

発表番号 7 (0310)

ビタミン B₁₂ 修飾電極による脱塩素化反応

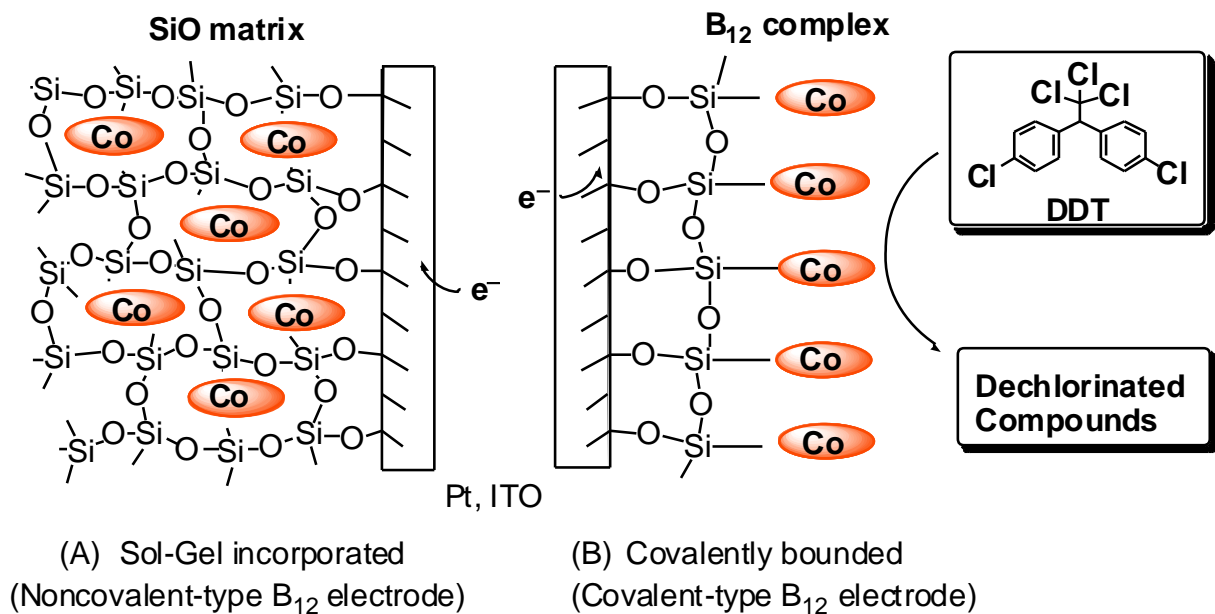
助成研究者：久枝良雄（九州大学大学院工学研究院応用化学部門）

共同研究者：畷越 恒（九州大学大学院工学研究院応用化学部門）

増子隆博（九州大学大学院工学研究院応用化学部門）

イオン交換膜法により海水から製造された塩素は、有用な有機塩素化合物へと変換され、化学工業や生活必需品として人類の幸福のために利用されている。しかし、一方ではテトラクロロエチレン(PCE)に代表される有機塩素化合物は、深刻な環境汚染物質として問題視され、効率の良い除去・分解法の開発が望まれている。既存の微生物の浄化作用を利用した生物化学的手法では、反応条件の制限や基質選択性という点で条件が限定され、大量かつ迅速に広範な有機塩素化合物を分解するには適していない。

近年、脱ハロゲン化呼吸するビタミン B₁₂ 依存性酵素が発見され、その環境浄化機能が注目されている。このような背景から、B₁₂ 酵素を模範として、環境負荷物質を無害化する完全人工型の分子デバイスの開発に挑戦してみようという着想に至った。本研究では、ビタミン B₁₂ 誘導体によるDDTなどの有機ハロゲン化物の還元的分解反応に成功した。さらに、ビタミン B₁₂ 錯体をITO電極上に集積した非共有結合型 B₁₂ 修飾電極および共有結合型 B₁₂ 修飾電極の開発に成功し、効率良く脱塩素化する手法を見出した。



ビタミン B₁₂ 修飾電極による脱塩素化反応

久枝良雄 (九州大学大学院工学研究院応用化学部門)

鳶越 恒 (九州大学大学院工学研究院応用化学部門)

増子隆博 (九州大学大学院工学研究院応用化学部門)

