

## 解 説

(-)-Epigallocatechin gallate と  
cyclodextrin 類との水溶液中における  
包接複合体形成に関する熱力学的考察

大波多 友規, 池田 浩人

福岡大学 薬学部

(受取日: 2020年4月24日, 受理日: 2020年6月11日)

Thermodynamic Study on Formation of Inclusion Complexes between  
(-)-Epigallocatechin gallate and Cyclodextrins in Aqueous Solutions

Tomonori Ohata and Hirohito Ikeda

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University

(Received Apr. 24, 2020; Accepted June 11, 2020)

Catechins, which are polyphenols contained in tea leaves, are an important ingredient in tea beverages. (-)-Epigallocatechin gallate (EGCg) is the most abundant catechins in tea leaves. It is known that inclusion of EGCg with cyclodextrins (CDs) reduces the astringency and bitterness of EGCg. To elucidate the formation mechanism of the inclusion complex between EGCg and  $\beta$ CD (EGCg- $\beta$ CD), the study using isothermal titration calorimetry (ITC),  $^1$ H-NMR spectroscopy and molecular modeling calculation (MMC) was performed. It was found that two types of EGCg- $\beta$ CD are formed in an aqueous solution depending on the pH of the solution. The first type of the complex with a large association constant was formed independently of the pH of the solution. In the complex, the A-ring of EGCg was inserted deeply into the cavity of  $\beta$ CD. On the other hand, the second type of complex, the G-ring of EGCg was included in the  $\beta$ CD's cavity, was formed depending on the pH of the solution. Furthermore, the intermolecular hydrogen bonds formed between EGCg and  $\beta$ CD were found to be important for complex formation. These results suggested that when determining the structures of inclusion complexes in an aqueous solution, ITC might be indispensable to discuss the inclusion mechanism between cyclodextrin and guest molecules such as catechins with some insertable sites.

Keywords: catechins, cyclodextrins, inclusion complex, molecular modeling calculation, intermolecular hydrogen bond

## 1. はじめに

包接複合体は、分子内に空洞をもつホスト分子とその空洞内に包接されるゲスト分子からなる一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類 (CDs; Fig.1), クラウンエーテル, ククルビットウリル等が知られている。これらのホスト分子を医薬分野において利用する場合、水溶性や毒性の有無の問題、さらに製造供給が比較的容易であるか等の問題があり、現在はCDsのみが医薬品製剤原料として実用化されている。<sup>1-3)</sup> CDsによる包接化は、ゲスト分子である薬物の溶解性の改善, 安定性の向上, 苦味や不快臭のマスクング, 揮発性防止などに応用される。また、近年ではがん細胞に対するターゲティング機能を有した製剤の開発や、ジェネリック医薬品への応用が増加している。<sup>4)</sup>

水溶液中におけるゲスト分子とCDsとの包接複合体形成を確認する方法としては、溶解度法, 分光光度法およびNMRスペクトル法等が知られているが、包接複合体の立体構造の詳細は未だ明確ではない。その理由の一つとして、ゲスト分子の多くがCDsに対して複数の被包接部位を有していることが挙げられる。この場合、水溶液中において、ゲスト分子の各被包接部位がCDsによってそれぞれ包接された複合体が複数形成される。しかし、実験値から算出される複合体形成定数などの値は、水溶液中で混在する複数の包接複合体の平均値として算出される場合が多く、ゲスト分子の各被包接部位がCDsによって包接されたそれぞれの複合体の形成定数や立体構造に関する情報などの値を求めることが不可能なことになる。(-)-Epigallocatechin gallate (EGCg; Fig.1)は、複数のフェノール性水酸基を有するポリフェノールの一種である。CDs空洞内は疎水性で

あるため、親水性の置換基を複数有する EGCg は、CDs 空洞内に包接されにくいことが考えられる。しかし、EGCg は CDs と包接複合体を形成することで EGCg 特有の苦味や渋味が抑制され、抗酸化作用は増大することが実験的に明らかにされている。<sup>5-8)</sup> Fig.1 に示すように、EGCg は 3 種の環構造を有するため、水溶液中では A 環のみならず、B 環または G 環の各環が CDs 空洞内に包接される可能性が考えられるが、水溶液中において EGCg のそれぞれの環が CDs に包接された複合体の立体構造は明らかにされていない。

包接複合体は、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非共有結合性の弱い分子間相互作用により形成される。ゲスト分子と CDs との包接複合体形成における結合定数は  $10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$  であることから、複合体形成過程の熱力学的諸量を定量して、包接複合体形成機構を明確にすることが重要である。熱力学的諸量を直接解析可能な手法である熱量測定は、分光光度法では測定できない不活性な物質や懸濁液について低濃度からの測定が可能である。さらに、熱量測定の解析技法を工夫すれば、水溶液中で形成される複数の包接複合体について、それぞれの複合体の形成機構について検討することができる。

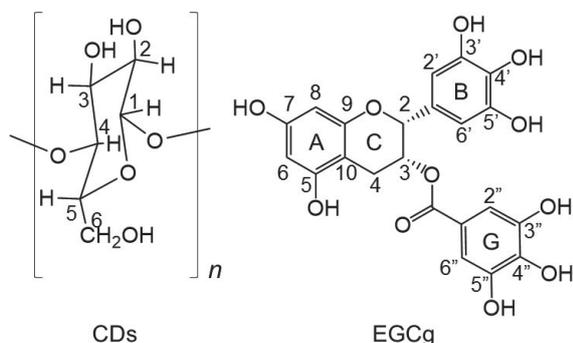


Fig.1 Chemical structures of CDs ( $n=6$ ;  $\alpha\text{CD}$ ,  $n=7$ ;  $\beta\text{CD}$  and  $n=8$ ;  $\gamma\text{CD}$ ) and EGCg.

