

平成 30 年度 博士学位論文

複数の被包接部位を有するカテキンと  
 $\beta$ -cyclodextrin との包接複合体形成機構の  
熱力学的解明

大波多 友規

## 目次

序論 .....	1
第 1 章 カテキン- $\beta$ -cyclodextrin 包接複合体の水溶液中安定構造 7	
第 1 節 量子化学計算 .....	12
第 1 項 (-)-Epigallocatechin .....	14
第 2 項 (-)-Epigallocatechin gallate .....	24
第 3 項 (-)-Epicatechin および (-)-epicatechin gallate .....	32
第 4 項 (-)-Gallocatechin および (-)-gallocatechin gallate .....	43
第 5 項 Ionized (-)-epigallocatechin gallate .....	59
第 6 項 小括 .....	64
第 2 節 分子動力学計算 .....	67
第 2 章 カテキン- $\beta$ -cyclodextrin 包接複合体形成の検証 .....	74
第 1 節 核磁気共鳴スペクトル測定 .....	74
第 2 節 等温滴定マイクロ熱量測定 .....	84
第 3 節 小括 .....	96
第 3 章 包接複合体の安定化に寄与する分子間水素結合 .....	98
結論 .....	106
謝辞 .....	108
計算の部 .....	109
実験の部 .....	114
参考文献 .....	117

## 略語一覧

EGC	: (-)-epigallocatechin
EGCg	: (-)-epigallocatechin gallate
EC	: (-)-epicatechin
ECg	: (-)-epicatechin gallate
GC	: (-)-gallocatechin
GCg	: (-)-gallocatechin gallate
GC <sub>A</sub>	: GC の Conformer A
GC <sub>E</sub>	: GC の Conformer E
GCg <sub>A</sub>	: GCg の Conformer A
GCg <sub>E</sub>	: GCg の Conformer E
Catechin- $\beta$ -CD	: カテキンと $\beta$ -CD との複合体
Catechin_A- $\beta$ -CD	: カテキンの A 環が $\beta$ -CD に包接された複合体
Catechin_B- $\beta$ -CD	: カテキンの B 環が $\beta$ -CD に包接された複合体
Catechin_G- $\beta$ -CD	: カテキンのガロイル基が $\beta$ -CD に包接された複合体
$E_{\text{steric}}$	: CONFLEX 法で算出される立体エネルギー (Steric energy)
$E_{\text{form}}$	: PM3 法で算出される生成熱 (Heat of formation energy)
$E_{\text{total}}$	: DFT 法で算出される全エネルギー (Total energy)

## 序論

近年、コンピュータの演算速度の高速化や磁気ディスク容量の拡大に伴い、量子化学計算を始めとする計算化学的手法は適用範囲を急速に拡大している。以前は、研究対象である分子を構成するフェニル基やアルキル基等の原子数の多い置換基を原子数の少ない水素やメチル基等に変更して計算を行っていた。しかし、現在では、研究対象である分子（例：たんぱく質）そのものを計算することが可能となり、さらには複数の分子間の詳細な相互作用解析や創薬のための *in silico* スクリーニングなどが活発に行われている[1-6]。

分子間相互作用には静電的相互作用、双極子間相互作用、電荷移動相互作用、水素結合による相互作用、疎水性相互作用等が知られている。静電的相互作用は電荷を有するイオン間に働く相互作用である。異符号のイオン間には引力が作用し、同符号のイオン間には斥力が作用する。双極子間相互作用は永久双極子を有する分子間に働き、電荷移動相互作用は分子間で電子が非局在化することによって生じる相互作用である。水素結合は、水素原子と電気陰性度の大きな原子（O, N, F, Cl など）を介した分子間の相互作用であり、水素結合による相互作用エネルギーは  $10 \sim 40 \text{ kJ mol}^{-1}$  と双極子間相互作用の 10 倍以上大きい[7]。分子間の水素結合は、電気陰性度の高いフッ素や酸素などの原子の方が、電気陰性度の低い原子に比べて水素結合エネルギーが高く、フェノール類は、共鳴により酸素原子の電気陰性度が増すことで、アルコール類に比べて強い水素結合を形成することができるため、例えばジエチルエーテルに対するメタノールとフェノールの分子間水素結合エネルギーは、メタノールでは  $10.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  であるのに対し、フェノールでは  $15.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  である[8]。薬物は、その構造中に水酸基、アミノ基やカルボキシ基等の官能基を有することが多い。そのため、水溶液中で



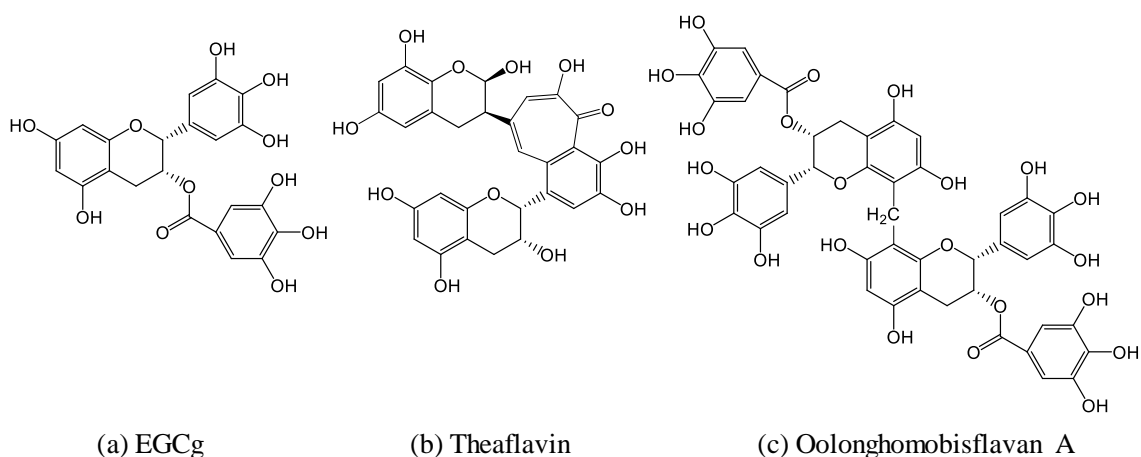
は薬物同士あるいは薬物と他の物質との相互作用、特に先述した官能基を介した分子間水素結合を形成することで薬効の減弱が引き起こされる可能性が十分に考えられる。従って、水溶液中における分子間相互作用において、分子間水素結合を考慮することは極めて重要であり、本論文では分子間水素結合に注目して議論を行う。

薬物と他の物質（飲食物に含まれる生理活性物質やたんぱく質等）との相互作用のうち、薬効を減弱させる相互作用は、疾病の薬物治療上、非常に大きな問題となる。例えば、統合失調症治療薬である risperidone (RISP) 内用液は、茶葉抽出飲料で希釈すると RISP 含量が低下することが知られている[9, 10]。この含量低下は、RISP と茶葉抽出飲料に含まれる生理活性物質である茶カテキン、特にその主成分である(-)-epigallocatechin gallate (EGCg) とモル比 1:1 の不溶性複合体を形成することに起因し、特に RISP のピペリジン環窒素と EGCg のガロイル基にある水酸基との間で形成される分子間水素結合が重要であることが報告されている[9]。

一方、上記の不溶性複合体形成は  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) を添加することで抑制できる[11-13]。このとき、 $\beta$ -CD は RISP とは相互作用せず、もっぱら EGCg と相互作用することで、EGCg による RISP 含量低下を抑制できることが等温滴定マイクロ熱量測定 (ITC) による実験によって明らかにされている。

薬物は食後に服用されることが多く、また多くの日本人は食事と共に茶葉抽出飲料を摂取する習慣がある。RISP と同様の構造を有する薬物は多数上市されており、茶葉抽出飲料中のカテキンとの相互作用が懸念される[14-16]。従って、RISP と EGCg との相互作用のように、薬効減弱に繋がるような相互作用を  $\beta$ -CD の添加によってコントロールできるという知見について、計算化学を用いて詳細かつ理論的に検討することは、薬学的に極めて重要であると考えられる。

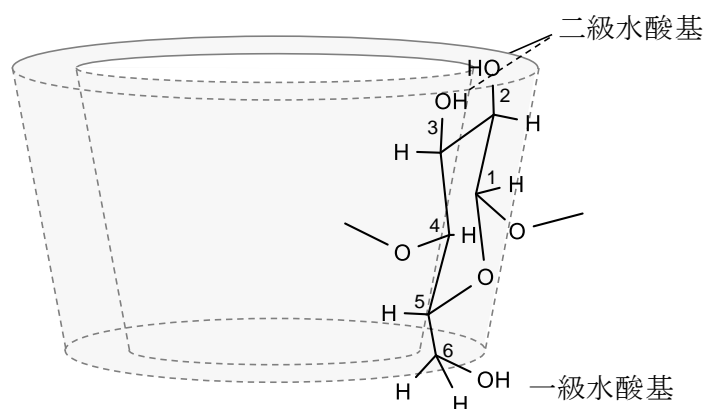
茶葉抽出飲料には、EGCg 以外にも多くのカテキンが含まれている。カテキンは、分子内に複数のフェノール性水酸基をもつ化合物群であり、その構造の多様性ゆえに生体内でさまざまな生理機能を示し、特定保健用食品等の成分として使用されている[17, 18]。不発酵茶である緑茶には EGCg などのカテキンが多く含まれるが、茶葉の発酵過程でカテキンは酸化重合するため、半発酵茶の紅茶にはテアフラビン等、発酵茶のウーロン茶にはウーロン茶ポリフェノール等のカテキン重合体が多く含まれる [19-23]。EGCg、テアフラビンおよびウーロン茶ポリフェノールの一種である Oolonghomobisflavan A の構造を Fig 1 に示した。これらのカテキンおよびカテキンの酸化重合体は抗ガン作用、抗動脈硬化作用、血圧上昇抑制作用、抗菌・抗ウイルス作用、抗アレルギー作用や抗肥満作用等の生理活性作用を有し、その効果はカテキンの種類によって異なることが報告されている[24-33]。このように、カテキンには多数の有益な作用がある反面、分子中の複数の水酸基による高い反応性のため、薬効の低下や薬物代謝酵素との相互作用など種々の問題を引き起こす可能性がある[14-16, 34]。



**Fig. 1** EGCg およびカテキン重合体構造

緑茶に含まれるカテキンを(a) に示し、紅茶およびウーロン茶に含まれるカテキン重合体をそれぞれ(b) および(c) に示した。

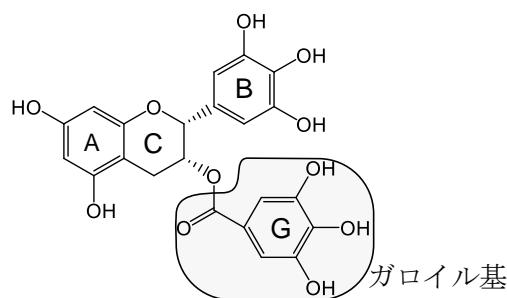
天然に存在する CD は、グルコースが  $\alpha$ -1,4 結合した環状オリゴ糖であり、構成するグルコースの数によって  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD および  $\gamma$ -CD が存在する。CD は Fig. 2 に示すように底のないバケツ型の構造をとる。CD を構成するグルコース単位の 2 位および 3 位の炭素原子に結合する二級水酸基は、CD の環の広い側に位置し、グルコース単位の 6 位の炭素原子に結合する一級水酸基は CD 環の狭い側に位置するため、CD 環の外側は親水性を示し、CD 空洞内は疎水性を示す。CD の一級水酸基や二級水酸基をメチル基やヒドロキシプロピル基などに置換することで、CD の溶解性やゲスト分子の分子認識機能を改善する[35]。このような CD の立体構造上の特徴によって、その空洞内に種々の物質（ゲスト分子）を取り込み包接複合体を形成する[36-40]。ゲスト分子の疎水性部位は CD 空洞内に包接されやすく、これらの相互作用は非共有結合性であるため、溶液中では一般的に可逆反応である[41, 42]。さらに、包接複合体形成がゲスト分子の物理化学的性質を変化させるため、CD はイトラコナゾールの溶解補助、リマプロストの安定化等、医薬品の添加物として使用されている[41-45]。



**Fig. 2** CD の構造模式図

炭素原子番号は IUPAC 命名法に準拠した。

ポリフェノール的一种であるカテキンは、複数のフェノール性水酸基を有する。CD 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カテキンの各環は包接されにくいと考えられる。しかし、カテキンは CD との包接複合体を形成することで、カテキンの苦味や渋味が抑制され、抗酸化作用は増大することが知られており、CD によるカテキンの包接複合体について、種々の検討が行われている[46-57]。例えば、EGCg と  $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD および  $\gamma$ -CD との反応熱量は  $\beta$ -CD が最も高く、 $\alpha$ -CD との反応熱量は観測されなかったことが報告されている[58]。また、EGCg と  $\beta$ -CD による包接複合体は、核磁気共鳴スペクトル (NMR) 測定によるプロトンのケミカルシフト変化および ROESY スペクトルから EGCg の A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された複合体構造が報告されている[59, 60]。Fig. 3 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 環だけでなく B 環やガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内に包接される可能性が考えられる。しかし、NMR 測定では EGCg の各環がそれぞれ  $\beta$ -CD によって包接された複合体のケミカルシフトの平均値が測定値として得られ、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、各種包接複合体の形成定数や親和力の真の値を求めることができない。ゆえに、EGCg のように複数の被包接部位を有するゲスト分子の場合、包接複合体形成メカニズムを詳細に解明するためには、計算化学的手法を駆使する以外に方法はない。



**Fig. 3** EGCg の構造

各環の名称を A、B、C および G とした。

計算化学は、水中で複数の複合体が生成する可能性を有する場合に、各複合体についてエネルギー的に安定な 3 次元構造を決定することができる唯一の方法であり、複合体の安定性に寄与する水素結合などの分子間相互作用を求めることができる。本論文では、分子間相互作用を検討するモデル分子として、置換基を有さず、水溶液中で脂肪族化合物だけでなく芳香族化合物など様々な分子を、モル比 1:1 で包接することができる  $\beta$ -CD を用いた。また、 $\beta$ -CD に対する親水性のゲスト分子として、フェノール性水酸基を複数有し、かつ複数の被包接部位を有するカテキンを用いた。

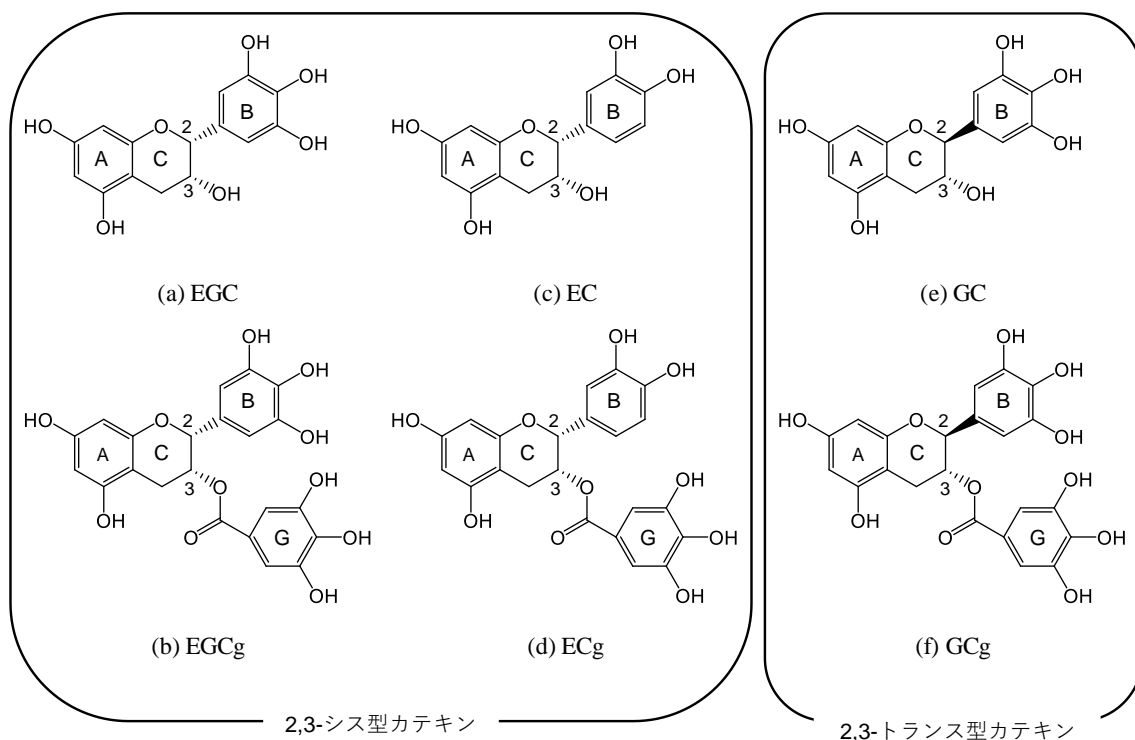
第 1 章では、複数の計算化学的手法を用い、カテキンと  $\beta$ -CD との複合体形成メカニズムについて、カテキンと  $\beta$ -CD との分子間水素結合ならびにカテキンの立体構造に注目し詳細を述べる。

第 2 章では、カテキンと  $\beta$ -CD との複合体について、EGC および EGCg と  $\beta$ -CD との複合体を NMR 測定によって検討し、さらに、ITC を用いた複合体形成の熱力学的検討結果を述べる。

第 3 章では、第 1 章で述べる検討によって得られた 6 種のカテキンと  $\beta$ -CD との複合体構造と、第 2 章で述べる検討によって得られたカテキンと  $\beta$ -CD との複合体形成に関する熱力学的パラメータについて検証結果を述べる。

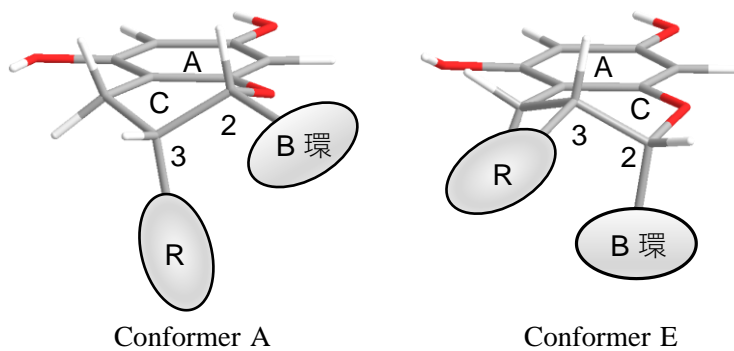
## 第 1 章 カテキン- $\beta$ -cyclodextrin 包接複合体の水溶液中 安定構造

カテキンと  $\beta$ -CD との水溶液中における包接複合体形成メカニズムを理解するためには、包接複合体形成を制御するエネルギー的および立体的因子を解明する必要がある。カテキンは、Fig. 4 に示すようにジヒドロピラン環である C 環の 2 位および 3 位に 2 つの不斉炭素をもつ flavan-3-ols を基本骨格とし、天然には (2*R*, 3*R*) 体の 2,3-シス型カテキンが多い。EGC は、B 環がピロガロール基であり、C 環 3 位に水酸基が結合する (Fig. 4 (a)) が、EGCg は C 環 3 位にガロイル基が結合する (Fig. 4 (b))。EC は B 環がカテコール基であり C 環 3 位に水酸基が結合する (Fig. 4 (c)) が、ECg は C 環 3 位にガロイル基が結合する (Fig. 4 (d))。EGC や EGCg は、加熱によって C 環 2 位の炭素が *S* 体にエピマー化し、(2*S*, 3*R*) 体の 2,3-トランス型カテキンである(-)-gallocatechin (GC) や(-)-gallocatechin gallate (GCg) に変化し (Fig. 4 (e) および(f))、これらは加温されたペットボトルや缶の緑茶飲料中に含まれる[61-63]。C 環は、水相中でパッキングが起こるため、Fig. 5 に示すように C 環 2 位炭素原子に結合する B 環が擬エカトリアル位および 3 位炭素原子に結合する置換基 R (水酸基またはガロイル基) が擬アキシアル位に位置した構造 (Conformer A) と、C 環 2 位の B 環が擬アキシアル位および 3 位の R が擬エカトリアル位に位置した構造 (Conformer E) をとり得る可能性がある[59, 64]。さらに、カテキンの B 環およびガロイル基は C 環 2 位および 3 位の炭素原子に対して単結合であるため、C 環に対して自由な配置をとることが可能である。このように、カテキンは水相中で数多くの配座を有すると考えられる。



**Fig. 4** カテキン 6 種の構造

炭素原子番号は IUPAC 命名法に準拠しており、各環の名称を A、B、B' および G とした。



**Fig. 5** Conformer A および Conformer E のパッカリング構造

B 環および置換基 R は模式図で表した。R は水酸基またはガロイル基を示す。

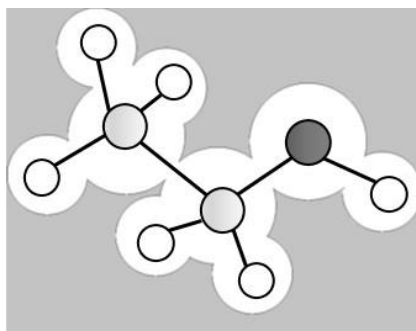
カテキンのガロイル基の有無、B 環の水酸基数や立体異性体は、様々な物性に影響を与える。例えば、フリーラジカル消去能は、ガロイル基を有するカテキンの方がガロイル基を有さないカテキンより強く、2,3-トランス型カテキンの方が対応する 2,3-シス型カテキンより強いことが報告されている[65-70]。また、ガロイル基を有するカテキンは、一部の薬物と非常に強い相互作用を引き起こすことが報告されている[9, 14]。よって、カテキンの構造的な差異は、水相中における  $\beta$ -CD との包接複合体形成に何らかの影響を与える可能性が非常に高く、被包接部位の変化による包接複合体の変化を調べることは、包接複合体形成の起動力が水素結合、ファンデルワールス力および疎水性相互作用などの弱い分子間相互作用に依存することを明白にするために重要である。

本研究では、 $\beta$ -CD に対するゲスト分子として、EGC、EGCg、EC、ECg、GC および GCg の 6 種のカテキンを用いた。各カテキン、 $\beta$ -CD およびカテキンと  $\beta$ -CD との複合体における水相中の最安定構造を決定するために、次に示す複数の計算方法を用いた。

計算化学は、分子の電子状態について解析を行う量子化学計算と、分子の位置や速度などの変化を追跡する分子動力学 (Molecular Dynamics : MD) 法がある。量子化学計算では、シュレディンガー方程式を解くことで分子の電子状態を求めるが、酸素原子や炭素原子などの多電子原子、あるいは分子に対するシュレディンガー方程式を厳密に解くことは不可能である。そのため、Parametric method 3 (PM3 法) では原子や分子の物性値 (実験値) をパラメータとして使用することで、シュレディンガー方程式の解である波動関数を近似的に求める。298 K の標準状態で各元素から 1 mol の化合物が生成する際の生成熱 (Heat of formation energy :  $E_{\text{form}}$ ) をエネルギー評価に用いる。密度汎関数 (Density Functional Theory : DFT) 法は電子の状態に対するシュレディンガー方程式を、ホーエンベルグ・



コーン定理に基づいて、近似的に解く。ホーエンベルグとコーンは、分子の電子密度が決まれば、分子の基底状態における電子エネルギーが確定することを証明した。そのため、DFT 法では分子の 3 次元空間座標上の電子密度を求める。分子を構成する全電子エネルギーと原子核間反発エネルギーの和で表される全エネルギー (Total energy) が算出される。前述の計算は、一般的に気相中 (Gas phase) で行われる。しかし、水溶液中の反応過程を考える際は、対象とする分子だけでなく、その分子を取り巻く水分子を考慮する必要がある。これらの水分子を個々の分子として取り扱う場合、PM3 法や DFT 法を用いた構造最適化計算では、水分子数に比例して計算時間が延長し、かつ多くの計算資源を必要とする。そこで、Fig. 6 に示すように、対象分子が適当な大きさ・形を持つ溶媒 (連続誘電体) の空孔中に存在すると仮定し、対象分子の電荷分布に基づき周辺の溶媒 (誘電体) を分極させることで水相中を想定した連続誘電体モデル (Polarizable continuum model : PCM ) を用いた。

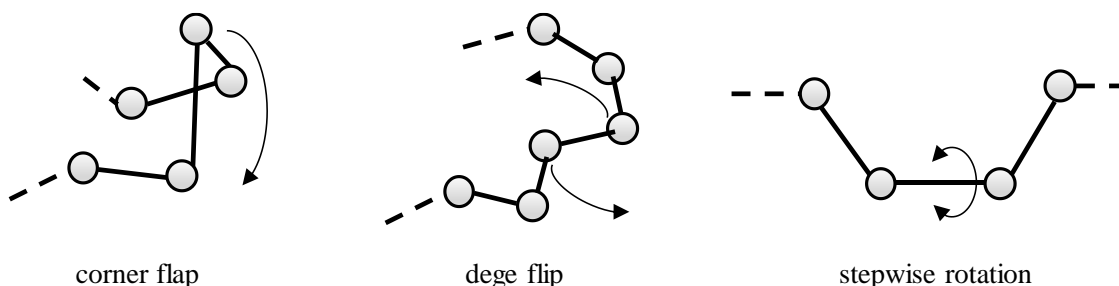


**Fig. 6** 連続誘電体モデル

分子をボール&スティックモデルで示し、溶媒 (連続誘電体) を鼠色で、連続誘電体内の空孔を白色で示した。

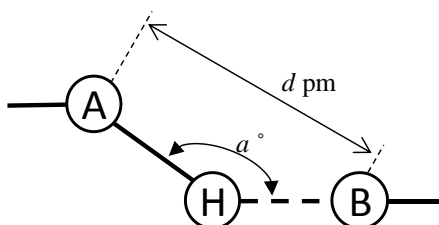
MD 法は、分子や分子を構成する原子に対する運動方程式を解く。数百分子を用いた解析が可能であるため、分子のまわりに水分子を配置し、各分子の運動を動的に検討することが可能となる。MD 法のひとつである CONFLEX 法は、

自由度の高い分子の配座探索に用いられる。Fig. 7 に示すような局所的な変形操作、環構造に対する corner flap と edge flip、直鎖や側鎖に対する stepwise rotation を行うことで、初期入力構造から複数の構造（試行構造）を創出する。試行構造の数は、構造を構成する原子数、環構造の有無、直鎖や側鎖の長さなどの構造に応じて異なる。得られた各配座に対して分子の結合、変角、ねじれ角エネルギーおよび非結合相互作用エネルギーの和で表される立体エネルギー（Steric energy:  $E_{\text{steric}}$ ）が算出され、最安定配座からのエネルギー差および  $E_{\text{steric}}$  に基づく存在比率が算出される。



**Fig. 7** 立体構造の局所的な構造摂動操作

分子間に形成される水素結合は、Fig. 8 に示すように A をプロトン供与基、B をプロトン受容基としたとき、 $A-H \cdots B$  の  $A \cdots B$  間距離を  $d$  (pm)、角度  $\angle AHB$  を  $a$  ( $^\circ$ ) としたとき、 $d$  値は 250 pm から 320 pm の範囲内かつ  $a$  値は  $130^\circ$  から  $180^\circ$  の範囲内にあるものを水素結合とした[71]。



**Fig. 8** 水素結合

A、B をそれぞれプロトン供与基、プロトン受容基としたとき、 $A \cdots B$  間距離 ( $d$  (pm)) および角度  $\angle AHB$  ( $a$  ( $^\circ$ )) を測定した。

## 第 1 節 量子化学計算

異なる 2 種類の分子から構成される複合体構造を推定する場合、一般的に結晶 X 線回折や NMR 測定などの実験データから相互作用部位を推定することで計算に用いる複合体の初期推定構造を作成する。一方、実験データから相互作用部位を推定することが難しい場合、分子ごとの表面電荷、最高被占軌道や最低空軌道を基に複合体構造を推定する。

$\beta$ -CD 二級水酸基側の内径は一級水酸基側に比べて大きく、およそ 900 pm であり、芳香族化合物を含む種々のゲスト分子を二級水酸基側から空洞内に包接することができる。はじめに、 $\beta$ -CD に対するゲスト分子としてカテキン基本骨格を有する EGC を用いた。1,3-ベンゼンジオール (A 環) の酸素原子間距離はおよそ 480 pm であり、 $\beta$ -CD の内径を考慮すると EGC は Fig. 8 に示すように A 環だけでなく B 環も  $\beta$ -CD 空洞内に包接する可能性がある。EGC の A 環が  $\beta$ -CD の二級水酸基側から空洞内に包接する (EGC\_A- $\beta$ -CD) 場合、および B 環が空洞内に包接する (EGC\_B- $\beta$ -CD) 場合について詳細に説明する。カテキンの最安定構造および複合体構造を求める計算手順を Fig. 9 に示した。

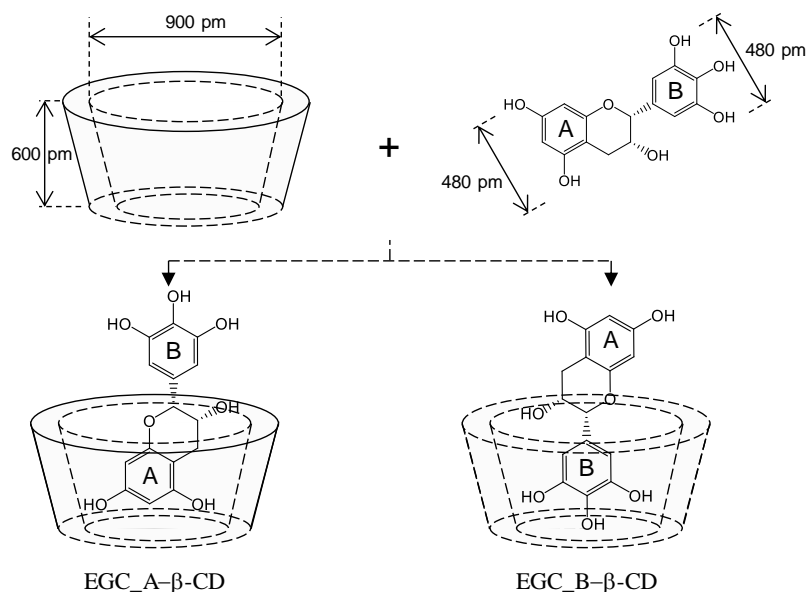
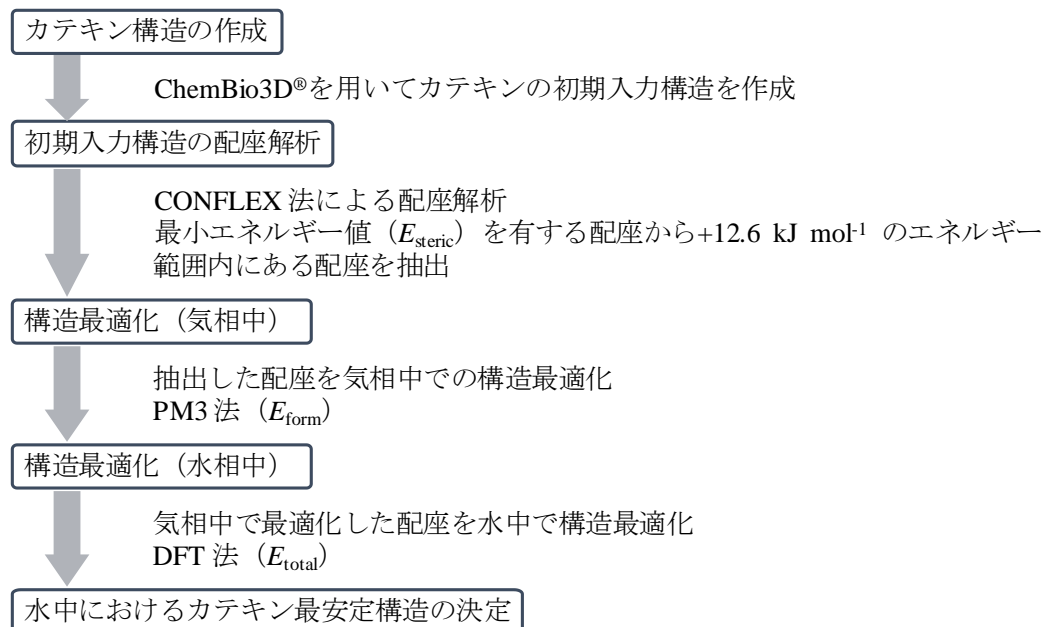


Fig. 9 EGC と  $\beta$ -CD との複合体モード概略図

### カテキンの最安定構造



### カテキンと $\beta$ -CD との複合体の最安定構造

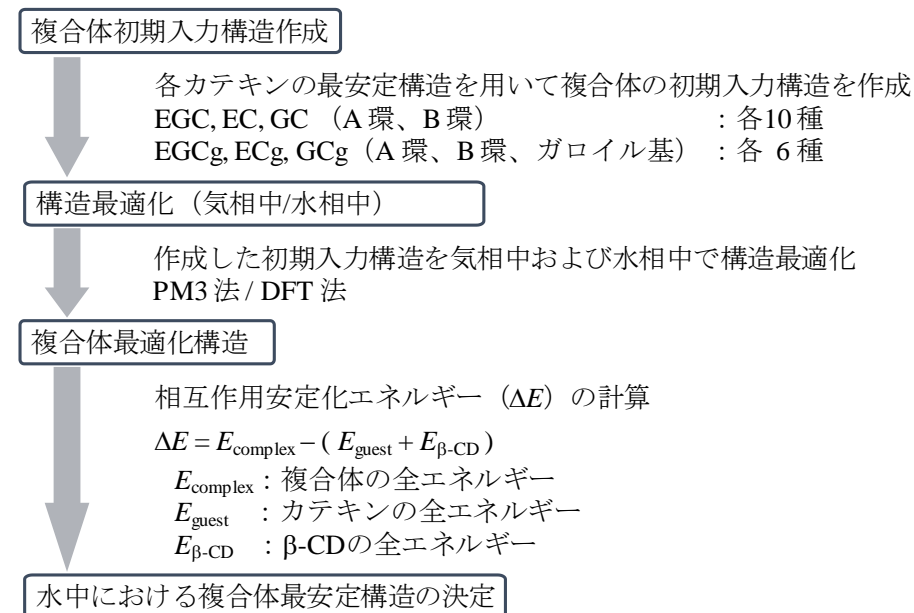


Fig. 10 計算方法のフローチャート

## 第 1 項 (-)-Epigallocatechin

はじめに、プログラム ChemBio3D<sup>®</sup> (PerkinElmer 社製) を使用し、EGC の初期構造 (Fig.11) を作成した。この構造は Conformer E であり、C 環に対する B 環の立体的な位置をあらわす二面角 ( $\angle C^{1'}-C^2-O^1-C^9$ ) は  $87.3^\circ$  であった。

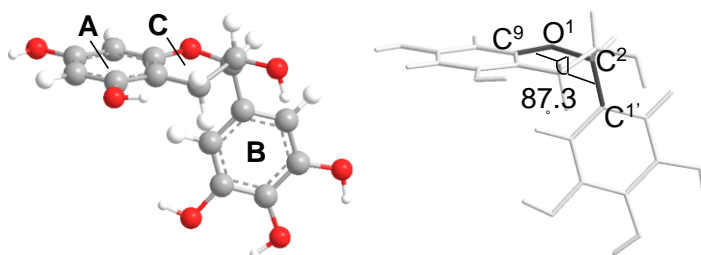
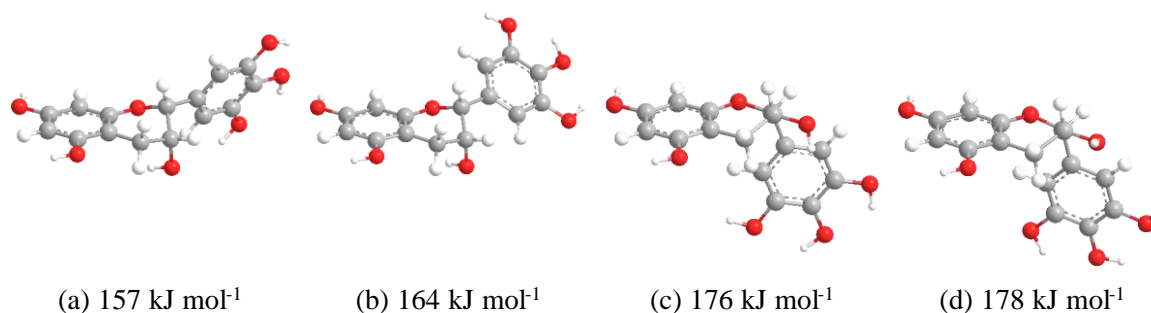


