

解 説

バルビツール酸誘導体と 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンの 水溶液中多種包接複合体形成についての熱力学的考察

安藝初美, 山本孫兵衛

(受取日: 1998年8月31日, 受理日: 1998年9月14日)

Thermodynamic Aspects of Multiple Inclusion Complexation between Barbiturates and 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin in Aqueous Solution

Hatsumi Aki and Magobei Yamamoto

(Received August 31, 1998, Accepted September 14, 1998)

Isothermal titration calorimetry has been employed to evaluate inclusion mechanism associated with complexation between 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) and barbiturates (BAs). The association constants, stoichiometry, and enthalpic changes were calculated from calorimetric titration curves using a non-linear least squares method. The inclusion modes (structures) were explored by relating the thermodynamic parameters to the chemical structures of BAs molecule and the cavity size of HP β CD. Two different types of BAs-HP β CD inclusion complexes at 1:1 stoichiometry were realized by un-ionized BAs, whereas only one type of inclusion was by barbital. The first type of BAs-HP β CD with higher association constant was largely entropically driven with the constant values of ΔG_1 , ΔH_1 and ΔS_1 at various pH, thus the hydrophobic interaction dominated the stabilization of the complexes. The second type was characterized by large negative values of ΔH_2 and small ΔS_2 at pH < pKa values of BAs, reflecting van der Waals' interaction and/or hydrogen bonding formation, and all the thermodynamic parameters markedly decreased at pH > pKa. It is indicated that the R2 substituent at 5C in barbituric acid ring of BAs was included within HP β CD cavity in the first type of complexes and that the barbituric acid ring penetrated into the cavity in the second type. In both types, the ethyl-side chain of R1 substituent remained outside of the cavity. The results were agreed with those from ^{13}C -NMR spectrometry. The inclusion geometry of the complexes were estimated by molecular dynamics calculations.

1. 緒 言

包接複合体医薬品は包接格子をもつホスト分子とその空

洞内にゲスト薬物分子が包接された1種の分子化合物である。ホスト分子としては、シクロデキストリン、クラウンエーテル、デオキシコール酸等が知られているが、なかん

福岡大学薬学部: 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1,

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

© 1998 The Japan Society of Calorimetry and Thermal Analysis.

2. 理 論

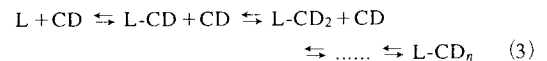
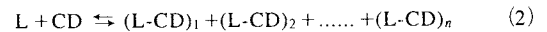
ずく毒性が低い、水溶性が大きい、さらに製造供給が比較的容易である等の理由から各種のシクロデキストリンが医薬品として実用化されている。医薬品において、各種のシクロデキストリン包接複合体はゲスト薬物分子の安定性の向上、溶解度および溶解速度の増大、固形化維持、不快臭味のマスキング、揮散性防止など製剤物性の改善を一次利用目的としている。¹⁻³⁾ さらに、臨床上適正な生物学的利用能を与えるために、ペプチド系薬物、プロスタグランジン等の脈管内投与適用あるいは経腸、経皮、経鼻投与適用を二次目的として製剤の開発が進んでいる。⁴⁻⁷⁾

薬物とシクロデキストリンの水溶液中の包接複合体形成については、溶解度法、分光光度法およびNMRスペクトル法等を活用して複合体形成定数を中心に論ぜられているが、薬物の安定性および溶解性や生物学的利用能の適正化に大きく寄与する包接複合体の包接モード（構造）に関しては、いまだに明白さを欠いている。その原因は、水溶液中の複合体が唯1種類の包接モードが形成されると想定されていることにあり、実際に2種類以上の包接モードによる複合体が存在すれば、複合体形成定数は混在する複合体の平均値として算出されるから、各種複合体の形成定数および親和力の真の値を求めるのが不可能なことにある。包接複合体形成の起動力が共有結合やイオン性結合ではなく、ファンデルワールス力、疎水性相互作用および水素結合等の弱い分子間相互作用に依存していることから、⁸⁻¹⁰⁾ 複合体形成過程の熱力学的諸量を定量して、複合体の包接モードを明確にすることが重要である。熱力学的諸量を直接検証する手法である熱量測定（カロリーメトリー）は、乳・懸濁液や分光学的に不活性物質でも少量（低濃度）からの測定が可能であり、熱量測定値の解析技法を工夫すれば容易に多種包接モードの複合体形成を検討することができる。¹¹⁻¹⁷⁾ これまでの熱量測定値解析では、ほとんどの薬物はモル比1:1の複合体形成モデルを前提にした解析法であり、シンナリジン、テルフェナジン、クロルヘキシジンやグリコロール酸等の比較的大きい分子構造をもつ薬物のみがモル比1:2の複合体形成を形成するにすぎない。¹³⁻¹⁵⁾ しかし、水溶液中で存在可能な多種包接モードの包接複合体に関しては、その解析は依然として未展開のままである。

本論文では、反応熱量測定値から種々の包接モードの複合体形成定数および熱力学的パラメータを解析し、これらの諸特性に基づいて包接モードを考察する。ゲスト薬物分子はバルビツール酸誘導体を、ホスト分子は水溶性が高く、毒性の低いヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを選択した。さらに、熱量測定法で推定した包接モードを検証するために¹³C-NMRスペクトル測定法、および包接モードの水溶液中における平衡状態の確認には分子動力学的计算法を用いた。