The numbers in these structures represent the hydrogen atom attached to the ring according to IUPAC. Symbols in the phenyl group of EGCg represent the names of the rings.

本解説では、異なる pH の水溶液中において、等温滴定マイクロカロリメトリー (ITC) による反応熱量を測定することで、EGCg と  $\beta\text{CD}$  による複数の包接複合体について複合体形成定数および熱力学的諸量を解析し、それぞれの包接複合体の立体構造を推定する。さらに、推定された包接複合体の立体構造を検証するために、<sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定および分子モデリング計算を用い、水溶液中における包接複合体構造を明らかにする。

## 2. EGCg と CDs との相互作用

溶解性やゲスト分子に対する分子認識機能の改善を目的として、水酸基の水素を他の置換基に変換した CD 誘導体は数多く存在する。CD 誘導体は置換基の数および位置が定まっていないものが多いため、今回は置換基を有さず空洞径の異なる  $\alpha\text{CD}$ 、 $\beta\text{CD}$  および  $\gamma\text{CD}$  を用い、EGCg との相互作用解析を行った。0.5 mM EGCg 溶液を 10 mM CDs 溶液で滴定し、298.15  $\pm$  0.01 K における反応熱量を Thermal Activity Monitor 2277 型 (Thermometric 社製) で測定した。EGCg と CDs のサーモグラムを Fig.2 に示す。EGCg は  $\alpha\text{CD}$  との反応熱量は観察されず、相互作用はないことが示され

た。EGCg と  $\beta\text{CD}$  との反応熱量は、 $\gamma\text{CD}$  よりも大きいことが確認された。EGCg と  $\beta\text{CD}$  および  $\gamma\text{CD}$  について、各反応熱量滴定曲線を解析して得られた熱力学的諸量を Table 1 に示す。化学量論比 ( $n$ ) およびエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) より EGCg は  $\beta\text{CD}$  または  $\gamma\text{CD}$  とモル比 1:1 で複合体 (EGCg- $\beta\text{CD}$  または EGCg- $\gamma\text{CD}$ ) を発熱的に形成し、複合体形成定数 ( $K$ ) より  $\beta\text{CD}$  は  $\gamma\text{CD}$  よりも優位に EGCg と複合体を形成することが分かった。

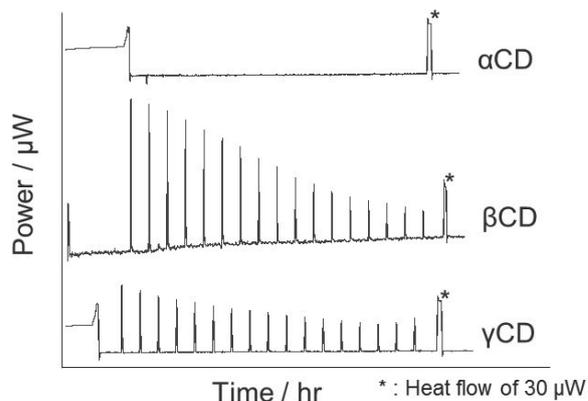


Fig.2 Thermograms of EGCg titrated into CDs.

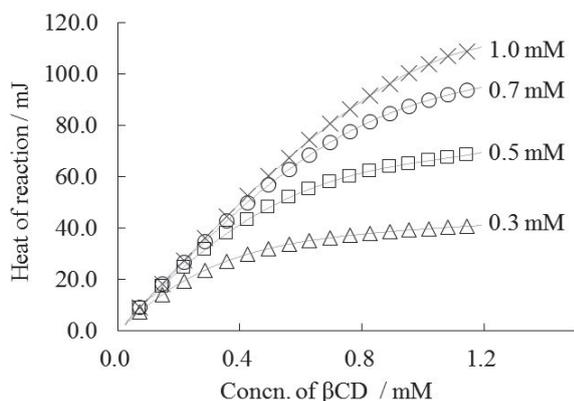
Table 1 Stoichiometry ( $n$ ), association constant ( $K$ ) and thermodynamic parameters ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  and  $T\Delta S$ ) computed from calorimetric titration curves for EGCg- $\beta\text{CD}$  and EGCg- $\gamma\text{CD}$  complexation in water at 298.15 K.

| CDs               | $n$  | $K$<br>/ $\text{M}^{-1}$ | $\Delta G$<br>/ $\text{kJ mol}^{-1}$ | $\Delta H$<br>/ $\text{kJ mol}^{-1}$ | $-T\Delta S$<br>/ $\text{kJ mol}^{-1}$ |
|-------------------|------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| $\beta\text{CD}$  | 1.00 | 6830                     | -21.9                                | -49.2                                | 27.3                                   |
| $\gamma\text{CD}$ | 1.00 | 330                      | -14.4                                | -35.1                                | 20.7                                   |