Fig. 11 ChemBio3D<sup>®</sup> で作成した EGC

各環の名称および二面角 ( $\angle C^{1'}-C^2-O^1-C^9$ ) を記した。

次に、プログラム CONFLEX ver.6.12a (CONFLEX 社製) による配座解析を行い、102 個の配座異性体を得た。このうち、4 個の代表的な配座異性体とその立体エネルギー ( $E_{\text{steric}}$ ) 値を Fig. 12 に示した。C 環の立体構造が異なる Conformer A ((a)、(b)) および Conformer E ((c)、(d)) が創出され、 $E_{\text{steric}}$  値は Conformer A の方が小さい傾向にあった。C 環 2 位炭素原子に対して B 環は単結合であるため、B 環の回転による配座異性体や、各水酸基の水素原子の向きが異なる配座異性体等が多く創出された。102 個の配座について  $E_{\text{steric}}$  の最小値から順に  $4.2 \text{ kJ mol}^{-1}$  ごとに分類し、各エネルギー範囲内に含まれる Conformer A および Conformer E の配座数および存在比率を算出し、Table 1 にまとめた。最小の  $E_{\text{steric}}$  値を有する配座から  $12.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  の範囲内には Conformer A のみが 14 個含まれ、それらの存在比率の和は 98.9 % であった。これらの 14 個の配座異性体を Fig. 13 に示した。2,3-シス型カテキンは、結晶 X 線回折による結晶構造や D<sub>2</sub>O

中の NMR 測定により Conformer A であることが報告されており、CONFLEX 法による配座解析と一致した[59, 72-74]。

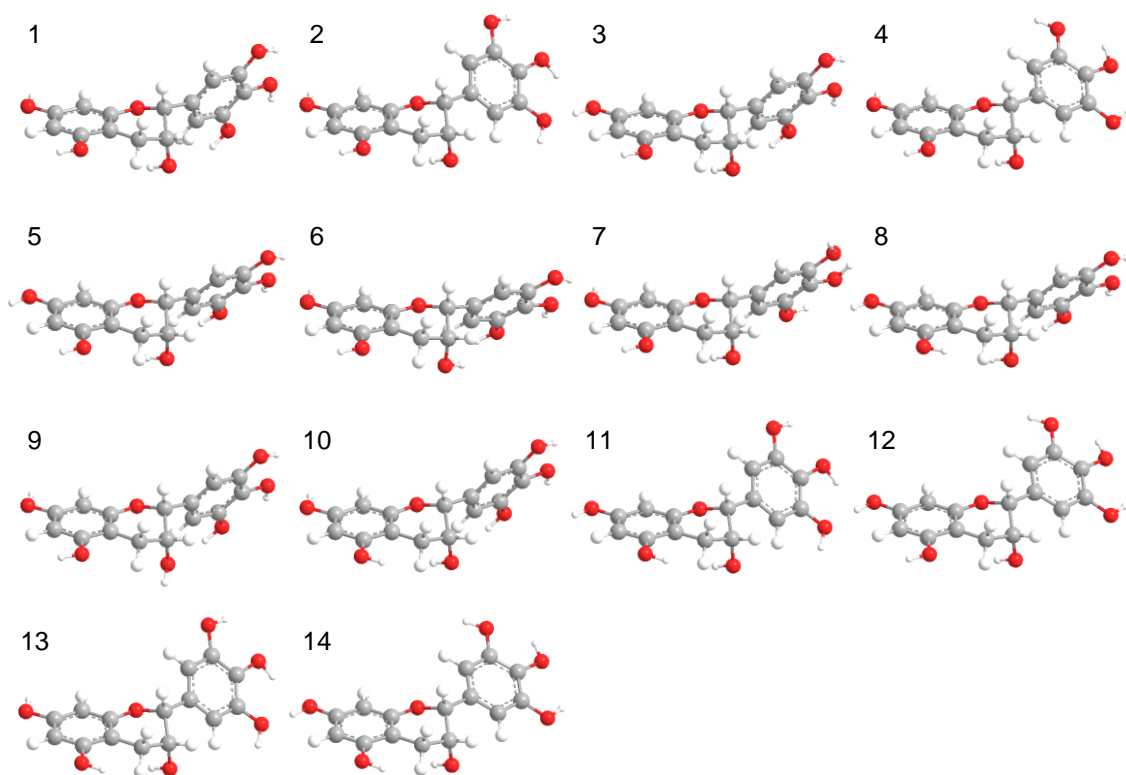


**Fig. 12** 配座解析により得られた代表的な配座とその立体エネルギー

(a) および(b) は Conformer A、(c) および(d) は Conformer E である。

**Table 1** EGC の配座解析

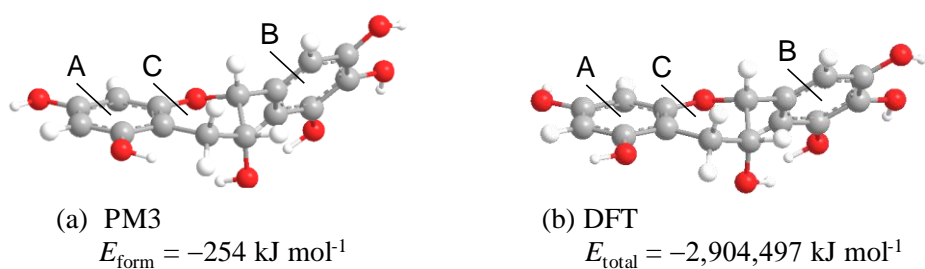
エネルギー範囲 / kJ mol <sup>-1</sup>	配座数合計		存在比率 / %
	Conformer A	Conformer E	
0 ~ 4.2	2	0	79.0
4.2 ~ 8.4	6	0	16.1
8.4 ~ 12.6	6	0	3.8
12.6 ~ 16.7	7	0	0.9
16.7 ~ 20.9	2	2	0.1
20.9 ~ 25.1	8	6	0.1
25.1 ~ 29.3	3	10	0.0
29.3 ~ 33.5	8	11	0.0
33.5 ~ 37.7	7	1	0.0
37.7 ~ 41.8	0	0	0
41.8 ~ 46.0	3	0	0
46.0 ~ 50.2	3	0	0
50.2 ~ 54.4	8	1	0
54.4 ~ 58.6	4	0	0
58.6 <	3	1	0



**Fig. 13** 配座解析により得られたエネルギー的に安定な 14 個の配座  
最小の  $E_{\text{steric}}$  を有する配座から順に 1~14 と番号を付けた。

配座解析により創出された 14 個の配座について、PM3 法で気相中での構造最適化（プログラム GAMESS Ver.12）を行った。生成エネルギー（ $E_{\text{form}}$ ）を比較し、最小の  $E_{\text{form}}$  を有する最適化構造を Fig. 14 (a) に示した。 $E_{\text{form}} = -254 \text{ kJ mol}^{-1}$  であり、C 環に対する B 環の二面角  $\angle \text{C}^{1'}\text{-C}^2\text{-O}^1\text{-C}^9$  は  $174^\circ$  であり、C 環および B 環はほぼ同一平面上に位置した。さらに、これら 14 個の配座について、DFT 法による水相中における構造最適化（プログラム Gaussian 09 rev E.01）を行った。最小の全エネルギー（ $E_{\text{total}}$ ）を有する最適化構造を Fig. 14 (b) に示した。 $E_{\text{total}}$  は  $-2,904,497 \text{ kJ mol}^{-1}$  であり、二面角  $\angle \text{C}^{1'}\text{-C}^2\text{-O}^1\text{-C}^9$  は  $175^\circ$  であった。Fig. 14 に観られる様に、A 環 5 位、7 位および C 環 3 位の炭素原子に結合する水

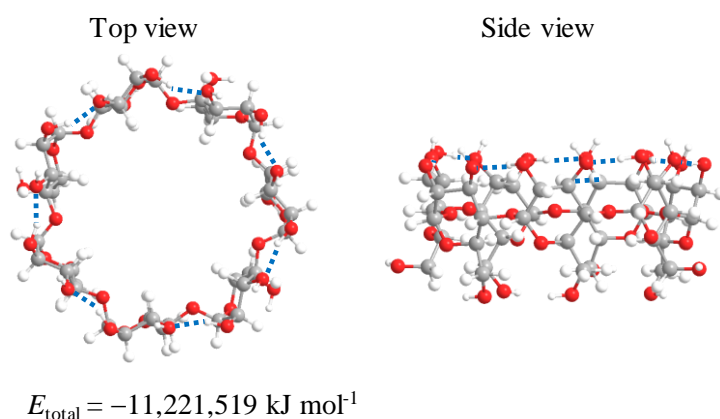
酸基の水素原子の向きが異なるが、気相中または水相中に関わらず C 環に対する B 環の立体位置はほぼ同様であった。本研究では水相中の包接複合体構造を求めるため、DFT 法による最適化構造 (Fig.14 (b)) を初期構造として使用した。



**Fig. 14** PM3 法および DFT 法による最適化構造

それぞれの環の名称を図中に示し、それぞれの計算法による算出エネルギー ( $E_{\text{form}}$  および  $E_{\text{total}}$ ) 値を図下に示した。

$\beta$ -CD について、EGC と同様の方法で水相中における最安定構造を求め、その構造を Fig. 15 に示した。全エネルギーは  $-11,221,519 \text{ kJ mol}^{-1}$  であり、二級水酸基側の  $\text{C}^2$  および  $\text{C}^3$  に結合した水酸基間で分子内水素結合を形成した。

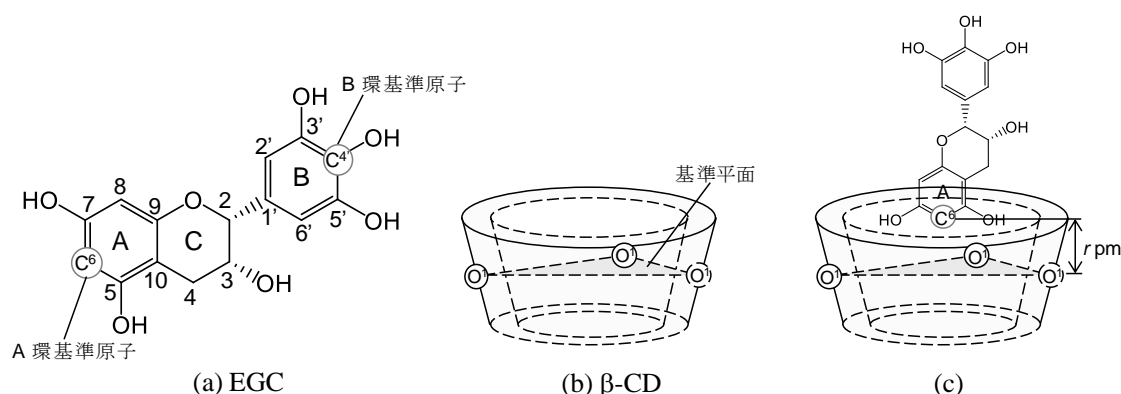


**Fig. 15**  $\beta$ -CD の最安定構造

青色破線は  $\beta$ -CD の分子内に形成した水素結合を示した。



EGC の  $\beta$ -CD 空洞内の包接位置を決定するために、はじめに EGC の A 環および B 環の基準原子として  $C^6$  および  $C^{4'}$  をそれぞれ設定し (Fig. 16 (a))、 $\beta$ -CD 空洞内のグリコシド結合を構成する酸素原子 ( $O^1$ ) 3 点から成る平面を基準平面として設定し (Fig. 16 (b))、これらの距離を  $r$  (pm) とした (Fig. 16 (c))。  $r = 0$  pm は、EGC の基準原子が  $\beta$ -CD の基準平面上に位置したときである。



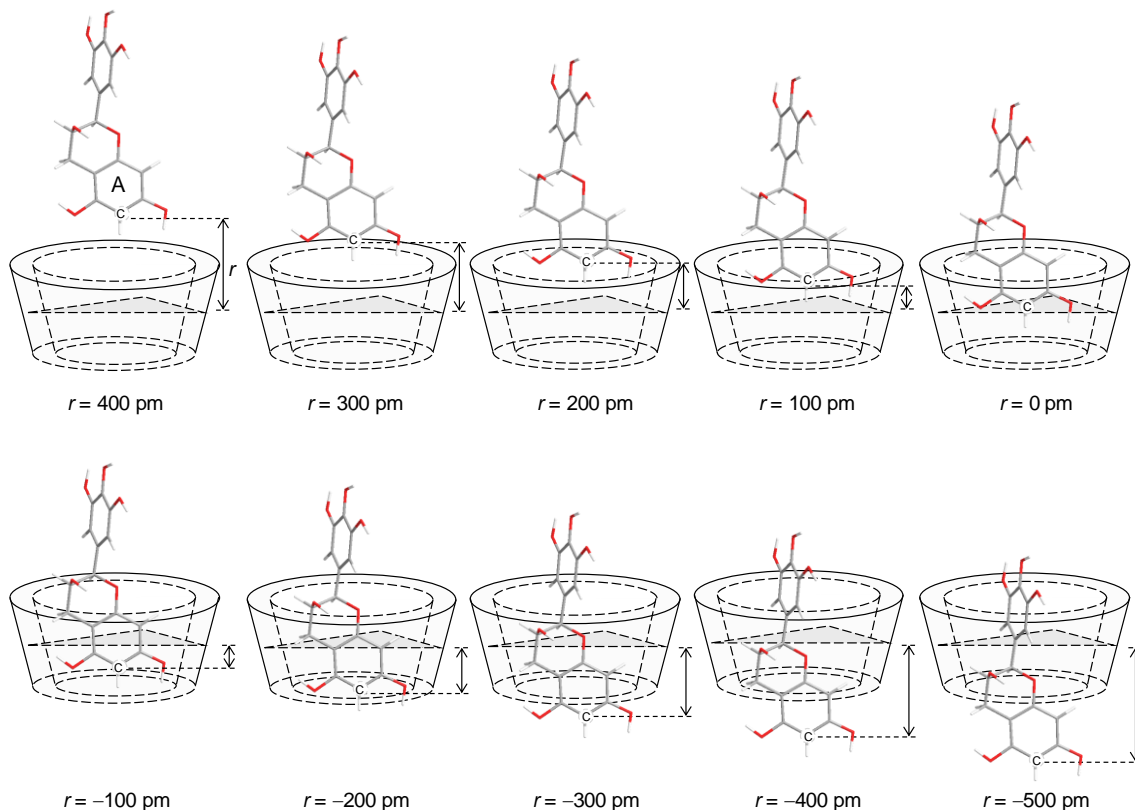
**Fig. 16** EGC の基準原子および  $\beta$ -CD の基準平面

炭素原子番号は IUPAC 命名法に準拠しており、EGC および  $\beta$ -CD の基準原子に丸を付けた。EGC の基準炭素原子と  $\beta$ -CD の基準平面との距離を  $r$  (pm) とした。

EGC および  $\beta$ -CD の水相中の最安定構造 (Fig.14 (b) および Fig. 15) を用い、EGC の各環の基準原子が  $\beta$ -CD の二級水酸基側の縁よりやや上位に位置する  $r = 400$  pm から、 $\beta$ -CD 空洞内の最深位置  $r = -500$  pm まで 100 pm ずつ変化させた複合体の初期入力構造 10 種を作成した。EGC\_A- $\beta$ -CD の初期入力構造 10 種の模式図を Fig. 17 に示した。各初期入力構造について PM3 法による気相中での構造最適化を行い、最終的に DFT 法による水相中での構造最適化を行った。また、DFT 法より複合体の  $E_{\text{complex}}$  を計算し、ゲスト分子および  $\beta$ -CD の  $E_{\text{guest}}$ 、 $E_{\beta\text{-CD}}$  を差し引くことで、次式を用いた相互作用安定化エネルギー ( $\Delta E$ ) を算出した。

$$\Delta E = E_{\text{complex}} - (E_{\text{guest}} + E_{\beta\text{-CD}}) \cdots \cdots \cdots (1)$$

ただし、 $E_{\text{EGC}}$  および  $E_{\beta\text{-CD}}$  は前述の  $E_{\text{total}}$  (EGC :  $-2,904,497 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、 $\beta\text{-CD}$  :  $-11,221,519 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) を使用した。



**Fig. 17** EGC\_AC- $\beta$ -CD の複合体初期構造

EGC を  $\beta$ -CD の二級水酸基側から接近させ、10 個の初期入力構造を作成した。それぞれの構造における  $r$  値を図の下に示した。

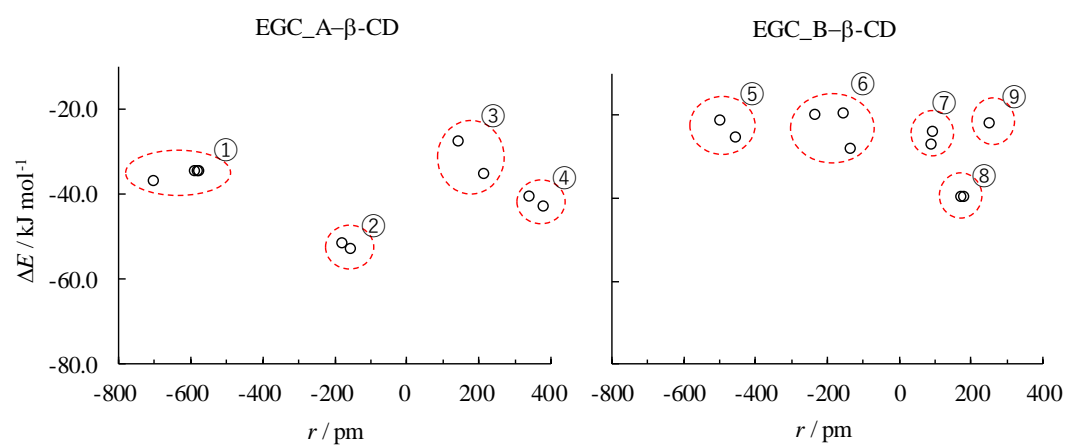
Fig. 18 は、EGC\_A- $\beta$ -CD および EGC\_B- $\beta$ -CD 各 10 種の初期入力構造について DFT 法による構造最適化を行い、各最適化構造の  $r$  値を横軸に、対応する  $\Delta E$  値を縦軸に示した。EGC\_A- $\beta$ -CD と EGC\_B- $\beta$ -CD の最適化構造について、それぞれ  $r$  値と  $\Delta E$  値が類似した最適化構造をまとめると、EGC\_A- $\beta$ -CD は①～④ の 4 つのグループ、EGC\_B- $\beta$ -CD は⑤～⑨ の 5 つのグループに分類された。各グループにおいて  $\Delta E$  が最小値の最適化構造、 $\Delta E$  値および  $r$  値、分子間

水素結合の詳細 ( $d$  値および  $a$  値) を Fig. 19 および Fig. 20 に示した。各最適化構造中の青色破線は EGC と  $\beta$ -CD 間に形成された分子間水素結合の位置を示した。

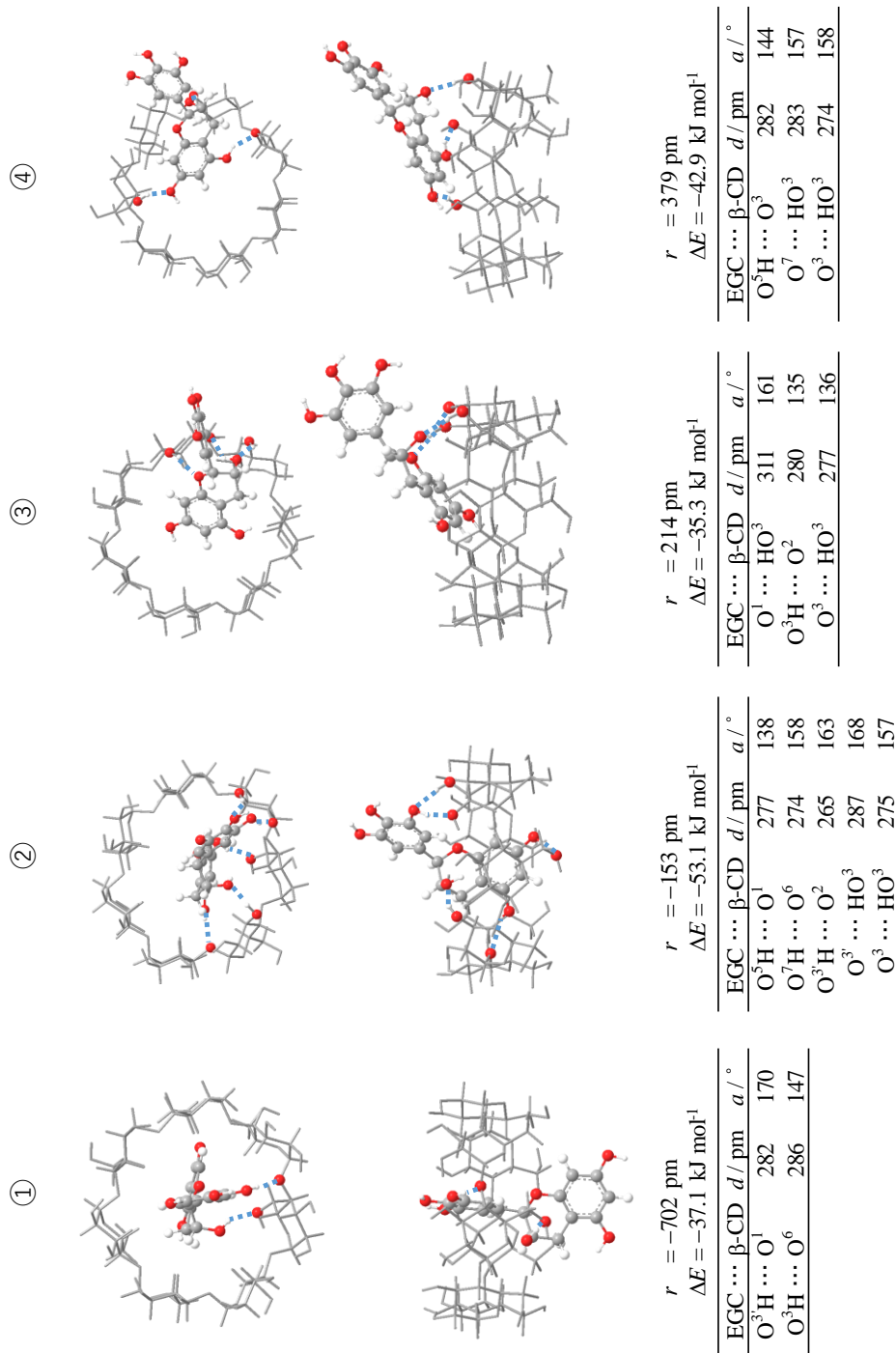
EGC\_A- $\beta$ -CD について、EGC は  $\beta$ -CD の空洞内に包接された方が  $\Delta E$  値は低下し、 $r = -153$  pm のとき  $\Delta E$  値は最小値であり、これは EGC の A 環が  $\beta$ -CD 空洞内中央に位置した構造 (②) であった。この最適化構造では、EGC の水酸基と  $\beta$ -CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合の数は 5 か所あった。EGC の A 環が  $\beta$ -CD 空洞内深くに位置した構造 (①) や空洞内に浅く位置した構造 (④) の  $\Delta E$  値は、② に対して約  $16 \text{ kJ mol}^{-1}$  増加した。

EGC\_B- $\beta$ -CD について、EGC は  $\beta$ -CD の二級水酸基側の縁上部に B 環が位置した  $r = 184$  pm のとき (⑧)、 $\Delta E$  値は最小値であった。B 環はもとより A 環および C 環は完全に  $\beta$ -CD 空洞外に位置しており、包接複合体を形成していなかった。B 環をよりも深く挿入した⑤、⑥ および⑦ の  $\Delta E$  値は  $r$  値に関わらず、ほぼ同じ値 ( $\Delta E = -23.5 \pm 3.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) であった。

EGC\_A- $\beta$ -CD および EGC\_B- $\beta$ -CD の全ての最適化構造のうち  $\Delta E$  値の最小値は② であり、分子間水素結合を最も多く形成した。フェノール性水酸基と  $\beta$ -CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合一つのエネルギーは  $-8.4 \sim -5.9 \text{ kJ mol}^{-1}$  であると報告されており[41]、最小  $\Delta E$  値から分子間水素結合二つ分の  $+16 \text{ kJ mol}^{-1}$  の範囲内、すなわち④ や② の最適化構造も水相中でとり得ると考えられる。すなわち、EGC の A 環は  $\beta$ -CD 空洞内に緩く包接され、水相中では空洞内の一級水酸基側から二級水酸基側まで揺れ動くことが推定された。一方、EGC の B 環が包接された各最適化構造は、A 環が包接された最適化構造に比べて全体的に  $\Delta E$  値は小さく、EGC の B 環は  $\beta$ -CD 空洞内にほとんど包接されないと考えて良い。

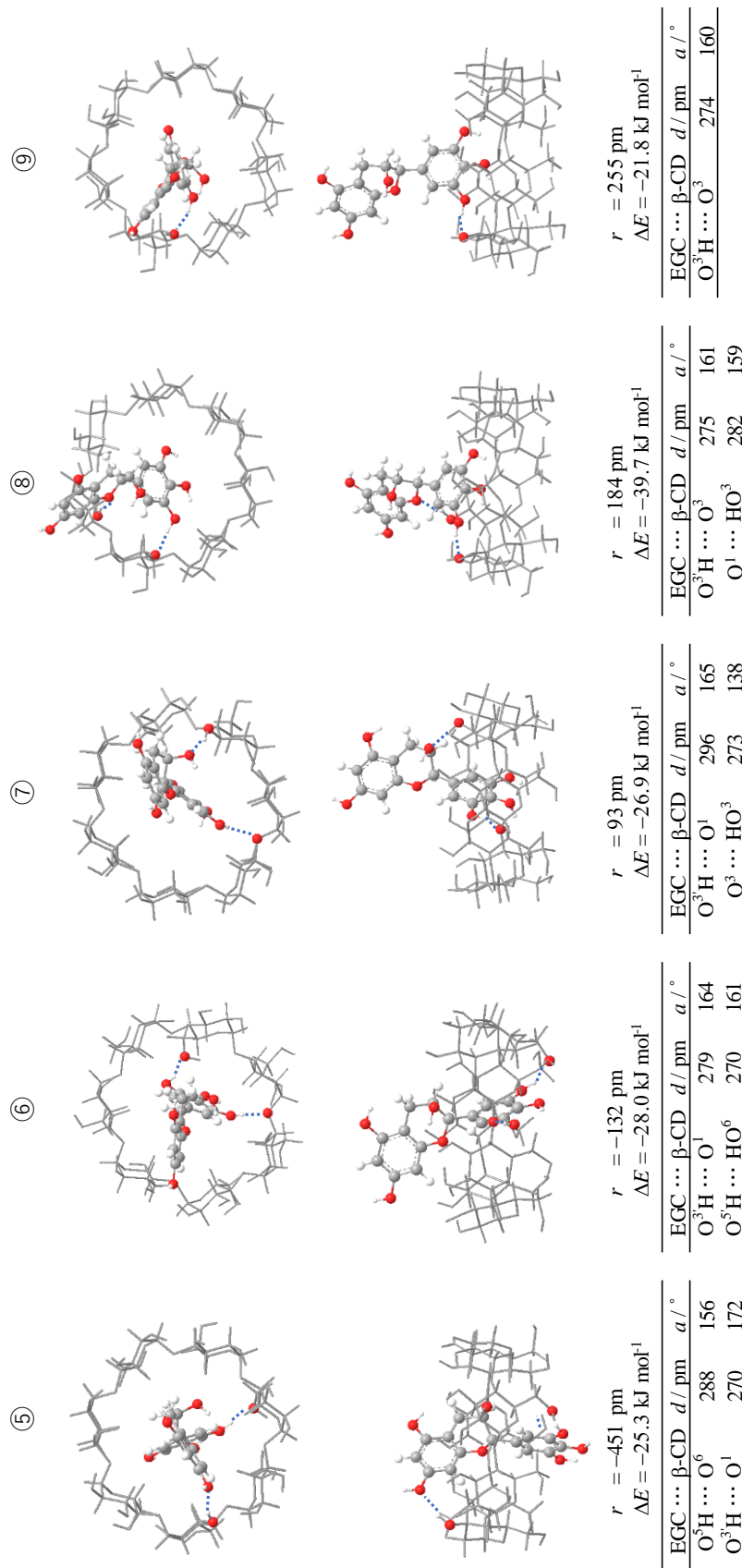


**Fig. 18** EGC-β-CD の最適化構造における  $r$  値および  $\Delta E$  値  
各グループを赤丸で囲み、① ~ ⑨の番号を付けた。



**Fig. 19** EGC\_A- $\beta$ -CD におけるグループ① ~ ④ の最適化構造および分子間水素結合の詳細

$\beta$ -CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。

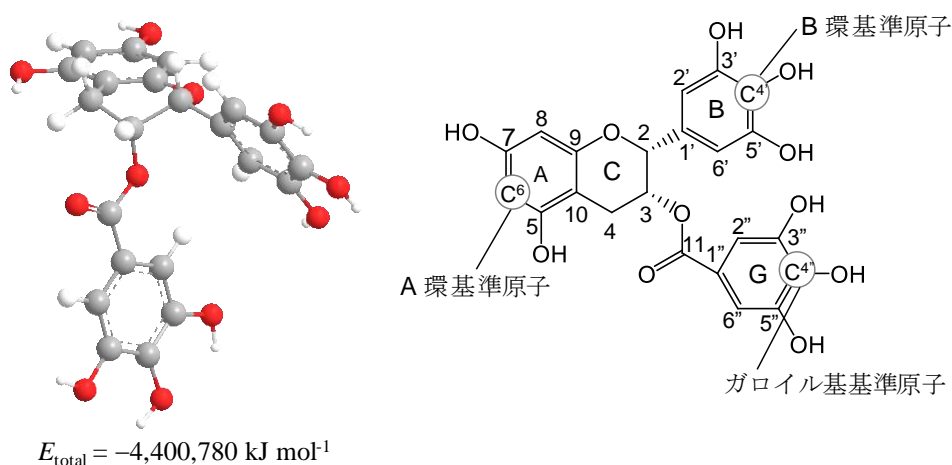


**Fig. 20** EGC\_B-β-CD におけるグループ⑤ ~ ⑨ の最適化構造および分子間水素結合の詳細

β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。

## 第 2 項 (-)-Epigallocatechin gallate

3 か所の被包接部位を有する EGCg をゲスト分子とし、Fig. 10 のフローチャートに従い、はじめに水中における EGCg の最安定構造を求めた。CONFLEX 法を用いた配座解析では、最小の  $E_{\text{steric}}$  を有する配座から  $12.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  の範囲内に Conformer A のみが 11 個含まれ、それらの存在比率の和は 96.9 % であった。11 個の配座について PM3 法による気相中での構造最適化を行い、最終的に DFT 法による水中での構造最適化を行った。最小の  $E_{\text{total}}$  を有する最安定構造を Fig. 21 に示した。C 環に対する B 環の二面角  $\angle \text{C}^{1'}\text{-C}^2\text{-O}^1\text{-C}^9 = 172^\circ$  であり、C 環に対する B 環の立体構造は EGC とほぼ同様であった。

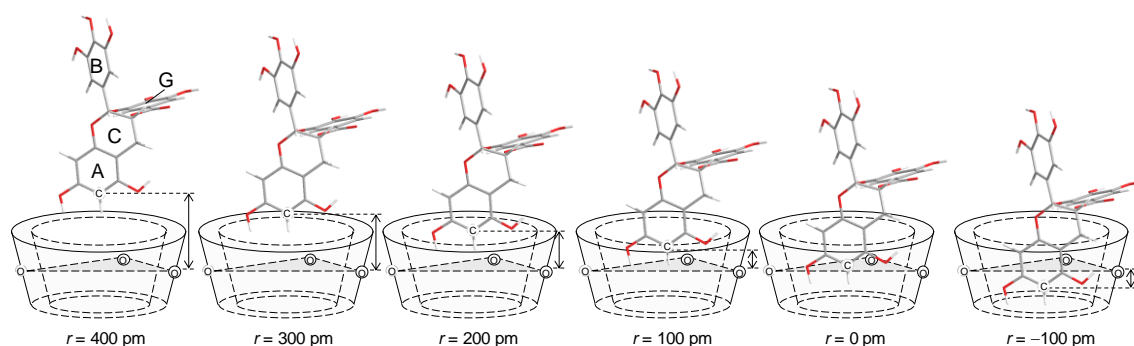


**Fig. 21** EGCg の最構造および基準原子

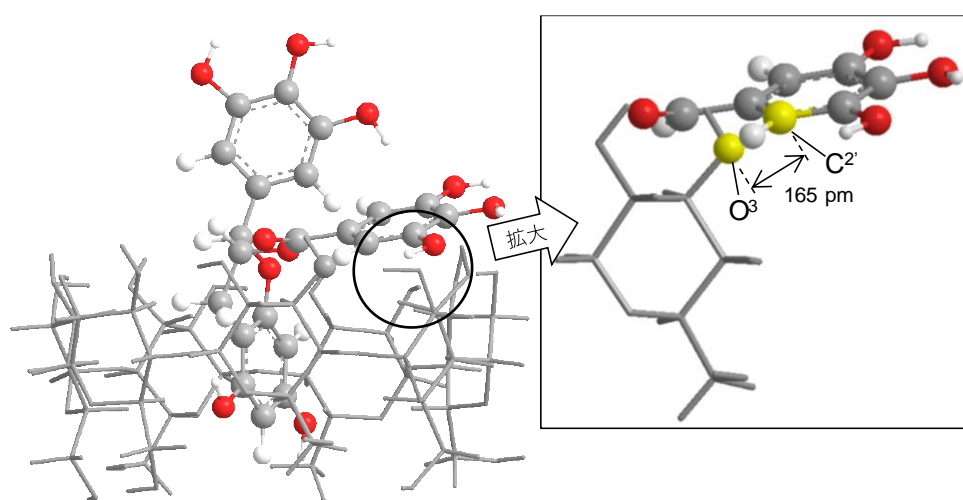
炭素原子番号は IUPAC 命名法に準拠しており、EGCg の基準原子に丸を付けた。最適化構造の下に  $E_{\text{total}}$  を示した。

EGCg はガロイル基を有するため、EGC のように  $\beta$ -CD 空洞内を二級水酸基側から一級水酸基側まで通り抜けることができない。Fig.21 に示すように、EGC と同様に A 環および B 環の基準炭素原子を設定し、ガロイル基の基準炭素原子を  $\text{C}^{4''}$  と設定したとき、EGCg の各環の基準原子が  $\beta$ -CD の二級水酸基側の縁

よりやや上位に位置する  $r = 400$  pm から、 $\beta$ -CD 空洞内の  $r = -100$  pm まで 100 pm ずつ変化させた複合体の初期入力構造 6 種を作成した。Fig. 22 は EGCg\_A- $\beta$ -CD の初期入力構造 6 種の模式図を示した。それぞれの初期入力構造について PM3 法による気相中での構造最適化を行い、最終的に DFT 法による水中での構造最適化を行った。ただし、EGCg\_A- $\beta$ -CD の  $r$  値が  $-100$  pm の初期入力は、Fig. 23 に示すように EGCg の 2'' 位炭素原子と  $\beta$ -CD の 3 位酸素原子との距離 (165 pm) がファンデルワールス半径の和 (322 pm) より小さくなり、構造最適化計算を行うことはできなかった [75]。