1. 研究目的

イオン交換膜法により海水から製造された塩素は、有用な有機塩素化合物へと変換され、化学工業や生活必需品として人類の幸福のために利用されている。しかし、一方ではテトラクロロエチレン(PCE)およびトリクロロエチレン(TCE)に代表される有機塩素化合物は、深刻な環境汚染物質として問題視され、効率の良い除去・分解法の開発が望まれている。既存の微生物の浄化作用を利用した生物化学的手法では、反応条件の制限や基質選択性という点で条件が限定され、大量かつ迅速に広範な有機塩素化合物を分解するには適していない。近年、脱ハロゲン化呼吸するビタミン B₁₂ 依存性酵素が発見され、その環境浄化機能が注目されている。このような背景から、B₁₂ 酵素を模範として、環境負荷物質を無害化する完全人工型の分子デバイスの開発に挑戦してみようという着想に至った。本研究では、ビタミン B₁₂ 誘導体による有機ハロゲン化物の分解反応と、ビタミン B₁₂ 錯体を ITO 電極上に集積し、効率良く脱塩素化するための基礎的知見研究を行った。

金属酵素の一つであるビタミン B₁₂ はコバルトを中心金属とする錯体であり、その触媒作用は有機合成化学的観点からも極めて興味深い[1]。前述のように、脱塩素化反応を行う菌体中に本酵素が存在することが明らかにされ、脱塩素化触媒としての応用が期待されている[2,3]。ビタミン B₁₂ 酵素の鍵中間体は、コバルト・炭素結合をもつ有機金属錯体である。この結合は Co(I)種と有機ハロゲン化物との反応により容易に生成し、また酸化還元・光照射・加熱などの外部刺激により任意に開裂させることができる。本研究では、脱ハロゲン化反応を行うビタミン B₁₂ 依存性酵素に着目し、B₁₂ モデル錯体を電解メディアータとして用いて有機ハロゲン化物の電気分解反応を行った。その際、錯体をゾル-ゲル法及び化学修飾法により電極上に固定化することで、錯体触媒の耐久性及び電流効率の向上を目指した。

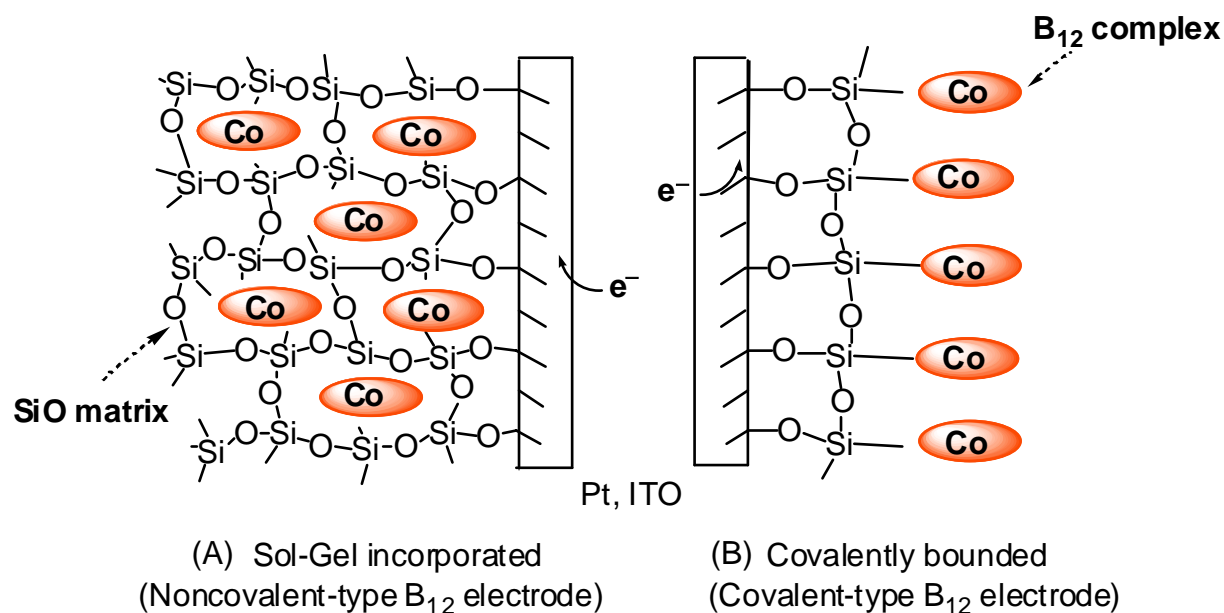


Fig. 1 Two types of vitamin B₁₂ modified electrodes.