2.1 水溶液中における薬物とシクロデキストリンの包接複合体形成

一般に、薬物とシクロデキストリンの水溶液中での各種包接複合体形成では、薬物の分子構造や化学的性質およびシクロデキストリンの空洞径や置換基の種類など空間的特性によって包接モードが異なり、次の(i)～(iii)の複合体形成が考えられる。すなわち、(i)包接複合体の形成過程は1段階反応で終り、薬物リガンド(L)とシクロデキストリン(CD)がモル比1:1で複合体を形成し、(1)式の平衡である。このとき、CDがLの特定部位のみを包接する複合体(L-CD)を形成している。(ii)形成過程が1段階反応のみでモル比1:1の包接複合体を形成するが、(2)式で表されるように、Lの包接部位が異なるn種類の包接複合体(L-CD)_nが形成される。(iii)形成過程は(3)式で表されるn段階の逐次反応であり、モル比1:nの包接複合体(L-CD)_nが逐次形成される。



2.2 熱力学的パラメータの算出

a) L-CD複合体形成反応熱量(Q_r)からみかけの形成パラメータ(n_{app} , K_{app} , ΔH_{app})を算出する。 Q_r は(4)式で示されるように複合体形成量($[L-CD]$)に比例する。

$$Q_r = \Delta H_{app} [L-CD] \quad (4)$$

ここで、 ΔH_{app} は複合体1モル当りのみかけの形成(反応)エンタルピー変化である。みかけのn種類の複合体形成(n_{app})でみかけの形成定数を K_{app} とすると、 Q_r はLの全濃度(L_1)およびCDの全濃度(CD_1)の関数として(5)式で表される。

$$Q_r = \Delta H_{app} (A - \sqrt{A^2 - 4n_{app}L_1CD_1})/2 \quad (5)$$

$$\text{ただし、} A = n_{app}L_1 + CD_1 + 1/K_{app}, \quad n_{app}\Delta H_{app} = \Delta H_{max}$$

ここで、 ΔH_{app} と ΔH_{max} の初期値はそれぞれ熱量滴定曲線の立ち上がり直線部分およびプラトー値から実験的に求められるから、 n_{app} の値を推算できる。

b) (1)式の1種類包接モードの複合体の形成定数および形成エンタルピー変化をそれぞれ、 K_1 および ΔH_1 とすると、 Q_r は(6)式で表され、(7)式の残差平方和(SSR)を解析すれば各パラメータが算出できる。

$$Q_r = \Delta H_1 (A - \sqrt{A^2 - L_1CD_1})/2 \quad (6)$$

ただし、 $A = L_i + CD_i + 1/K_i$

$$SSR = \sum (Q_{r,i} - Q_{c,i})^2 \quad (7)$$

$(i = 1, 2, \dots, N)$

ここで、 N はデータ数、 $Q_{r,i}$ と $Q_{c,i}$ はそれぞれ形成熱量の
実測値および計算値を示す。

c) (2)式の独立して形成されるモル比 1 : 1 の n 種類包接
モードの各複合体形成定数および標準エンタルピー変化を
それぞれ K_i と ΔH_i とすると、 Q_r は (8) 式で、エンタルピー
変化は (9) 式で表される。

$$Q_r = L_i \sum (\Delta H_i K_i CD_i) / (1 + K_i CD_i) \quad (8)$$

$(i = 1, 2, \dots, n)$

$$\sum \Delta H_i = \Delta H_{max} \quad (9)$$

例えば、2種類包接モードの複合体形成 ($n = 2$) では、
 CD_i は CD の非結合濃度であり (10) 式の解から求められる
ので、(11) 式の内線形最小二乗法により各パラメータを算
出することができる。

$$[CD_i]^3 + \alpha [CD_i]^2 + \beta CD_i + \gamma = 0 \quad (10)$$

$$\text{ただし } \alpha = L_i(\Delta H_1 + \Delta H_2) + (1/K_1 + 1/K_2) - CD_i$$

$$\beta = L_i(\Delta H_1/K_2 + \Delta H_2/K_1) - CD_i(1/K_1 + 1/K_2) + 1/K_1 \cdot 1/K_2$$

$$\gamma = -CD_i/K_1 \cdot 1/K_2$$

$$SSR = \sum \{(Q_{r,i} - Q_{c,i}) + (CD_{i,i} - CD_{c,i})^2\} \quad (11)$$

$(i = 1, 2, \dots, N)$

ここで、 $CD_{i,i}$ および $Q_{r,i}$ は CD 全濃度と形成反応熱量の
実測値、 $CD_{c,i}$ および $Q_{c,i}$ はそれぞれの計算値を示す。

d) (3) 式で表される逐次反応による i 段階反応の形成定
数を K_i 、エンタルピー変化を ΔH_i とすれば、 Q_r は次式で表
される。

$$Q_r = L_i \sum \Delta h_i k_i [CD_i]^i \quad (12)$$

$(i = 1, 2, \dots, n)$

ここで、 $\Delta h_i = \sum \Delta H_i = \Delta H_{max}$ 、 $k_i = \prod K_i$ であり、 L_i およ
び CD_i はそれぞれ (13) 式と (14) 式で表される。

$$CD_i = CD_f + L_i \sum i k_i [CD_i]^i \quad (13)$$

$$L_i = L_f (1 + \sum k_i [CD_i]^i) \quad (14)$$

例えば、2段階反応によるモル比 1 : 2 の包接複合体形成
($n = 2$) を仮定すると、(15) および (16) 式が得られるの
で、(11) 式を用いて各パラメータが算出できる。

$$Q_r = L_i(\Delta h_1 k_1 CD_f + \Delta h_2 k_2 [CD_f]^2) / (1 + k_1 CD_f + k_2 [CD_f]^2) \quad (15)$$

$$CD_i = CD_f + L_i(k_1 CD_f + 2k_2 [CD_f]^2) / (1 + k_1 CD_f + k_2 [CD_f]^2) \quad (16)$$