**Fig. 22** EGCg\_A- $\beta$ -CD の 6 種の初期入力構造



**Fig. 23** EGCg\_A- $\beta$ -CD の  $r = -100$  pm における初期入力構造および拡大図  
EGCg と  $\beta$ -CD の近接した原子を黄色で示した。



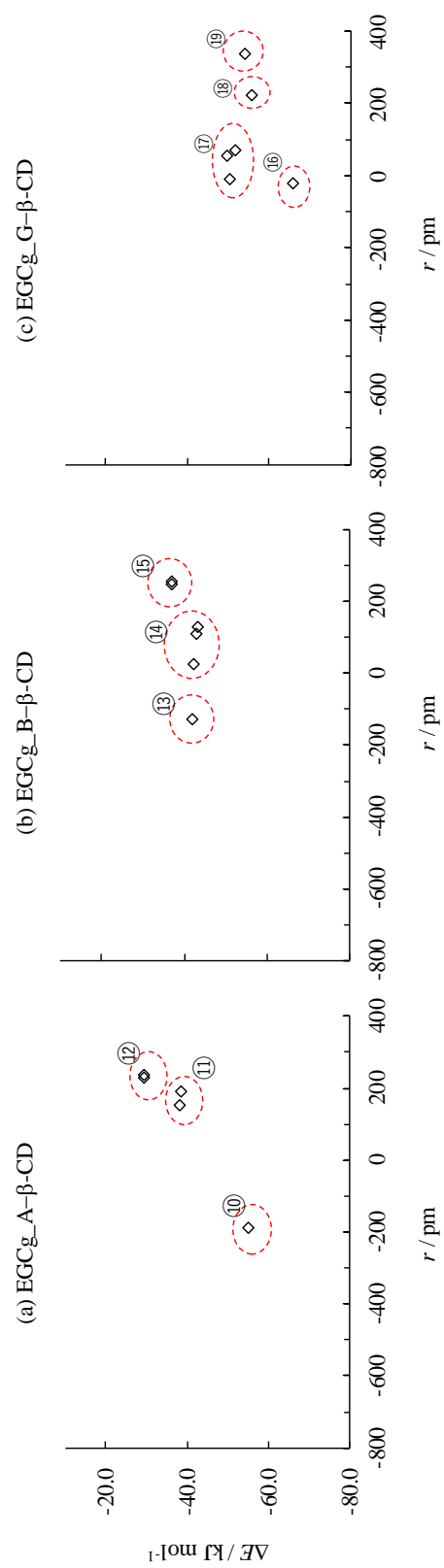
Fig. 24 は、EGCg\_A- $\beta$ -CD 5 種、EGCg\_B- $\beta$ -CD および EGCg\_G- $\beta$ -CD 各 6 種の初期入力構造について DFT 法による構造最適化を行い、各最適化構造の  $r$  値を横軸に、対応する  $\Delta E$  値を縦軸に示した。 $r$  値と  $\Delta E$  値が類似した最適化構造をまとめると、EGCg\_A- $\beta$ -CD は⑩~⑫ の 3 つのグループ、EGCg\_B- $\beta$ -CD は⑬~⑮ の 3 つのグループ、EGCg\_G- $\beta$ -CD は⑯~⑲ の 4 つのグループに分類された。各グループにおいて  $\Delta E$  が最小値の最適化構造、 $\Delta E$  値および  $r$  値、分子間水素結合の詳細 ( $d$  値および  $a$  値) を Fig. 25、Fig. 26 および Fig. 27 に示した。

EGCg\_A- $\beta$ -CD について、EGCg の A 環は  $\beta$ -CD の空洞外より空洞内に位置した方が  $\Delta E$  値は減少し、 $r = -188$  pm のときに  $\Delta E$  値は最小値であり、これは EGCg の A 環が  $\beta$ -CD 空洞内中央に位置した構造 (⑩) であった。この最適化構造では、EGCg の水酸基またはカルボニル基の酸素原子と  $\beta$ -CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合の数は 5 か所あった。

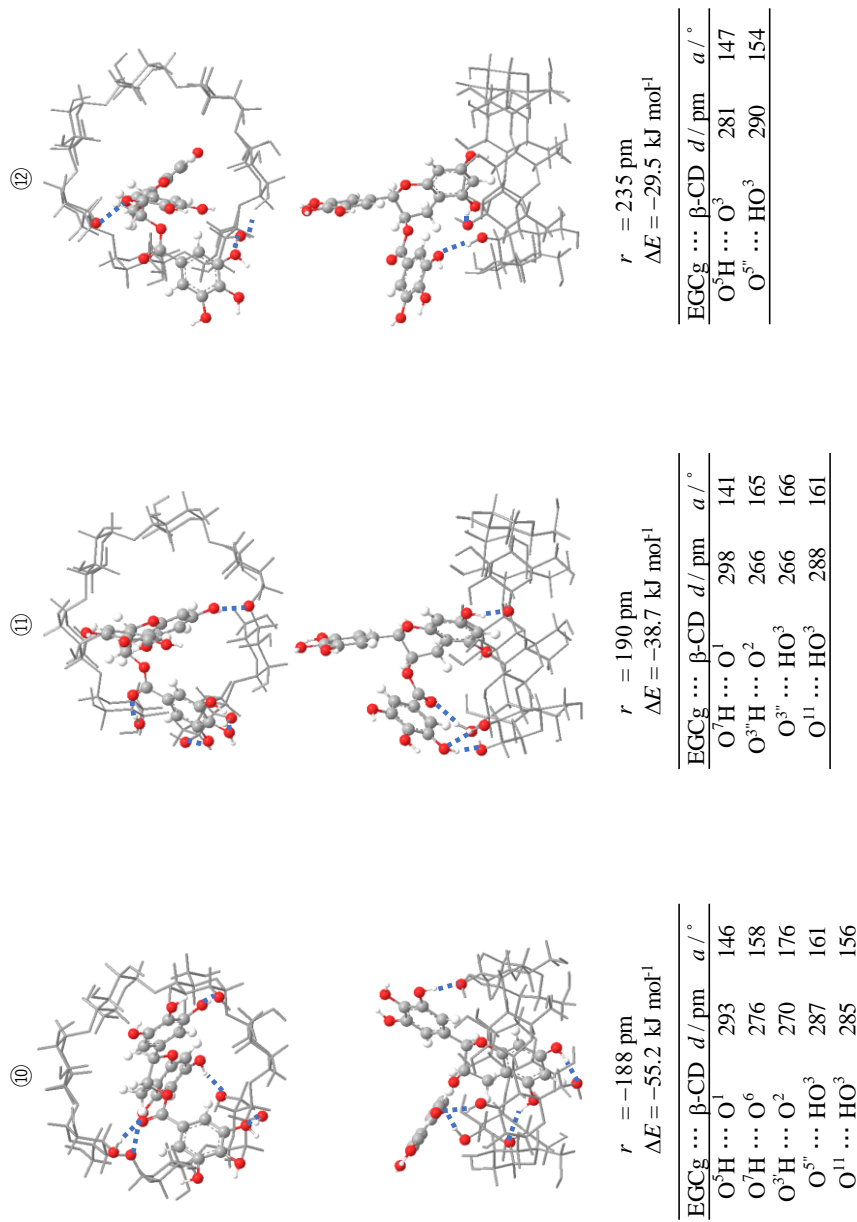
EGCg\_B- $\beta$ -CD について、EGCg は B 環の位置によらず  $\Delta E$  値はほぼ同一の値であった ( $\Delta E = -39.5 \pm 3.0$  kJ mol<sup>-1</sup>)。  $r = 130$  pm のときに  $\Delta E$  値は最小値であり、これは EGCg の B 環が  $\beta$ -CD 空洞内に級水酸基側に浅く位置した構造 (⑭) であった。この最適化構造では、EGCg の水酸基またはカルボニル基の酸素原子と  $\beta$ -CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合の数は 4 か所あった。

EGCg\_G- $\beta$ -CD について、⑰、⑱ および⑲ の  $\Delta E$  値はほぼ同じ値 ( $\Delta E = -52.2 \pm 2.5$  kJ mol<sup>-1</sup>) を示した。 $r = -18$  pm のときに  $\Delta E$  値は最小値であり、これは EGCg のガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内中央に位置した構造 (⑯) であった。この最適化構造では、EGCg の水酸基またはカルボニル基の酸素原子と  $\beta$ -CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合の数は 6 か所あった。

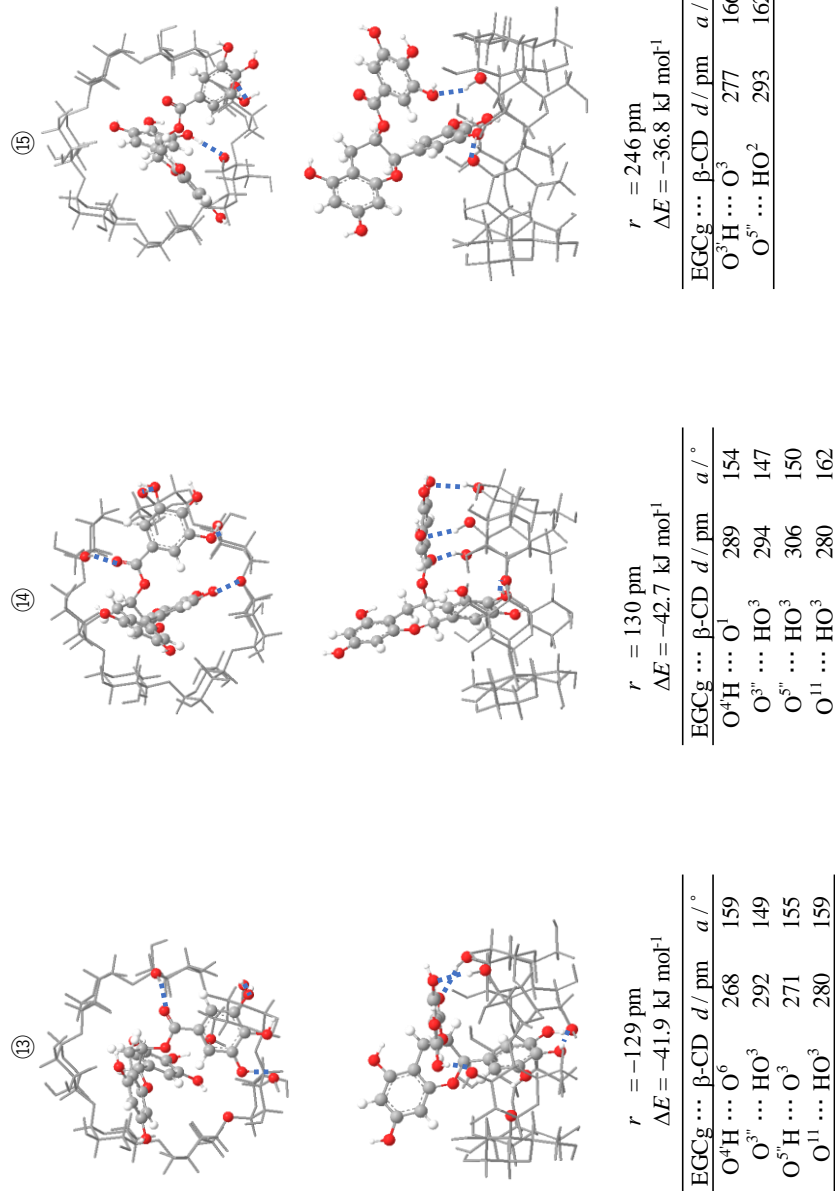
EGCg\_A- $\beta$ -CD、EGCg\_B- $\beta$ -CD および EGCg\_G- $\beta$ -CD の全ての最適化構造のうち、 $\Delta E$  値は⑩ < ⑮ < ⑭ < ⑯ < ⑰ << ⑬ の順に増大したため、B 環 (⑬) に比べてガロイル基 (⑭ ~ ⑯) や A 環 (⑩) は  $\beta$ -CD の空洞内に包接されやすい。ただし、⑭ の  $\Delta E$  値 ( $\Delta E = -66.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) から分子間水素結合二つ分の  $+16 \text{ kJ mol}^{-1}$  の範囲内には⑰、⑮ および⑯ の最適化構造が含まれたため、ガロイル基は  $\beta$ -CD 空洞内に緩く包接され、水相中では空洞内中央から二級水酸基側にかけて揺れ動くことが推定された。EGCg\_A- $\beta$ -CD では前述の範囲内にある最適化構造は⑩ のみであり、A 環は  $\beta$ -CD 空洞内にきつく包接された包接複合体を形成することが推定された。一方、B 環が包接された⑬ は、ガロイル基が包接された⑭ に比べて  $\Delta E$  値は  $23 \text{ kJ mol}^{-1}$  以上増加したため、EGCg の B 環は  $\beta$ -CD 空洞内にほとんど包接されないと考えて良い。



**Fig. 24** EGCg-β-CD の最適化構造における  $r$  値および  $\Delta E$  値  
各グループを赤丸で囲み、⑩～⑲ の番号を付けた。

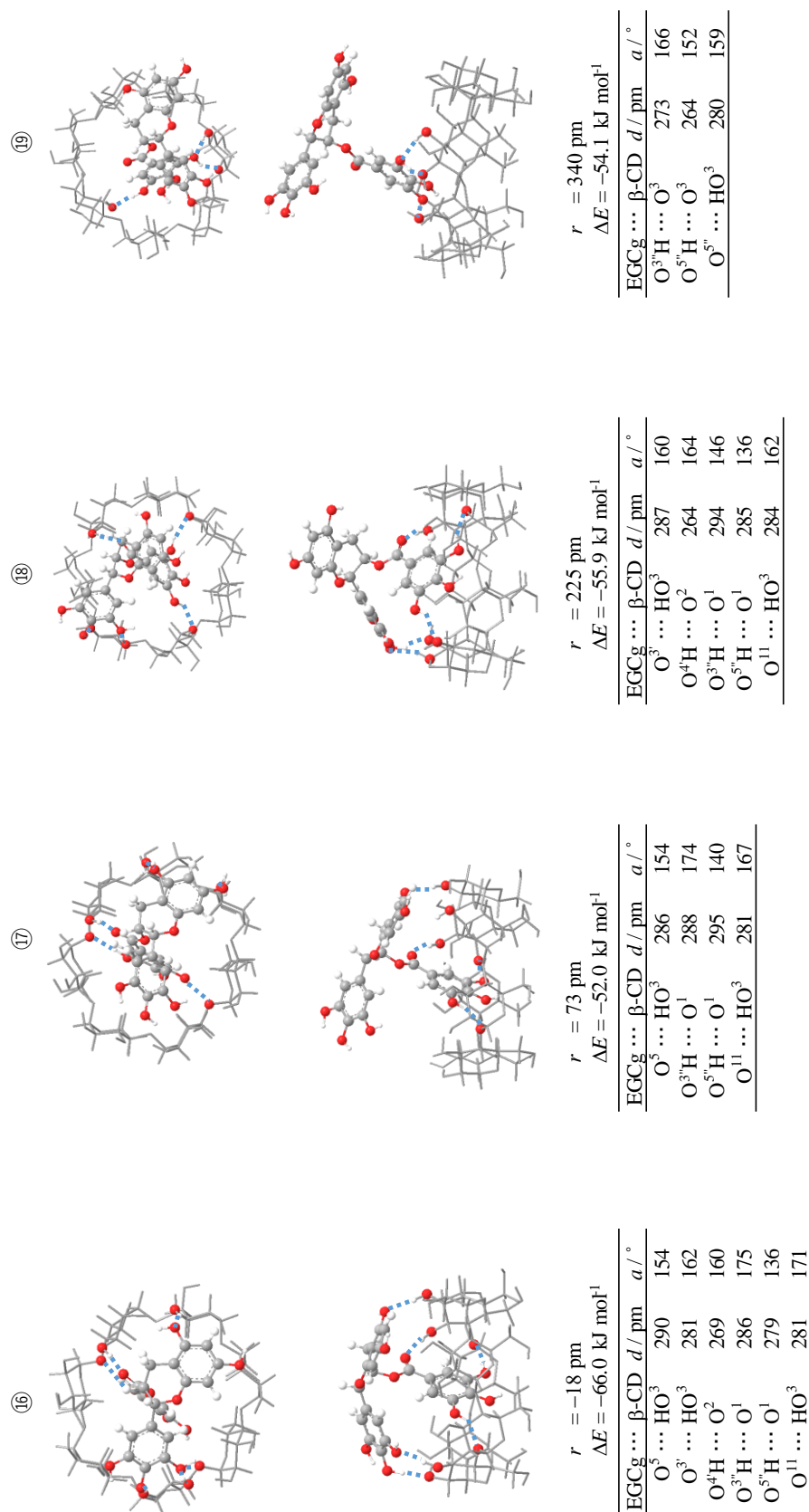


**Fig. 25** EGCg A-β-CD におけるグループ⑩~⑫ の最適化構造および分子間水素結合 β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青色破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。



**Fig. 26** EGCg\_B-β-CD におけるグループ⑬ ~⑮ の最適化構造および分子間水素結合

β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。

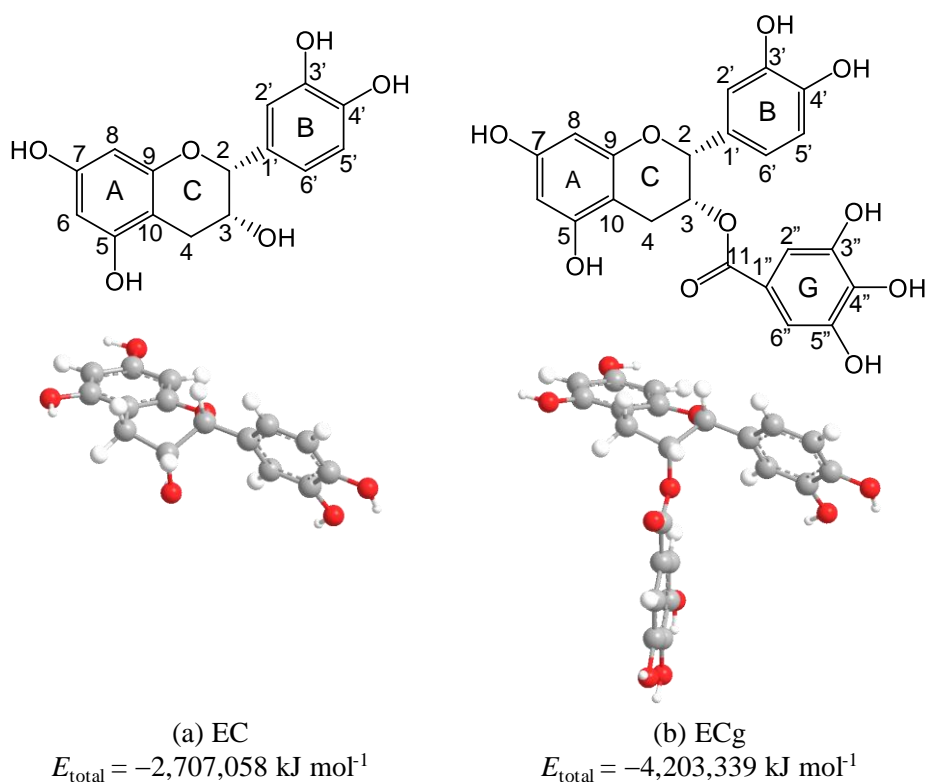


**Fig. 27** EGCg, G-β-CD におけるグループ⑩ ~ ⑱ の最適化構造および分子間水素結合

β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。

### 第 3 項 (-)-Epicatechin および (-)-epicatechin gallate

カテキンのうち、B 環がカテコール基である EC および ECg をゲスト分子とし、Fig. 10 のフローチャートに従い、はじめに水相中における最安定構造を求めた。CONFLEX 法を用いた配座解析では、最小の  $E_{\text{steric}}$  値を有する配座から  $12.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  の範囲内に Conformer A のみが EC は 32 個、ECg は 27 個含まれ、このエネルギー範囲内には存在比率の 95% 以上が含まれた。これらの配座について PM3 法による気相中での構造最適化を行い、最終的に DFT 法による水相中での構造最適化を行った。最小の  $E_{\text{total}}$  を有する最適化構造を Fig. 27 に示した。C 環に対する B 環の二面角  $\angle \text{C}^{1'}\text{-C}^2\text{-O}^1\text{-C}^9$  は、EC、ECg それぞれ  $175^\circ$ 、および  $172^\circ$  であり、C 環に対する B 環の立体構造はほぼ同様であった。



**Fig. 28** EC および ECg の水相中の最安定構造

最安定構造の上に化学構造を示し、各環名および IUPAC 命名法に準拠した炭素原子番号を記した。各構造の下に  $E_{\text{total}}$  を示した。

EC の A 環および B 環の基準原子は、Fig. 16 の EGC と同様に  $C^6$  および  $C^4$  とした。EC と  $\beta$ -CD との複合体形成について、EC の各環の基準原子が  $\beta$ -CD の二級水酸基側の縁よりやや上位に位置する  $r = 400$  pm から、 $\beta$ -CD 空洞内の最深位置  $r = -500$  pm まで 100 pm ずつ変化させた複合体の初期入力構造 10 種を作成した。それぞれの初期入力構造について PM3 法による気相中での構造最適化を行い、最終的に DFT 法による水相中での構造最適化を行った。

Fig. 29 は、EC\_A- $\beta$ -CD および EC\_B- $\beta$ -CD 各 10 種の初期入力構造について DFT 法による構造最適化を行い、各最適化構造の  $r$  値を横軸に、対応する  $\Delta E$  値を縦軸に示した。 $r$  値と  $\Delta E$  値が類似した最適化構造をまとめると、EC\_A- $\beta$ -CD は⑳～㉔の 5 つのグループ、EC\_B- $\beta$ -CD は㉕～㉙の 5 つのグループに分類された。各グループの  $\Delta E$  が最小値の最適化構造、 $\Delta E$  値および  $r$  値、分子間水素結合の詳細 ( $d$  値および  $a$  値) を Fig. 30 および Fig. 31 に示した。

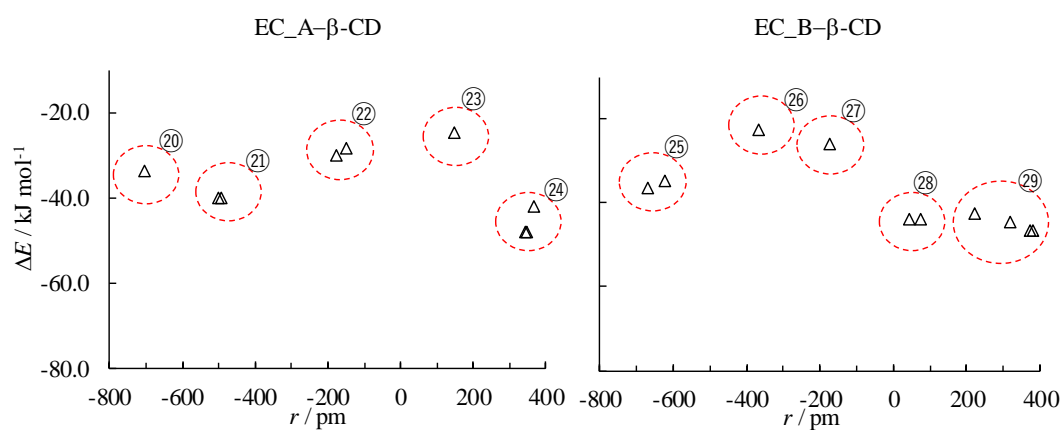
EC\_A- $\beta$ -CD について、EC は  $\beta$ -CD の二級水酸基側の縁上部に A 環が位置した  $r = 350$  pm のとき、(㉔)  $\Delta E$  値は最小値であり、これは包接複合体を形成していなかった。準安定構造は  $r = -491$  pm のとき (㉑)、 $\Delta E = -40.1$  kJ mol<sup>-1</sup> であり、㉔ との  $\Delta E$  値の差は +7.8 kJ mol<sup>-1</sup> であった。

EC\_B- $\beta$ -CD について、EC は  $\beta$ -CD の二級水酸基側の縁上部に B 環が位置した  $r = 372$  pm のとき (㉙)、 $\Delta E$  値は最小値であり、包接複合体を形成していなかった。準安定構造は  $r = 75$  pm のとき (㉘)、 $\Delta E = -43.9$  kJ mol<sup>-1</sup> であり、㉙ との  $\Delta E$  値の差は +2.7 kJ mol<sup>-1</sup> であった。

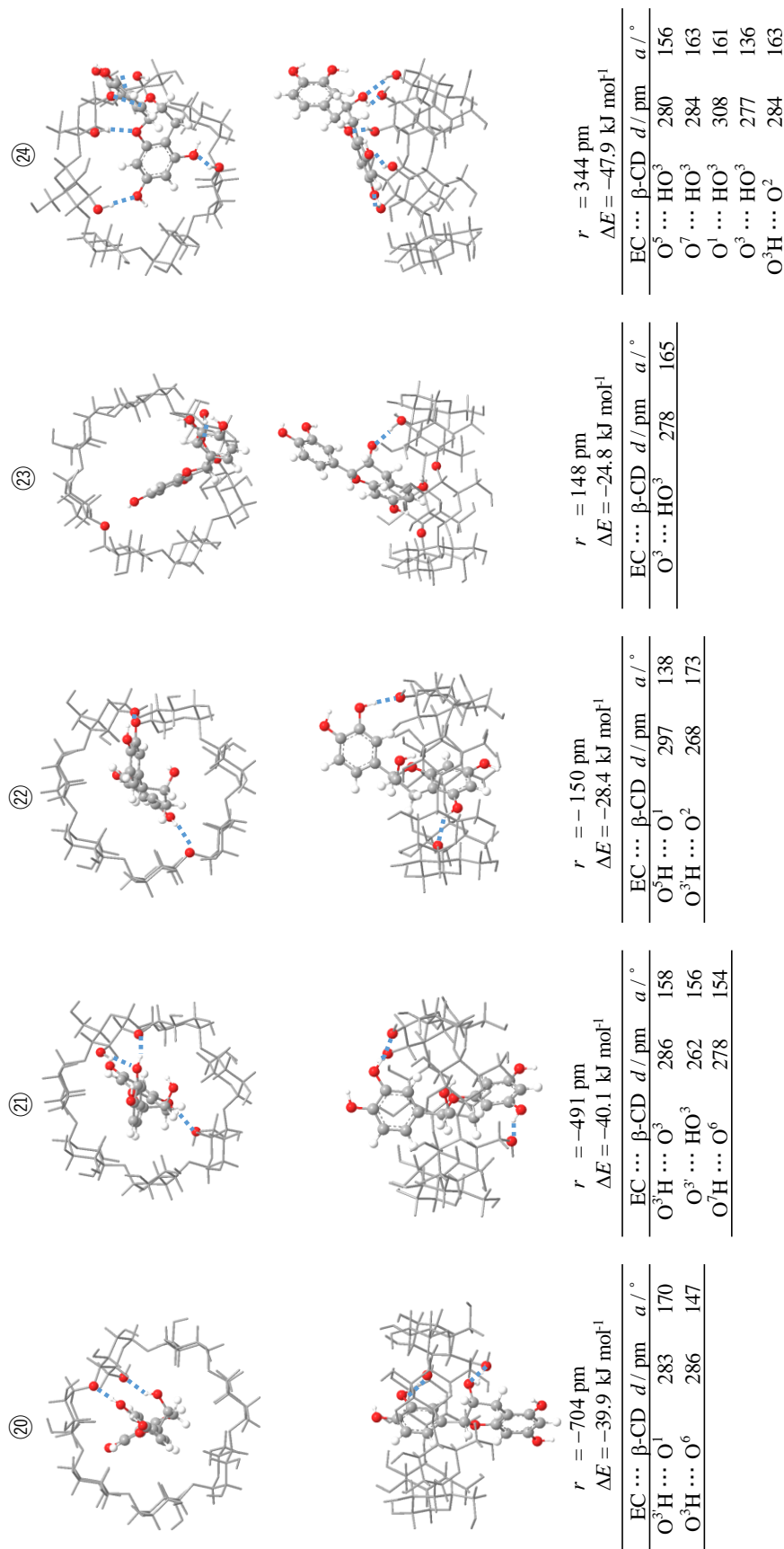
EC\_A- $\beta$ -CD および EC\_B- $\beta$ -CD は、 $\Delta E$  値の最小値の最適化構造はともに  $\beta$ -CD 空洞外に EC が位置した (㉔ および ㉙) が、最小  $\Delta E$  値から +16 kJ mol<sup>-1</sup> の範囲内には、空洞内に包接された最適化構造 (㉑ および ㉘) が含まれ、これらの最適化構造も水相中でとり得ると考えられる。EC の A 環および B 環は  $\beta$ -



CD 空洞内に緩く包接され、水相中では空洞内の二級水酸基側から一級水酸基側まで揺れ動くことが考えられた。

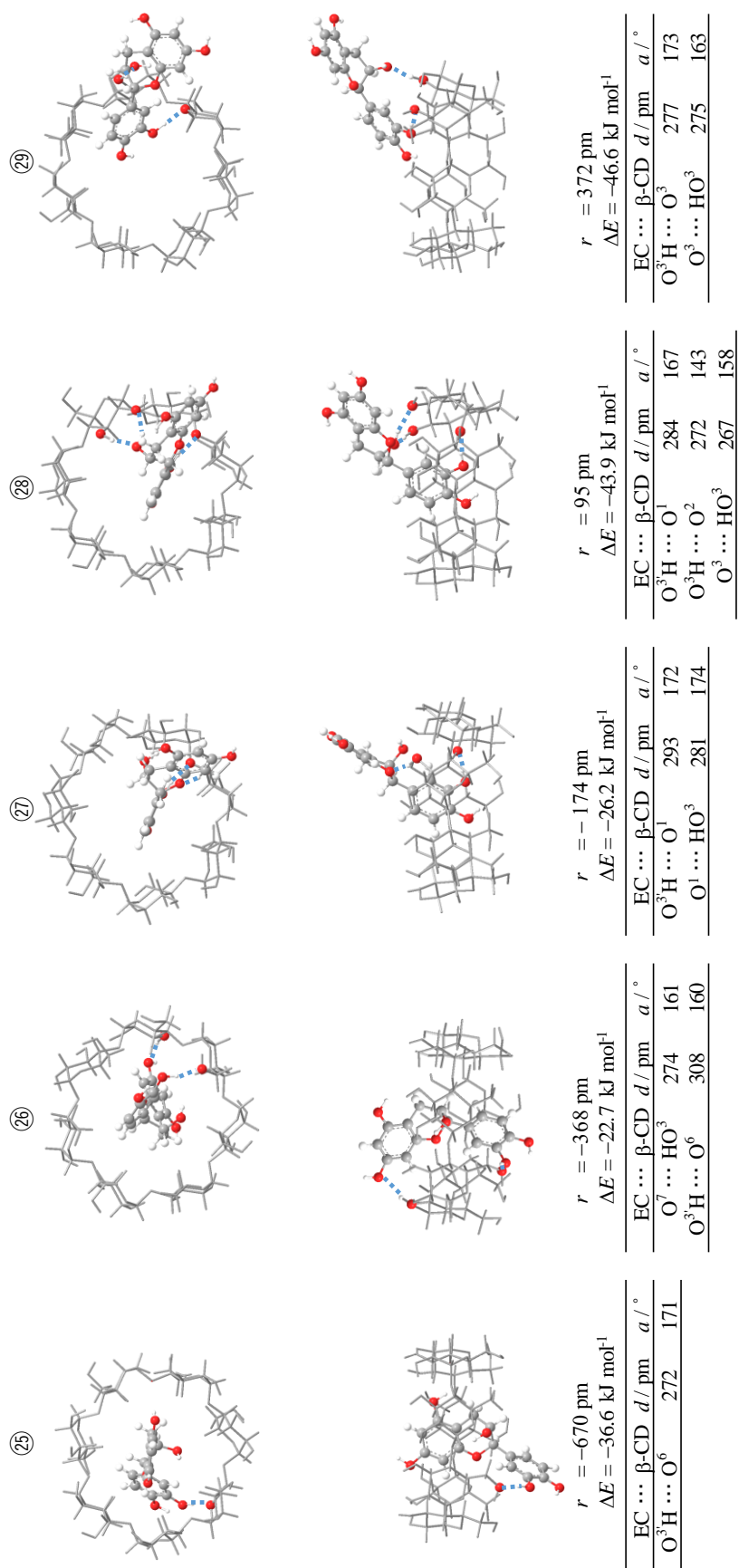


**Fig. 29** EC-β-CD の最適化構造における  $r$  値および  $\Delta E$  値  
各グループを赤丸で囲み、②⑩ ~ ②⑨ の番号を付けた。



**Fig. 30** EC\_A-β-CD におけるグループ②① ~ ②④ の最適化構造および分子間水素結合

β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。



**Fig. 31** EC\_B-β-CD におけるグループ②⑤ ~ ②⑨ の最適化構造および分子間水素結合

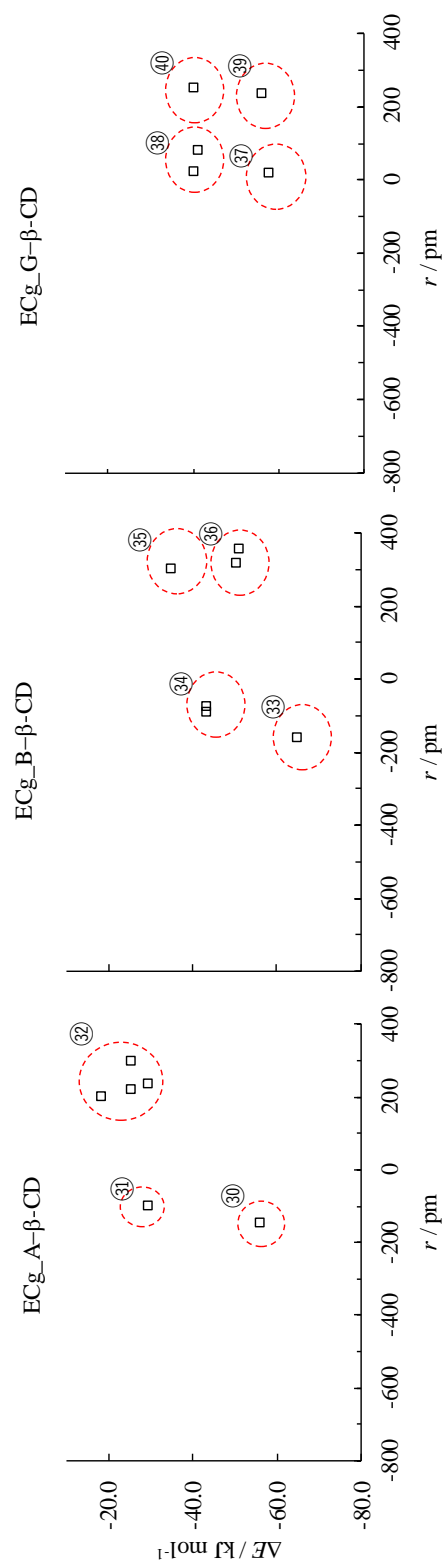
β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下にΔE 値および分子間水素結合の詳細を示した。

ECg の A 環、B 環およびガロイル基の基準原子は、Fig. 21 の EGC と同様に C<sup>6</sup>、C<sup>4'</sup> および C<sup>4''</sup> とした。ECg と  $\beta$ -CD との複合体形成について、ECg の各環の基準原子が  $\beta$ -CD の二級水酸基側の縁よりやや上位に位置する  $r = 400$  pm から、 $\beta$ -CD 空洞内の  $r = -100$  pm まで 100 pm ずつ変化させた複合体の初期入力構造 6 種を作成した。それぞれの初期入力構造について PM3 法による気相中での構造最適化を行い、最終的に DFT 法による水相中での構造最適化を行った。ただし、ECg\_G- $\beta$ -CD の初期  $r$  値を  $-100$  pm の初期構造は、ECg の 3'' 位の酸素原子と  $\beta$ -CD の 3 位酸素原子との距離 (99 pm) がファンデルワールス半径の和 (304 pm) より小さく、構造最適化計算を行うことはできなかった[75]。