2. 研究方法

測定機器：NMR は、ブルカー社製 Avance 500 超伝導核磁気共鳴吸収装置を用いて測定した。超高分解能走査型電子顕微鏡(SEM)は、日立 S-5000 を用いて測定した。いずれも、九州大学中央分析センター工学分室に設置の装置を利用した。

化合物：ビタミン B12 モデル錯体 [Cob(II)7C₃ester]ClO₄, 1 は(Fig.2)、文献記載の方法[4,5]により合成し、NMR 及び MALDI-MS で同定した。その他の化学試薬は、市販のものを使用した。

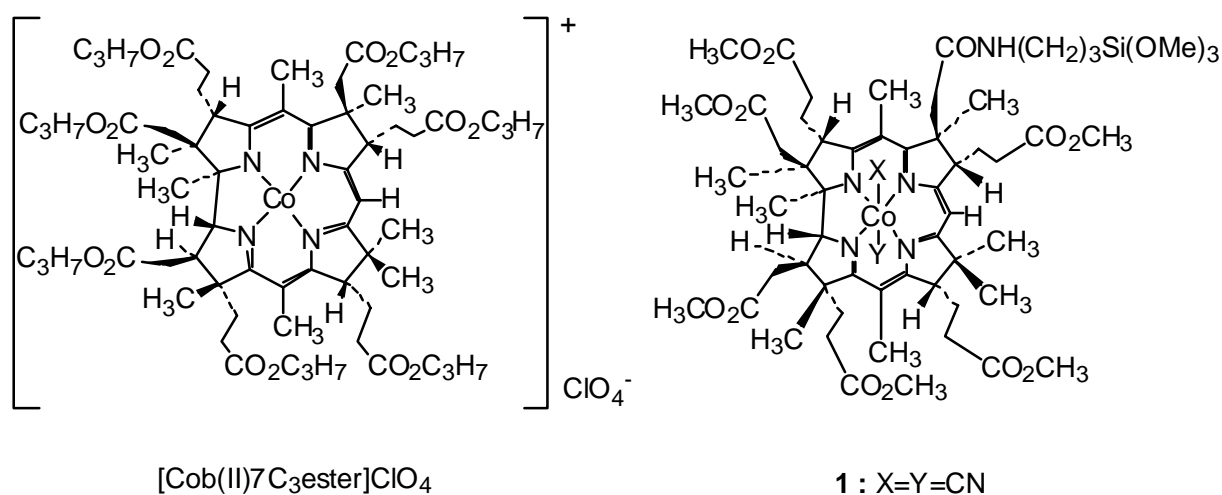


Fig. 2 Structure of vitamin B₁₂ model complexes.

修飾電極 A の作製 : $\text{Si}(\text{OEt})_4:\text{EtOH}:0.1\text{N-HCl}=1:8:4$ の溶液を調整し、室温で 24 時間攪拌しゾル溶液を作製した。この溶液に $[\text{Cob}(\text{II})7\text{C}_3\text{ester}]\text{ClO}_4$ 錯体を EtOH に溶かして加え、さらに室温で 1 時間攪拌した後、ITO 基板の上にディップコーティング法により固定化し(基板引き上げ速度 100 および 50 mm/min)、80 °C で 12 時間エージングしゲル化した。最後に修飾電極を 0.1M-KCl 水溶液に数日浸し、ビタミン B12 固定ゾル-ゲル修飾電極とした。作製した修飾電極は、SEM および XPS により同定した。電気化学的性質をサイクリックボルタモグラム法により評価した(対極:Pt, 参照電極:Ag/AgCl, 溶媒: H_2O , 支持電解質:0.1M-KCl)。

修飾電極 B の作製 : 白金表面を 0.5M 硫酸中+1.9 V vs. Ag/AgCl で酸化し、1 を含む乾燥トルエン中(5 mM)に 30 分浸した後、物理吸着物をトルエン及びジクロロメタンで洗浄することにより作製した。作製した修飾電極は、XPS による表面分析及び CV 測定(対極:Pt, 参照電極:Ag/AgCl, 溶媒:DMF, 支持電解質:0.1M-*n*-Bu₄NCIO₄)により評価した。

3. 研究結果と考察

3.1 修飾電極の同定と電気化学的挙動

修飾電極 A ディップコーティング法では、基板の引き上げ速度により膜厚が変化することが知られており[6]、SEM による破断面観察の結果、膜厚は引き上げ速度が 100mm/min のもので約 330nm、50 mm/min のもので約 170 nm であった(Fig. 3)。また XPS 測定により Co と Si 原子の組成比を求めると、いずれも Co:Si=約 1:20 であった。膜厚が 330 nm の修飾電極のサイクリックボルタモグラムを測定したところ、-0.42 V vs. Ag/AgCl に、Co(II)/Co(I)に帰属される酸化還元波が観測された。