以上で得られた各種包接モードの ΔH_i および K_i 、気体定
数 (R) および絶対温度 (T) から標準自由エネルギー変化
(ΔG_i) および標準エントロピー変化 (ΔS_i) が求められる。

$$\Delta G_i = -RT \ln K_i = \Delta H_i - T\Delta S_i \quad (17)$$

計算はすべて FORTRAN プログラムで UX ソフトウェア
サブルーチンを用い、NEC UP4800/650 ワークステーション
で行った。

3. 実験

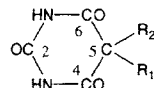
3.1 試薬

バルビツールナトリウム (B) とフェノバルビツールナ
トリウム (PHB) は和光純薬工業 (株) 製、ペントバルビタ
ールナトリウム (PB) は東京化成工業 (株) 製を直接使い、ア
モバルビツールナトリウム (AB) およびセコバルミツール
ナトリウム (SB) はそれぞれ日本新薬 (株) 製および吉富製
薬 (株) 製の注射用凍結乾燥品をエタノールから再結晶して
用いた。これらのバルビツール酸誘導体 (BAs) の構造は
Table 1 に示す。2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキスト
リン (HPβCD) は日本食品化工 (株) から提供されたものを
直接使用し、その平均質量と置換度は Pitha らの方法¹⁸⁾ を
用いて FAB-MS 測定から決定した。その他の試薬はすべて
特級品を使用した。

3.2 等温滴定微少熱量測定

BAs と HPβCD の包接複合体形成反応の微少熱量測定は
Thermal Activity Monitor 2277 型 (Thermometric 社製)
を用いて 25.0 ± 0.01 °C で行った。BAs および HPβCD はそ
れぞれ蒸留水または緩衝溶液に溶解し、ペリスタルポンプ
(Minipuls 2, Gilson 社製) を用いて混合セル内に一定流速
 0.01 ml min^{-1} で送液した。BAs の希釈熱量を記録計 (理
化電機 (株) 製) の基線にとり、HPβCD で滴定して混合熱
量を測定し、別途測定した HPβCD 溶液の希釈熱量との差熱
量を形成熱量 (Q_r) とした。

Table 1 Structures of barbiturates.



Barbiturates	R1	R2
Barbital (B)	CH ₃ -CH ₂ -	CH ₃ -CH ₂ -
Amobarbital (AB)	CH ₃ -CH ₂ -	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂ -
Pentobarbital (PB)	CH ₃ -CH ₂ -	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)-
Secobarbital (SB)	CH ₂ =CHCH ₂ -	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)-
Phenobarbital (PHB)	CH ₃ -CH ₂ -	C ₆ H ₅ -

3.3 ¹³C-NMR スペクトル測定

¹³C-NMR スペクトルはJEOL GX-400 (DEC-RSX-11M付)を用いて35℃, D₂O中で測定し, 2,2,3,3,3-*d*₄-3-トリメチルシリルプロピオン酸を内部標準としてBAsのケミカルシフト (δ_{free})を決定した。D₂O 10 ml 中BAs 25 mgに対し, モル比がHP β CD/BAs = 0.2~5.0になるようにHP- β CDを添加し, 12 h 遮光攪拌後に混合D₂O溶液の¹³C-NMR スペクトルのケミカルシフト ($\delta_{complex}$)を測定した。BAs各Cのシフト変化 ($\Delta\delta$: $\Delta\delta = \delta_{free} - \delta_{complex}$)は, BAsおよびHP β CDの全濃度 (L_t および CD_t)の関数(18)式で表される。

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{max}(B - \sqrt{B^2 - 4mL_tCD_t})/2mL_t \quad (18)$$

ただし, $B = mL_t + CD_t + 1/K_{NMR}$

ここで, K_{NMR} はBAs-HP β CD複合体のBAs各炭素が受ける相互作用の強さ(親和定数), m は化学量論数, $\Delta\delta_{max}$ はケミカルシフト変化の限界値である。

3.4 分子動力学計算

水溶液中のLとCDとの包接複合体形成の平衡化計算プログラムはKollmannら^{19, 20)}によるAMBER法(AMBER 4.0)を使用, CDのモデルには, β -シクロデキストリン(β CD)を用いた。MM3法で作成したBAsおよび β CDの

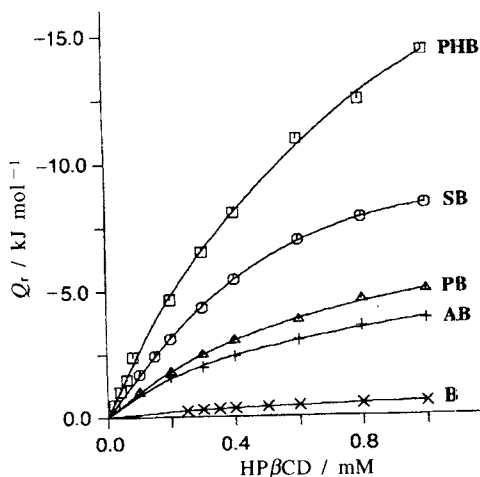


Fig.1 Calorimetric titration curves for barbiturates-2-hydroxy-propyl- β -cyclodextrin (BAs-HP β CD) complexations at pH 5.5 in 1/30 M phosphate buffer and 25°C. The concentrations of barbiturates used were 1.0 mM for B and 0.2 mM for AB, PB, SB and PHB. Points show the means of experimental data from triplicate measurements and solid lines represent the computer-generated best fit curves using Eq.(8).