## 3. EGCg と $\beta\text{CD}$ による複合体形成

前述のように、EGCg は  $\beta\text{CD}$  と複合体を形成しやすいことが明らかになった。そこで、EGCg- $\beta\text{CD}$  の複合体形成機構の詳細を明らかにするために、各種濃度 (0.3 mM  $\sim$  1.0 mM) の EGCg と 15 mM の  $\beta\text{CD}$  との反応熱量を 298.15  $\pm$  0.01 K、精製水またはリン酸緩衝液中で測定した。得られた反応熱量と別途測定した希釈熱量との差を複合体形成熱量とした。各種濃度の EGCg と  $\beta\text{CD}$  との熱量滴定曲線 (Fig.3) を解析し、得られた複合体形成における熱力学的諸量を Table 2 に示す。EGCg の濃度の増加に伴い、反応熱量は増大することが判明した (Fig.3)。算出された熱力学的諸量は、水溶液中において EGCg 濃度によらず、それぞれのパラメータの平均値は一定値を示した ( $K = 7590 \pm 110 \text{ M}^{-1}$ ,  $n = 1.01 \pm 0.01$ ,  $\Delta G = -22.1 \pm 0.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta H = -49.8 \pm 0.34 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $T\Delta S = -27.6 \pm 0.32 \text{ kJ mol}^{-1}$ )。また、リン酸緩衝液の塩濃度によらず熱力学的パラメータは一定値を示した。そのため、EGCg- $\beta\text{CD}$  複合体形成には、EGCg 濃度やリン酸緩衝液の塩濃度の影響を受けないことが判明した。

さらに、EGCg の pKa 値は 7.5 であるため、水溶液の液性が中性領域では分子型およびイオン型の EGCg が共存する。そのため、pH7 付近の水溶液中では、分子型の EGCg が  $\beta\text{CD}$  に包接された複合体と、イオン型の EGCg が  $\beta\text{CD}$  に包接された 2 種の複合体の形成が予想される。すなわち、溶液の pH によって EGCg の分子型とイオン型の比率が変



**Fig.3** Calorimetric titration curves for the reaction between EGCg and  $\beta$ CD in aqueous solution at 298.15 K. The concentrations of EGCg were 0.3, 0.5, 0.7 and 1.0 mM. Points show the experimental values and solid lines represent the computer generated best fit curves.

**Table 2** Association constant and thermodynamic parameters computed from calorimetric titration curves for EGCg- $\beta$ CD complexation in water and various concentration of phosphate buffer solution at 298.15 K.

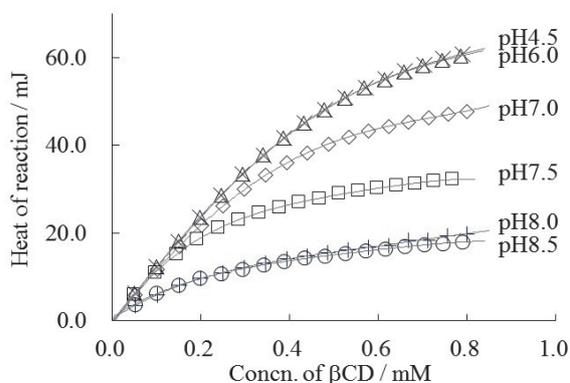
| Concn. of EGCg / mM | $n$  | $K$ / $M^{-1}$ | $\Delta G$ / $\text{kJ mol}^{-1}$ | $\Delta H$ / $\text{kJ mol}^{-1}$ | $-T\Delta S$ / $\text{kJ mol}^{-1}$ |
|---------------------|------|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 0.29 <sup>a)</sup>  | 0.97 | 7113           | -22.0                             | -49.1                             | 27.1                                |
| 0.51 <sup>a)</sup>  | 0.99 | 7584           | -22.1                             | -49.2                             | 27.1                                |
| 0.66 <sup>b)</sup>  | 1.02 | 7292           | -22.0                             | -50.1                             | 28.0                                |
| 0.62 <sup>c)</sup>  | 1.03 | 7633           | -22.2                             | -49.0                             | 26.8                                |
| 0.54 <sup>d)</sup>  | 1.06 | 8097           | -22.3                             | -51.8                             | 29.5                                |
| 0.70 <sup>a)</sup>  | 1.00 | 7731           | -22.2                             | -49.5                             | 27.6                                |
| 0.96 <sup>a)</sup>  | 1.01 | 7708           | -22.2                             | -49.4                             | 27.2                                |

a) water, b)1/60 M phosphate buffer, c)1/30 M phosphate buffer, d)1/15 M phosphate buffer.