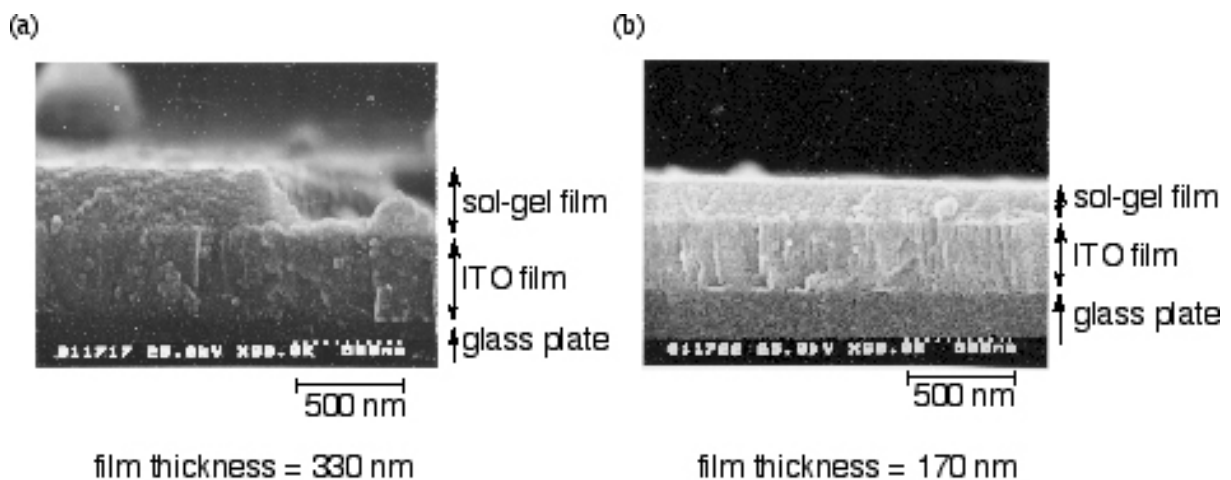


Fig. 3 Cross-sectional SEM photograph for the sol-gel modified ITO electrode trapped with vitamin B₁₂ derivative. (a) 100 mm min⁻¹, (b) 50 mm min⁻¹.

膜厚が 170 nm のものも、ほぼ同じ電位に酸化還元波が観測された。電荷量から見積もったコバルト錯体の固定化量は、膜厚が 330 nm のもので $6.2 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$ 、170 nm のもので $3.0 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$ であった。以上のことより、ゾル-ゲル修飾法により、電極基板上にビタミン B12 モデル錯体を電気化学活性を保持したまま均一に固定化できることが明らかになった。

修飾電極 B 上記ゾル-ゲル修飾電極(A)は、簡便かつ大量にビタミン B12 錯体を固定化することが出来るが、錯体はゲルマトリクス中に物理化学的に固定化されているだけで、溶媒への溶出が問題となる。一方修飾電極(B)では、電極固定化部位である $\text{Si}(\text{OMe})_3$ 基を修飾した B12 錯体を用い、共有結合により白金電極上に直接固定化しているため、高い耐久性が期待される。実際 CV 測定では、錯体の溶出が懸念される有機溶媒中でも、 $\text{Co}(\text{II})/\text{Co}(\text{I})$ に由来する明瞭な酸化還元波が $-0.72 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ に観測された(Fig. 4)。電荷量から見積もったコバルト錯体の固定化量は、 $1.6 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ であり、この値を基に、CPK モデルから見積もった被覆率は、約 80% であった。

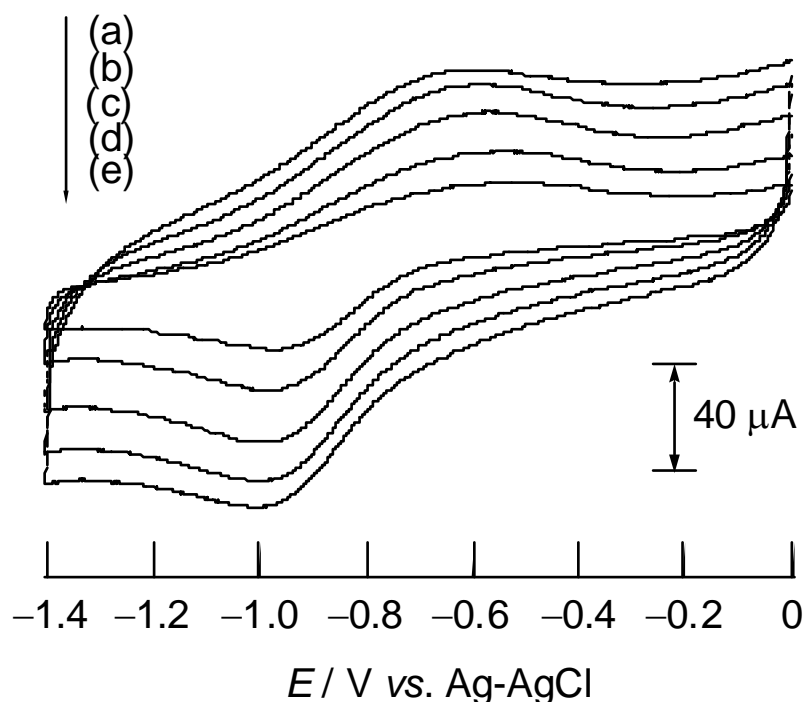


Fig. 4 CV of vitamin B₁₂ (1) immobilized Pt electrode in DMF containing of 0.1 M *n*-Bu₄NClO₄ at different scanning rates. Scan rate (a) 400, (b) 300, (c) 200, (d) 100, (e) 50 mVs⁻¹.