初期構造を最適化し, BAsを β CD空洞内に, 周囲6 Åに359個のTIP3Pモデル水分子を配置した。包接複合体の平衡状態の分子動力学計算は定温, 低压および定積条件下(30p: $\Delta t = 0.001$ ps, 30,000 step, 294 K), NEC UP4800/650ワークステーションで行った。¹⁶⁾包接複合体の座標とエネルギーは50 step毎に取り出し, 包接複合体の構造変化アニメーションと時間に対するエネルギー, 温度, 圧力の変化図で平衡化を確認した。

4. 結 果

4.1 BAs-HP β CD複合体形成と形成反応熱量

Fig.1はpH 5.5, 1/30 Mリン酸緩衝液中, BAs-HP β CD複合体形成の熱量滴定曲線を示す。複合体形成は $\Delta H < 0$ の発熱反応であり, 形成熱量はBAsおよびHP β CD濃度の増加に伴い増大した。初めに, これらの滴定曲線を(5)式で解析し n_{app} , K_{app} および ΔH_{app} を算出した結果, 各パラメータにBAs濃度依存性は認められず(**Table 2**), 緩衝液の種類や塩濃度についても影響を受けなかった。¹⁶⁾ n_{app} 値からBは一種類, ABとPBは2種類, およびSBとPHBは3種類の複合体形成が予測されるので, B-HP β CD複合体形成については(6)式, その他のBAsについては(8)式の形成反応モデル($n = 2, 3$)を用いて解析すると, K_1 および ΔH_1 ともに $PHB > SB > PB > AB > B$ の順に大きい値を示した。また, PHBおよびSBの K_3 値が K_1 や K_2 に比較して過小のため, 第3種類包接モード複合体形成はほとんど無視できるものとした。**Table 3**には算出した熱力学的パラメータをまとめた。

4.2 複合体形成における溶液pHの影響

BAsおよびHP β CDを種々緩衝液(pH 5.0~10.5)に溶解して複合体形成反応熱量を測定した。形成熱量はpHがBAsのpK_a値以上で明らかに減少し, 複合体形成においては非解離形BAsの方が解離形BAsよりもHP β CDとの反応性が高く, 強い分子間相互作用が示唆された。PB-HP β CD

Table 2 Apparent association and thermodynamic parameters for BAs-HP β CD complexation in pH 5.5 phosphate buffer solution at 25°C.

Barbiturates	Conc. mM	n_{app}	K_{app} 10 ³ M ⁻¹	$-\Delta H_{app}$ kJ mol ⁻¹
Barbital	1.0	0.88 ± 0.22	10.7 ± 4.3	1.09 ± 0.16
Amobarbital	0.2	2.13 ± 0.13	4.74 ± 0.17	2.39 ± 0.28
Pentobarbital	0.2	2.41 ± 0.14	5.77 ± 0.21	2.54 ± 0.15
Secobarbital	0.2	2.69 ± 0.21	10.5 ± 0.8	3.92 ± 0.44
Phenobarbital	0.05	3.23 ± 0.29	11.9 ± 2.0	4.64 ± 0.45
	0.1	3.23 ± 0.12	12.8 ± 4.7	4.92 ± 0.33
	0.20	3.26 ± 0.30	12.0 ± 3.3	5.02 ± 0.26

Table 3 Thermodynamic parameters of BAs-HP β CD complexation in pH 5.5 phosphate buffer solution at 25 °C.

Barbiturates	$-\Delta G_1^*$	$-\Delta H_1^*$	ΔS_1^{**}	$-\Delta G_2^*$	$-\Delta H_2^*$	ΔS_2^{**}	$-\Delta G_3^*$	$-\Delta H_3^*$	ΔS_3^{**}
Barbital	22.40	1.092	54.4	—	—	—	—	—	—
Amobarbital	24.04	2.496	72.3	17.58	4.772	43.0	—	—	—
Pentobarbital	24.67	2.740	74.5	20.09	5.709	51.0	—	—	—
Secobarbital	26.34	3.210	77.6	22.21	8.005	47.7	12.43	3.890	28.7
Phenobarbital	27.75	5.521	74.6	21.69	12.87	29.6	13.03	5.500	25.3

*: kJ mol⁻¹, **: J mol⁻¹ K⁻¹

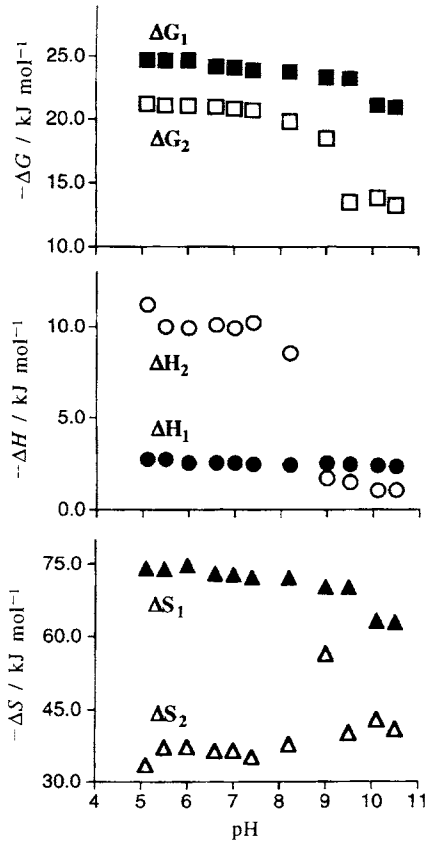


Fig.2 pH profiles of thermodynamic parameters for PB-HP β CD complexation in buffer solution. All open symbols represent thermodynamic parameters of the first type of inclusion modes and closed symbols are thermodynamic parameters of the second type of inclusion modes for the complexation.