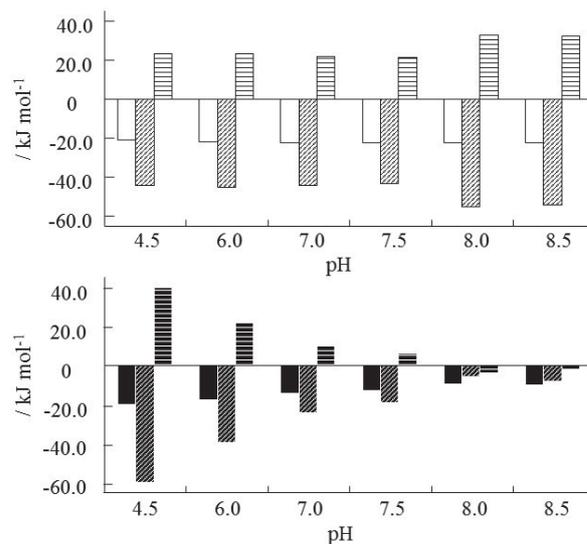
化するため、溶液の pH は EGCg と  $\beta$ CD による複合体形成に影響する可能性がある。

そこで、EGCg- $\beta$ CD 形成における溶液 pH の影響を解明するため、EGCg および  $\beta$ CD を各種 pH のリン酸緩衝液 (pH 4.5~8.5) に溶解して複合体形成反応熱を測定した (Fig.4)。EGCg- $\beta$ CD 複合体形成における反応熱は、pH 4.5 のとき最大となり、pH の上昇に伴い反応熱は減少した。2 種の複合体がそれぞれ形成するような反応モデルを仮定し、各 pH における反応熱曲線を解析した。解析して得られた 2 種の  $K$  の大きさ ( $K_1 > K_2$ ) に従い、2 種の複合体をそれぞれ第 1 複合体および第 2 複合体とした。各複合体に対応する熱力学諸量をそれぞれ  $\Delta G_1$ ,  $\Delta G_2$ ,  $\Delta H_1$ ,  $\Delta H_2$ ,  $\Delta S_1$  および  $\Delta S_2$  とし、反応熱曲線から得られた熱力学的諸量 ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  および  $T\Delta S$ ) を pH 毎に Fig.5 に示した。第 1 複合体の化学量論比  $m_1$  は  $0.99 \pm 0.01$  であり、 $K_1$  および  $\Delta H_1$  は pH に関係なくほぼ一定となった。 $K_1$ ,  $\Delta H_1$  および  $\Delta S_1$  の平均値は、それぞれ  $K_1 = 7430 \pm 168 \text{ M}^{-1}$ ,  $\Delta H_1 = -47.2 \pm 4.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  および  $\Delta S_1 = -25.6 \pm 5.2 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  であった。 $\Delta H_1$  および  $\Delta S_1$  が負の値かつ大きな絶対値を示したため、第 1 複合体の形成には主として分子間水素結合が関与していると考えられる。第 2 複合体の化学量論比である  $m_2$  は、pH 4.5 のとき 1.00 であったが、pH の上昇に伴い減少し、pH 8.0 では 0.25、pH 8.5 では 0.30 と非常に小さくなった。

$K_2$  および  $-\Delta H_2$  の値は pH の上昇に伴い減少し、特に pH 8.0 および pH 8.5 においては、これらの値は極めて小さくなった。すなわち、塩基性溶液中では、pH の高い水溶液中では、第 2 複合体は形成されにくいと考えられる。塩基性水溶液中では、EGCg は G 環 4' 位の水酸基 (Fig.1) がイオン化されることが知られており、イオン化された割合は Henderson-Hasselbalch 式によれば、pH 4.5 で 0.10%、pH 7.5 で 50%、pH 8.5 で 91% と pH 上昇に伴い増加する。第 1 複合体形成における種々の熱力学的諸量に pH 依存性がないことより、第 1 複合体形成は、イオン化が起こりにくい EGCg の A 環または B 環が  $\beta$ CD 空洞内に包接される反応モデルで進行すると推定される。一方、第 2 複合体形成の場合、pH の上昇に伴い、 $m_2$  値は 1.0 から 0.5 に、 $K_2$  値は  $3250 \text{ M}^{-1}$  から  $180 \text{ M}^{-1}$  に減少した。 $\beta$ CD の空洞内は疎水性であり、ゲスト分子はイオン型より分子型の方が  $\beta$ CD の疎水性空洞内に包接されやすい。<sup>9)</sup> それゆえ、第 2 複合体は溶液 pH の上昇に伴ってイオン化しやすい G 環が  $\beta$ CD 空洞内に包接された複合体と考えられる。



**Fig.4** Calorimetric titration curves of EGCg- $\beta$ CD systems in various pH solutions at 298.15 K. In all experiments, the initial concentrations of EGCg as a titrand and  $\beta$ CD as a titrant were 0.5 mM and 10 mM, respectively. Each solid line represents a computer-fitting curve by using a two-type binding model.



**Fig.5** Best-fit values of thermodynamic parameters for complexation between EGCg and  $\beta$ CD at 298.15 K and 101.32 kPa.  $\square$ :  $\Delta G_1$ ,  $\text{hatched}$ :  $\Delta H_1$ ,  $\text{striped}$ :  $-T\Delta S_1$ ,  $\blacksquare$ :  $\Delta G_2$ ,  $\text{diagonal hatched}$ :  $\Delta H_2$ , and  $\text{horizontal hatched}$ :  $-T\Delta S_2$ .