Fig. 32 は、ECg\_A- $\beta$ -CD および ECg\_B- $\beta$ -CD 各 6 種、ECg\_G- $\beta$ -CD 5 種の初期入力構造について DFT 法による構造最適化を行い、各最適化構造の  $r$  値を横軸に、対応する  $\Delta E$  値を縦軸に示した。 $r$  値と  $\Delta E$  値が類似した最適化構造をまとめると、ECg\_A- $\beta$ -CD は③⑩ ~ ③⑫ の 3 つのグループ、ECg\_B- $\beta$ -CD は③⑬ ~ ③⑯ の 4 つのグループ、ECg\_G- $\beta$ -CD は③⑰ ~ ③⑲ の 4 つのグループに分類された。各グループにおいて  $\Delta E$  が最小値の最適化構造、 $\Delta E$  値および  $r$  値、分子間水素結合の詳細 ( $d$  値および  $a$  値) を Fig. 33、Fig. 34 および Fig. 35 に示した。

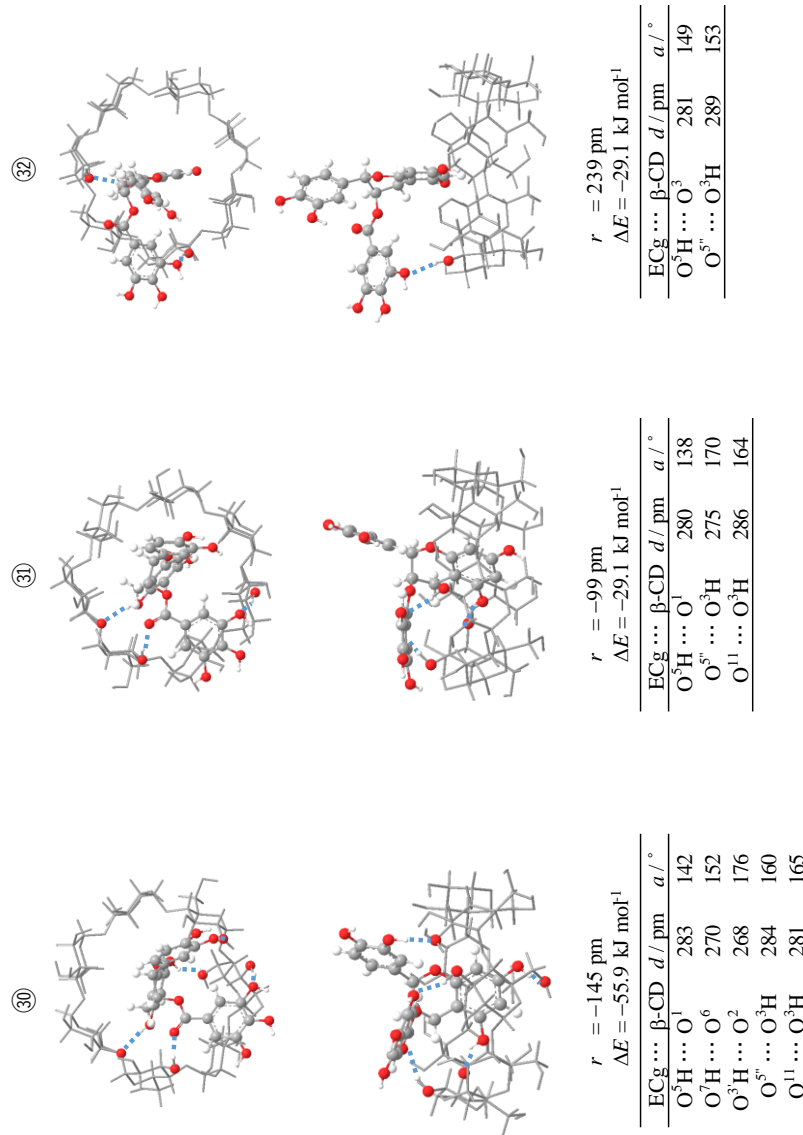
ECg の A 環および B 環は、 $\beta$ -CD の空洞内に包接された方が  $\Delta E$  値は低下し、ECg\_A- $\beta$ -CD では  $r = -145$  pm のとき、ECg\_B- $\beta$ -CD では  $r = -159$  pm のときに  $\Delta E$  値は最小値であり、これは ECg の A 環または B 環が  $\beta$ -CD 空洞内深くに位置した構造 (③⑩および③⑬) であった。ECg のガロイル基は A 環や B 環の場合と同様に  $\beta$ -CD の空洞内に包接された方が  $\Delta E$  値は低下したが、 $r = 19$  pm のとき  $\Delta E$  値は最小値であり、ECg のガロイル基は A 環や B 環に比べて  $\beta$ -CD 空洞内の浅い位置 (③⑰) であった。

ECg は A 環、B 環およびガロイル基のすべての環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接されることで安定化し、特に B 環が包接した㉓ の  $\Delta E$  値は全ての最適化構造の中で最小値であり、水素結合数は最大であった。ECg\_B- $\beta$ -CD について、㉓ から +16 kJ mol<sup>-1</sup> の範囲内には 2 個の最適化構造が含まれていたが、ともに  $r = 300$  pm 以上であり、これらは包接複合体でなかった。そのため、最小  $\Delta E$  値から 16 kJ mol<sup>-1</sup> の範囲内の包接複合体を形成した最適化構造は㉓ のみであった。ECg\_A- $\beta$ -CD について、前述のエネルギー範囲内に含まれる最適化構造は㉔のみであり、ECg の A 環や B 環は  $\beta$ -CD 空洞内にきつく包接された包接複合体を形成することが明らかとなった。一方、ECg\_G- $\beta$ -CD について前述のエネルギー範囲内の最適化構造は  $r = 19$  pm および 236 pm に 2 個あるため、ガロイル基は  $\beta$ -CD 空洞内に緩く包接されており、空洞内中央から二級水酸基にかけて揺れ動くことが明らかとなった。

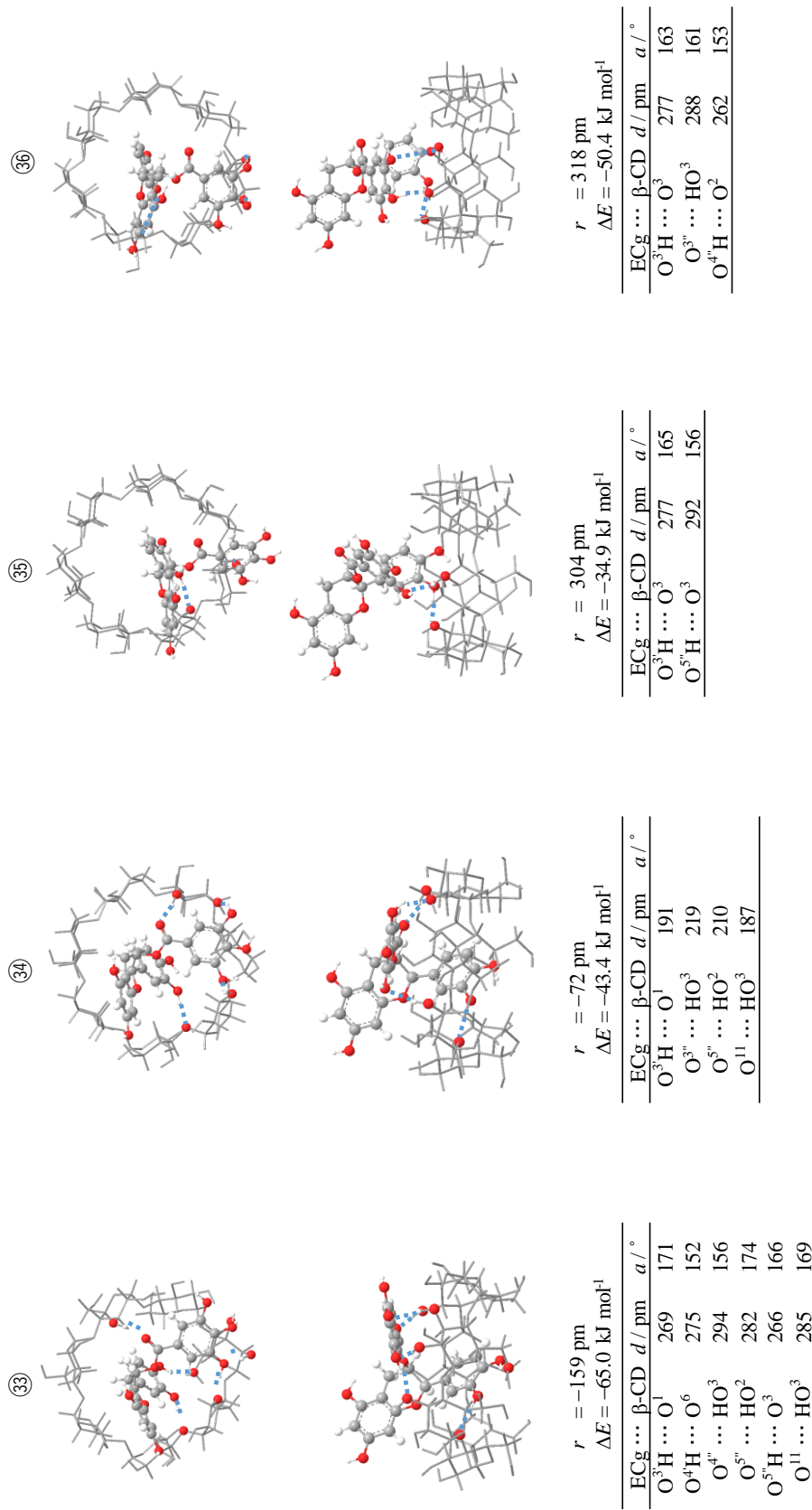


**Fig. 32** ECg-β-CD の最適化構造における  $r$  値および  $\Delta E$  値

各グループを赤丸で囲み、③① ~ ④① の番号を付けた。



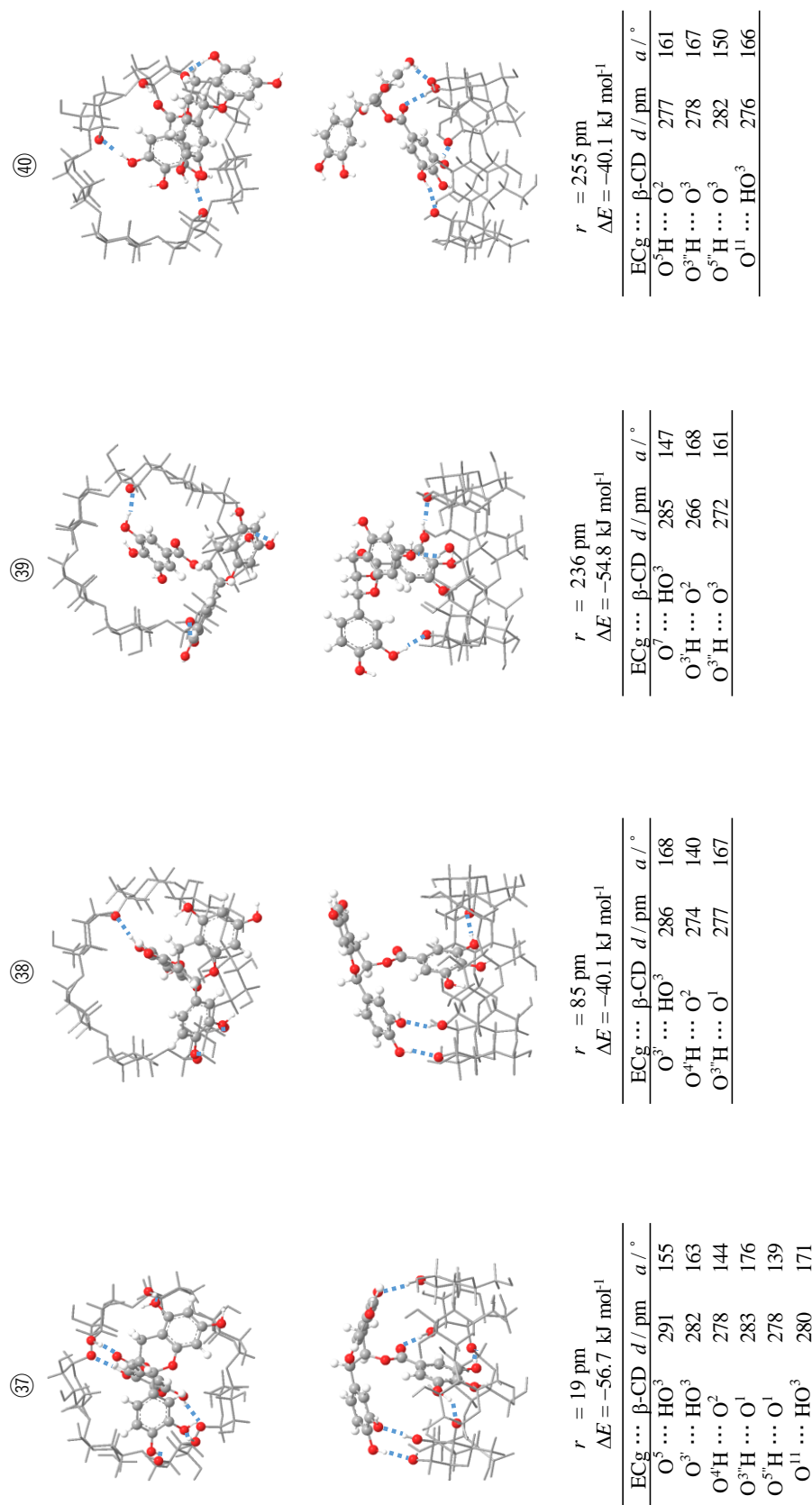
**Fig. 33** ECg\_A- $\beta$ -CD におけるグループ③① ~ ③② の最適化構造および分子間水素結合  $\beta$ -CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。



**Fig. 34** ECg\_B- $\beta$ -CD におけるグループ③③ ~ ③⑥ の最適化構造および分子間水素結合

$\beta$ -CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。





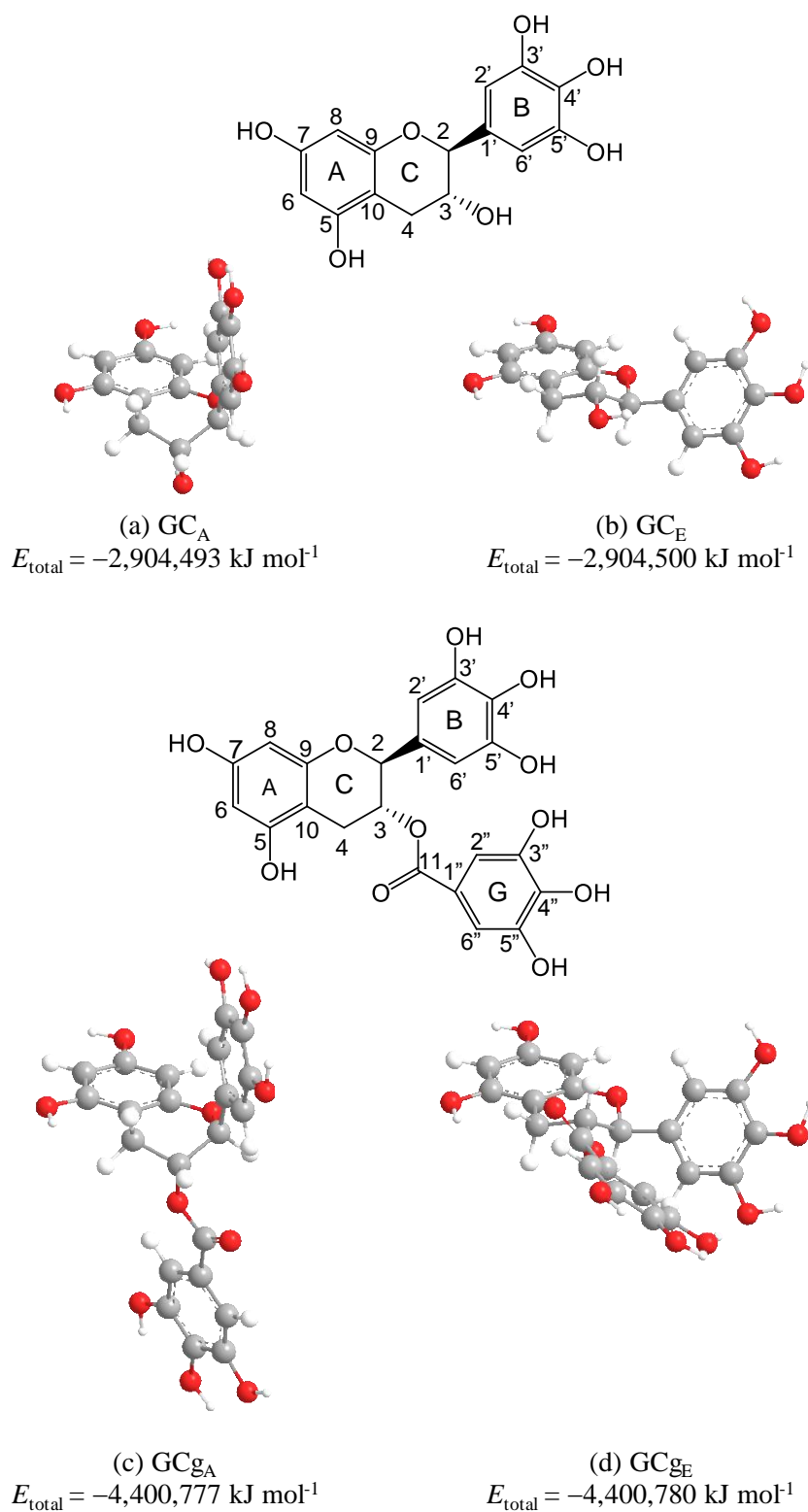
**Fig. 35** ECg\_G- $\beta$ -CD におけるグループ③⑦ ~④⑩ の最適化構造および分子間水素結合

$\beta$ -CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。

#### 第 4 項 (–)-Gallocatechin および (–)-gallocatechin gallate

カテキンのうち、2 位炭素原子に結合する B 環が S 配置である GC および GCg をゲスト分子とし、Fig. 10 のフローチャートに従い、水相中における最安定構造を求めた。CONFLEX 法を用いた配座解析では、最小の  $E_{\text{steric}}$  を有する配座から  $12.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  の範囲内に GC は 45 個、GCg は 56 個の配座が含まれ、存在比率の和はともに 95% 以上であった。この範囲内において、GC および GCg は、ともに Conformer A ( $\text{GC}_A$  および  $\text{GCg}_A$ ) だけでなく、Conformer E ( $\text{GC}_E$  および  $\text{GCg}_E$ ) が含まれていた。GCg、および GCg とカフェインの複合体についての結晶 X 線回折による結晶構造が報告されており、GCg は Conformer A であるが、GCg とカフェインの複合体における結晶構造は Conformer E であった[76, 77]。従って、2,3-トランス型カテキンである GC および GCg は水相中で 2 種の配座が存在し得ると考えられる。配座解析により創出された複数の配座について PM3 法による気相中での構造最適化を行い、最終的に DFT 法による水相中での構造最適化を行った。DFT 法により算出された  $E_{\text{total}}$  を比較し、 $\text{GC}_A$ 、 $\text{GC}_E$ 、 $\text{GCg}_A$  および  $\text{GCg}_E$  の最低  $E_{\text{total}}$  値を有する最適化構造を Fig. 35 に示した。

GC の A 環および B 環の基準原子は、Fig. 16 の EGC と同様に  $\text{C}^6$  および  $\text{C}^{4'}$  とした。GC と  $\beta$ -CD との複合体形成について、GC の各環の基準原子が  $\beta$ -CD の二級水酸基側の縁よりやや上位に位置する  $r = 400 \text{ pm}$  から、 $\beta$ -CD 空洞内の最深位置  $r = -500 \text{ pm}$  まで  $100 \text{ pm}$  ずつ変化させた複合体の初期入力構造 10 種を作成した。それぞれの初期入力構造について PM3 法による気相中での構造最適化を行い、最終的に DFT 法による水相中での構造最適化を行った。ただし、 $\text{GC}_A\_A$ - $\beta$ -CD および  $\text{GC}_A\_B$ - $\beta$ -CD の初期  $r$  値が  $-500 \text{ pm}$  から  $0 \text{ pm}$  の初期構造は、 $\text{GC}_A$  と  $\beta$ -CD の一部の原子同士がファンデルワールス半径より接近または重なり合ったため、構造最適化計算を行うことができなかった[75]。



**Fig. 36** GC の水相中の最安定構造

最安定構造の上に化学構造を示し、各環名および IUPAC 命名法に準拠した炭素原子番号を記した。各構造の下に  $E_{\text{total}}$  を示した。

Fig. 37 は、GC<sub>A</sub>\_A-β-CD および GC<sub>A</sub>\_B-β-CD 各 4 種、GC<sub>E</sub>\_A-β-CD および GC<sub>E</sub>\_B-β-CD の初期入力構造各 10 種について DFT 法による構造最適化を行い、各最適化構造の  $r$  値を横軸に、対応する  $\Delta E$  値を縦軸に示した。 $r$  値と  $\Delta E$  値が類似した最適化構造をまとめると、GC<sub>A</sub>\_A-β-CD は④⑩ および④⑪ の 2 つのグループ、GC<sub>A</sub>\_B-β-CD は④⑫~④⑭ の 3 つのグループ、GC<sub>E</sub>\_A-β-CD は④⑮~④⑲ の 4 つのグループ、GC<sub>E</sub>\_B-β-CD は④⑳~④㉒ の 4 つのグループに分類された。各グループにおいて  $\Delta E$  が最小値の最適化構造、 $\Delta E$  値および  $r$  値、分子間水素結合の詳細 ( $d$  値および  $a$  値) を Fig. 38 から Fig. 40 に示した。

GC<sub>A</sub>\_A-β-CD について、GC<sub>A</sub> は β-CD の空洞内に包接された方が  $\Delta E$  値は低下し、 $r=35$  pm のとき  $\Delta E$  値は最小値であり、これは GC<sub>A</sub> の A 環が β-CD 空洞内中央に位置した構造 (④⑩) であった。この最適化構造では、GC<sub>A</sub> の水酸基と β-CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合の数は 5 か所あった。

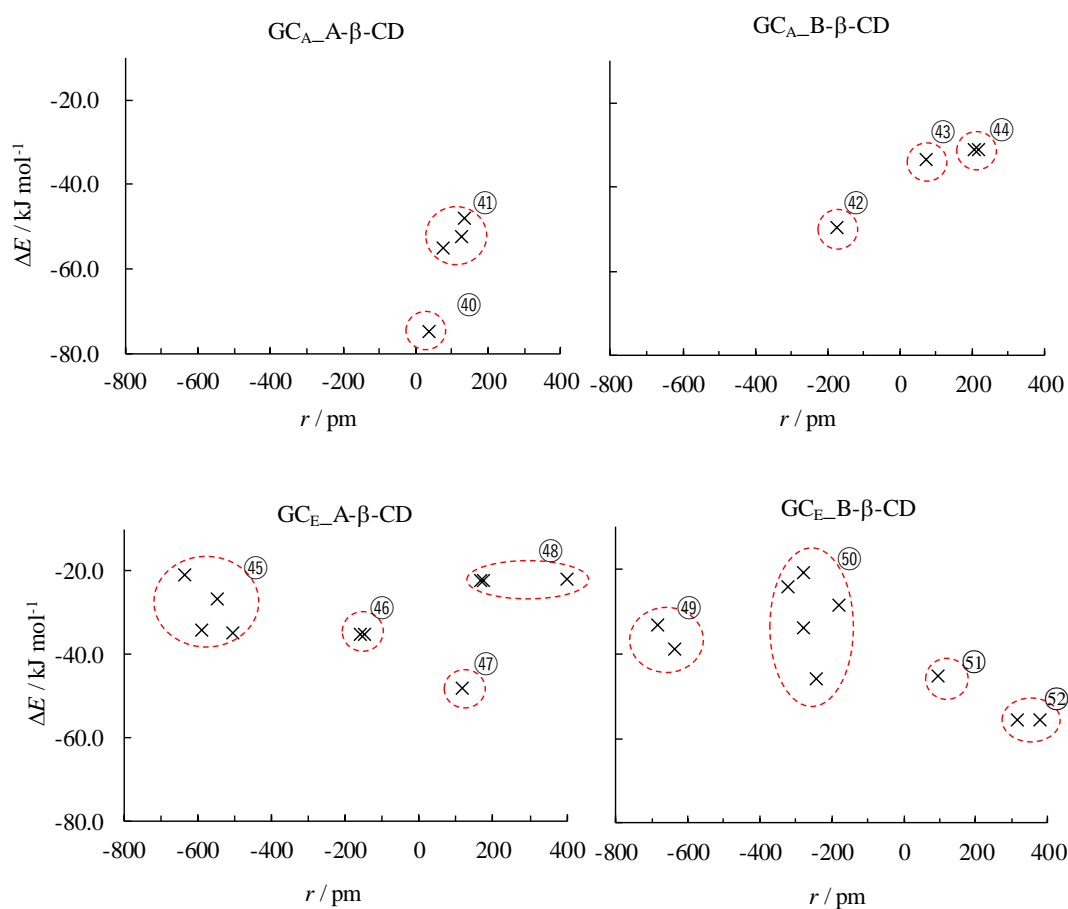
GC<sub>A</sub>\_B-β-CD について、GC<sub>A</sub> は β-CD の空洞内に包接された方が  $\Delta E$  値は低下し、 $r = -176$  pm のとき  $\Delta E$  値は最小値であり、これは GC<sub>A</sub> の B 環が β-CD 空洞内深くに位置した構造 (④⑫) であった。

GC<sub>E</sub>\_A-β-CD について、GC<sub>E</sub> は β-CD の二級水酸基側の縁上部に A 環が位置した  $r=117$  pm のとき  $\Delta E$  値は最小値であり、これは GC<sub>E</sub> の A 環が β-CD 空洞内浅くに位置した構造 (④⑰) であった。GC<sub>E</sub> の A 環が β-CD 空洞内深くに位置した構造 (④⑮ や④⑱) の  $\Delta E$  値は、④⑰ に対して  $13.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  以内であった。

GC<sub>E</sub>\_B-β-CD について、GC<sub>E</sub> は β-CD の二級水酸基縁上部に B 環が位置した  $r=316$  pm のとき (④㉒)、 $\Delta E$  値は最小値であった。B 環はもとより A 環および C 環は完全に β-CD 空洞外に位置し、包接複合体を形成していなかった。

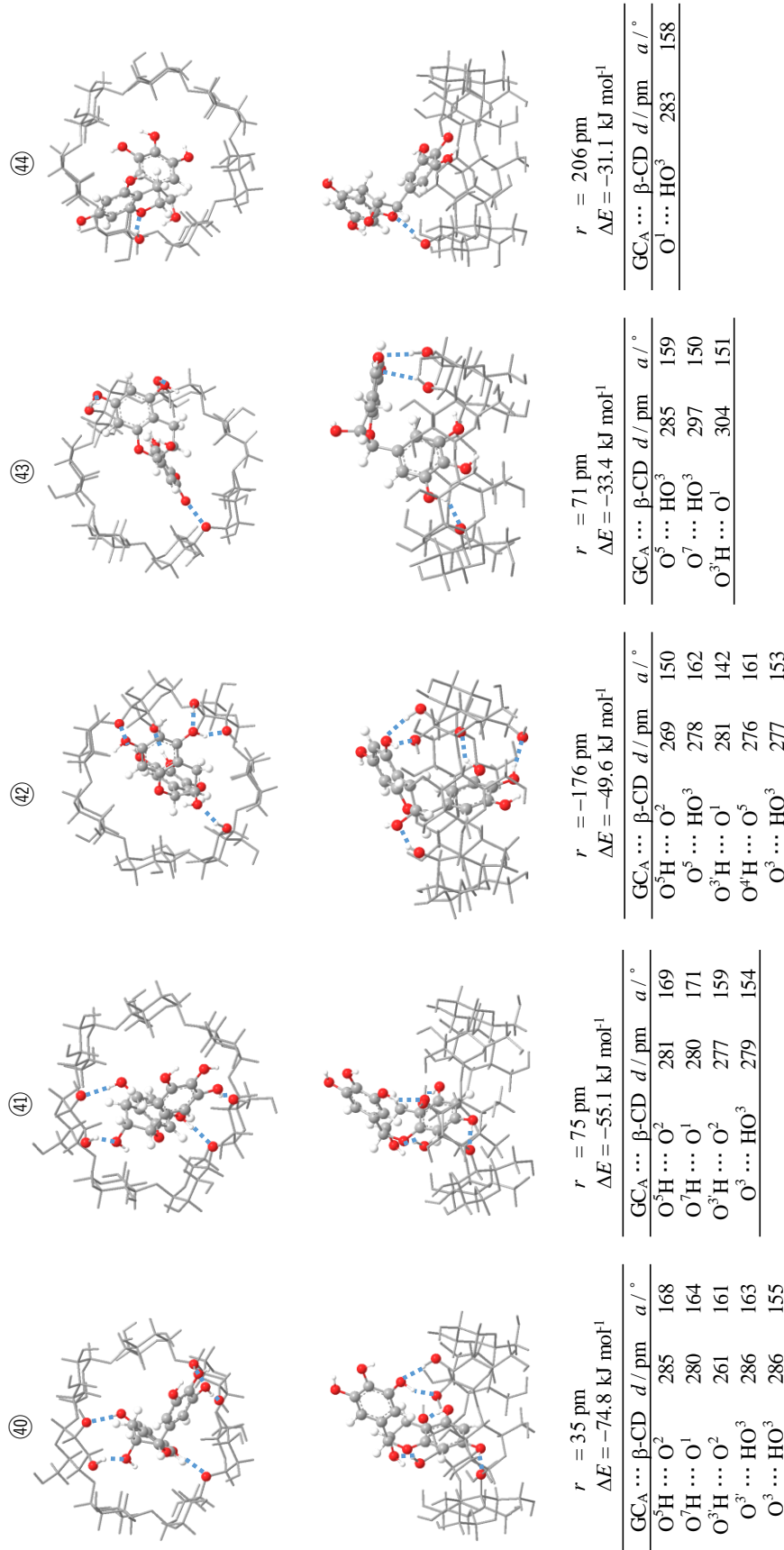
GC<sub>A</sub>\_A-β-CD、GC<sub>A</sub>\_B-β-CD、GC<sub>E</sub>\_A-β-CD および GC<sub>E</sub>\_B-β-CD の全ての最適化構造のうち  $\Delta E$  値の最小値は④⑩ であり、分子間水素結合を最も多く形成し

た。④の $\Delta E$  値から  $16 \text{ kJ mol}^{-1}$  の範囲内に他の最適化構造は含まれないため、GC は A 環が  $\beta$ -CD 空洞内にきつく包接された 1 種の包接モードであることが推定された。

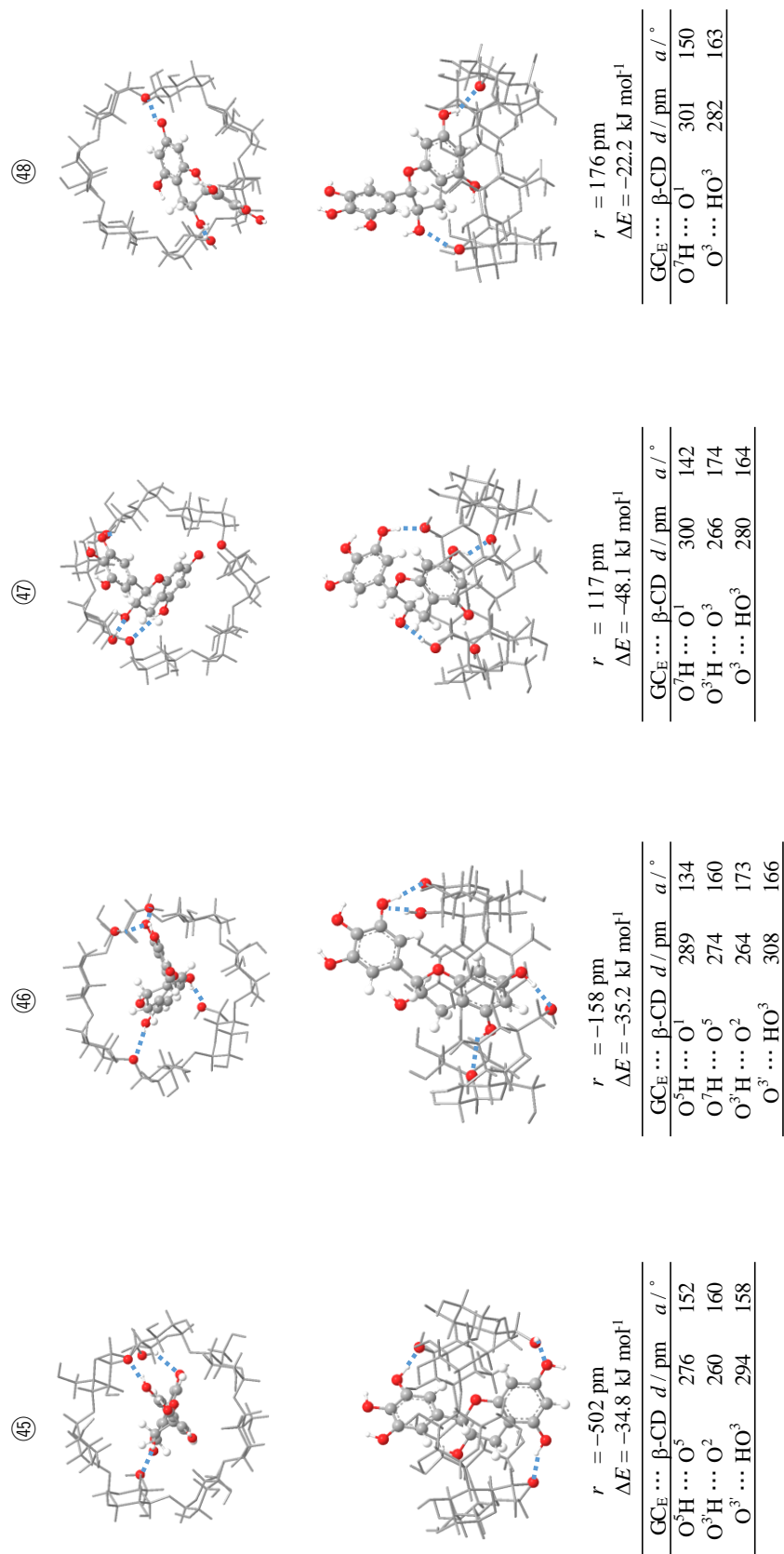


**Fig. 37** GC<sub>A</sub>- $\beta$ -CD および GC<sub>B</sub>- $\beta$ -CD の最適化構造における  $r$  値および  $\Delta E$  値

上段には GC<sub>A</sub>-A- $\beta$ -CD および GC<sub>A</sub>-B- $\beta$ -CD、下段には GC<sub>E</sub>-A- $\beta$ -CD および GC<sub>E</sub>-B- $\beta$ -CD を示した。各グループを赤丸で囲み、④ ~ ⑤② の番号を付けた。