およびB-HP β CD複合体形成における熱力学的パラメータ (ΔG_i , ΔH_i , ΔS_i) のpHによる影響をFig.2およびFig.3に示す。B-HP β CD複合体形成の標準熱力学的パラメータはpH > pKa = 7.91で急激に減少した。しかし、PB-HP β CD複合体形成では、 $-\Delta G_1$, $-\Delta H_1$ および ΔS_1 値はpH変化の

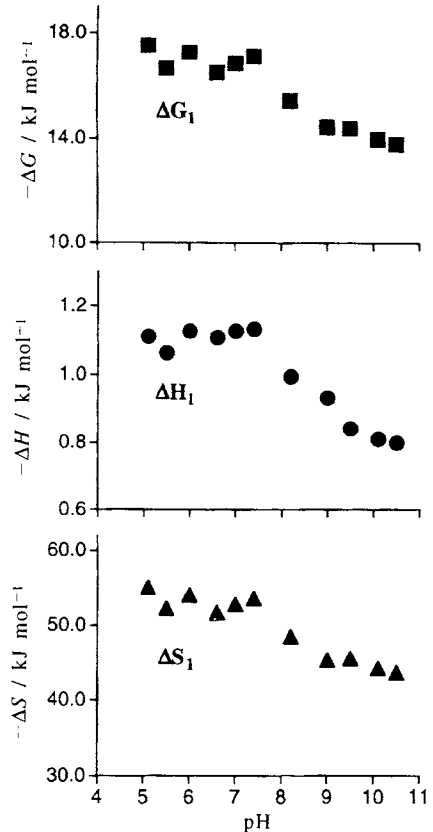


Fig.3 pH profiles of thermodynamic parameters for B-HP β CD complexation in buffer solution.

影響が少なくほぼ一定値をとるが、 $-\Delta G_2$ と $-\Delta H_2$ がpH > pKa = 8.11では減少、それに伴い ΔS_2 がやや増大した。AB, SBおよびPHBにも同様な傾向がみられた。^{16,17)}

4.3 ¹³C-NMR スペクトル測定

BA_s-HP β CD複合体の¹³C-NMRスペクトル測定からBA_s各Cの $\Delta\delta$ を求め、(17)式によって*m*と*K*_{NMR}を計算した結果、BA_sすべてのCについて*m* ≈ 1であった。¹⁶⁾ Fig.4にはB-HP β CDおよびPB-HP β CD複合体形成におけるBA_s各Cの $\Delta\delta$ 変化を示した。B-HP β CDでは、バルビツール酸

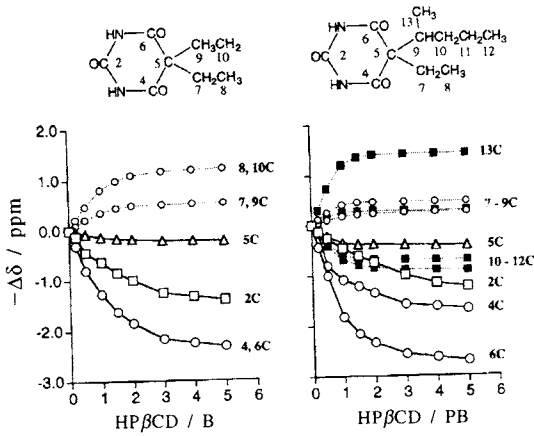


Fig.4 Changes in ^{13}C -NMR chemical shifts of PB (right) and B (left) in D_2O as a function of molar ratio of $\text{HP}\beta\text{CD}/\text{BAs}$.

環Cのみが高磁場シフトしたが、R1およびR2のエチル基Cはともに大きく低磁場シフトした。その他のBAs- $\text{HP}\beta\text{CD}$ では、バルビツール酸環2, 4および6位C (2C, 4C, 6C) の $\Delta\delta$ が顕著に高磁場シフトし、バルビツール酸環5位R1置換基のエチル基C (7C, 8C) のシグナルは反対に低磁場シフトした。さらに、PBのR2置換基のアルキル側鎖 (10C~12C) およびPHBのフェニル基 (10C~14C) は、 $\Delta\delta$ の変化度は他Cに比較すると若干小さいが、高磁場シフトした。

4.4 分子動力学計算

BAs- βCD 包接複合体の水溶液中の挙動は熱測定や ^{13}C -NMR スペクトル測定の結果を基に、次の3種類の包接モード (Mode I~III) について分子動力学計算によるシミュレーションを行った。BAsのバルビツール酸環を βCD の第二ヒドロキシ側から空洞内に包接 (Mode I)、同様にR2置換基を βCD の第二ヒドロキシ側から包接 (Mode II)、およ

