3))。さらに、5.1, 4.5, 4.3 ppm 付近に新たなピーク (*印) が観測された。AA に対して大過剰な PB を加えたことによって、AA の 2 箇所のジオール部位に 2 つの PB が結合したジエステルではないかと推定している。

AA, 2,3-bAA, 5,6-bAA 由来の 3 種のボロン酸エステルを比較するため、10 当量の PB を加えて 18 時間経過後の ^1H NMR を比較した (Fig. 7)。Fig.s 3, 4 及び 6 の各スペクトル(3)を抜粋したものである。

Fig.7 の(2)と(3)をみると、そのスペクトルが酷似してお

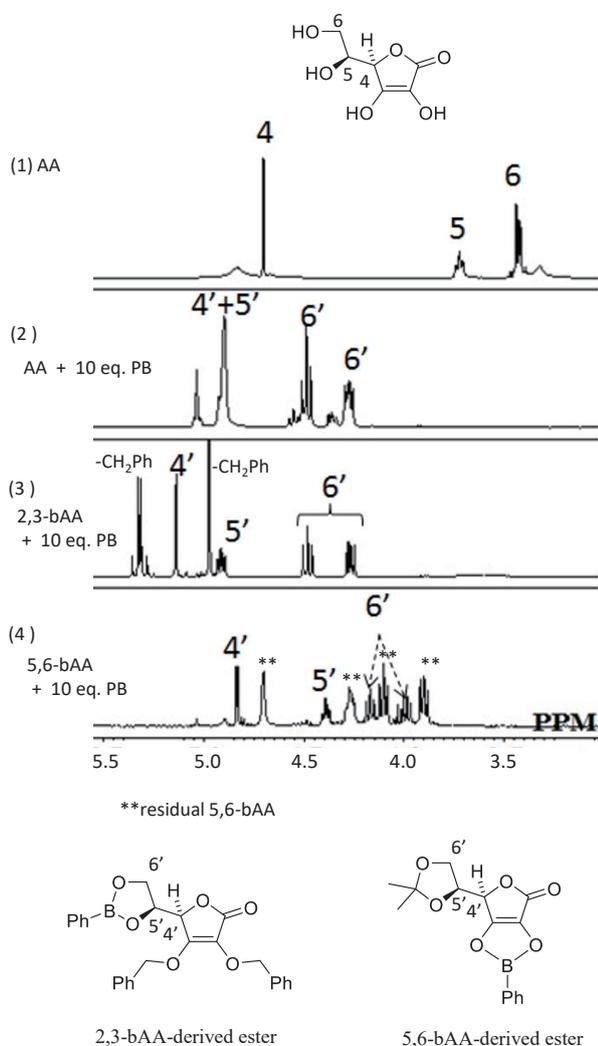


Fig.7. AA と AA 誘導体の各種 ^1H NMR スペクトル (50 mM of AA or bAA in $\text{DMSO}-d_6$) の比較、および対応するボロン酸エステルの構造

(1) AA, (2) AA+10 当量 PB, (3) 2,3-bAA + 10 当量 PB, (4) 5,6-bAA+10 当量 PB

り、AA がボロン酸モノエステルを形成するときは、5,6 位で反応 (Fig.6) することが分かる。これは 3-1 項で見積もった濃度平衡定数が AA と 2,3-bAA とで近い値 (それぞれ $1.2 \times 10^{-1} \text{ M}$ と $2.4 \times 10^{-1} \text{ M}$) であること、反応性が 5,6 位 \gg 2,3 位であることの実験結果によく一致する。

4. まとめ

L-アスコルビン酸 AA とフェニルボロン酸 PB を混合した時、そのボロン酸エステル化の反応挙動を評価した。比較対象として、反応点の制限を目的とし、2,3 位を保護した AA 誘導体 (5,6 位ジオール体) と、5,6 位を保護した AA 誘導体 (2,3 位ジオール体) を合成し、同じように PB との反応挙動を評価した。評価は、 ^1H NMR スペクトル (30°C , 50 mM $\text{DMSO}-d_6$) の比較により行った。

AA 誘導体の評価から、5,6 位ジオール体の濃度平衡定数は、2,3 位ジオール体のそれに比べて 160 倍大きかった。AA の濃度平衡定数は、5,6 位ジオール体が反応する場合の値に近かった。 ^1H NMR スペクトルの比較によって、AA と PB がエステル形成する場合、AA に 2 か所あるジオール部位のうち、5,6 位ジオールが優先的に反応することを明らかにした。また、測定した条件下では、PB と AA を等モル量混合すると、約半分の AA がエステル化することが分かった。

以上の結果から、AA とボロン酸誘導体を用いた機能性物質創製に向けて、重要な知見が得られ、また評価方法の 1 つを確立できた。

参考文献

- [1] 山本格: 安定・持続型ビタミン C の発明から大学発ベンチャーの立ち上げと保健機能性食品の誕生までの道程, *日本薬理学会誌*, **132**, 160, (2008).
- [2] Atanu Chakraborty, Nikhil R. Jana: Vitamin C-Conjugated Nanoparticle Protects Cells from Oxidative Stress at Low Doses but Induces Oxidative Stress and Cell Death at High Doses, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**(48), 41807, (2017).
- [3] Greg Springsteen, Binghe Wang: A detailed examination of boronic acid-diol complexation, *Tetrahedron*, **58**(26), 5291, (2002).
- [4] Lihong He, Dominic E. Fullenkamp, José G. Rivera, Phillip B. Messersmith: pH responsive self-healing hydrogels formed by boronate-catechol complexation, *Chem. Commun.*, **47**, 7497, (2011).
- [5] Yanzhai Wang, Junjiao Yang, Jing Yang: Synthesis and self-assembly of novel amphiphilic copolymers poly(lactic acid)-block-poly(ascorbyl acrylate), *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **49**(18), 3988, (2011).
- [6] Hiroharu Kato, Tomohiro Kino, Fumihiko Yamamoto, Tetsuo Kaneshiro, Takahiro Mukai, Minoru Maeda: *Chem. Phar. Bull.*, **55**(12), 1700, (2007).