3.2 修飾電極の反応特性

修飾電極(A)を用い、有機ハロゲン化物(臭化ベンジル)の電解反応を行った。光照射下、 $-1.2\text{ V vs. Ag/AgCl}$ で定電位電解反応を行ったところ、対応する脱ハロゲン化物が効率良く生成した(Table 1)。固定化した錯体のターンオーバー数は2,000回を超え、高い耐久性と反応効率を有することが明らかとなった。光非照射下及び錯体を固定化していない電極を用いた場合はほとんど反応は進行せず、電極上に固定化したビタミン B12 錯体が触媒となり、光感受性のコバルト-炭素結合を経由して反応が進行していると判断される。

Table 1 Product analyses for the controlled-potential electrolyses of benzyl bromide using the modified electrode (A)^a

Dopant in sol-gel electrode	Electrolyses condition			Conversion (%)	Product ratio		Total T. N. ^d
	$h\nu^b$	Charge ^c / Time / h F mol ⁻¹			Toluene	Bibenzyl	
[Cob(II)7C ₃ ester] ⁺		0.1	2	8.5	6	94	2260
[Cob(II)7C ₃ ester] ⁺	×	0.015	2	0	0	0	-
None		0.019	2	0	0	0	-

^a Controlled-potential electrolyses were carried out at $-1.20\text{ V vs. Ag-AgCl}$ under an argon atmosphere. Initial concentration: benzyl bromide, $1.0 \times 10^{-2}\text{ M}$; KCl, 0.1 M .

^b Under irradiation by a 500 W tungsten lamp at a distance of 30 cm.

^c Electrical charge passed per mol of the substrate.

^d Total turnover number was estimated from the total amount of B₁₂ complex in the sol-gel electrode, $3.7 \times 10^{-9}\text{ mol/cm}^2$.

一方、修飾電極(B)を用いた場合は、 $-1.2\text{ V vs. Ag/AgCl}$ で臭化フェネチル定電位電解反応を行ったところ、スチレンが56%の収率で得られた。錯体のターンオーバーは6,000回を越え、修飾電極(A)と比較してさらに高い効率と耐久性を有することが明らかとなった。スピントラップ試薬(α -フェニル *N*-(*t*-ブチル)ニトロン)存在下で本反応を行ったところ、スピン付加物に由来する ESR シグナルを与え($g=2.006$, $A^{\parallel}=13.9\text{ G}$, $A^{\perp}=2.6\text{ G}$, $10^4\text{G}=1\text{ Tesla}$)、さらにスチレンの生成はほとんど抑制されたことより、Fig. 5に示す反応機構で進行していると推察される。