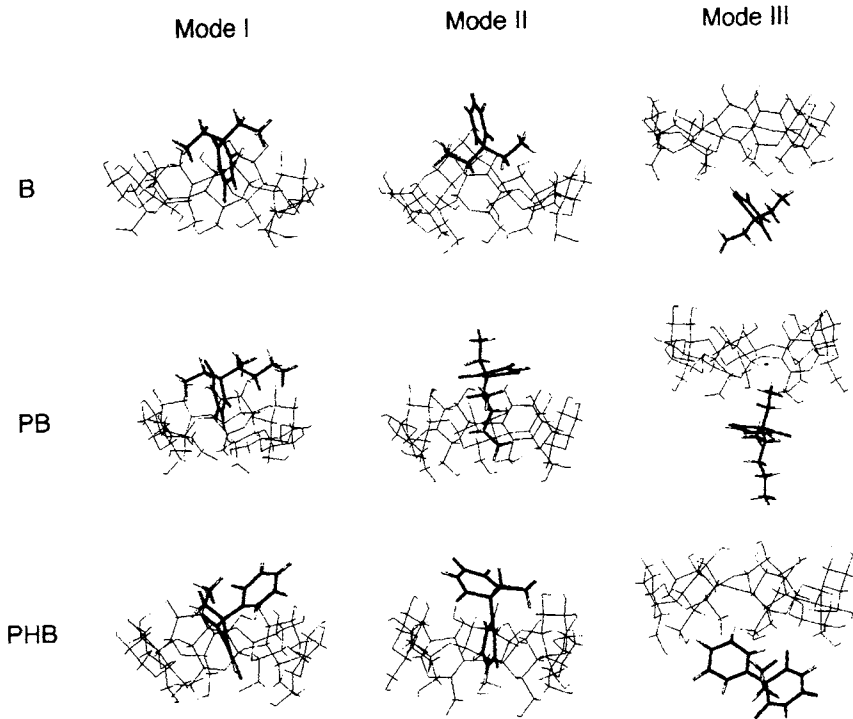


Fig.5 Inclusion geometries calculated by molecular dynamics simulation for B- βCD , PB- βCD and PHB- βCD complexes in aqueous solutions. All inclusion modes are represented as the final geometries through 30 ps simulation. The first geometries of Mode I and Mode II are inclusion modes with the barbituric acid ring and the R2 substituent of BAs inside the βCD cavity, respectively, whereas others are located at the rim of the secondary hydroxy side. Mode III is an inclusion mode where BAs penetrates into the cavity from the primary hydroxy side of βCD .

びBAsをβCDの第一ヒドロキシ側から空洞内に包接 (Mode III) を初期構造として、30 ps間の構造変化をアニメーション化した。Fig.5はB-βCD, PB-βCDおよびPHB-βCDの計算終了時の瞬間構造を取り出したものである。その結果、Mode IIIは、30 ps後には初期構造が崩れてBAsがβCD空洞から完全に追い出されてしまい、BAsが一級水酸基側から包接される可能性は皆無である。PB-βCDやPHB-βCDのMode IおよびMode IIは、ともに初期構造を維持し、これらの包接モードは安定である。このことはバルビツール酸環およびR2置換基がHPβCD空洞内に包接されやすいことを示唆している。また、B-βCDはMode Iのみが比較的初期構造を維持するが、バルビツール酸環はβCD空洞内に深くは包接され難い。

5. 考察

5.1 包接複合体形成と熱力学的パラメータ

BAs-HPβCD複合体形成の熱量測定曲線の解析結果から、AB, PB, SBおよびPHBはモル比1:1で2種類の包接複合体を形成することが明らかになった。複合体形成定数の大きい順 ($K_1 > K_2$) に第1種複合体および第2種複合体と仮定すると、BAsが非解離形で存在するpH 5.5緩衝溶液中の複合体形成では $\Delta H_1 < \Delta H_2 < 0$ および $\Delta S_1 > \Delta S_2 > 0$ の傾向が観察されたが (Table 3), 第1種および第2種複合体形成にBAsのどの部位が関与するかは不明であった。熱力学的パラメータ ΔG_1 , ΔH_1 および ΔS_1 がpHに依存せずほぼ定値を示し (Fig.2), ΔS_1 が大きく $-\Delta H_1$ が小さいという熱力学的特性から、第1種複合体形成は主として疎水性相互作用が関与していることが明白である。第2種複合体では、BAsが解離形で存在するpH > pKa溶液中で $-\Delta G_2$ 値と $-\Delta H_2$ が大きく低下し、それに伴い ΔS_2 が増大した。非解離形BAsでの $-\Delta H$ 値が大きく、 ΔS_2 値が小さいのは複合体形成にファンデルワールス力または水素結合が寄与するためである。解離形BAsで $-\Delta H_2$ 値が激減して ΔS_2 が増大するのは、複合体形成定数の K_2 値がほとんど無視できる程度に小さくなり ($K_2 = 10^2 \text{ M}^{-1}$), $-\Delta G_2$ が減少して乱雑性が増大するためである。つまり、第1種複合体の包接モードはpH変化に依存しない疎水性基、BAsのバルビツール酸環5位置換基のアルキル側鎖またはフェニル環がHPβCD空洞内に包接された構造をとり、そして、第2種複合体はBAsのバルビツール酸環がHPβCD空洞内に包接された構造をとると推定される。

Bはモル比1:1で1種類のみの包接モードで複合体形成をするが、その形成定数は他のBAsに比較すると非常に小さく ($K^1 \approx 10^3 \text{ M}^{-1}$), 特にpH > pKaでは複合体形成はほとんど無視できる程度であった。解離形Bでは、 $-\Delta G_1$, $-\Delta H_1$ および $-\Delta S_1$ 値はpHに依存して減少し (Fig.3), バ