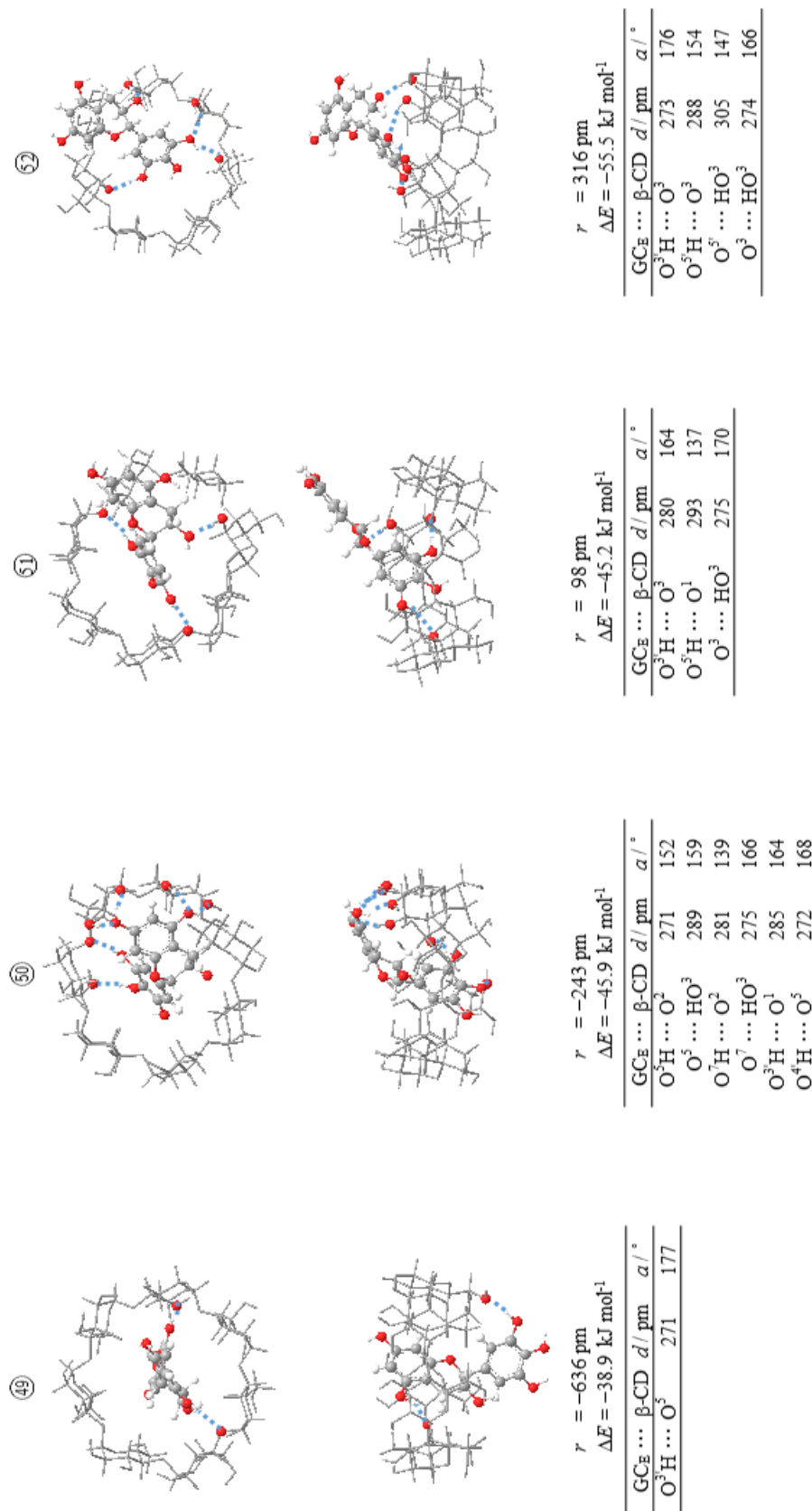


**Fig. 38** GC<sub>A</sub>\_A-β-CD および GC<sub>A</sub>\_B-β-CD におけるグループ④ ~ ④④ の最適化構造および分子間水素結合 β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に  $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。



**Fig. 39** GC<sub>E</sub> A-β-CD におけるグループ④⑤ ~ ④⑧ の最適化構造および分子間水素結合

β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。



**Fig. 40** GC<sub>E</sub>\_B-β-CD におけるグループ④⑨ ~ ⑤② の最適化構造および分子間水素結合

β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下にΔE 値および分子間水素結合の詳細を示した。



GCg と  $\beta$ -CD との複合体形成について、GCg の各環の基準原子が  $\beta$ -CD の二級水酸基側の縁よりやや上位に位置する  $r = 400$  pm から、 $\beta$ -CD 空洞内の最深位置  $r = -100$  pm まで 100 pm ずつ変化させた複合体の初期入力構造 6 種を作成した。それぞれの初期入力構造について PM3 法による気相中での構造最適化を行い、最終的に DFT 法による水相中での構造最適化を行った。ただし、GCg<sub>A</sub>\_A- $\beta$ -CD の初期  $r$  値を -100 pm の初期構造、GCg<sub>B</sub>\_B- $\beta$ -CD および GCg<sub>B</sub>\_G- $\beta$ -CD の初期  $r$  値が -100 pm および 0 pm の初期構造は、GCg と  $\beta$ -CD の一部の原子がファンデルワールス半径の和 (322 pm) より小さいため、構造最適化計算を行うことはできなかった[75]。また、GCg<sub>A</sub> は B 環とガロイル基が C 環に対して対角に位置するため、GCg の B 環とガロイル基の立体障害が小さく、それぞれ初期  $r$  値を  $r = -200$  pm とした複合体を作成し、構造最適化計算を行った。

Fig. 41 は、GCg<sub>A</sub>\_A- $\beta$ -CD 5 種、GCg<sub>A</sub>\_B- $\beta$ -CD および GCg<sub>A</sub>\_G- $\beta$ -CD 各 7 種、GCg<sub>E</sub>\_A- $\beta$ -CD 6 種、GCg<sub>E</sub>\_B- $\beta$ -CD および GCg<sub>E</sub>\_G- $\beta$ -CD 各 3 種の初期入力構造について DFT 法による構造最適化を行い、各最適化構造の  $r$  値を横軸に、対応する  $\Delta E$  値を縦軸に示した。 $r$  値と  $\Delta E$  値が類似した最適化構造をまとめると、GCg<sub>A</sub>\_A- $\beta$ -CD は 4 つのグループ、GCg<sub>A</sub>\_B- $\beta$ -CD は 5 つのグループ、GCg<sub>A</sub>\_G- $\beta$ -CD は 5 つのグループ、GCg<sub>E</sub>\_A- $\beta$ -CD は 5 つのグループ、GCg<sub>E</sub>\_B- $\beta$ -CD は 3 つのグループおよび GCg<sub>E</sub>\_G- $\beta$ -CD は 2 つのグループに分類された。各グループにおいて  $\Delta E$  が最小値の最適化構造、 $\Delta E$  値および  $r$  値、分子間水素結合の詳細 ( $d$  値および  $a$  値) を Fig. 42 から Fig. 46 に示した。各最適化構造中の青色破線は GCg と  $\beta$ -CD 間に形成された分子間水素結合を示した。

GCg<sub>A</sub>\_A-β-CD について、GCg<sub>A</sub> の A 環は β-CD の二級水酸基縁上部に位置した、 $r$  値が183 pm のとき (⑤)、 $\Delta E$  値は最小値であった。A 環はもとより B 環およびガロイル基は完全に β-CD 空洞外に位置しており、包接複合体を形成していなかった。

GCg<sub>A</sub>\_B-β-CD について、GCg<sub>A</sub> の B 環はβ-CD の空洞内に包接された方が  $\Delta E$  値は低下し、 $r=-154$  pm のとき  $\Delta E$  値は最小値であり、これは GCg<sub>A</sub> の B 環が β-CD 空洞内中央に位置した構造 (⑧) であった。この最適化構造では、EGC の水酸基と β-CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合の数は 6 か所あった。

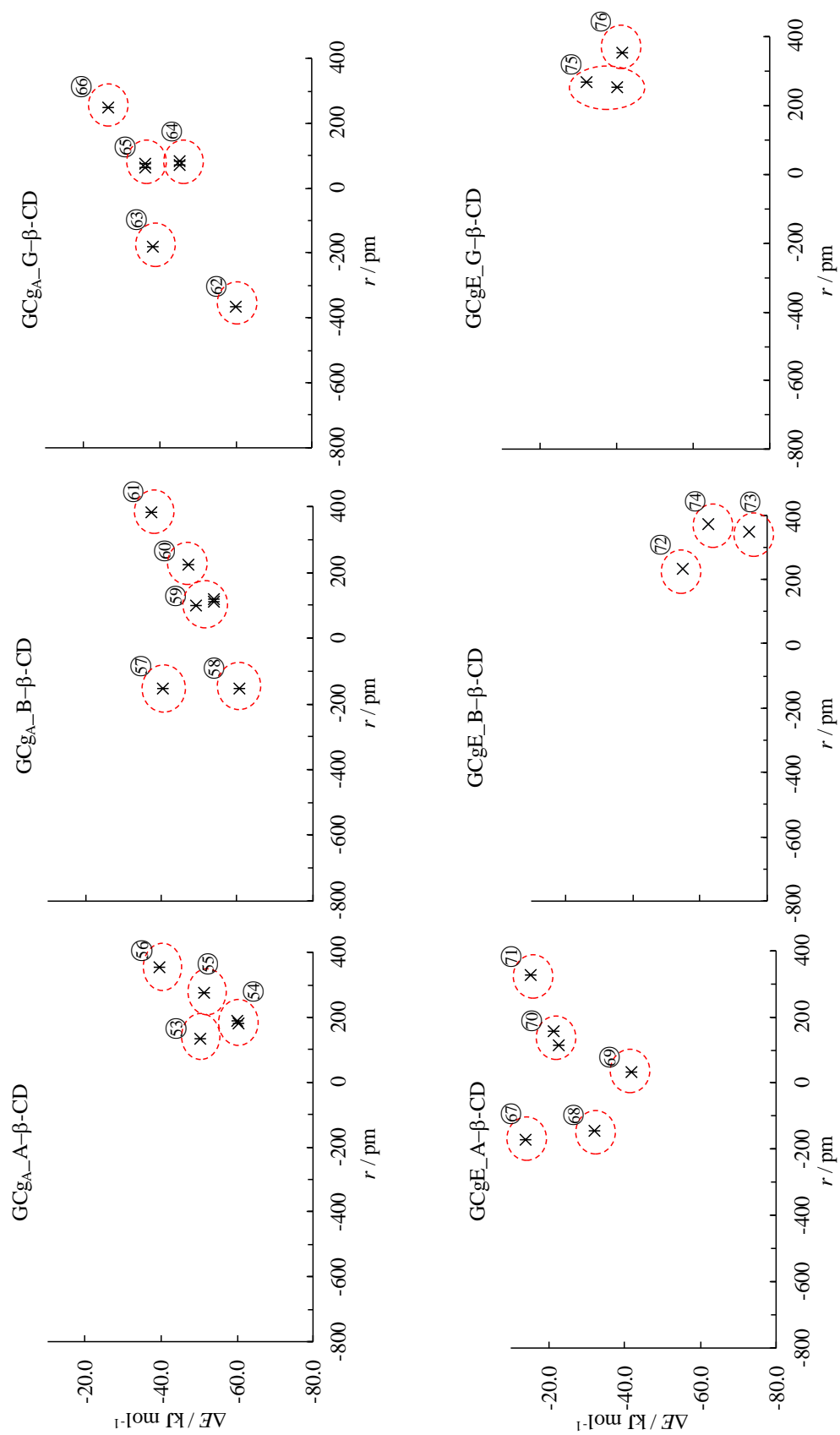
GCg<sub>A</sub>\_G-β-CD について、GCg<sub>A</sub> のガロイル基はβ-CD の空洞内に包接された方が  $\Delta E$  値は低下し、 $r=-363$  pm のとき  $\Delta E$  値は最小値であり、これは GCg<sub>A</sub> の B 環が β-CD 空洞内中央に位置した構造 (⑨) であった。この最適化構造では、GCg<sub>A</sub> の水酸基と β-CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合の数は 5 か所あった。

GCg<sub>E</sub>\_A-β-CD について、GCg<sub>E</sub> の A 環は β-CD の空洞内に包接された方が  $\Delta E$  値は低下し、 $r=32$  pm のとき  $\Delta E$  値は最小値であり、これは GCg<sub>E</sub> の B 環が β-CD 空洞内中央に位置した構造 (⑩) であった。この最適化構造では、GCg<sub>A</sub> の水酸基と β-CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合の数は 3 か所あった。

GCg<sub>E</sub>\_B-β-CD について、GCg<sub>E</sub> の B 環は β-CD の二級水酸基縁上部に位置した、 $r$  値が345 pm のとき (⑪)、 $\Delta E$  値は最小値であった。B 環はもとより A 環およびガロイル基は完全に β-CD 空洞外に位置しており、包接複合体を形成していなかった。

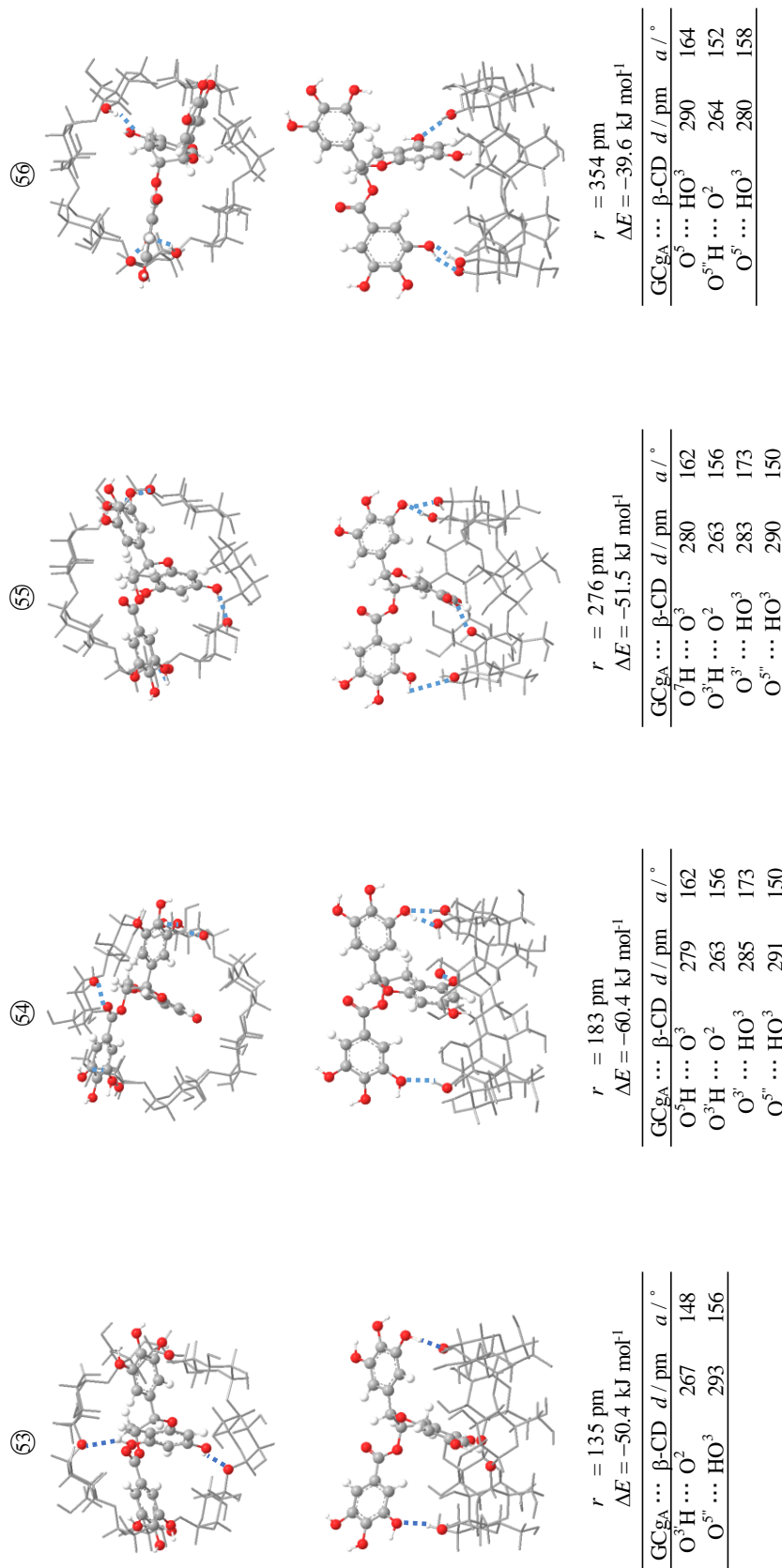
GCg<sub>E</sub>\_G-β-CD について、GCg<sub>E</sub> のガロイル基は β-CD の二級水酸基縁上部に位置した、 $r$  値が351 pm のとき (㉟)、 $\Delta E$  値は最小値であった。ガロイル基はもとより A 環および B 環は完全に β-CD 空洞外に位置しており、包接複合体を形成していなかった。

GCg<sub>A</sub>\_A-β-CD、GCg<sub>A</sub>\_B-β-CD、GCg<sub>A</sub>\_G-β-CD、GCg<sub>E</sub>\_A-β-CD、GCg<sub>E</sub>\_B-β-CD および GCg<sub>E</sub>\_G-β-CD の全ての最適化構造のうち、 $\Delta E$  値の最小値は㉟ であったが、包接複合体を形成していなかった。包接複合体を形成した最適化構造のなかで、 $\Delta E$  値が最小の最適化構造は㉟ であったが、㉟、㉟、㉟ はほぼ同様の $\Delta E$  値であった。㉟ を含む GCg<sub>A</sub> の A 環がβ-CD 空洞内に接近した最適化構造は、B 環とガロイル基との立体障害により A 環が β-CD 空洞内にほとんど包接されていなかった。GCg<sub>A</sub>\_B-β-CD について、㉟ から+16 kJ mol<sup>-1</sup> の範囲内にはには  $r=-160$  pm から 230 pm までの複数の最適化構造が含まれるため、B 環は β-CD 空洞内に緩く包接されており、一級水酸基側から二級水酸基側まで揺れ動くことが考えられる。一方、GCg<sub>A</sub>\_G-β-CD について、前述のエネルギー範囲内の最適化構造は㉟ 一つであり、ガロイル基は β-CD 空洞内にきつく包接された包接複合体を形成することが明らかとなった。



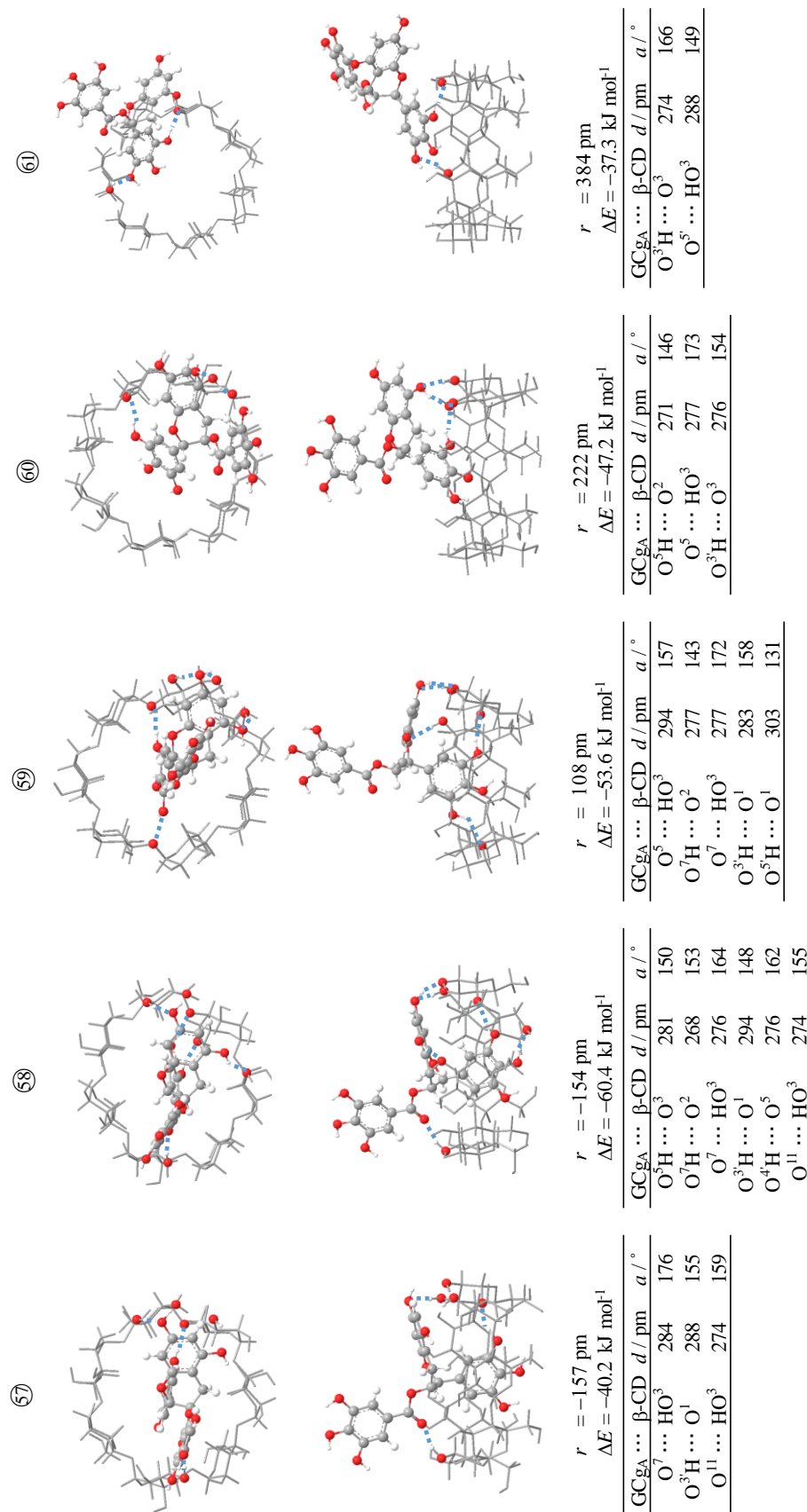
**Fig. 41** GCgA- $\beta$ -CD および GCgE- $\beta$ -CD の最適化構造における  $r$  値および  $\Delta E$  値

各グループを赤丸で囲み、53 ~ 76 の番号を付けた。



**Fig. 42** GCgA-A-β-CD におけるグループ⑤③ ~ ⑤⑥ の最適化構造および分子間水素結合

β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下にΔE 値および分子間水素結合の詳細を示した。



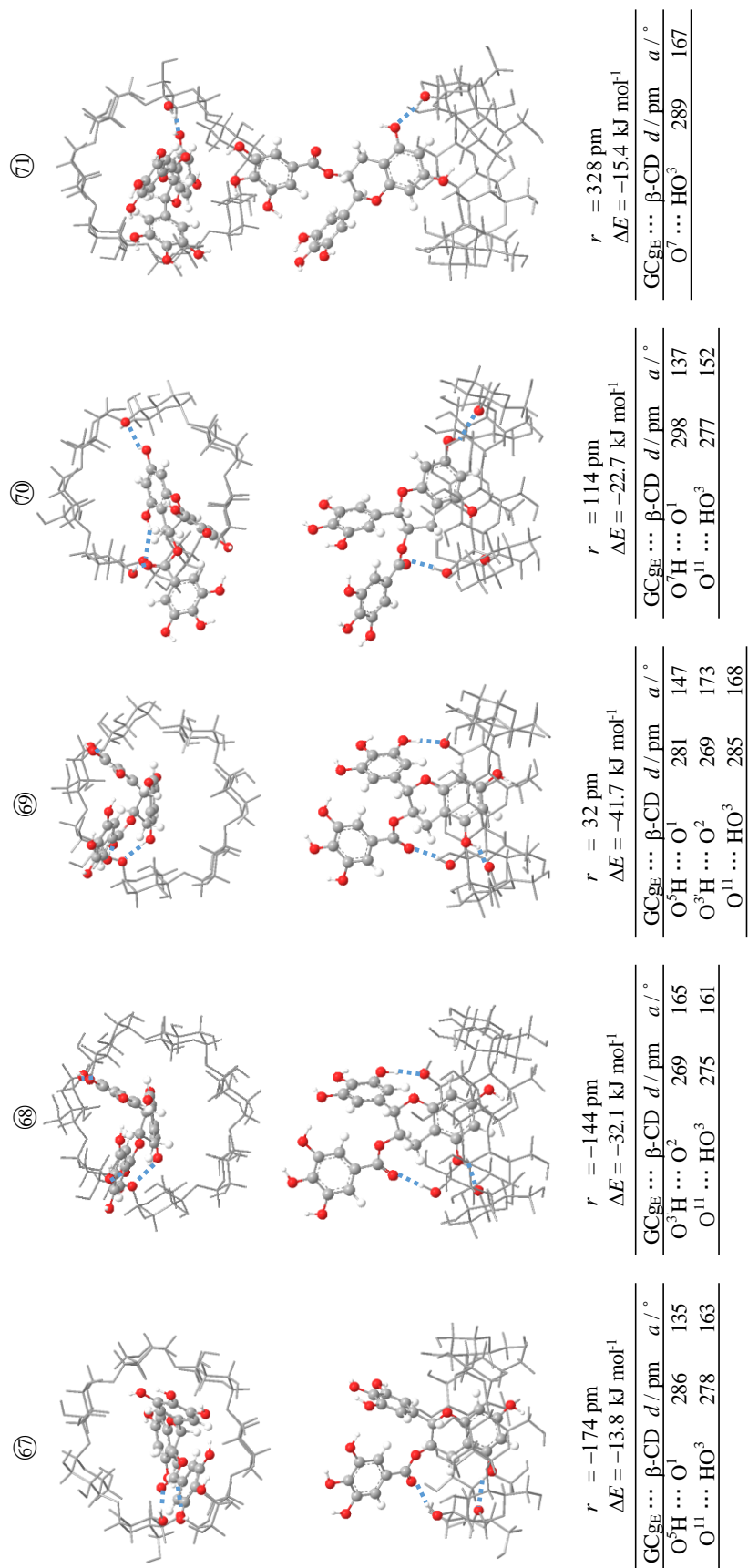
**Fig. 43** GCgA\_B-β-CD におけるグループ⑤⑦ ~ ⑥① の最適化構造および分子間水素結合

β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。

⑥②	⑥③	⑥④	⑥⑤	⑥⑥
$r = -363 \text{ pm}$ $\Delta E = -59.8 \text{ kJ mol}^{-1}$	$r = -180 \text{ pm}$ $\Delta E = -37.9 \text{ kJ mol}^{-1}$	$r = 72 \text{ pm}$ $\Delta E = -43.0 \text{ kJ mol}^{-1}$	$r = 80 \text{ pm}$ $\Delta E = -35.9 \text{ kJ mol}^{-1}$	$r = 252 \text{ pm}$ $\Delta E = -26.4 \text{ kJ mol}^{-1}$
GCgA ... β-CD $d / \text{pm}$ $a / ^\circ$	GCgA ... β-CD $d / \text{pm}$ $a / ^\circ$	GCgA ... β-CD $d / \text{pm}$ $a / ^\circ$	GCgA ... β-CD $d / \text{pm}$ $a / ^\circ$	GCgA ... β-CD $d / \text{pm}$ $a / ^\circ$
O <sup>7</sup> ... HO <sup>3</sup> 289 149	O <sup>5</sup> ... HO <sup>3</sup> 300 160	O <sup>5</sup> ... HO <sup>3</sup> 286 162	O <sup>3</sup> H ... O <sup>1</sup> 287 175	O <sup>3</sup> H ... O <sup>3</sup> 274 161
O <sup>5</sup> ... HO <sup>3</sup> 292 151	O <sup>7</sup> ... HO <sup>3</sup> 294 147	O <sup>3</sup> H ... O <sup>1</sup> 286 174	O <sup>5</sup> H ... O <sup>1</sup> 297 141	
O <sup>3</sup> H ... O <sup>5</sup> 273 169	O <sup>3</sup> H ... O <sup>1</sup> 281 177	O <sup>5</sup> H ... O <sup>1</sup> 292 136	O <sup>11</sup> ... HO <sup>3</sup> 282 163	
O <sup>5</sup> H ... O <sup>5</sup> 274 154	O <sup>5</sup> H ... O <sup>5</sup> 273 148	O <sup>11</sup> ... HO <sup>3</sup> 285 164		
O <sup>1</sup> ... HO <sup>3</sup> 284 160	O <sup>1</sup> ... HO <sup>3</sup> 287 160			

**Fig. 44** GCgA\_G-β-CD におけるグループ⑥② ~⑥⑥ の最適化構造および分子間水素結合

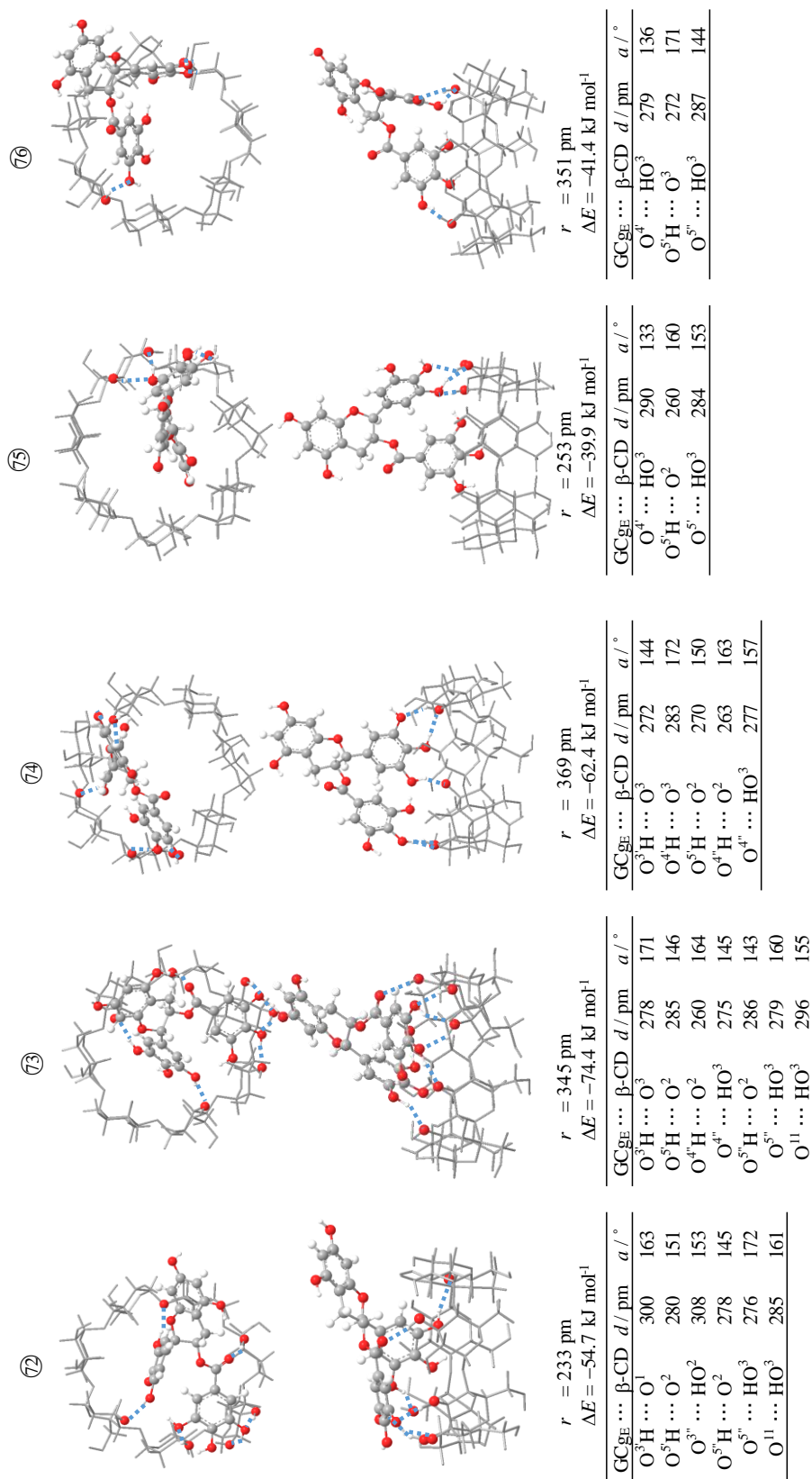
β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。



**Fig. 45** GC<sub>GE</sub>-A-β-CD におけるグループ⑥ ~ ⑦ の最適化構造および分子間水素結合

β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。





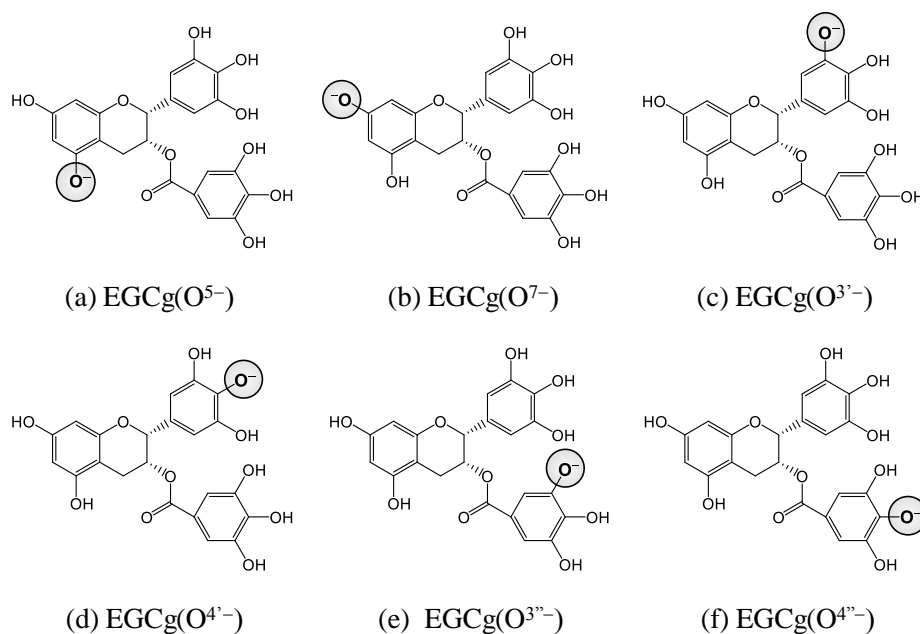
**Fig. 46** GCgE\_B-β-CD および GCgE\_G-β-CD におけるグループ② ~ ⑥ の最適化構造および分子間水素結合

β-CD の二級水酸基を上面とした図および横から見た図を示した。複合体構造中の青破線は、分子間水素結合を表す。各グループの構造の下に $\Delta E$  値および分子間水素結合の詳細を示した。

## 第 5 項 Ionized (-)-epigallocatechin gallate

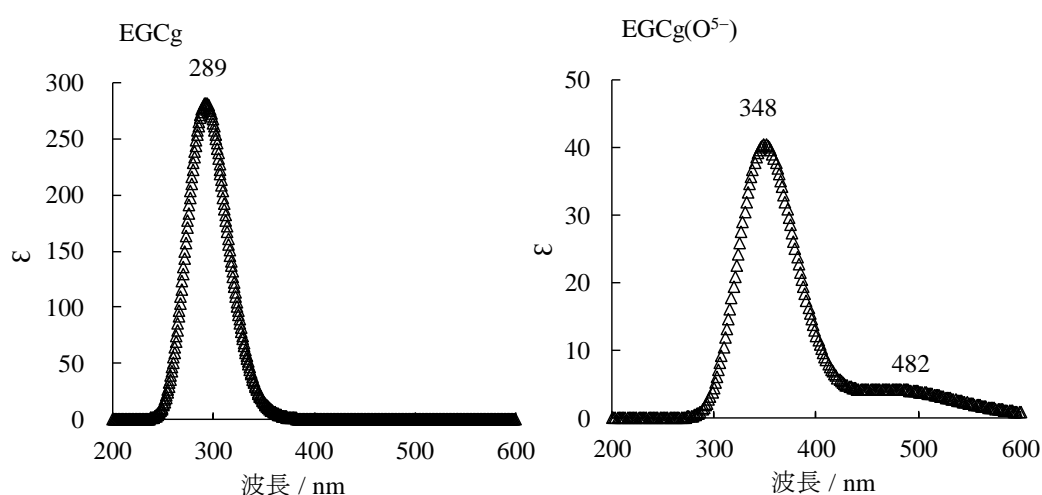
EGCg の pKa は 7.5 であり、pH が 5.0 から 8.5 へ変化に伴い吸収極大は 270 nm から 322 nm に赤色シフトし、290 nm に等吸収点が観測されるため、EGCg は溶液中で分子型とイオン型との間で平衡が成立するという報告がある[78, 79]。