#### 4. 複合体形成における ROESY スペクトル変化

NMR スペクトル測定法は、溶液中の有機化合物の構造解明のための重要な測定法である。ゲスト分子と CDs の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの化学シフト変化 ( $\Delta\delta$ ) は、包接複合体の構造の解明に頻繁に用いられている。<sup>10)</sup> 例えば、芳香環を持つゲスト分子が CDs 空洞内に包接される場合、環電流効果により CDs 空洞内に位置する 3 位および 5 位のプロトン

(3-H および 5-H) の化学シフトは高磁場側へ移動することが知られている。<sup>11)</sup> しかし、ゲスト分子は、CD 空洞内の疎水環境下に位置することで、溶媒効果の減少、空洞内に包接されたことによる遮蔽効果、ゲスト分子の立体的な構造変化などの影響により  $\Delta\delta$  のみではゲスト分子の包接部位の決定は困難である。一方、核オーバーハウザー効果

(NOE) は、同種核間の空間的距離に依存し、一般に、NOE 相互作用は 600 pm (6 Å) 以内の距離にあるプロトン間に対して観測されるため、2 次元 NMR スペクトル (NOESY スペクトル) の測定によりゲスト分子の包接部位を推定することができる。ただし、分子量が 700~1000 程度の化合物では NOE 強度が 0、または負の NOE として観測されることがあるため、今回は分子相関時間や観測周波数に依存せず、強度がゼロや負になることはない ROE (Rotating frame nuclear Overhauser Effect) を観測する ROESY 測定を行った。

はじめに、EGCg と  $\beta$ CD を D<sub>2</sub>O 中で混合したサンプル (EGCg+ $\beta$ CD) の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定し、EGCg 存在下における  $\beta$ CD の各プロトンの化学シフト ( $\delta_{\text{mix}}$ ) を決定した。Table 3 には、 $\beta$ CD の化学シフト ( $\delta_{\beta\text{CD}}$ ) および化学シフト変化 ( $\Delta\delta = \delta_{\text{mix}} - \delta_{\beta\text{CD}}$ ) をまとめた。EGCg+ $\beta$ CD では、 $\beta$ CD の 3-H および 5-H の化学シフトは顕著に高磁場側へ移動した。この結果は、EGCg が  $\beta$ CD 空洞内に包接されていることを支持した。

**Table 3** Shift values (ppm) of chemical shifts of  $\beta$ CD alone and  $\beta$ CD in the presence of EGCg at 308 K

| $\beta$ CD proton | $\beta$ CD / ppm                     |  | EGCg+ $\beta$ CD / ppm           |                           |
|-------------------|--------------------------------------|--|----------------------------------|---------------------------|
|                   | $\delta_{\beta\text{CD}}^{\text{a)}$ |  | $\delta_{\text{mix}}^{\text{b)}$ | $\Delta\delta^{\text{c)}$ |
| 1-H               | 4.954                                |  | 4.957                            | 0.003                     |
| 2-H               | 3.536                                |  | 3.555                            | 0.019                     |
| 3-H               | 3.843                                |  | 3.677                            | -0.166                    |
| 4-H               | 3.466                                |  | 3.517                            | 0.051                     |
| 5-H               | 3.764                                |  | 3.663                            | -0.101                    |

a) 3.2 mM  $\beta$ CD, b) 13.2 mM EGCg + 11.6 mM  $\beta$ CD,

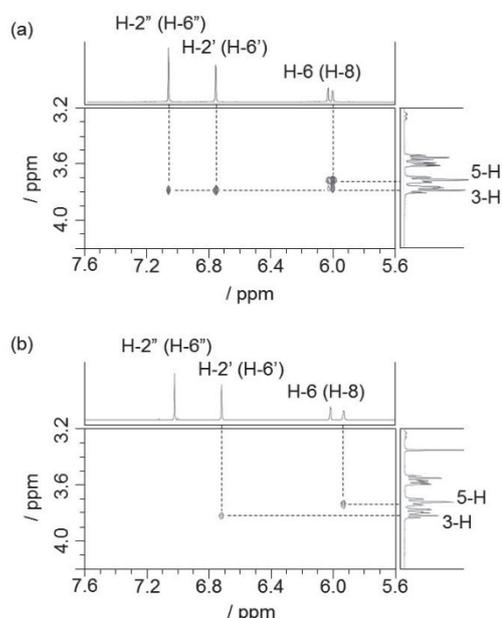
c)  $\Delta\delta = \delta_{\text{mix}} - \delta_{\beta\text{CD}}$

次に、中性領域の水溶液では、EGCg ( $\text{pK}_a = 7.5$ ) は分子型とイオン型が共存することを考慮し、EGCg の分子型の割合がほぼ 100%である pH 3.0、およびイオン型の割合が約 91%存在する pH 8.5 で ROESY 測定を行った。ただし、pH 3.0 および pH 8.5 溶液中では、A 環の H-6 および H-8 は重水置換されやすく、長時間を要する ROESY 測定では、重水置換によるクロスピークの消失により A 環について正確な評価ができない。そのため、本研究における ROESY 測定には試料管として二重管を使用し、pH 3.0 HCl 溶液および pH 8.5 NaHCO<sub>3</sub> 溶液に試料を溶解させ、presaturation 法を用いた<sup>12)</sup>。