ルビツール酸環5位のエチル基を考慮すると、B-HPβCD複合体は非解離形バルビツール酸環が空洞内に包接された包接モードであると考えられる。

5.2 包接モードの確定

水溶液中での包接複合体の形成機構をより一層明確にするためには熱量測定で推定した包接モードを別途の方法で検証することが必要であり、 ^{13}C -NMRスペクトル測定や分子動力学計算で分子レベルでの吟味は非常に有用である。 ^{13}C -NMRスペクトル測定では、包接複合体形成によってCD空洞内に包接されたLの特定部位Cの $\Delta\delta$ が遮蔽効果によって高磁場シフトする²¹⁾が、BAs-HPβCD複合体形成では、BAsのバルビツール酸環カルボニル基C (2C, 4C, 6C) とR2置換基Cの $\Delta\delta$ が高磁場シフトした (Fig.4)。カルボニル基Cの $\Delta\delta_{\text{max}}$ が大きいののはバルビツール酸環がHPβCDに包接される際に形成する水素結合によるものと思われる。反対にR1置換基Cの低磁場シフトはHPβCD縁側の原子団またはヒドロキシプロピル基と反撥して起こる脱遮蔽効果によるためである。各Cの K_{NMR} を比較すると、バルビツール酸環およびR2置換基の包接によってHPβCD縁側に最も近接した5C, 7Cおよび9Cで大きい値を示したが、すべてのCで $m \approx 1$ であるのは $\Delta\delta$ がモル比1:1の複合体形成に起因していることを示す。つまり、Bを除くBAs-HPβCD複合体は、バルビツール酸環またはR2置換基をHPβCD空洞内に包接した2種類の包接モードが独立して形成され、B-HPβCD複合体ではバルビツール酸環のみが包接される。

しかし、 ^{13}C -NMRスペクトル測定においてはBAs各Cの $\Delta\delta_{\text{max}}$ 値や K_{NMR} 値の大小による包接部位の決定は難しいので、包接部位の構造上大きな塊であるバルビツール酸環およびR2置換基Cの K_{NMR} 値から ΔG_{NMR} ($\Delta G_{2,4,6\text{C}}$, $\Delta G_{5\text{C}}$, $\Delta G_{\text{R}2}$) の平均値を算出して (Table 4), 熱測定の ΔG_1 値と比較した。ここで、 $\Delta G_{2,4,6\text{C}}$, $\Delta G_{5\text{C}}$ および $\Delta G_{\text{R}2}$ はそれぞれバルビツール酸環カルボニル基C, 5位CおよびR2置換基Cの ΔG_{NMR} 値を表す。 ΔG_1 は $\Delta G_{\text{R}2}$ と良い相関性を示し (Fig.6), R2置換基のHPβCD空洞内包接が第1種複合体を

Table 4 Mean values of free energy changes for each carbon obtained from the chemical shift changes in the ^{13}C -NMR spectra of BAs-HP-βCD complexation in D_2O .

Barbiturates	$-\Delta G_{2,4,6\text{C}}$ kJ mol ⁻¹	$-\Delta G_{5\text{C}}$ kJ mol ⁻¹	$-\Delta G_{\text{R}2}$ kJ mol ⁻¹
Barbital	23.2 ± 0.4	30.7	—
Amobarbital	22.1 ± 0.4	21.9	23.4 ± 0.3
Pentobarbital	23.2 ± 1.2	23.2	23.8 ± 0.7
Secobarbital	22.5 ± 0.8	23.7	25.2 ± 1.7
Phenobarbital	24.9 ± 1.0	32.5	26.4 ± 0.9

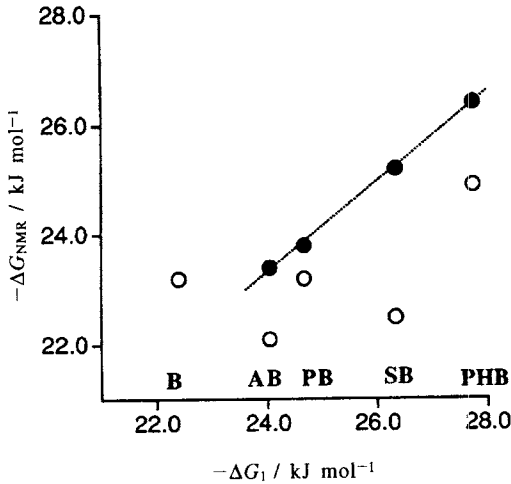


Fig.6 Relationship between ΔG_1 obtained from calorimetric data and ΔG_{NMR} from ^{13}C -NMR chemical shift changes for BAs-HP β CD complexation. \circ and \bullet represent $\Delta G_{2,4,6C}$ and ΔG_{R2} of ΔG_{NMR} in Table 4, respectively.

形成することが明らかになった。

HP β CDは β CDの第一ヒドロキシ基側にヒドロキシプロピル (HP) 基が置換した水溶性の β -シクロデキストリン誘導体であるため、薬物分子は第一ヒドロキシ基側から包接され難く、そのほとんどが第二ヒドロキシ基側から包接されて複合体を形成する。分子動力学計算には、HP β CDの分子量およびHP置換度が一定しないので分子モデル化が困難である。そのため、モデル化には β CDを用いたが、BAs- β CD複合体形成のシミュレーションの結果は熱量測定によって推定した第1種および第2種複合体の包接モードの安定性が正しく検証された (Fig.5)。

さらに、PHBとHP β CD (モル比1:3)の混合水溶液を24 h攪拌した後、凍結乾燥した試料のFAB-MS測定の結果からもモル比1:1のPHB-HP β CD複合体の形成を確定できた。