はじめに、イオン型の構造を明らかにするため、ChemBio3D<sup>®</sup> を使用し EGCg の O<sup>5</sup>、O<sup>7</sup>、O<sup>3'</sup>、O<sup>4'</sup>、O<sup>3''</sup> および O<sup>4''</sup> に結合した水素原子を取り除いたイオン型構造 (EGCg(O<sup>5-</sup>), EGCg(O<sup>7-</sup>), EGCg(O<sup>3'-</sup>), EGCg(O<sup>4'-</sup>), EGCg(O<sup>3''-</sup>) および EGCg(O<sup>4''-</sup>)) を作成した (Fig. 47)。作成した各構造について DFT 法による構造最適化を行い、UV スペクトルを求めた。



**Fig. 47** EGCg について想定したイオン型構造

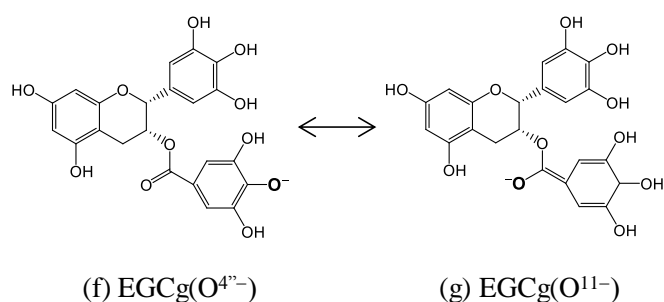
Fig. 48 には、EGCg および EGCg(O<sup>5-</sup>) の UV 連続スペクトルについて波長を横軸に、吸収ピーク (ε) を縦軸に示した。EGCg の吸収極大波長は 289 nm であったが、EGCg(O<sup>5-</sup>) の吸収極大波長は 348 nm および 482 nm の 2 か所あった。その他の構造における吸収極大波長を Table 2 に示した。EGCg(O<sup>7-</sup>)、EGCg(O<sup>3'-</sup>)、EGCg(O<sup>4'-</sup>) は EGCg(O<sup>5-</sup>) と同様に、紫外および可視領域にそれぞれ 2 か所の吸収極大波長があった。EGCg(O<sup>3''-</sup>) では 397 nm に、EGCg(O<sup>4''-</sup>) は 326 nm に吸収極大波長が観測された。実験値と比較したとき、EGCg の吸収極大波長は約 19 nm 異なったが、4'' 位水酸基を脱プロトン化した構造がイオン型構造であることは明らかであった。また、EGCg の 4'' 位水酸基を脱プロトン化したとき、Fig. 49 の共鳴混成構造が推定される。EGCg(O<sup>11-</sup>) の構造を作成し、UV スペクトルを求めたところ、326 nm に吸収極大波長が観測された。すなわち、EGCg の 4'' 位水酸基の脱プロトン化により共役系が大きくなることで、吸収極大は 270 nm から 322 nm に赤色シフトした。



**Fig. 48** EGCg および EGCg(O<sup>5-</sup>) の UV 連続スペクトル

**Table 2** EGCg について想定したイオン型構造における吸収極大波長

EGCg	吸収極大波長 / nm
EGCg(O <sup>7-</sup> )	346, 495
EGCg(O <sup>3'-</sup> )	362, 527
EGCg(O <sup>4'-</sup> )	347, 544
EGCg(O <sup>3''-</sup> )	397
EGCg(O <sup>4''-</sup> )	326

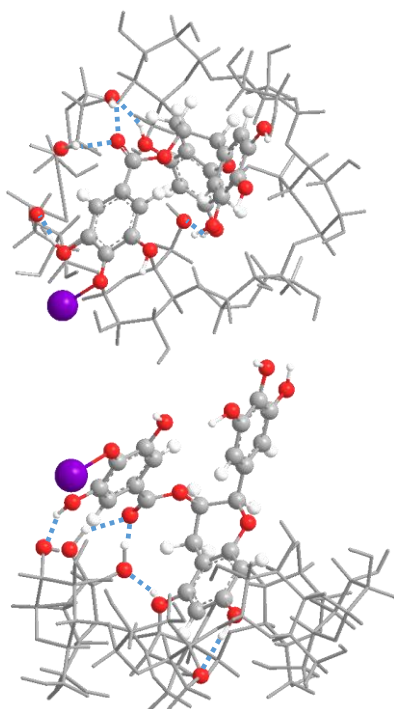
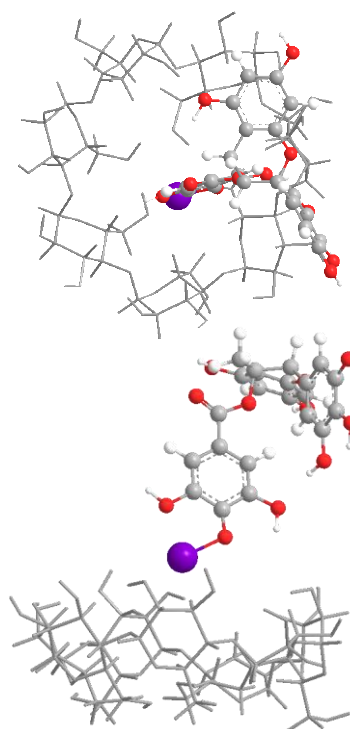
**Fig. 49** イオン型 EGCg の共鳴混成構造

イオン型構造を用いた DFT 計算では、一般的に電子の分布を考慮するために diffuse 関数と呼ばれる専用の関数を使用する。この関数は膨大な計算資源および計算時間を必要とし、また計算対象の原子数の増大によりこの傾向は大きくなるという欠点があり、EGCg と  $\beta$ -CD との複合体についての計算は困難であった。このため、EGCg 分子全体の電荷を中性化するために、カウンターイオンとしてナトリウムイオンをガロイル基に 1 つ配置した EGCg 分子 (EGCg(Na)) を用いた。第 1 節第 2 項より EGCg の B 環は  $\beta$ -CD 空洞内に包接されないことが明らかであるため、A 環およびガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内に包接する場合 (EGCg(Na)\_A- $\beta$ -CD および EGCg(Na)\_G- $\beta$ -CD) について複合体初期構造を作

成した。構造最適化計算には、ナトリウム原子の計算パラメータが含まれた PM6 法を用いた。

EGCg(Na)\_A- $\beta$ -CD について、EGCg(Na) の A 環は  $\beta$ -CD 空洞内に位置したとき  $\Delta E$  値は最小値となり、 $r$  値は -60 pm であった (Fig. 50 (a))。この最適化構造は、EGCg(Na) の水酸基またはカルボニル基の酸素原子と  $\beta$ -CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合の数は 5 か所あった。一方、EGCg(Na)\_G- $\beta$ -CD の  $\Delta E$  値が最小値の最適化構造は Fig. 50 (b) に示すように、EGCg(Na) のガロイル基は、 $\beta$ -CD の二級水酸基側の縁上部に位置し、包接複合体を形成していなかった。

すなわち、EGCg(Na) は A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接した複合体を形成した。この複合体のガロイル基は  $\beta$ -CD 空洞外に位置するため、複合体形成に大きな影響を与えなかった。また、 $\beta$ -CD 空洞内が疎水性であるためガロイル基自身は空洞内に包接されなかった。

(a) EGCg(Na)\_A- $\beta$ -CD(b) EGCg(Na)\_G- $\beta$ -CD

EGCg(Na) $\cdots$ $\beta$ -CD	$d / \text{pm}$	$a / ^\circ$
$\text{O}^5\text{H} \cdots \text{O}^2$	266	148
$\text{O}^7\text{H} \cdots \text{O}^5$	277	172
$\text{O}^{3''}\text{H} \cdots \text{O}^2$	273	161
$\text{O}^{11} \cdots \text{HO}^2$	286	170
$\text{O}^{11} \cdots \text{HO}^3$	275	154

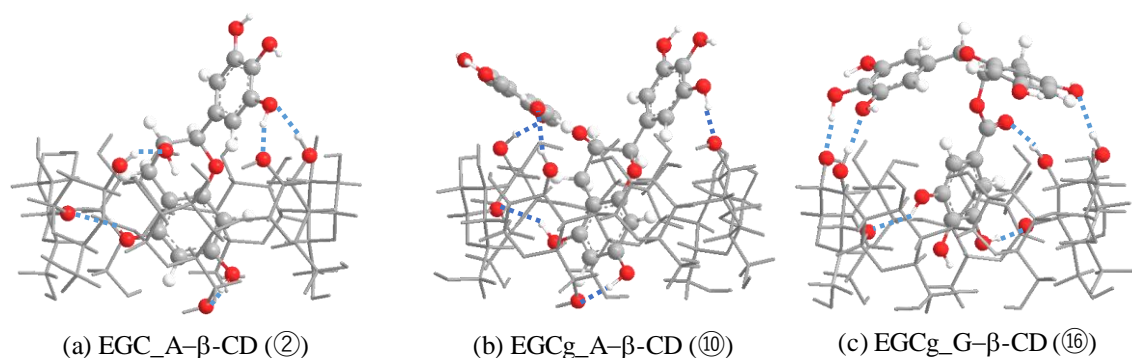
**Fig. 50** EGCg(Na) と $\beta$ -CD との複合体最安定構造

紫色原子は Na 原子を表し、青色破線は分子間水素結合を示す。

## 第 6 項 小括

カテキンと  $\beta$ -CD との複合体形成について、6 種のカテキンおよびイオン型構造をゲスト分子として、 $\beta$ -CD との包接複合体構造を求めた。DFT 法を用いた最適化計算では、 $\beta$ -CD の二級水酸基側から空洞内にカテキンを接近させた複数の初期入力構造を作成し、それぞれについて構造最適化を行うことで、複合体安定化エネルギーに対するカテキンの位置との関係を明らかにした。

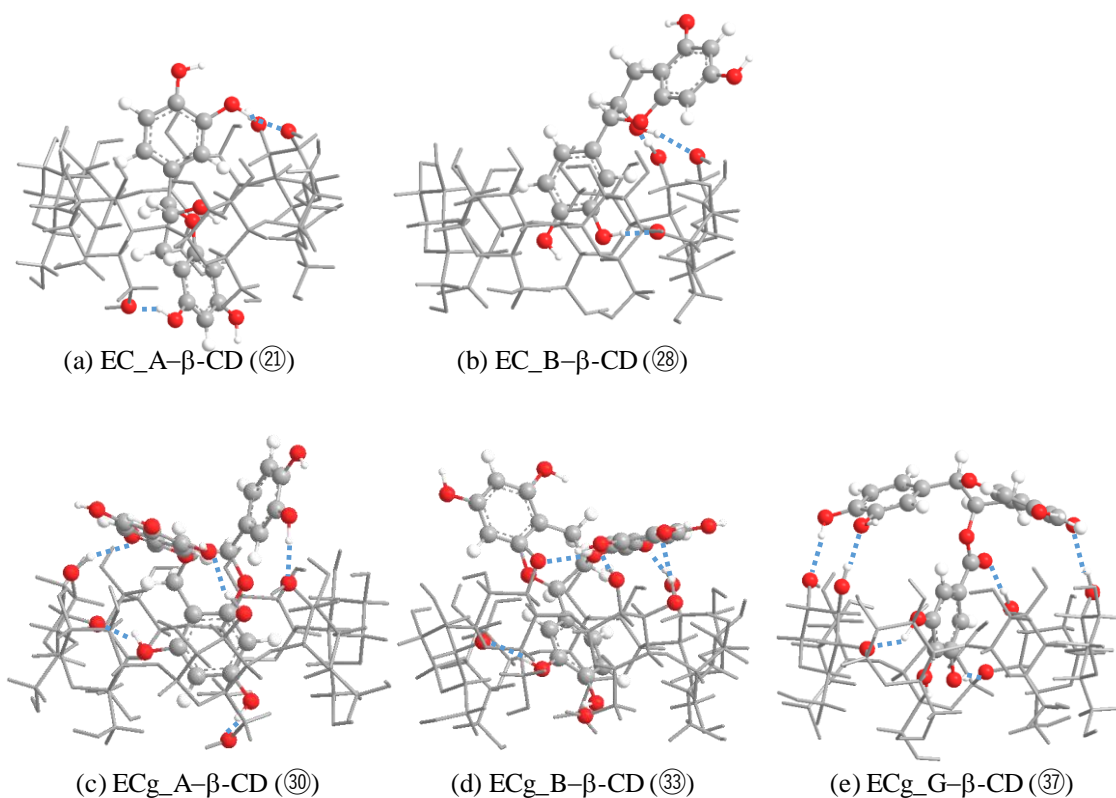
6 種カテキン全ての最適化構造は  $\Delta E < 0$  であり、カテキンは  $\beta$ -CD と複合体を形成しやすい傾向を示した。EGC は A 環が  $\beta$ -CD 空洞内を一級水酸基側から二級水酸基側まで揺れ動く 1 種の包接モードが推定された (Fig.51 (a))。EGCg は、EGC と同様に A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された (Fig.51 (b))。A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に位置したとき、A 環、B 環およびガロイル基の全てと  $\beta$ -CD との間で分子間水素結合を形成することで、空洞内きつく包接された複合体を形成した。また、EGCg はガロイル基自身が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された複合体を形成した (Fig.51 (c))。ガロイル基は空洞内に緩く包接されるため空洞内中央から二級水酸基にかけて揺れ動くことが推察される。以上の結果、ガロイル基は包接複合体形成に大きく寄与すると考えられる。



**Fig. 51** DFT 法を用いて推定された EGC または EGCg と  $\beta$ -CD との複合体構造

各構造は EGC\_A- $\beta$ -CD、EGCg\_A- $\beta$ -CD、EGCg\_G- $\beta$ -CD それぞれの最小  $\Delta E$  値を有する最適化構造、括弧内にグループ番号を記した。

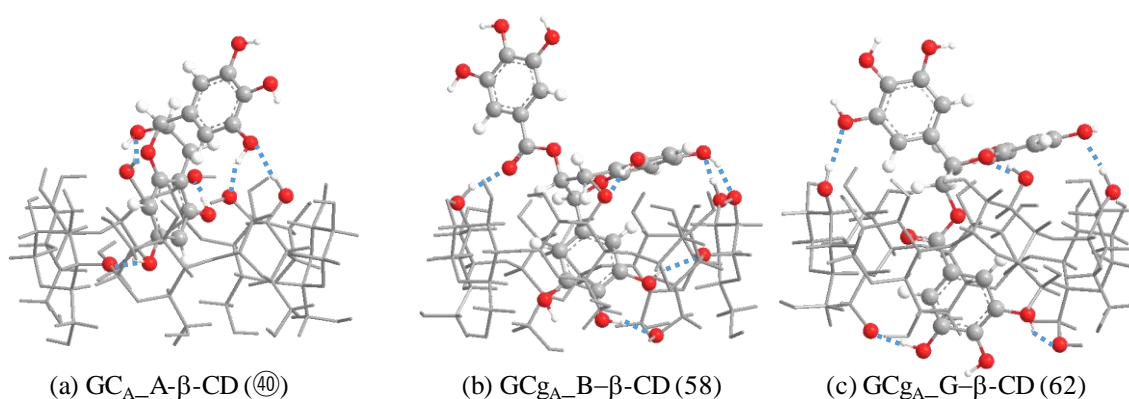
EC は、A 環だけでなく B 環もまた  $\beta$ -CD 空洞内に包接されたが、ともに緩く  $\beta$ -CD 空洞内を揺れ動く (Fig. 52 (a), (b))。ECg の A 環、B 環およびガロイル基は、すべて  $\beta$ -CD 空洞内に包接されたが、特に B 環の空洞内への包接により  $\Delta E$  値は最小値かつ分子間水素結合数は最大であった (Fig. 52 (c), (d), (e))。B 環がピロガロール基である EGC や EGCg と同様に EC や ECg の A 環は  $\beta$ -CD 空洞内に包接されたが、B 環水酸基数の減少による疎水性の増大により、B 環自身が  $\beta$ -CD 空洞内に包接されやすい傾向を示した。



**Fig. 52** DFT 法を用いて推定された EC または ECg と  $\beta$ -CD との複合体構造  
各構造は EC\_A- $\beta$ -CD、EC\_B- $\beta$ -CD、の包接複合体を形成した構造における最小  $\Delta E$  値を有する最適化構造、ECg\_A- $\beta$ -CD、ECg\_B- $\beta$ -CD および ECg\_G- $\beta$ -CD それぞれの最小  $\Delta E$  値を有する最適化構造、括弧内にグループ番号を記した。



GC は B 環がピロガロール基であるため、EGC と同様に A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接されたが、 $\beta$ -CD 空洞内にきつく包接された安定な 1 種の包接モードが推定された (Fig. 53 (a))。GCg は B 環が  $\beta$ -CD 空洞内に緩く包接された包接モード (Fig. 53 (b)) と、ガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内にきつく包接された包接モード (Fig. 53 (c)) が推定された。すなわち、C 環に対して B 環が *S* 配置の方が、*R* 配置より  $\beta$ -CD とより安定な包接複合体を形成することが判明した。



**Fig. 53** DFT 法を用いて推定された GC または GCg と  $\beta$ -CD との複合体構造  
各構造は GC<sub>A</sub>-A- $\beta$ -CD、GCg<sub>A</sub>-A- $\beta$ -CD、GCg<sub>A</sub>-G- $\beta$ -CD それぞれの最小 $\Delta E$  値を有する最適化構造、括弧内にグループ番号を記した。

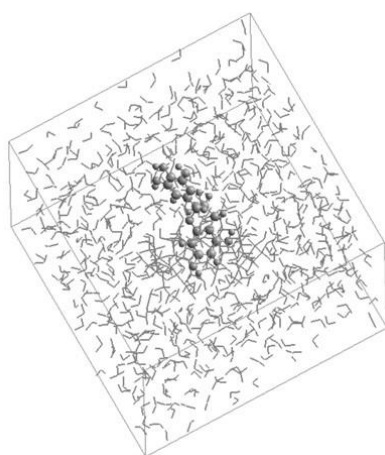
EGCg は  $pK_a < pH$  ではガロイル基がイオン化し、イオン化したガロイル基は  $\beta$ -CD 空洞内に包接されないことが判明した。

以上の結果、 $\beta$ -CD と包接複合体を形成しやすいカテキンの特徴として、以下の 4 点が明らかとなった。① ガロイル基を有する。② B 環はカテコール基である。③ 立体構造は、2,3-トランス型カテキンである。④ 分子型である。

## 第 2 節 分子動力学計算

カテキンと  $\beta$ -CD との複合体形成について、水分子がカテキンと  $\beta$ -CD との複合体形成に与える影響を明らかにするため、実座標として水分子を取り込み、ゲスト分子として被包接部位が 2 か所の EGC、3 か所の EGCg を用いて分子動力学計算によるシミュレーションを行った。

はじめに、プログラム SCIGRESS ME 2.0 (Fujitsu 社製) を使用し、 $\beta$ -CD 1 分子および水分子 700 分子を配置させた一辺 2830 pm の立方体セルを作成した。次に、この立方体セル内の  $\beta$ -CD に対し、EGC の各環の基準炭素原子が  $\beta$ -CD 空洞内中央に位置する  $r=0$  pm となるように配置した初期入力構造を作成した。EGC\_A- $\beta$ -CD の初期入力構造を Fig. 54 に示した。水分子および  $\beta$ -CD をスティックモデルで、EGC をボール&スティックモデルで表し、枠は一辺 2830 pm の立方体セルを表す。EGCg については、EGC と同様の手順で A 環、B 環およびガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内中央に位置した初期入力構造を作成した。それぞれの初期入力構造に対して、定温 (298K) および定圧 (1013 hPa) 条件下でシミュレーションを行った。

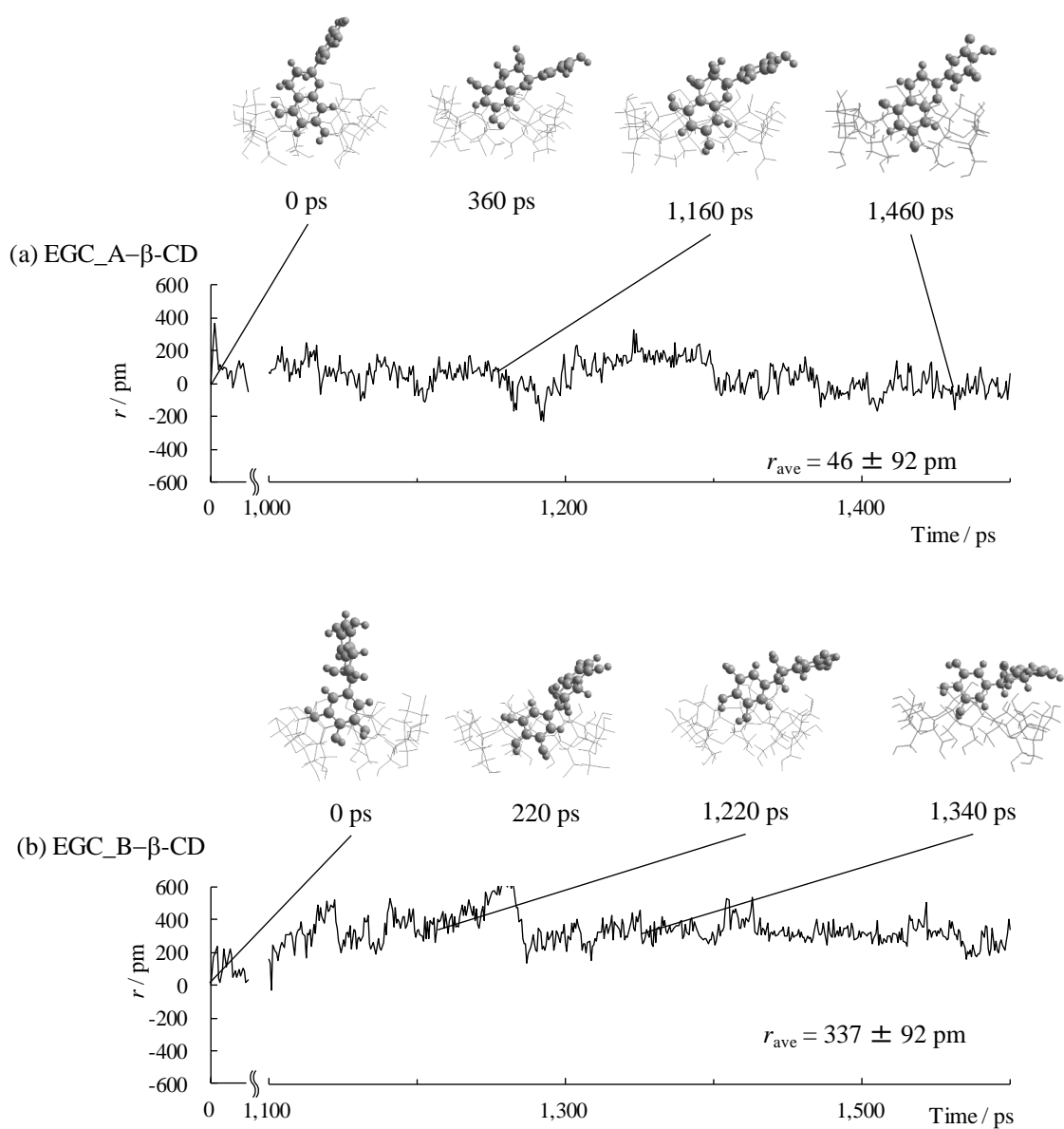


**Fig. 54** EGC\_A- $\beta$ -CD の初期入力構造

EGC はボール&スティックモデルで表し、 $\beta$ -CD および水分子はスティックモデルで表した。図中の枠は、MD セルを表す。

Fig.55 は、EGC\_A- $\beta$ -CD および EGC\_B- $\beta$ -CD について、系が平衡状態に達した後、500 ps 間の経過時間を横軸に、対応する  $r$  値を縦軸に示した。500 ps 間の  $r$  値の平均値 ( $r_{\text{ave}}$ ) を記した。また、初期入力構造、平衡化中および平衡化後の複合体の瞬間構造 (水分子は非表示) を各グラフ上に図示した。構造変化のアニメーション、 $r$  値、経過時間に対する温度および圧力の変化図を用いて平衡化を確認した。EGC\_A- $\beta$ -CD は 1,000 ps で平衡状態に達し、1,000 ps から 1,500 ps の間、EGC の A 環は  $\beta$ -CD 空洞内に位置した構造を維持したが、 $r$  値は -229 pm から 328 pm までの振幅があった。 $r$  値が平均値のときの水分子を含む瞬間構造 (1,110 ps) を Fig 56 に示した。このとき、EGC と  $\beta$ -CD、EGC と水分子、および  $\beta$ -CD と水分子の間で水素結合は形成されていなかった。EGC\_B- $\beta$ -CD は、1,100 ps で EGC が全体的に  $\beta$ -CD 空洞から追い出されてしまった。そのため、EGC の B 環が包接される可能性はほとんど考えられない。

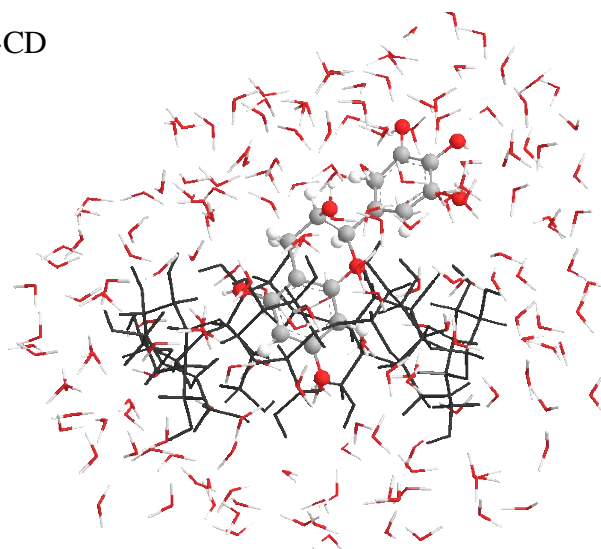
Fig.57 は、EGCg\_A- $\beta$ -CD、EGCg\_B- $\beta$ -CD および EGCg\_G- $\beta$ -CD について、系が平衡状態に達した後から 500 ps 間の経過時間を横軸に、対応する  $r$  値を縦軸に示し、500 ps 間の  $r$  値の平均値 ( $r_{\text{ave}}$ ) を記した。また、初期入力構造、平衡化中および平衡化後の複合体の瞬間構造 (水分子は非表示) を各グラフ上に図示した。EGCg と  $\beta$ -CD との MD 計算 では、全て 1,000 ps で平衡状態に達した。EGCg\_A- $\beta$ -CD について、平衡化後 EGCg の A 環は  $\beta$ -CD 空洞内の一級水酸基側に位置した構造を維持し、 $r$  値は -537 pm から -36 pm までの振幅があった。 $r$  値が平均値のときの水分子を含む瞬間構造 (1,300 ps) を Fig 58 (a) に示した。このとき、EGCg と  $\beta$ -CD 、EGCg と水分子、および  $\beta$ -CD と水分子の間で水素結合は形成されていなかった。しかし、EGCg のカルボニル基の酸素原子は、 $\beta$ -CD 二級水酸基と水素結合できる距離 ( $\text{O}^{11}\cdots\text{H}-\text{O}^3$  の  $\text{O}^{11}\cdots\text{O}^3$  間距離 : 323 pm) に位置した。EGCg\_B- $\beta$ -CD は、100 ps で EGCg が全体的に  $\beta$ -CD 空洞から追



**Fig. 55** EGC とβ-CD との MD 計算結果

$r$  値の初期値および系が平衡化してからの 500 ps 間について、経時的な  $r$  値の変化を棒グラフで表した。各グラフ内の  $r_{\text{ave}}$  は、測定範囲における平均距離を表した。

(a) EGC\_AC- $\beta$ -CD  
1,110 ps



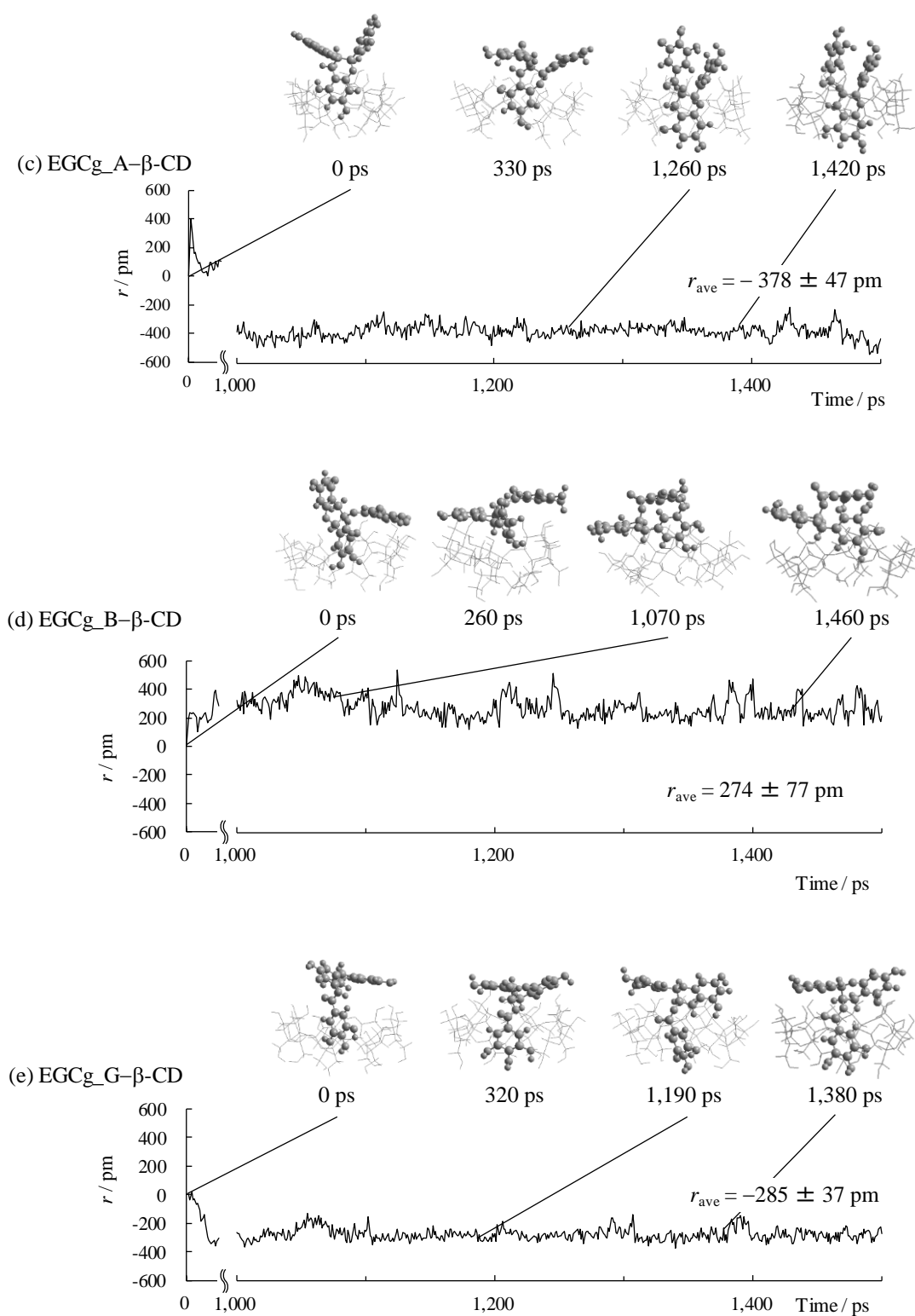
**Fig. 56** EGC\_A- $\beta$ -CD のスナップショット

EGC はボール&スティックモデルで表し、 $\beta$ -CD は黒色のステックモデルで表し、水分子は赤および白のステックモデルで表した。

い出されてしまい、その後、B 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接されることはなかった。そのため、EGCg の B 環が包接される可能性はほとんど考えられない。EGCg\_G- $\beta$ -CD について、平衡化後 EGCg のガロイル基は  $\beta$ -CD 空洞内の一級水酸基側に位置した構造を維持し、複合体構造はほとんど変化しなかった。 $r$  値が平均値のときの水分子を含む瞬間構造 (1,040 ps) を Fig 58 (b) に示した。EGCg と  $\beta$ -CD、EGCg と水分子、および  $\beta$ -CD と水分子の間で水素結合は形成されていなかった。

以上の結果、EGC または EGCg の A 環およびガロイル基は、 $\beta$ -CD 空洞内に包接されやすく、B 環は  $\beta$ -CD 空洞内に包接されにくいことが明らかとなり、DFT 法を用いた最適化構造結果を支持するものとなった。しかし、EGC または EGCg と  $\beta$ -CD との間で形成された分子間水素結合について、その重要性を指摘した DFT 法を用いた最適化構造の結果とは矛盾した。これは、EGC または EGCg と  $\beta$ -CD との間で形成される分子間の水素結合は静的なものでなく、経

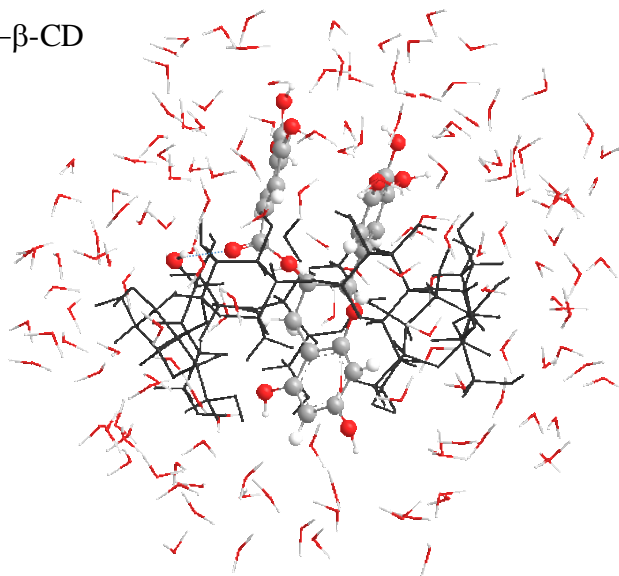
時的にかつ動的に変化しているため、MD 計算の瞬間構造の評価だけでは不十分であったと考えられる。MD 計算はカテキンと  $\beta$ -CD との包接複合体における  $r$  値についての評価を可能とするが、分子間の水素結合については DFT 法による検討が必要である。



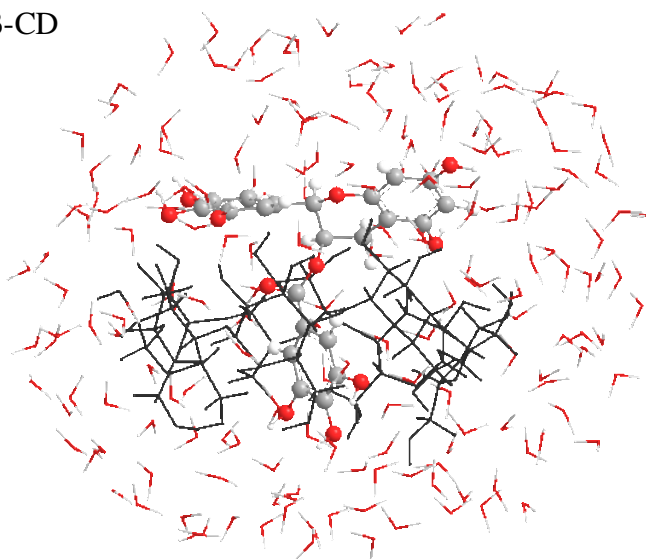
**Fig. 57** EGCg とβ-CD との MD 計算結果

$r$  値の初期値および系が平衡化してからの 500 ps 間について、経時的な  $r$  値の変化を棒グラフで表した。各グラフ内の  $r_{\text{ave}}$  は、測定範囲における平均距離を表した。