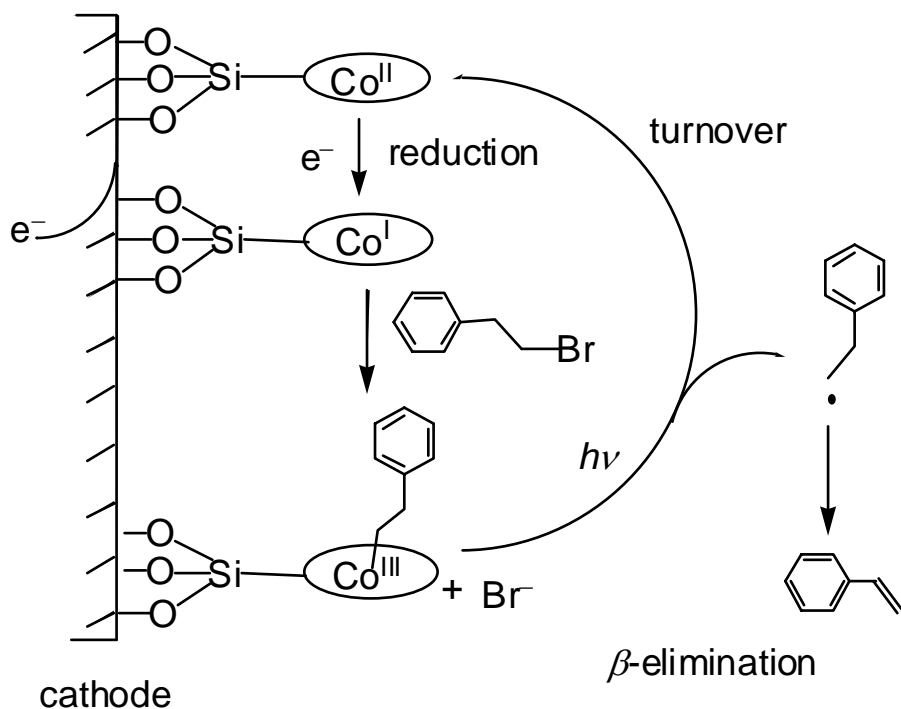
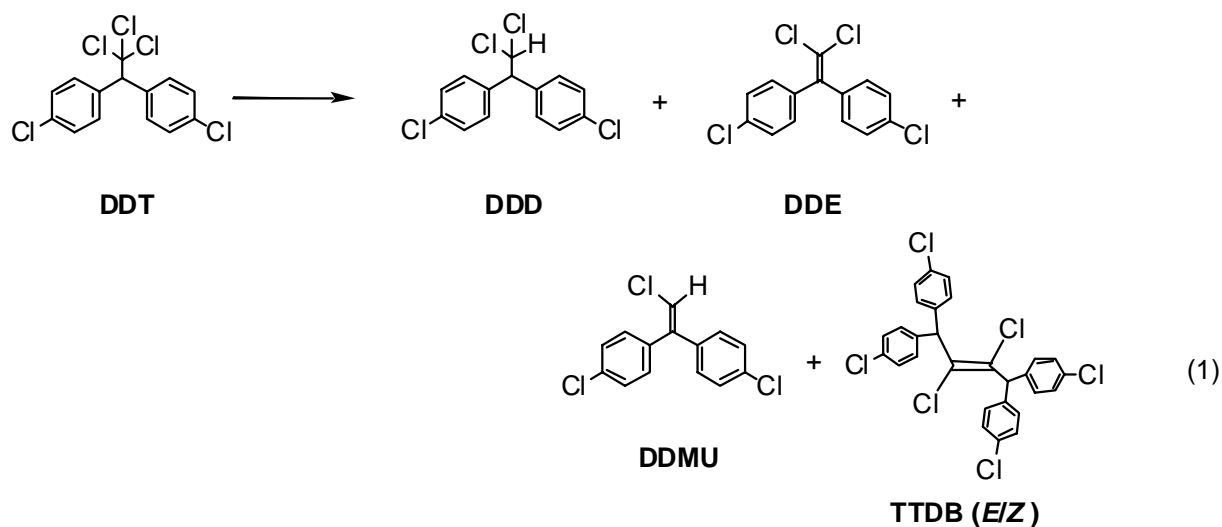


Fig. 5 Proposed mechanism for the electrolysis of phenethyl bromide catalyzed by vitamin B₁₂ modified electrode (B).

3.3 疎水性ビタミン B12 による DDT の分解反応

天然の B12 酵素の活性中心を有する疎水性ビタミン B12 ([Cob(II)7C₁ester]ClO₄) を電解メディエーターとして用い、環境汚染物質の 1 つである DDT の分解反応を行った。DDT は世界中で最も多量に用いられた殺虫剤であり、土壌中の残留 DDT が環境汚染物質として問題視されている。種々の条件で DDT の電解反応を行った(式(1)参照)。



可視光照射しながら基質に対して 1.4 F/mol 通電すると、DDT の脱塩素体 (DDD, DDE, TTTB) が得られた。また電解後、錯体触媒はほとんど分解しておらず、高い耐久性を有していた。一方、錯体触媒不在では、ほとんど電解反応は進行せず、また他のコバルト錯体 (コバロキシム) を用いた場合は、効率の良い電解反応は進行しなかった。以上の結果より、疎水性ビタミン B₁₂ 錯体は DDT の優れた脱ハロゲン化触媒として機能することが明らかとなった。電解中光敏感性のアルキル錯体に由来する電子スペクトルが得られたことより、Fig.6 に示す機構により反応が進行していると推察される。この反応は、電気化学的手法と可視光照射を併用した光駆動型の分子変換反応であり、クリーンで高効率なプロセスと言える。