6. 結 言

等温滴定熱量測定では包接複合体の種別、形成定数および形成反応エンタルピー変化が熱量滴定曲線の解析から直接算出され、熱力学的特性に基づいた複合体形成の起動力と包接部位を考案することが可能である。その結果は ^{13}C -NMRスペクトル法や分子動力学計算等を併用して分子レベルから包接部位を特定することによって相互に検証される。水溶液中での包接複合体形成にはLとCDの相互作用だけでなく、分子周辺の状態変化、溶媒、またはCD空

洞内の水分子環境について考慮する必要があり、熱力学的特性はこれら形成反応過程の形成熱力学量を集約したものであるから、適正な解析モデルを用いて形成反応過程を解析すれば、水溶液中における包接複合体形成の機構を明らかにする手法として非常に有用性が高い。

文 献

- 1) "Cyclodextrins and their industrial uses", ed., by D. Duchêne, Editions de Santé, Paris (1987).
- 2) K. -H. Frömring and J. Szejtli, "Cyclodextrins in pharmacy", Kluwer Academic Publishers, London (1994).
- 3) T. Loftsson and M. E. Brewster, *J. Pharm. Sci.* **85**, 1017 (1996).
- 4) R. A. Rajewski and V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.* **85**, 1142 (1996).
- 5) T. Irie and K. Uekama, *J. Pharm. Sci.* **85**, 1142 (1997).
- 6) Z. Shao, Y. Li, T. Chermak and A. K. Mitra, *Pharm. Res.* **11**, 1174 (1994).
- 7) J. C. Fréville, G. Dollo, P. L. Corre, F. Chevanne, and R. L. Verge, *Pharm. Res.* **13**, 1576 (1996).
- 8) R. I. Gelb, L. M. Schwartz, B. Cardelino, H. S. Fuhrman, R. F. Johnson and D. A. Laufer, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1750 (1981).
- 9) Y. Inoue, T. Hakushi, Y. Liu, L.-H. Tong, B.-J. Shen and D.-S. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 475 (1993).
- 10) M. V. Pekharsky, F. P. Schwarz, Y. B. Tewari, R. N. Goldberg, M. Tanaka and Y. Yamashoji, *J. Phys. Chem.* **98**, 4098 (1994).
- 11) L.-E. Brigger, X.-R. Ni, F. Tenpesti and I. Wadsö, *Thermochimica Acta* **109**, 139 (1986).
- 12) H. Ueda, J. H. Perrin and T. Nagai, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **7**, 639 (1989).
- 13) W. -Q. Tong, J. L. Lach, T. -F. Chin and J. K. Guillory, *Pharm. Res.* **8**, 951 (1991).
- 14) X. Tan and S. Lindenbaum, *Int. J. Pharm.* **74**, 127 (1991).
- 15) H. Qi, T. Nishihata, and J. H. Rytting, *Pharm. Res.* **11**, 1207 (1994).
- 16) H. Aki, T. Haraguchi, T. Niiya, Y. Goto and M. Yamamoto, *YAKGAKU ZASSHI, Japan* **116**, 803 (1996).
- 17) H. Aki, T. Niiya, Y. Iwase, and M. Yamamoto, *Thermochimica Acta* **308**, 115 (1998).
- 18) J. Pitha, T. Irie, P. B. Sklar, and J. S. Nye, *Life Sci.* **43**, 493 (1988).

- 19) D. A. Perlman, D. A. Case, J. C. Caldwell, G. L. Seibel, P. Weiner and P. A. Kollman, "Amber 4.0", University of California, San Francisco, 1991.
- 20) S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, and D. A. Case, *J. Comp. Chem.* **7**, 230 (1986).
- 21) W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey and M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **79**, 926 (1983).

要 旨

等温滴定熱量計を用いて、水溶液中バルビツール酸誘導体 (BAs) と 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP β CD) の包接複合体形成の機構を検討した。各種 pH 緩衝液中で測定した複合体形成反応熱量の滴定曲線から形成定数および形成エンタルピー変化を算出した結果、非解離形 BAs ではモル比 1:1 の 2 種類の包接モードをもつ複

合体の形成、および解離形 BAs では 1 種類の包接複合体の形成が確認された。形成定数の大きい順に第 1 種および第 2 種複合体とすると、第 1 種複合体形成は ΔG_1 , ΔH_1 および ΔS_1 は pH に依存せずほぼ定値であり、 ΔH_1 が負の小さい値、 ΔS_1 が正の大きい値を示すことから、疎水性相互作用が寄与している。また、第 2 種複合体形成は ΔG_2 , ΔH_2 および ΔS_2 の pH > pKa での減少、 ΔH_2 が負の大きい値、そして ΔS_2 が正の小さい値を示すことから、ファンデルワールス相互作用または水素結合が寄与している。つまり、BAs-HP β CD 複合体には BAs のバルビツール酸環 5 位の R2 の疎水性置換基が HP β CD 空洞内に包接された第 1 種複合体とバルビツール酸環が HP β CD 空洞内に包接された第 2 種複合体の 2 種類の包接モードが存在し、第 2 種複合体は非解離形 BAs においてのみ形成される。これらの包接モードは ^{13}C -NMR ケミカルシフト変化の解析結果と一致し、動力学的計算によって包接複合体の水溶液中での安定性が検証された。

【国際会議のお知らせ】

16th IUPAC Conference on Chemical Thermodynamics

August 6-11, 2000
Halifax, Nova Scotia, Canada

Contact: Prof. Mary Anne White
Department of Chemistry, Dalhousie University
Halifax, Nova Scotia, B3H 4J3, Canada
Tel: 902-494-3894
Fax: 902-494-1310
e-mail: ICCT@IS.DAL.CA
or Mary.Anne.White@DAL.CA
website: <http://IS.DAL.CA/~ICCT>