(a) EGCg\_AC- $\beta$ -CD  
1,300 ps



(b) EGCg\_G- $\beta$ -CD  
1,040 ps



**Fig. 58** EGCg\_A- $\beta$ -CD および EGCg\_G- $\beta$ -CD のスナップショット

EGCg はボール&スティックモデルで表し、 $\beta$ -CD は黒色のステックモデルで表し、水分子は赤および白のステックモデルで表した。



## 第 2 章 カテキン- $\beta$ -cyclodextrin 包接複合体形成の検証

### 第 1 節 核磁気共鳴スペクトル測定

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非常に重要な測定法である。CD とゲスト分子の複合体構造を推定する場合、それぞれの化学シフトの変化を観測することで、包接モードや包接部位の推定に頻繁に用いられている[39, 40, 43]。例えば、芳香環を持つゲスト分子が CD 空洞内に包接される場合、環電流効果により CD 空洞内に位置する 3-H および 5-H のシグナル位置は高磁場側へ移動することが知られている[39, 59]。しかし、ゲスト分子については、CD 空洞内の疎水環境下に位置することで、溶媒効果や空洞内に包接されたことによる遮蔽効果、また立体的な構造変化に影響されて、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルの化学シフト変化 ( $\Delta\delta$ ) のみでは、ゲスト分子の包接部位の決定は難しい[39]。しかし、双極子交差緩和機構 (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) を測定することで、ゲスト分子の包接部位を推定することができる[40]。しかし、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、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) を測定する ROESY 測定を行いました。

前章より、カテキンのガロイル基の有無が  $\beta$ -CD との包接複合体形成に大きく影響することが示唆されたため、ゲスト分子として EGC および EGCg を用い、はじめに複合体形成による  $\beta$ -CD の化学シフト変化を計算した。EGC または EGCg と  $\beta$ -CD を  $\text{D}_2\text{O}$  中で混合 (EGC+ $\beta$ -CD または EGCg+ $\beta$ -CD) して  $^1\text{H}$ -

NMR スペクトルを測定し、 $\beta$ -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 の化学シフトおよび化学シフト変化 ( $\Delta\delta = \delta_{\text{mix}} - \delta_{\beta\text{-CD}}$ ) をまとめ、Fig. 58 にはそれらの  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示した。EGC+ $\beta$ -CD では、 $\beta$ -CD の 3-H および 5-H の  $\Delta\delta$  は高磁場にシフトした ( $\Delta\delta = -0.035$  および  $\Delta\delta = -0.058$ )。EGCg+ $\beta$ -CD では、前者に比べ  $\beta$ -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 ( $\Delta\delta = -0.166$  および  $\Delta\delta = -0.101$ )。EGC や EGCg との混合による  $\beta$ -CD 空洞内の 3-H および 5-H の高磁場側への化学シフトの移動は、EGC と EGCg が  $\beta$ -CD 空洞内に包接されたことを支持した。

**Table 3**  $\text{D}_2\text{O}$  中の  $\beta$ -CD の化学シフトおよび化学シフト変化

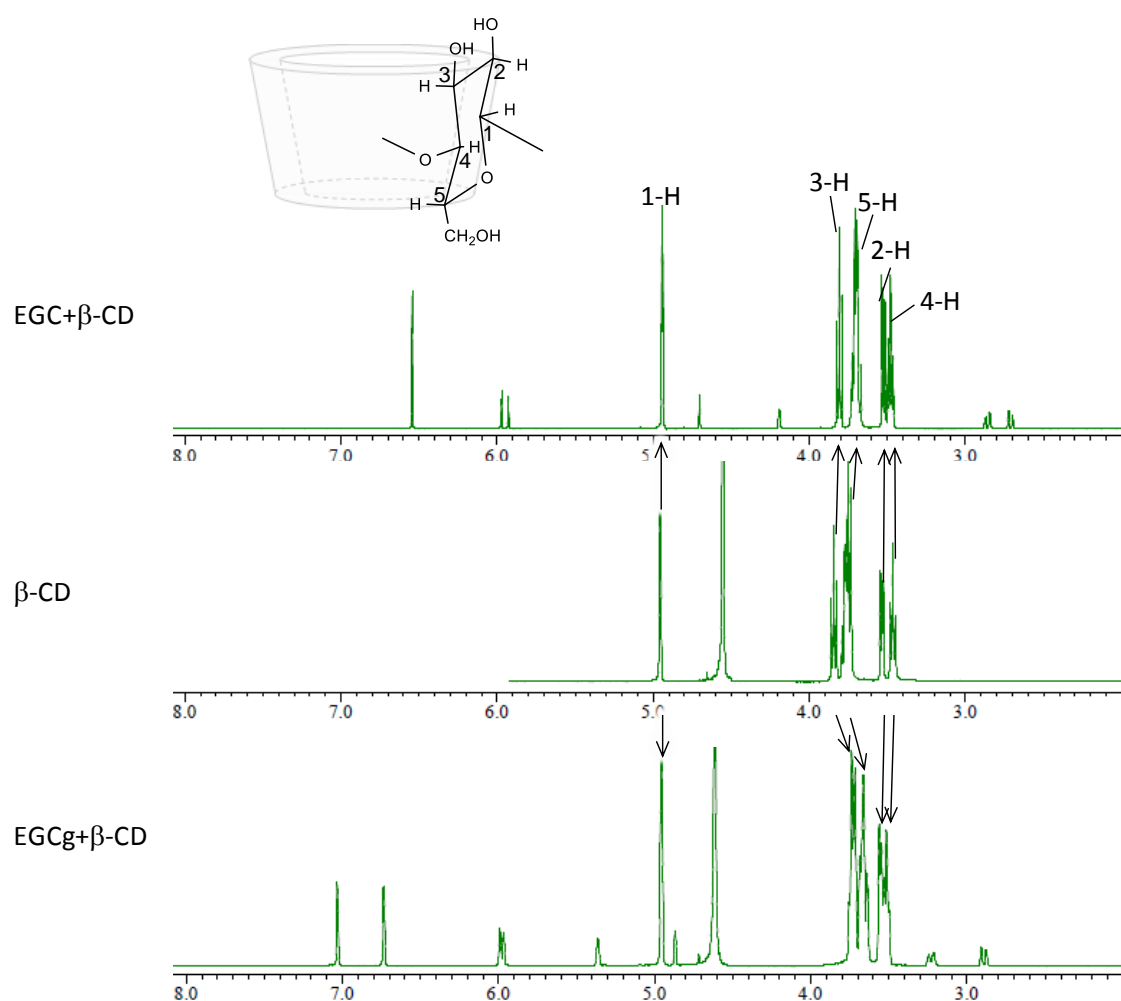
$\beta$ -CD proton	$\beta$ -CD / ppm	EGC+ $\beta$ -CD / ppm		EGCg+ $\beta$ -CD / ppm	
	$\delta_{\beta\text{-CD}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{mix}}^{\text{b}}$	$\Delta\delta^{\text{d}}$	$\delta_{\text{mix}}^{\text{c}}$	$\Delta\delta^{\text{d}}$
1-H	4.954	4.942	-0.012	4.957	0.003
2-H	3.536	3.524	-0.012	3.555	0.019
3-H	3.843	3.808	-0.033	3.677	-0.166
4-H	3.466	3.480	0.014	3.517	0.051
5-H	3.764	3.706	-0.058	3.663	-0.101

<sup>a</sup> 13.2 mM  $\beta$ -CD, 308 K

<sup>b</sup> 10.0 mM EGC + 9.56 mM  $\beta$ -CD, 308 K

<sup>c</sup> 13.2 mM EGCg + 11.6 mM  $\beta$ -CD, 308 K

<sup>d</sup>  $\Delta\delta = \delta_{\text{mix}} - \delta_{\beta\text{-CD}}$



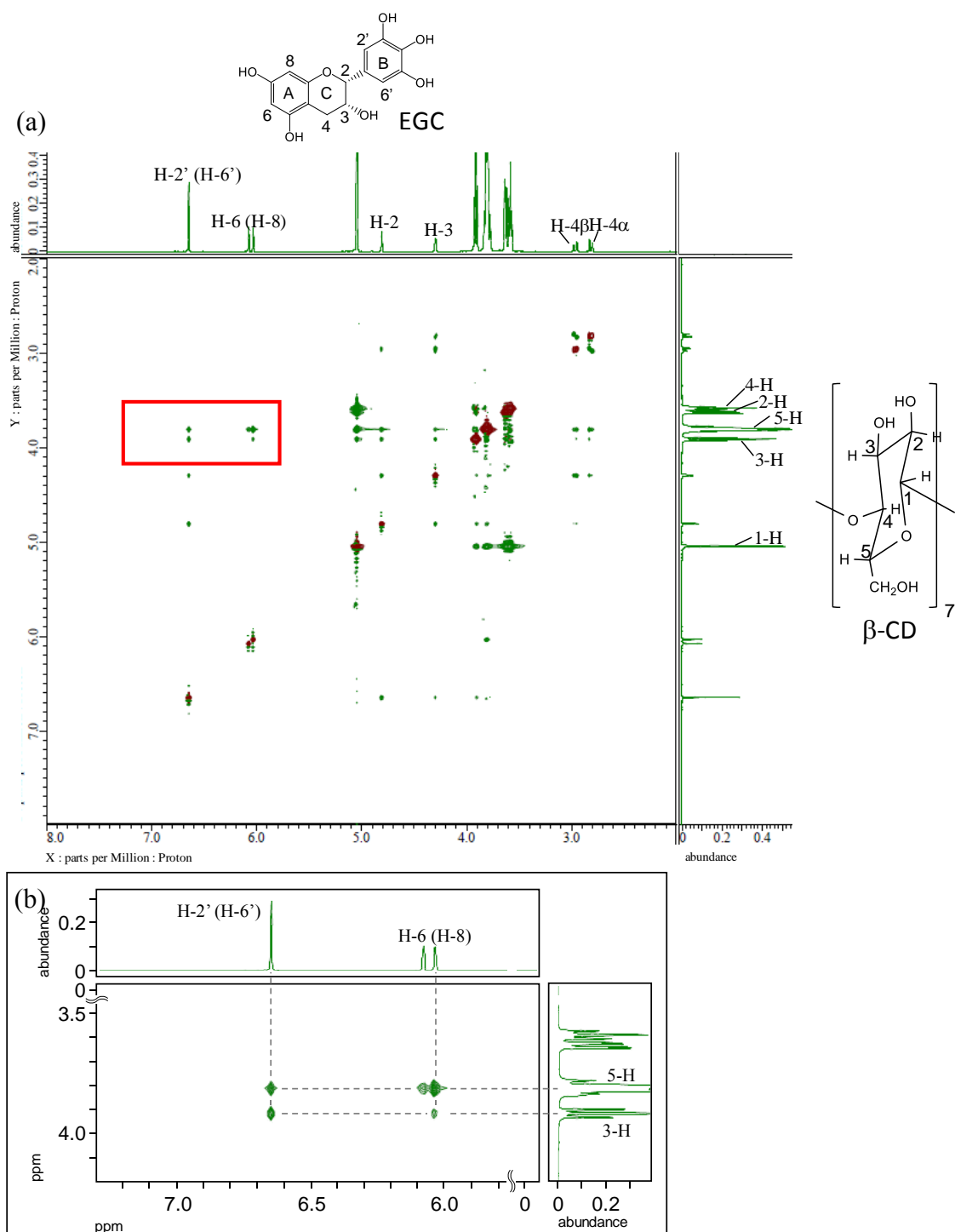
**Fig. 59**  $\beta$ -CD、EGC+ $\beta$ -CD および EGCg+ $\beta$ -CD の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル  
( $\text{D}_2\text{O}$ 、308 K)

1-H、2-H、3-H、4-H および 5-H は  $\beta$ -CD の各プロトンであり、 $\beta$ -CD の構造を上部に記した。

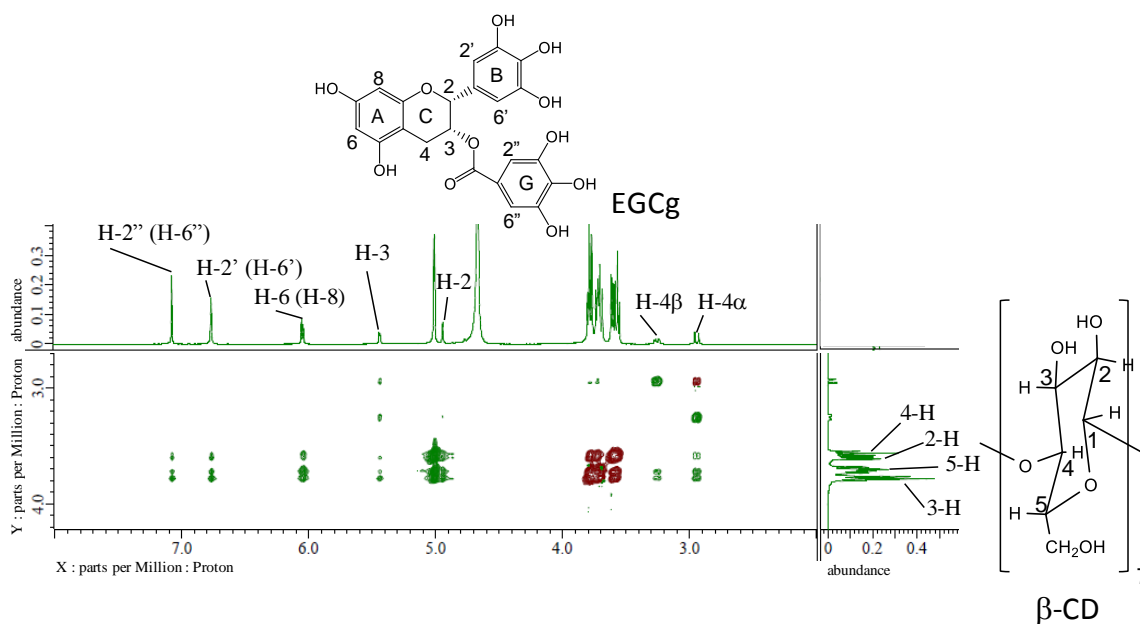
Fig. 60 は EGC+ $\beta$ -CD について、X 軸および Y 軸共に 2.0 ppm から 8.0 ppm の ROESY スペクトルを示した。X 軸上に EGC、Y 軸上に  $\beta$ -CD の各プロトンシグナル位置を表記した。EGC+ $\beta$ -CD では、特に  $\beta$ -CD の 3-H と EGC B 環の H-2' (H-6') の ROE 強度、および  $\beta$ -CD の 5-H と EGC A 環の H-6 (H-8) との間の ROE 強度が大きく現れたため、EGC の A 環および B 環はともに  $\beta$ -CD 空洞内に包接される可能性が示唆された。

Fig. 61 は EGCg+ $\beta$ -CD についての ROESY スペクトルを示した。 $\beta$ -CD 空洞内の 3-H および 5-H と EGCg との ROE 相互作用に注目し、X 軸は 2.0 ~ 8.0 ppm、Y 軸は 2.7 ~ 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。特に、 $\beta$ -CD の 3-H と EGCg A 環の H-6 (H-8)、B 環の H-2' (H-6')、ガロイル基の H-2'' (H-6'')、および  $\beta$ -CD の 5-H と EGCg の A 環の H-6 (H-8) との ROE 強度が大きく現れた。これらの結果から、EGCg の A 環、B 環およびガロイル基のすべての環が、 $\beta$ -CD の空洞内に包接されている可能性が示された。

$\beta$ -CD の 3-H は空洞内の二級水酸基側の浅い位置に、5-H は 1 級水酸基側の深い位置に存在するプロトンである。 $\beta$ -CD の 3-H と 5-H に着目すると、EGC+ $\beta$ -CD または EGCg+ $\beta$ -CD の D<sub>2</sub>O 混合溶液では、いずれも両プロトンが高磁場側へ移動した。これは EGC または EGCg の A 環、B 環またはガロイル基の芳香環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接されたことで、芳香環の環電流効果により  $\beta$ -CD の 3-H および 5-H が遮蔽されたためである。すなわち、D<sub>2</sub>O 中では、EGCg および EGC の A、B およびガロイル基は  $\beta$ -CD 空洞内のプロトン (3-H および 5-H) と近接位置にあることが判明した。



**Fig. 60** EGC と $\beta$ -CD の  $D_2O$  中における ROESY スペクトル(a) および拡大図 (b)  
 X 軸およびY 軸は共に 2.0 ppm から 8.0 ppm の範囲を示し、X 軸はEGC、  
 Y 軸は  $\beta$ -CD についての  $^1H$  化学シフトの帰属位置を示し、EGC および  
 $\beta$ -CD の構造を各軸の側に記した。(b) は(a) の赤枠範囲内を拡大した。



**Fig. 61** EGCg+β-CD の ROESY スペクトル (308 K)

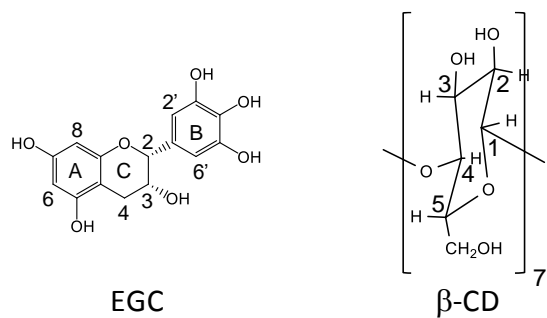
X 軸は 2.0 ~ 8.0 ppm、Y 軸は 2.7 ~ 4.2 ppm の範囲を示し、X 軸は EGCg、Y 軸は β-CD についての  $^1\text{H}$  化学シフトの帰属を示し、EGCg の構造を X 軸上部に記した。

EGCg は  $\text{pK}_a = 7.5$  であり、中性領域では分子型およびイオン型が存在するため、2 種以上の包接複合体の形成が予想される。EGC を対照とし、EGCg 分子型分率がほぼ 100% である pH3.0、およびイオン型が約 91% 存在する pH8.5 で ROESY スペクトルを測定した。pH3.0 および pH8.5 溶液中では、A 環の H-6 および H-8 は重水置換されやすい。長時間を要する ROESY スペクトル測定では、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ため、pH3.0 HCl 溶液および pH8.5  $\text{NaHCO}_3$  溶液を使用し presaturation 法を用いた[59, 60, 80, 81]。

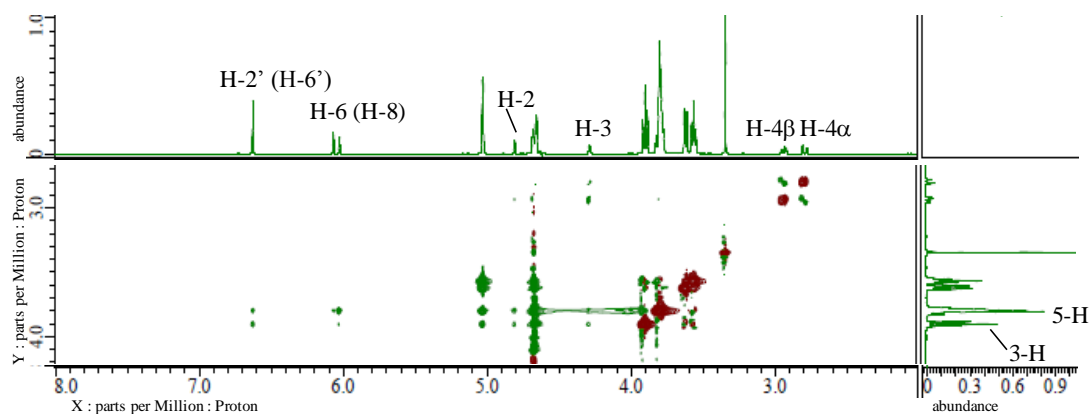
Fig.62 は、EGC+β-CD の pH3.0 HCl 溶液および pH8.5  $\text{NaHCO}_3$  溶液中の ROESY スペクトルである。EGC+β-CD では、溶液 pH に関わらず β-CD の 3-H と EGC の H-2' (H-6')、β-CD の 5-H と EGC の H-6 (H-8) との 2 種のクロス

ピークが観測された。すなわち、EGC は溶液 pH に関わらず、EGC の A 環が  $\beta$ -CD の一級水酸基側付近の空洞内に位置し、EGC の B 環が  $\beta$ -CD の二級水酸基側の空洞内に位置した Fig. 64 (a) のような包接複合体が示唆された。

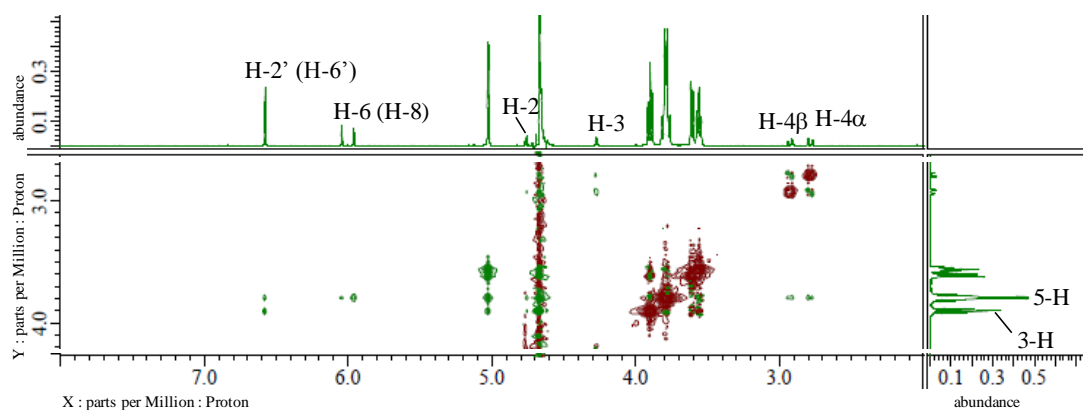
pH3.0 HCl 溶液および pH8.5 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中での EGCg+ $\beta$ -CD ROESY スペクトルを Fig. 63 に示した。pH3.0 HCl 溶液中では、 $\beta$ -CD の 3-H と EGCg の H-3、H-4 $\alpha$ 、H-6 (H-8)、H-2' (H-6')、および H-2'' (H-6'')、 $\beta$ -CD の 5-H と EGCg の H-4 $\alpha$ 、H-4 $\beta$  および H-6 (H-8) とのクロスピークが観測された (Fig.63 (a))。pH8.5 NaHCO<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.63 (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察されたことは、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. 64 (b) のような包接複合体構造が明らかになった。 $\beta$ -CD の 3-H と EGCg のガロイル基の H-2'' (H-6'') とのクロスピークは pH3.0 HCl 溶液中のみであることは、分子型 EGCg では、ガロイル基が  $\beta$ -CD の二級水酸基側付近の空洞内に位置する Fig. 64 (c) のような包接複合体が示唆された。pH8.5 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中では、 $\beta$ -CD の 3-H と EGCg のガロイル基の H-2'' (H-6'') とのクロスピークが観察されなかった。つまり、分子型 EGCg は A 環とガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内に包接される 2 種の複合体を、イオン型 EGCg は A 環のみが  $\beta$ -CD 空洞内に包接される 1 種の複合体を形成することが明らかとなった。



(a) pH3.0 HCl



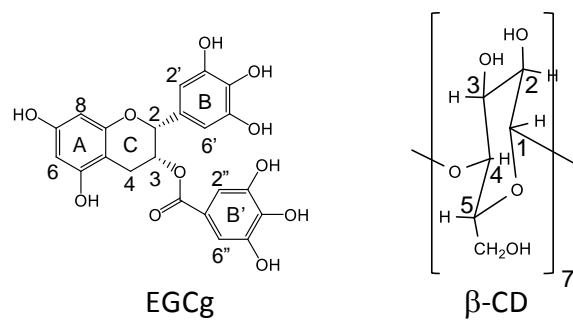
(b) pH8.5 NaHCO<sub>3</sub>



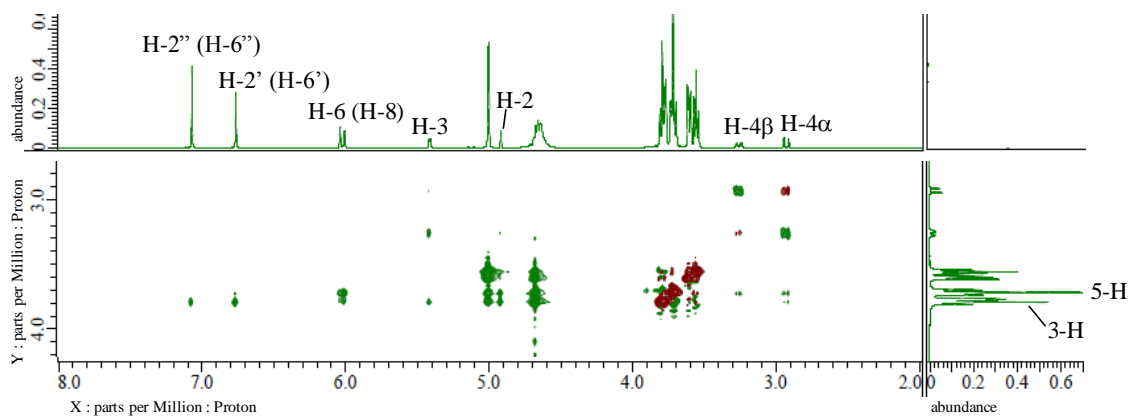
**Fig. 62** EGC+ $\beta$ -CD の ROESY スペクトル (308 K)

X 軸は 2.0 ~ 8.0 ppm、Y 軸は 2.7 ~ 4.2 ppm の範囲を示し、X 軸は EGC、Y 軸は  $\beta$ -CD についての  $^1\text{H}$  の化学シフトの帰属を示した。EGC および  $\beta$ -CD の構造を上部に記した。(a) は pH3.0 HCl 溶液、(b) は pH8.5 NaHCO<sub>3</sub> 溶液を用いた。

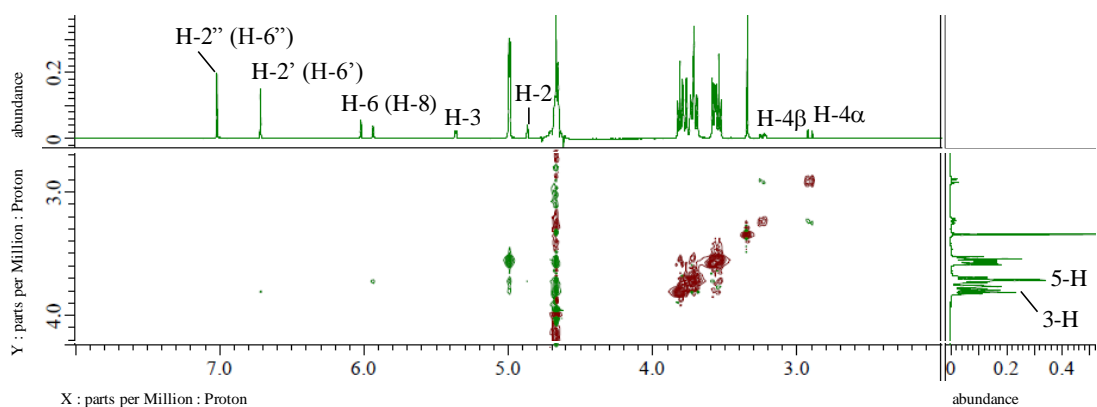




(a) pH3.0 HCl

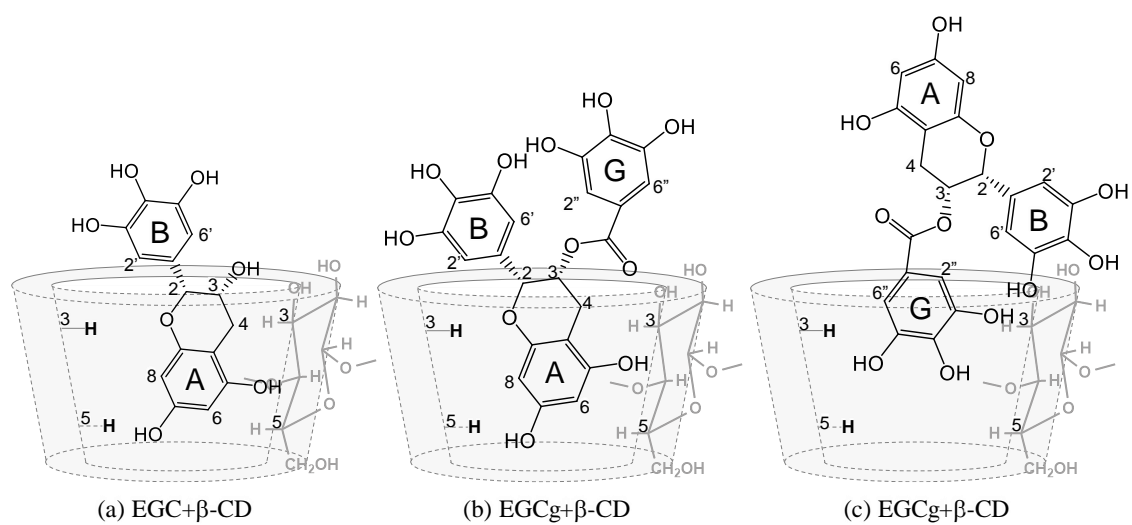


(b) pH8.5 NaHCO<sub>3</sub>



**Fig. 63** EGCg+β-CD の ROESY スペクトル (308 K)

X 軸は 2.0 ~ 8.0 ppm、Y 軸は 2.7 ~ 4.2 ppm の範囲を示し、X 軸は EGCg、Y 軸は β-CD についての <sup>1</sup>H の化学シフトの帰属を示した。EGCg および β-CD の構造を上部に記した。(a) は pH3.0 HCl 溶液、(b) は pH8.5 NaHCO<sub>3</sub> 溶液を用いた。



**Fig. 64**  $^1\text{H-NMR}$  から推定された EGC および EGCg と  $\beta\text{-CD}$  との包接複合体推定構造

ドーナツ型のイラストは  $\beta\text{-CD}$  を表し、空洞内に位置する 3-H および 5-H の位置を示した。

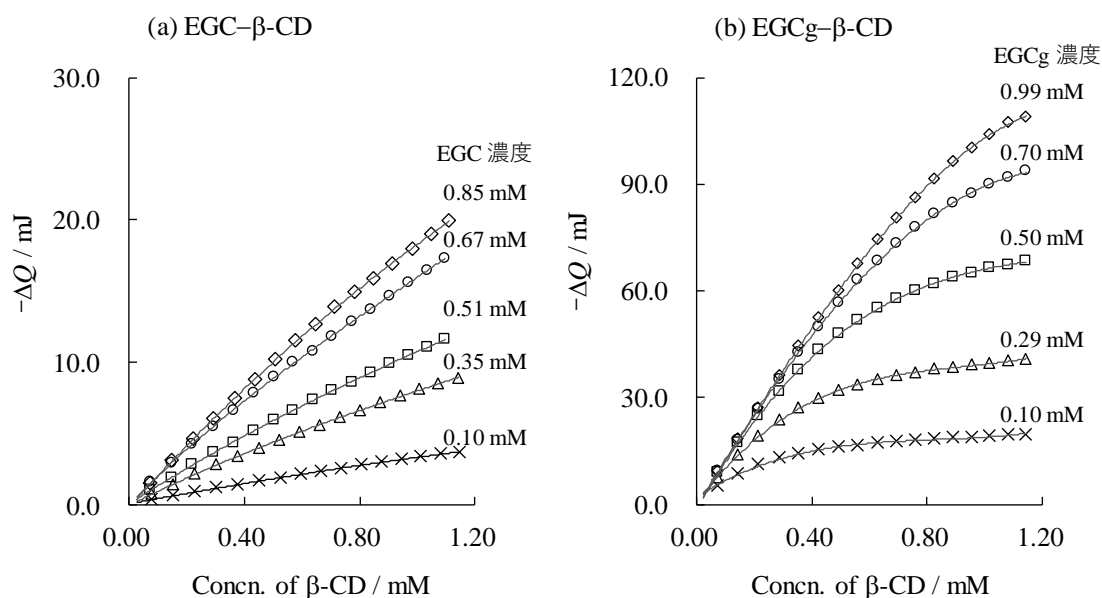
## 第 2 節 等温滴定マイクロ熱量測定

カテキンのガロイル基の有無による  $\beta$ -CD との複合体形成における化学量論比、複合体形成定数および熱力学的パラメータを得るために、ITC を用いて反応熱量を測定した。熱量測定とは、物質の物理的または化学的状態変化に伴う熱の発生または吸収について、状態変化に伴う熱エネルギーの変化を定量的に解析できる。ITC は混合、沈殿、錯体生成、酵素基質結合などの反応を試料の状態によらず、熱量変化を試料濃度の独立変数として測定できるため、化学量論比、複合体形成定数、反応エンタルピーを直接決定できる方法として極めて広い応用面をもつ[82]。

はじめに、カテキンのガロイル基の有無による  $\beta$ -CD との複合体形成を比較するため、EGC と EGCg の濃度を 0.1 mM から 0.9 mM に変化させ、 $\beta$ -CD との反応熱量を 298.15 K、水溶液中で測定した。Fig. 65 は EGC と EGCg の濃度を一定にして、15 mM の  $\beta$ -CD で滴定した場合の反応熱量 ( $\Delta Q$ /mJ) を示した。滴定熱量は(4) 式で解析し、化学量論比 ( $n$ )、複合体形成定数 ( $K$ ) およびエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) を算出し、Table 4 にまとめた。

EGC と  $\beta$ -CD との複合体形成 (EGC- $\beta$ -CD) は発熱反応 ( $\Delta H < 0$ ) であり、反応熱量 (Fig. 65 (a)) は EGC 濃度の増加に伴い増大した。しかし、Table 4 に示すように算出された各パラメータ ( $n$ 、 $K$  および  $\Delta H$ ) は EGC 濃度に関わらず一定であった ( $n = 1.08 \pm 0.02$ 、 $K = 0.341 \pm 0.018 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、および  $\Delta H = 29.8 \pm 0.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ )。EGCg と  $\beta$ -CD との複合体形成 (EGCg- $\beta$ -CD) についても EGC- $\beta$ -CD と同様に発熱反応 ( $\Delta H < 0$ ) であり、算出された各パラメータ ( $n$ 、 $K$  および  $\Delta H$ ) は EGCg 濃度に関わらず、一定であった ( $n = 1.03 \pm 0.01$ 、 $K = 7.26 \pm 0.13 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、および  $\Delta H = 53.2 \pm 1.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ )。

EGC- $\beta$ -CD および EGCg- $\beta$ -CD の熱量解析結果から、EGC および EGCg は  $n = 1.0$ 、すなわちモル比 1:1 で複合体を形成することが明らかになった。EGCg の  $\Delta Q$  は同濃度の EGC の約 4.6~5.9 倍、 $\Delta H$  値は約 1.6~1.9 倍、 $K$  値は EGCg の方が EGC より約 16.8~25.0 倍大きく、ガロイル基を有する EGCg の方が、EGC に比べて  $\beta$ -CD との反応性が高いことが判明した。



**Fig. 65** EGC- $\beta$ -CD (a) および EGCg- $\beta$ -CD (b) の反応熱量 (298.15 K)

各シンボルは反応熱量、実線は(4)式で解析したベストフィットカーブを表している。

**Table. 4** EGC- $\beta$ -CD および EGCg- $\beta$ -CD の熱量解析で得られた化学量論比 ( $n$ )、複合体形成定数( $K$ ) およびエンタルピー変化( $\Delta H$ ) (298.15 K)