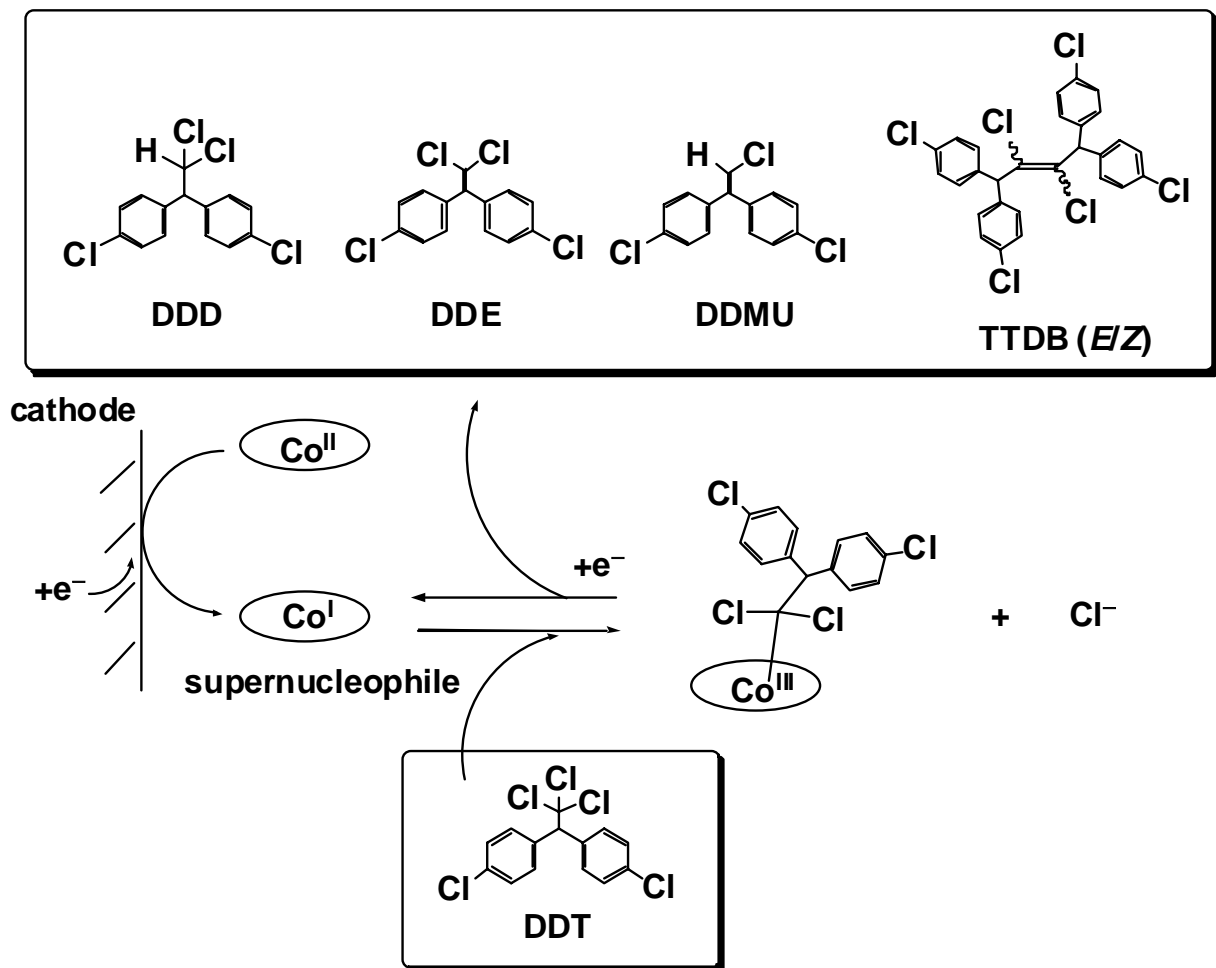


Fig. 6 Proposed reaction mechanism for the electrolysis of DDT mediated by hydrophobic vitamin B₁₂

4. 今後の課題

ゾル-ゲル法による修飾電極および共有結合により電極に直接結合させた修飾電極を作製する事に成功した。これらの修飾電極を用いることにより、効率良く有機ハロゲン化物の還元的脱ハロゲン化反応を進行させることができる。また、疎水性ビタミン B12 は、DDTなどの有機ハロゲン化物と還元的に反応するメディエーターとして高い性能を有していることも明らかになった。これらの知見より、ビタミン B12 修飾電極系を用いることにより、非常にソフトな反応条件下で、環境汚染物質である様々な有機塩素化合物の無害化が行えることが期待できる。

本研究で作製した修飾電極は高い反応性を有するが、電導性の関係から固定したビタミン B12 の数%しか有効に働いていないという問題点がある。今後は、修飾電極の電気伝導性を改善することにより、実用レベルの反応プロセスが可能になると言える。また、有機ハロゲン化物の分解のみならず、有用物質の合成反応への応用も期待できる。

5. 文献等

- [1] G. Wohlfarth and G. Diekert, *Chemistry and Biochemistry of B12*, ed. R. Banerjee, Wiley-Interscience, **1999**, 871.
- [2] D. R. Burris, C. A. Delcomyn, M. H. Smith, A. L. Roberts, *Environ. Sci. Technol.*, **1996**, *30*, 3047.
- [3] 久枝良雄、鳶越恒、*化学*, **2003**, *58*, 49.
- [4] H. Shimakoshi, A. Nakazato, M. Tokunaga, K. Katagiri, K. Ariga, J. Kikuchi and Y. Hisaeda, *Dalton Trans.*, **2003**, 2308.
- [5] H. Shimakoshi, M. Tokunaga, K. Kuroiwa, N. Kimizuka and Y. Hisaeda, *Chem. Commun.*, **2004**, 50.
- [6] C. J. Brinker and G. W. Scherer, *SOL-GEL SCIENCE The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press **1990**.