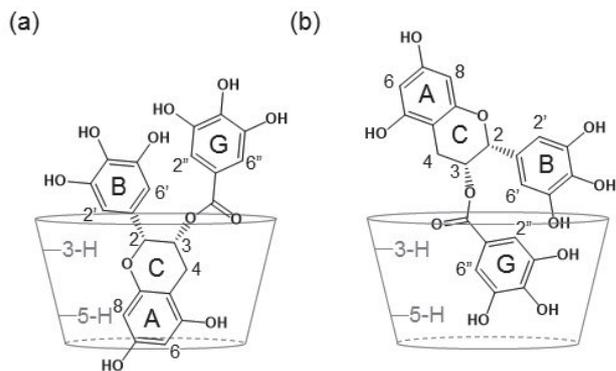
pH 3.0 HCl 溶液および pH 8.5 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中での EGCg+ $\beta$ CD の ROESY スペクトルを Fig.6 に示した。 $\beta$ CD 空洞内の 3-H および 5-H と EGCg との ROE に注目し、X 軸は 5.6~7.6 ppm, Y 軸は 3.2~4.2 ppm の範囲を図示した。X 軸と Y 軸には、それぞれ EGCg と  $\beta$ CD との各プロトンシグナル位置を表記した。pH3.0 HCl 溶液中では、 $\beta$ CD の

3-H と EGCg の H-6 (H-8), H-2' (H-6'), および H-2'' (H-6''),  $\beta$ CD の 5-H と EGCg の H-6 (H-8)とのクロスピークが観測された (Fig.6(a))。pH8.5 NaHCO<sub>3</sub> 溶液では、 $\beta$ CD の 3-H と EGCg の 2' (H-6'),  $\beta$ CD の 5-H と EGCg の H-6 (H-8)との 2 種類のクロスピークが観測された (Fig.6(b))。

溶液 pH に関わらず、 $\beta$ CD の 5-H と EGCg の A 環 H-6 (H-8)とのクロスピークおよび  $\beta$ CD の 3-H と EGCg の B 環 2' (H-6')とのクロスピークが観測されたことは、分子型およびイオン型の EGCg はいずれも EGCg の A 環が  $\beta$ CD の一級水酸基側付近の空洞内に包接され、B 環が  $\beta$ CD の二級水酸基側付近の空洞内に位置する、つまり Fig.7(a) のような包接複合体構造が推定された。一方、 $\beta$ CD の 3-H と EGCg の G 環の H-2'' (H-6'')とのクロスピークは、pH3.0 HCl 溶液中でのみ観測されることより、分子型 EGCg は、G 環が  $\beta$ CD の二級水酸基側付近の空洞内に位置する Fig.7(b) のような包接複合体が示唆された。pH 8.5 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中では、 $\beta$ CD の 3-H と EGCg の G 環の H-2'' (H-6'')とのクロスピークが観測されなかった。つまり、分子型 EGCg は A 環と G 環が  $\beta$ CD 空洞内に包接される 2 種の複合体の形成が推測され、イオン型 EGCg は A 環のみが  $\beta$ CD 空洞内に包接される複合体のみを形成することが推測された。



**Fig.6** ROESY spectra of EGCg and  $\beta$ CD mixtures in pH3.0 HCl solution (a) and pH8.5 NaHCO<sub>3</sub> solution (b) at 308 K. In ROESY spectra, the symbols shown on the X and Y axes represent the protons of EGCg and  $\beta$ CD molecules, respectively.



**Fig.7** Expected two types of inclusion complexes for EGCg- $\beta$ CD.

### 5. EGCg-βCD 複合体の水相中における最安定構造の推定

前述の実験によって得られた知見を理論的に確認するために、密度汎関数法 (DFT 法) による分子モデリング計算を行った。はじめに、ChemBio3D を用いて EGCg および βCD の初期構造を作成し、CONFLEX ver.6.12a による配座解析を行った。<sup>13,14)</sup> 次いで、創出された配座異性体のうち立体エネルギーが最小である配座から +12.6 kJ mol<sup>-1</sup> の範囲内にある配座について、PM3 法による気相中での構造最適化 (GAMESS Ver.12) を行い、さらに DFT 法による水相中での構造最適化 (Gaussian 09 rev E.01) を行った。<sup>15,16)</sup> それぞれの配座の全エネルギー ( $E_{\text{total}}$ ) を比較し、最終的に  $E_{\text{total}}$  が最小の構造を最安定構造とした。これらの最安定構造は、包接複合体作成のための初期構造として使用した。