Dechlorination Reaction Mediated by Vitamin B₁₂ Modified Electrode

Yoshio Hisaeda, Hisashi Shimakoshi, and Takahiro Masuko

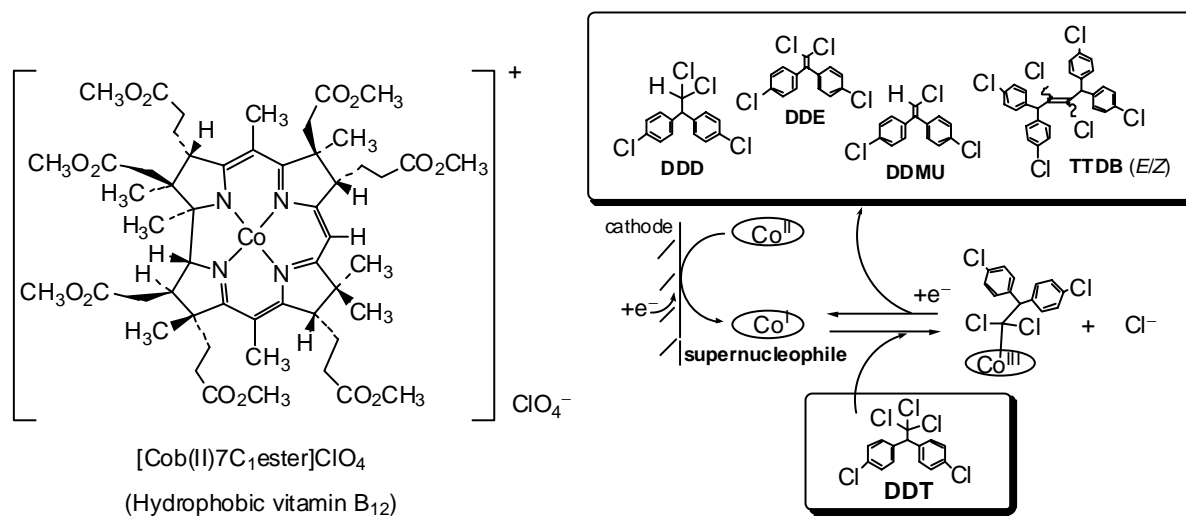
Department of Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University

We have been dealing with a hydrophobic vitamin B₁₂, heptamethyl cobyrinate perchlorate [Cob(II)7C₁ester]ClO₄, which has ester groups in place of the peripheral amide moieties of the naturally occurring cobalamin, and performed various enzymic model reactions using hydrophobic vitamin B₁₂ derivatives as catalysts by means of electrochemical methods.

Recently, it has been demonstrated that certain bacteria can use tetrachloroethane as electron acceptors by reducing it to cis-dichloroethane. An enzyme so-called *reductive dehalogenase* contains cobalamin as cofactor. A Co(I) species of cobalamin is a supernucleophile and reacts with an alkyl halide to form an alkylated complex with dehalogenation. Thus, the superior ability of cobalamin for reductive dehalogenation prompted us to investigate the catalysis of a cobalamin derivative for degradation of various halogenated organic compounds.

Two types of vitamin B₁₂ modified electrodes were prepared by a sol-gel method and a chemical reaction on the surface of the electrode. A hydrophobic vitamin B₁₂ was readily trapped on ITO electrode by a sol-gel reaction to form a noncovalent-type B₁₂ modified electrode. On the other hand, a new hydrophobic vitamin B₁₂, which has a trimethylsilyl group, was covalently immobilized into Pt electrode. Both vitamin B₁₂ modified electrodes have high reactivity for organic halides to form dehalogenated products under the electrochemical reductive conditions.

1,1-Bis(4-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane (**DDT**) is characterized by a pronounced insecticidal property and has been used worldwide for the last several decades despite its known hazardous effects on human health and wildlife. Therefore, much attention will be focused on the reaction between the hydrophobic vitamin B₁₂ and **DDT** under electrochemical conditions. In the present work, electrolysis of **DDT** catalyzed by hydrophobic vitamin B₁₂ was carried out as shown in Scheme 1.



Scheme 1.