Fig.8 に示すように、EGCg の各芳香環が βCD の二級水酸基側から空洞内に包接される 3 種の包接モード (EGCg<sub>A</sub>-βCD, EGCg<sub>B</sub>-βCD または EGCg<sub>G</sub>-βCD) を検討した。EGCg の各環に設けた基準炭素原子と、βCD 空洞内に設定した平面との距離を  $r$  (pm) とし  $r$  値を 400 pm から -100 pm まで 100 pm ずつ変化させた 6 種の初期入力構造を作成した。作成した初期入力構造は、DFT 法による水相中での構造最適化を行った。最適化構造の全エネルギー ( $E_{\text{complex}}$ )、EGCg および βCD の最安定構造における全エネルギー ( $E_{\text{EGCg}}$  および  $E_{\beta\text{-CD}}$ ) から、次式を用いて相互作用安定化エネルギー ( $\Delta E$ ) を算出した。

$$\Delta E = E_{\text{complex}} - (E_{\text{EGCg}} + E_{\beta\text{-CD}})$$

ただし、EGCg<sub>A</sub>-βCD の  $r = -100$  pm の初期入力構造は、EGCg の 2'位炭素原子と βCD の 3 位酸素原子が接近しすぎたため、構造最適化を行うことはできなかった。

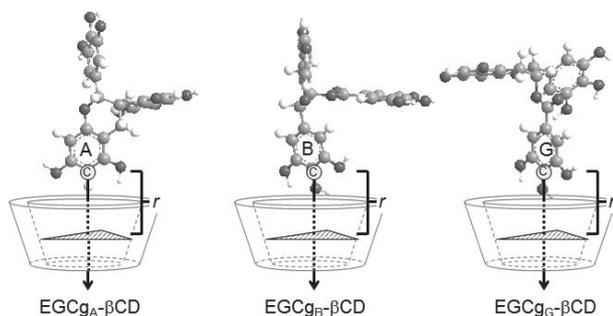


Fig.8 Initial structures of inclusion complex between EGCg and βCD for MMC.

Fig.9 は、EGCg<sub>A</sub>-βCD 5 種の最適化構造の  $\Delta E$  値、EGCg<sub>B</sub>-βCD および EGCg<sub>G</sub>-βCD それぞれ 6 種の最適化構造の  $\Delta E$  値を、 $r$  値に対してプロットしたものである。全ての最適化構造の  $\Delta E$  値を比較すると、EGCg<sub>A</sub>-βCD および EGCg<sub>G</sub>-βCD の  $\Delta E$  値は EGCg<sub>B</sub>-βCD の  $\Delta E$  値よりも低い値を示していた。そのため、水相中において、EGCg は B 環よりも A 環あるいは G 環が β-CD の空洞内に包接されやすいと考えられる。 $\Delta E$  値が最小値を示す複合体は、EGCg の G 環が βCD 空洞内に包接された構造であった (Fig.10(a))。この複合体の最適化構造では、6 か所の分子間水素結合が形成され、複合体はエネルギー的に大きく安定化されることが明らかとなった。EGCg<sub>A</sub>-βCD では、A 環が β-CD 空洞内に最も深く包接された複合体構造がエネルギー的に安定であることが判明した (Fig.10(b))。EGCg の A 環は、C 環と結合しているため、B 環および G 環と立体的に離れている (Fig.1)

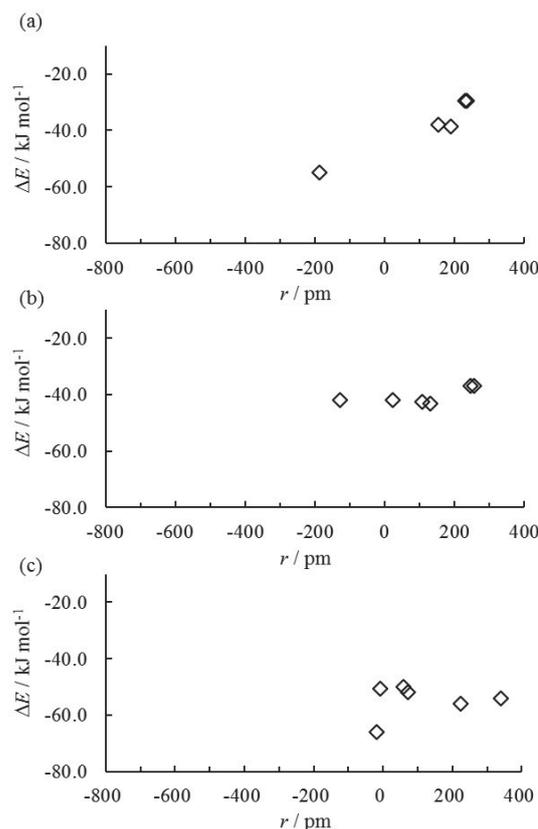


Fig.9 Stable conformation energy ( $\Delta E$ ) diagrams of the inclusion process of βCD complex (a) EGCg<sub>A</sub>-βCD mode, (b) EGCg<sub>B</sub>-βCD mode, and (c) EGCg<sub>G</sub>-βCD mode.

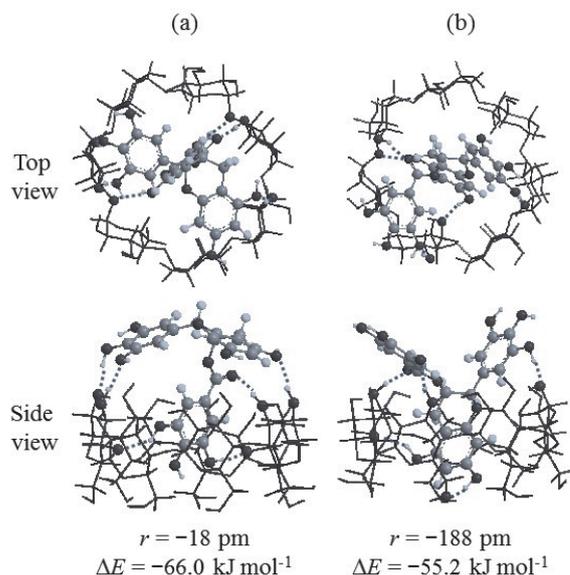


Fig.10 Most stable conformations of inclusion complex between EGCg and βCD in water. (a) Inclusion complex between G-ring of EGCg and βCD, (b) inclusion complex between A-ring of EGCg and βCD.

そのため、A 環は βCD 空洞内に深く包接され、さらには C 環も βCD 空洞内に包接されたと考えられる。一方、B 環が包接された複合体は、Fig.10(a) に示す最安定構造に比べて  $\Delta E$  値は +23 kJ mol<sup>-1</sup> 以上大きいことが判明したため、EGCg の B 環は βCD 空洞内に包接されにくいことが示唆された。

## 7. おわりに

EGCg のように複数の親水性被包接部位を有するゲスト分子は、EGCg のそれぞれの環が  $\beta$ CD の空洞内に包接される複数の複合体を形成すると考えられる。本研究で行った水溶液の pH を変化させた ITC ならびに  $^1\text{H-NMR}$  測定は、複数の包接複合体の存在を証明すると共に、EGCg のどの環が  $\beta$ CD の疎水性空洞内に包接されやすいかについての知見を得ることを可能にした。さらに、分子モデリング計算を併用することによって、包接複合体の安定化には、複数の分子間水素結合の形成が重要であることが解明され、実験で得られた各種の知見を確認することができた。

## 謝 辞

分子モデリング計算には、九州大学情報基盤研究開発センターならびに自然科学研究機構 岡崎共通研究施設 計算化学研究センターの計算機を利用いたしました。

## 文 献

- 1) A. Okamatsu, K. Motoyama, R. Onodera, T. Higashi, T. Koshigoe, Y. Shimada, K. Hattori, T. Takeuchi, and H. Arima, *Biomacromolecules* **14**, 4420-4428 (2013).
- 2) M. Yukawa, H. Moriwaki, T. Murakami, H. Ikeda, Y. Iwase, and H. Aki, *Koubunshi Ronbunshu* **67**, 192-197 (2010).
- 3) Y. Inoue, D. Iohara, N. Sekiya, M. Yamamoto, H. Ishida, Y. Sakiyama, F. Hirayama, H. Arima, and K. Uekama, *Int. J. Pharm.* **509**, 338-347 (2016).
- 4) A. Yaser, A. Ayuob, D. Soodabeh, and O. Yadollah, *Int. J. Polym. Mater. ens* **69** (7), 437-448 (2020).
- 5) T. Aree and S. Jongungruangchok, *Carbohydrate Polymers* **194**, 24-33 (2018).
- 6) T. Ohata, H. Ikeda, T. Mizobe, M. Yukawa, and H. Aki, *J. Therm. Anal. Calorim.* **135**(5), 2837-2841 (2019).
- 7) H. Ikeda, T. Ohata, M. Yukawa, M. Fujisawa, and H. Aki, *J. Therm. Anal. Calorim.* **135**(5), 2789-2795 (2019).
- 8) H. Ikeda, Y. Fukushige, T. Matsubara, M. Inenaga, M. Kawahara, M. Yukawa, M. Fujisawa, E. Yukawa, and H. Aki, *J. Therm. Anal. Calorim.* **123**: 1847-1850 (2016).
- 9) K. Uekama, *YAKUGAKU ZASSHI* **101**, 857-873 (1981).
- 10) K. Terao and M. Komiyama, "Applied Technology of Cyclodextrin" ed. by Cmcbooks, Tokyo, pp. 78-91.
- 11) T. Ishizu, C. Hirata, H. Yamamoto, and K. Harano, *Magn. Reson. Chem.* **44**, 776-783 (2006).
- 12) T. Ishizu, H. Tsutsumi, H. Yamamoto, and K. Harano, *Magn. Reson. Chem.* **47**, 283-287 (2009).
- 13) K. Hori, *Journal of Computer Aided Chemistry* **2**, 37-44 (2001).
- 14) P. Linus, "The nature of the chemical bond" ed. by Cornell University Press, New York, pp.407-456.
- 15) S. Murata, "The Fifth Series of Experimental Chemistry" ed. by The Chemical Society of Japan, Tokyo, pp. 54-65.
- 16) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J.

Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, "Gaussian 09", Revision D.01; Gaussian, Inc., USA) Gaussian, Inc., Wallingford CT (2013).



大波多 友規  
Tomonori Ohata  
E-mail: ohata@fukuoka-u.ac.jp



池田 浩人  
Hirohito Ikeda  
E-mail: ikeda@fukuoka-u.ac.jp