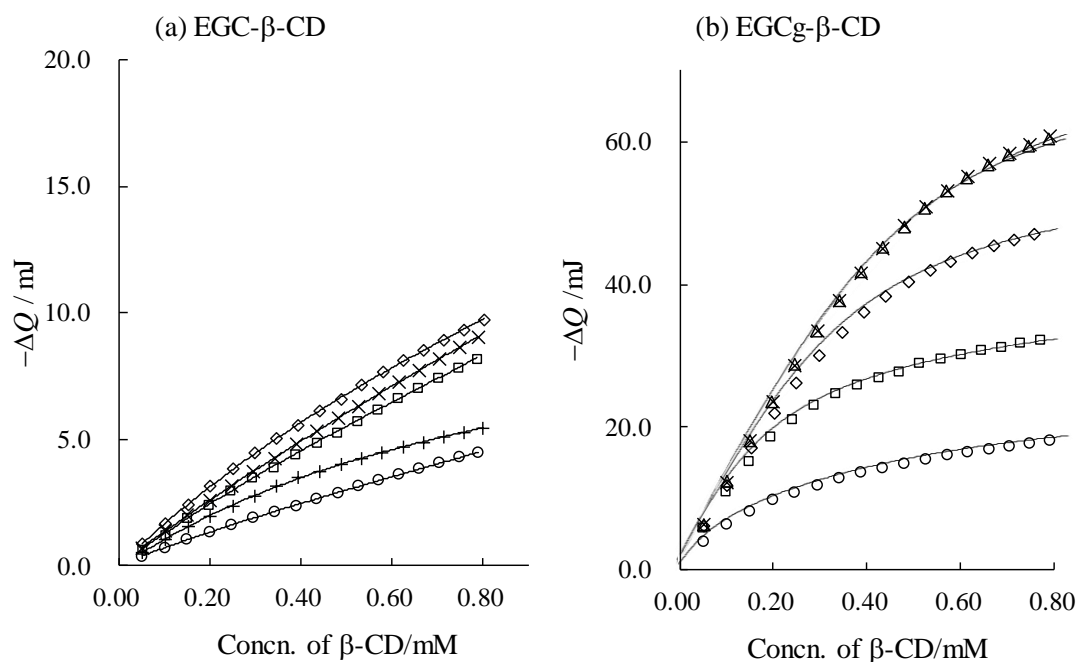
Catechin	Concentration / mM	$n_1$	$K_1 / 10^3 \text{ M}^{-1}$	$-\Delta H_1 / \text{kJ mol}^{-1}$
EGC	0.10	0.99	0.423	29.6
	0.35	1.12	0.289	30.0
	0.51	1.03	0.327	28.4
	0.67	1.15	0.356	29.7
	0.85	1.11	0.309	31.3
		$1.08 \pm 0.02$	$0.341 \pm 0.018$	$29.8 \pm 0.8$
EGCg	0.10	1.06	7.09	54.9
	0.29	0.99	7.00	54.1
	0.50	1.01	7.16	53.9
	0.70	1.06	7.34	54.2
	0.99	1.01	7.71	49.1
		$1.03 \pm 0.01$	$7.26 \pm 0.13$	$53.2 \pm 1.0$

EGC、EGCg および  $\beta$ -CD をリン酸緩衝液 (pH4.5~8.5) に溶解し、溶液 pH による複合体形成の各パラメータへの影響を検討した。pH4.5 から pH8.5 のリン酸緩衝液を用いて 0.5 mM の EGC および EGCg を初濃度 10 mM  $\beta$ -CD で滴定し、Fig. 66 に反応熱量を示した。

EGC- $\beta$ -CD 複合体形成について、第 2 章第 1 節の NMR 測定より pH 変化による複合体形成に影響が見られず、反応熱量を 1 種の複合体形成を仮定した(4)式で解析した (Table 5)。 $n_1 = 0.94 \pm 0.04$  であり EGC は $\beta$ -CD とモル比 1:1 で複合体を形成するが、その反応熱量は EGCg- $\beta$ -CD 複合体形成熱量に比べてはるかに小さかった (Fig. 66 (a))。 $K_1 = 0.304 \pm 0.104 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  は前項の水溶液中における EGC- $\beta$ -CD 複合体形成結果と一致し、その他の熱力学的パラメータは pH に依存せずほぼ一定であった ( $\Delta G_1 = -14.0 \pm 0.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、 $\Delta H_1 = -25.5 \pm 1.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、 $\Delta S_1 = -38.7 \pm 4.7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )。EGC は  $\text{pKa} = 8.6$  であるが、分子型のみが  $\beta$ -CD

と包接複合体を形成する。これらの結果は、酸性から弱塩基性領域においては、 $^1\text{H-NMR}$  測定結果を加味すると、A 環が  $\beta\text{-CD}$  空洞内に包接されたただ 1 種類の包接複合体の形成することが判明した。

EGCg- $\beta\text{-CD}$  複合体形成における反応熱量は、pH4.5 のとき最大となり、pH の上昇に伴い反応熱量は減少した (Fig. 66 (b))。第 2 章第 1 節の NMR 測定より、EGCg- $\beta\text{-CD}$  は  $\text{pH} < \text{pKa}$  において 2 種類の複合体を形成する可能性があるため、反応熱量を二種の複合体形成を仮定した(6) 式で解析し、 $K$  の大きい順 ( $K_1 > K_2$ ) に第 1 複合体および第 2 複合体と命名した。反応熱量を解析する際、第 1 複合体がモル比 1:1 で形成すると仮定 ( $n_1 = 1.00$ ) し、その他のパラメータ ( $K_1$ 、



**Fig. 66** 各種 pH における EGC または EGCg と  $\beta\text{-CD}$  との反応熱量および熱量滴定曲線 (298.15 K)

それぞれのマーカーは以下の溶液での反応熱量を示す。×: pH4.5, Δ: pH6.0, ◇: pH7.0, □: pH7.5, +: pH8.0, ○: pH8.5。実線は(6) 式または(4) 式で解析したベストフィットカーブを表している。EGC および EGCg の濃度は 0.5 mM、 $\beta\text{-CD}$  の初期濃度は 10 mM を用いた。

$K_2$ 、 $\Delta H_1$ 、 $\Delta H_2$  および  $n_2$  ) を算出し、Table 5 に示した。Fig. 66 の実線は、算出パラメータにより計算されたベストフィットカーブである。 $n_1 = 1.00$  のとき、 $K_1$  および  $\Delta H_1$  は pH に関係なくほぼ一定となった ( $K_1 = 7.43 \pm 1.68 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、 $\Delta H_1 = -47.2 \pm 4.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  および  $\Delta S_1 = -84.6 \pm 14.8 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )。  $\Delta H_1$  および  $\Delta S_1$  が負に大きい値を示し、第 1 複合体形成は主として水素結合が関与していることが反映されている。 $n_2$  値は pH4.5 のとき  $n_2 = 1.00$  であるが、pH の上昇に伴い減少し、pH8.0 では  $n_2 = 0.25$ 、pH8.5 では  $n_2 = 0.30$  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 pH8.0 および pH8.5 においては、これらの減少は顕著であった。すなわち、塩基性溶液中では、第 2 複合体はほとんど形成されないと考えても良い。

EGCg は水溶液中で、 $\beta$ -CD 空洞内に包接される 3 種の被包接部位 (A 環、B 環およびガロイル基) を有し、ガロイル基の 4'' 位の水酸基がイオン化され、その割合は pH4.5 で 0.10%、pH6.0 で 2.9%、pH7.5 で 50%、pH8.0 で 76%、pH8.5 で 91%と、pH 上昇に伴い増加すると考えれば、第 1 複合体の種々パラメータは pH 変化に関わらずほぼ一定値であったため、第 1 複合体はイオン化に関係しない A 環または B 環が包接された構造であることが推定される。  $\text{pH} \leq \text{pKa}$  では複合体形成定数は一定であったが、pH8.0 および pH8.5 についての再解析の結果における  $n_1$  値、 $K_1$  値はそれぞれ減少 ( $n_1 = 0.80 \pm 0.0$ 、 $K_1 = 2.12 \pm 0.47 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) した。これは、pH の上昇に伴い EGCg のイオン型分率の増加することで、 $\beta$ -CD との 1:1 の複合体の割合がかなり減少したためであると考えられる。一方、第 2 複合体は pH の上昇に伴い、 $n_2$  値は 1.0 から 0.5 に、 $K_2$  値は  $3.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  から  $0.18 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  に、 $-\Delta H_2$  値は  $60 \text{ kJ mol}^{-1}$  から  $19 \text{ kJ mol}^{-1}$  に減少した。 $\beta$ -CD の空洞内は疎水性であるため、ゲスト分子はイオン型よりも分子型の方が、 $\beta$ -CD の疎水性空洞内に包接されやすい[39]。そのため、第 2 複合体はガロイル基が

$\beta$ -CD 空洞内に包接された包接複合体であり、pH の上昇に伴い  $\beta$ -CD との 1:1 の複合体の形成が難しくなったと考えられる。 $^1\text{H-NMR}$  測定結果で得られた包接複合体構造を考慮すると、第 1 複合体は pH 変化に依存しない A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接され、B 環が  $\beta$ -CD の二級水酸基側に位置した包接複合体であり、第 2 複合体は EGCg のガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された包接複合体であるといえる。

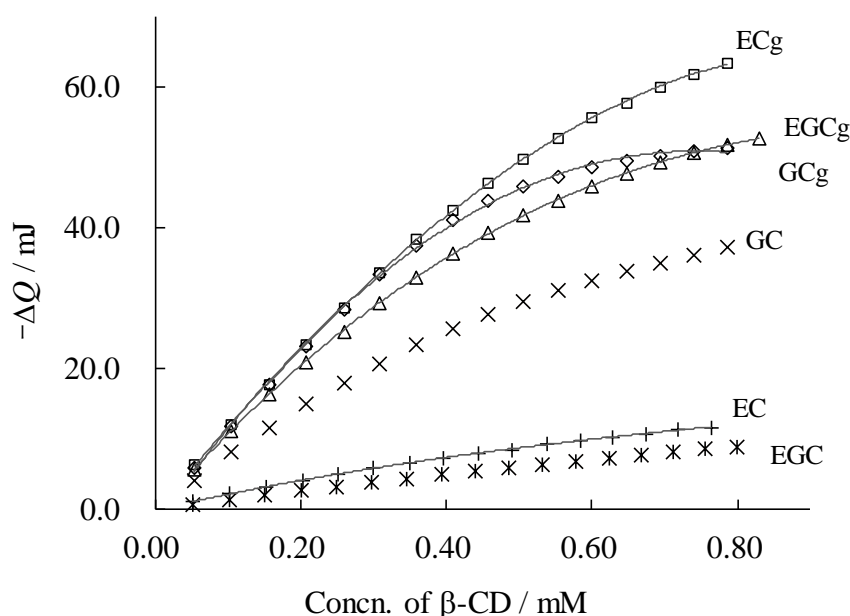


**Table 5** 各種 pH における EGC または EGCg と  $\beta$ -CD との化学量論比 ( $n_1, n_2$ )、複合体形成定数 ( $K_1, K_2$ ) および熱力学的パラメータ ( $\Delta G_1, \Delta G_2, \Delta H_1, \Delta H_2, \Delta S_1$  および  $\Delta S_2$ ) (298.15 K)

Catechin	pH	Initial Concn. Initial Concn.		$n_1$	$K_1$ / $10^3 \text{ M}^{-1}$	$-\Delta G_1$ / $\text{kJ mol}^{-1}$	$-\Delta H_1$ / $\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_1$ / $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	$n_2$	$K_2$ / $10^3 \text{ M}^{-1}$	$-\Delta G_2$ / $\text{kJ mol}^{-1}$	$-\Delta H_2$ / $\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S_2$ / $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
		of Catechin / $\text{mM}$	of $\beta$ -CD / $\text{mM}$										
EGC	4.6	0.53	10.4	1.00	0.341	14.4	28.8	-48.0					
	5.3	0.54	10.5	0.95	0.243	13.6	24.0	-34.7					
	6.0	0.51	9.40	0.98	0.408	14.9	25.8	-36.7					
	6.5	0.54	9.43	0.94	0.310	14.2	26.8	-42.1					
	7.0	0.54	9.20	0.91	0.444	15.1	26.0	-36.6					
	8.2	0.51	9.00	0.89	0.238	13.6	24.4	-36.4					
	8.5	0.56	10.5	0.93	0.146	12.4	3.1	-36.1					
EGCg	4.5	0.51	9.70	0.95	5.04	21.1	44.3	-77.8	1.00	3.25	20.0	59.8	-134
	5.3	0.54	10.5	1.00	6.47	21.7	48.4	-89.5	0.90	1.64	18.3	42.3	-80.6
	6.0	0.57	9.40	1.00	7.12	22.0	45.1	-77.7	0.78	1.22	17.6	39.5	-73.4
	6.5	0.53	10.1	1.00	5.02	21.1	42.3	-71.2	0.65	0.599	15.8	28.1	-41.2
	7.0	0.59	10.3	1.00	9.45	22.7	44.2	-72.1	0.60	0.292	14.1	24.1	-33.8
	7.5	0.57	10.1	1.00	8.21	22.3	43.7	-71.5	0.48	0.180	12.9	19.1	-20.7
	8.0	0.56	10.1	1.00	8.80	22.5	55.2	-110	0.25	0.043	9.3	5.8	11.8
	8.5	0.53	10.1	1.00	9.32	22.6	54.6	-107	0.30	0.050	9.7	7.7	6.5

カテキンを茶葉から抽出する場合、一般的に水道水や天然水などが使用される。茶葉に含まれる EGC、EGCg、EC、ECg、および加熱により生成する GC および GCg の 6 種のカテキンと  $\beta$ -CD との水溶液中複合体形成における熱力学的パラメータを算出した。

Fig. 67 にはそれぞれの反応熱量を示した。総じて、ガレート型カテキン (EGCg、ECg および GCg) は非ガレート型カテキン (EGC、EC および GC) より非常に高い反応熱をもち、B 環がカテコール基 (ECg および EC) の方がピロガロール基 (EGCg、EGC、GCg および GC) より、反応熱がわずかに高いという傾向を示した。ガロイル基を有さないカテキンのうち、GC は EGC や EC に比べて反応熱量が高かった。ガロイル基を有する EGCg、ECg および GCg の反応熱量は  $\beta$ -CD 濃度の増加に伴い増大したが、GCg の反応熱量はプラトー値を示した。



**Fig. 67** カテキンと  $\beta$ -CD との水溶液中における反応熱量および熱量滴定曲線 (298.15 K)

実線は Table 6 のパラメータを用いたベストフィットカーブを表している。カテキンの初濃度は約 0.5 mM であり、 $\beta$ -CD の初濃度は約 10 mM を用いた。

反応熱量の小さい EGC および EC は、反応熱量を 1 種の複合体形成を仮定した(4) 式で解析し、反応熱量の大きいガレート型カテキン (EGCg、ECg および GCg) および GC は二種の複合体形成を仮定した(6) 式で解析し、 $K$  の大きい順 ( $K_1 > K_2$ ) に第 1 複合体および第 2 複合体と命名し、解析結果をまとめて Table 6 に示した。

EGC および EC について、 $n_1$  値は約 1 であり、 $\beta$ -CD とモル比 1:1 で複合体を形成した。EGC- $\beta$ -CD の  $K_1$  値および他の熱力学的パラメータは、前項の各 pH における EGC- $\beta$ -CD 複合体形成結果の平均値とほぼ同様の値を示し、EC- $\beta$ -CD の  $-\Delta H_1$  値は  $5.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、 $-\Delta S_1$  値は  $19.1 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  増加した。

GC について、 $K_1$  および  $K_2$  値はそれぞれ  $5.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、 $0.88 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、 $\Delta H_1$  および  $\Delta H_2$  値はそれぞれ  $-46.5$ 、 $-16.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  であり、第 2 複合体の  $K_2$  および  $\Delta H_2$  は第 1 複合体に比較して非常に小さく、複合体形成においてはほとんど無視できると考えられる。そこで、GC について(4) 式で再計算したとき、 $n_1 = 0.96$ 、 $K_1 = 4.42 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、 $\Delta H_1 = -37.0 \text{ kJ mol}^{-1}$   $\Delta S_1 = -54.4 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  が得られた。

EGCg、ECg および GCg について、 $n_1$  および  $n_2$  値はともに 0.8~1.0 であり、水溶液中で  $\beta$ -CD とモル比 1:1 の 2 種類の複合体を形成した。EGCg- $\beta$ -CD の  $K_1$  値、 $K_2$  値および他の熱力学的パラメータは、前項の pH6.0 における EGCg- $\beta$ -CD 複合体形成結果と一致した。ECg- $\beta$ -CD の  $K_1$  および  $K_2$  値はほぼ同様であり、 $\Delta H_1$ 、 $\Delta H_2$ 、 $\Delta S_1$  および  $\Delta S_2$  値もまた同様の値を示した。GCg- $\beta$ -CD の  $K_1$  値は  $K_2$  値に比べて約 3 倍大きく、 $-\Delta H_1$  および  $-\Delta S_1$  値は  $-\Delta H_2$  および  $-\Delta S_2$  値に比べて大きく、第 1 複合体は特に  $\beta$ -CD との反応性が高いことが判明した。

水溶液中における EGC- $\beta$ -CD の熱量解析結果から、EGC の A 環は  $\beta$ -CD 空洞内に包接され、B 環は空洞外に位置した複合体構造であると考えられる。

EC は EGC と同様に 2,3-シス型カテキンであるため、EC- $\beta$ -CD の複合体構造が EGC- $\beta$ -CD と同様であれば、B 環水酸基数の差は各種熱力学的パラメータにほとんど影響を与えないはずである。しかし、EC は EGC に比べて  $\beta$ -CD との反応熱量は大きく、 $-\Delta H_1$  値および $-\Delta S_1$  値もまた若干増加したため、EC は EGC とは異なる包接モード、すなわち B 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された構造であると考えられる。

EGC の立体異性体である GC について、GC- $\beta$ -CD の反応熱量は EGC- $\beta$ -CD の約 4 倍、 $K_1$  値は約 11 倍大きく、GC は EGC に比べて  $\beta$ -CD との反応性が非常に高いことが判明した。また、 $-\Delta H_1$  および $-\Delta S_1$  値は大きく、第 1 複合体形成は主として水素結合が関与していることが反映されている。すなわち、C 環に対して 2 位の B 環と 3 位の水酸基がトランス位に位置することで、 $\beta$ -CD と複合体を形成しやすくなり、また複数の水素結合により複合体は安定したと考えられる。特に、B 環はピロガロール基であるため、EGC と同様に A 環が $\beta$ -CD 空洞内に包接された複合体構造が推定された。

水溶液中における EGCg- $\beta$ -CD の熱量解析結果から、第 1 複合体は A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接され、第 2 複合体は EGCg のガロイル基が包接された包接複合体であると考えられる。

ECg について、ECg- $\beta$ -CD の反応熱量は EGCg- $\beta$ -CD より大きく、第 1 複合体もしくは第 2 複合体は EGCg と異なる包接モードである可能性がある。ECg- $\beta$ -CD の第 1 複合体形成における種々パラメータは EGCg- $\beta$ -CD と同様であったが、第 2 複合体の種々パラメータは大きく異なった。すなわち、第 1 複合体は EGCg と同様に A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された構造であり、第 2 複合体は ECg のガロイル基ではなく、B 環が空洞内に包接された構造であることが推定された。

GCg について、GCg- $\beta$ -CD の反応熱量は EGCg- $\beta$ -CD とほぼ同様であったがプラトー値を有するため、GCg は EGCg に比べて  $\beta$ -CD との反応性が非常に高い。GCg- $\beta$ -CD の各種熱力学的パラメータについて、第 1 複合体の  $K_1$  値は第 2 複合体の  $K_2$  値に比べて約 3.7 倍大きく、 $-\Delta H_1$  値および  $-\Delta S_1$  値は  $-\Delta H_2$  値および  $-\Delta S_2$  値に比べてそれぞれ  $8.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、 $19.7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  増加したため、第 1 複合体は第 2 複合体に比べて  $\beta$ -CD と反応性が非常に高く、より包接複合体を形成しやすいことが推定された。GCg は C 環に対して B 環とガロイル基はトランス位に位置することで、B 環とガロイル基との立体障害が減少し、A 環、B 環およびガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内に包接される可能性が高い。しかし、GCg は EGCg と立体構造が異なり、また各種熱力学的パラメータも異なるため、第 1 複合体および第 2 複合体の複合体構造を推定することは困難である。

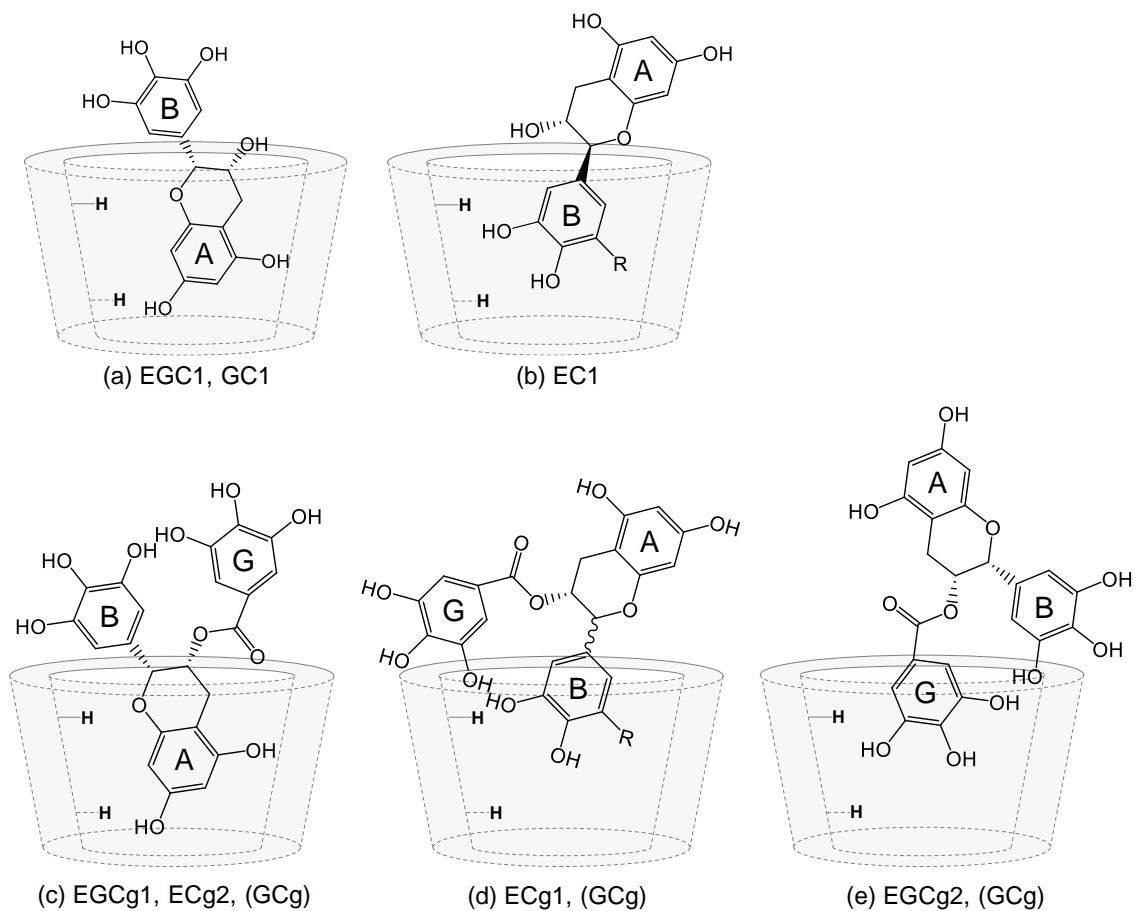
**Table 6** カテキンと  $\beta$ -CD との水溶液中における化学量論比 ( $n_1, n_2$ )、複合体形成定数 ( $K_1, K_2$ ) および熱力学的パラメータ ( $\Delta G_1, \Delta G_2, \Delta H_1, \Delta H_2, \Delta S_1$  および  $\Delta S_2$ ) (298.15 K)

Catechins	$n_1$	$K_1$ / $10^3 \text{ M}^{-1}$	$-\Delta G_1$ /kJ mol $^{-1}$	$-\Delta H_1$ /kJ mol $^{-1}$	$\Delta S_1$ /J mol $^{-1} \text{ K}^{-1}$	$n_2$	$K_2$ / $10^3 \text{ M}^{-1}$	$-\Delta G_2$ /kJ mol $^{-1}$	$-\Delta H_2$ /kJ mol $^{-1}$	$\Delta S_2$ /J mol $^{-1} \text{ K}^{-1}$
EGC	0.98	0.413	14.9	24.4	-31.9					
EC	0.95	0.391	14.8	28.7	-46.7					
GC	1.10	4.42	20.8	37.0	-54.4					
EGCg	1.02	6.27	21.7	49.7	-94.1	0.95	1.18	17.5	41.0	-78.9
ECg	1.10	7.01	21.9	44.7	-76.4	0.95	6.28	21.7	48.1	-88.7
GCg	1.02	18.5	24.3	41.5	-57.8	0.85	6.58	21.8	33.1	-38.1

### 第 3 節 小括

EGC は溶液 pH によらず 1 種類の包接複合体を形成した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトル結果から推定される複合体構造を Fig. 68 (a) に示した。EGC と  $\beta$ -CD の第 1 複合体は溶液 pH に依存せず熱力学的パラメータは一定値であったため、A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された複合体構造が推定された。EGCg は酸性および中性溶液中において、 $\beta$ -CD と 2 種類の複合体を形成し、塩基性溶液中では 1 種類の複合体を形成した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトル結果から推定されるこれらの複合体構造を Fig. 68 (c) および(e) に示した。EGCg と  $\beta$ -CD の第 1 複合体は溶液 pH に依存せず熱力学的パラメータは一定値であったため、A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された複合体構造であり、第 2 複合体はガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された複合体構造が推定された。

EC、ECg、GC および GCg は、水溶液中の ITC 測定により各種熱力学的パラメータを算出することで、複合体構造を推定した。B 環がカテコール基である EC や ECg は水酸基の減少により B 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接されやすくなり、EC では B 環 (Fig. 68 (b)) が、ECg では A 環 (Fig. 68 (c)) および B 環 (Fig. 68 (d)) が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された複合体構造が推定された。C 環に対して B 環と水酸基またはガロイル基がトランス位に位置する GC および GCg の構造は、より  $\beta$ -CD と複合体を形成しやすくなり、GC では A 環 (Fig. 68 (a)) が包接された複合体構造が推定された。一方、GCg は Fig. 68 (c)、(d) および(e) に示す A 環、B 環およびガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された複合体構造が推定されるが、第 1 複合体および第 2 複体の複合体構造を推定することは困難であった。



**Fig. 68** カテキンと  $\beta$ -CD との複合体推定構造

EGC- $\beta$ -CD、EC- $\beta$ -CD、GC- $\beta$ -CD、EGCg- $\beta$ -CD および ECg- $\beta$ -CD の第 1 複合体をそれぞれ EGC1、EC1、GC1、EGCg1 および ECg1 とし、EGCg- $\beta$ -CD および ECg- $\beta$ -CD の第 1 複合体を EGCg2 および ECg2 とした。

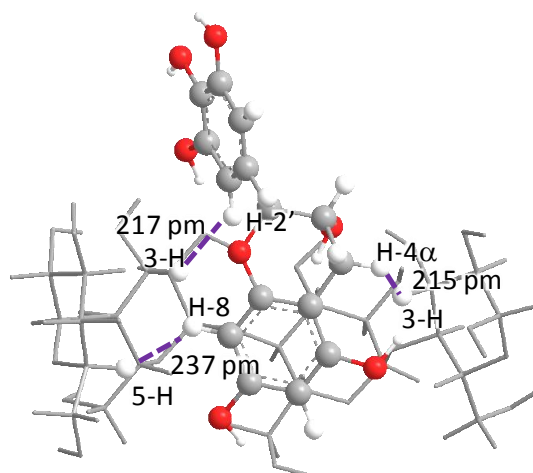


### 第 3 章 包接複合体の安定化に寄与する分子間水素結合

水溶液中でのカテキンと  $\beta$ -CD との包接複合体形成機構をより一層明確にするためには、第 1 章で得られたカテキンと  $\beta$ -CD との種々の包接モードを別途の方法で検証することが必要であり、NMR スペクトル測定および ITC での吟味は非常に有用である。

はじめに、EGC と  $\beta$ -CD との複合体について、第 1 章第 1 節第 1 項の DFT 法を用いて得られた水相中での最適化構造 (Fig. 19 ②) の EGC と  $\beta$ -CD との各水素原子間距離を測定し、第 2 章第 1 節における  $D_2O$  中で EGC と  $\beta$ -CD の ROESY スペクトル (Fig. 60) との検証を行った。

② の最適化構造について、 $\beta$ -CD 空洞内に位置する 3-H および 5-H と、これらの水素原子に接近した EGC の各水素原子との距離を測定し、測定結果を Fig 69 に示した。 $\beta$ -CD の 3-H に対して、EGC の H-4 $\alpha$  および H-2'、 $\beta$ -CD の 5-H に対して EGC の H-8 が接近しており、二つの水素原子間距離は全て 250 pm 以下であった。一方、Fig. 60 の  $D_2O$  中での EGC と  $\beta$ -CD との ROESY スペクトルは、 $\beta$ -CD の 3-H と EGC の H-2' (H-6') の NOE 強度、および  $\beta$ -CD の 5-H と EGC の H-6 (H-8) との間の NOE 強度が大きく現れた。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。② の最適化構造は  $\beta$ -CD 空洞内の一級水酸基付近 (5-H) に EGC の A 環 (H-8) が位置し、さらに  $\beta$ -CD 空洞内の二級水酸基付近 (3-H) に EGC の B 環 (H-2') が位置した最適化構造であり、ROESY スペクトル結果と一致した。よって、② の最適化構造が、 $D_2O$  中で形成されることが検証された。



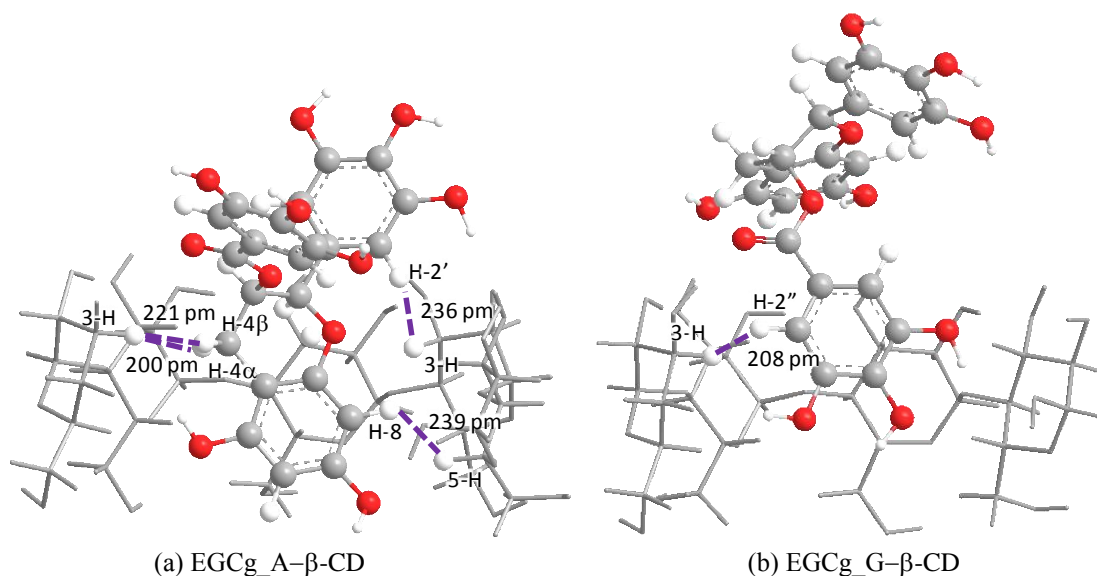
**Fig. 69** EGC\_A-β-CD の② における水素原子間距離

EGC はボール&スティックモデルで表し、β-CD はステックモデルで表した。β-CD の一部は表示していない。β-CD の 3-H および 5-H に最接近した EGC の各水素原子の二原子間を紫色破線で示し、構造中に各原子番号および原子間距離を記した。

次に、EGCg と β-CD との複合体について、第 1 章第 1 節第 2 項の DFT 法を用いて得られた水相中での 2 種の最適化構造 (Fig. 25 ⑩ および Fig. 27 ⑪) の EGCg と β-CD との各プロトン間距離を測定し、第 2 章第 1 節における D<sub>2</sub>O 中での EGCg と β-CD の ROESY スペクトル (Fig. 61) との検証を行った。

⑩ および⑪ の最適化構造について、β-CD 空洞内に位置する 3-H および 5-H と、これらの水素原子に接近した EGCg の各水素原子との距離を測定し、測定結果を Fig 70 に示した。⑩ は β-CD の 3-H に対して、EGCg の H-4α、H-4β および H-2' が接近し、β-CD の 5-H に対して EGCg の H-2' が接近しており、二つの水素原子間距離は全て 250 pm 以下であった。(Fig. 70 (a))。また、⑪ では、β-CD の 3-H と EGCg の H-2'' のみが 250 pm 以下であった (Fig. 70 (b))。一方、Fig. 61 の D<sub>2</sub>O 中での EGCg と β-CD との ROESY スペクトルは、β-CD の 3-H と EGCg の H-6 (H-8)、H-2' (H-6') および H-2'' (H-6'')、β-CD の 5-H と

EGCg の H-6 (H-8) との NOE 強度が大きく現れた。このとき、⑩ の最適化構造だけでは、 $\beta$ -CD の 3-H と EGCg の H-2'' (H-6'') の ROESY スペクトルが一致しない。⑩ の最適化構造は  $\beta$ -CD の二級水酸基側空洞内に EGCg のガロイル基が位置するため、上述のクロスピークが観測されるはずである。すなわち、EGCg\_A- $\beta$ -CD および EGCg\_G- $\beta$ -CD の 2 種の包接モードが、D<sub>2</sub>O 中で同時に形成されたことが検証された。さらに、EGCg のガロイル基のイオン化によりガロイル基は  $\beta$ -CD 空洞内に包接されなかった第 1 章第 1 節第 5 項の計算結果は、pH8.5 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中での EGCg と  $\beta$ -CD の ROESY スペクトル測定結果、すなわち  $\beta$ -CD の 3-H と EGCg のガロイル基の H-2'' (H-6'') とのクロスピークが観測されなかった結果を裏付けるものとなった。



**Fig. 70** EGCg\_A- $\beta$ -CD および EGCg\_G- $\beta$ -CD の最安定構造における水素原子間距離

EGCg はボール&スティックモデルで表し、 $\beta$ -CD はスティックモデルで表した。 $\beta$ -CD の一部は表示していない。 $\beta$ -CD の 3-H および 5-H に最接近した EGCg の各水素原子の二原子間を紫色破線で示し、構造中に各原子番号および原子間距離を記した。

次に、第 1 章で得られた 6 種のカテキンと  $\beta$ -CD との種々の包接モードについて、ITC による各種熱力学的パラメータとの検証を行った。

EGC- $\beta$ -CD について、第 1 章第 1 節第 1 項における DFT 法を用いた最適化計算では、EGC\_A- $\beta$ -CD のみが水相中で形成するが、EGC の A 環は  $\beta$ -CD 空洞内を二級水酸基側から一級水酸基側まで揺れ動くことが推定された。このとき、EGC と  $\beta$ -CD との複合体形成における反応熱量は小さく、 $K_1$ 、 $\Delta H_1$  も同様に小さい ITC 結果と一致した。

EGCg- $\beta$ -CD について、第 1 章第 1 節第 2 項より水相中では EGCg の A 環およびガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された 2 種の包接モードが推定された。EGCg\_G- $\beta$ -CD のガロイル基は、 $\beta$ -CD 空洞内中央から二級水酸基にかけて揺れ動くが、EGCg\_A- $\beta$ -CD の A 環は  $\beta$ -CD 空洞内深くに位置し、5 か所の分子間水素結合により安定な包接複合体を形成した。このため、 $\Delta E$  値および  $r$  値を考慮し、第 1 複合体を EGCg\_A- $\beta$ -CD、第 2 複合体を EGCg\_G- $\beta$ -CD と仮定したとき、次の ITC 結果と一致した。① 第 1 複合体の各種熱力学的パラメータは pH 変化に非依存적である。② 第 2 複合体の熱力学的パラメータは pH 変化に大きく依存し、分子型の EGCg の場合のみに  $\beta$ -CD と複合体を形成する。③ 水溶液中の EGCg- $\beta$ -CD 複合体形成における第 1 複合体と第 2 複合体の各種熱力学的パラメータを比較したとき、 $K_1$  値は  $K_2$  値の約 5 倍大きく第 1 複合体の方が第 2 複合体に比べて  $\beta$ -CD と包接複合体を形成しやすい。④ 安定な包接複合体である第 1 複合体について、 $\Delta H_1 = -49.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  であり、このすべてのエネルギーが分子間の水素結合によるものと仮定したとき、複合体構造の 1 か所あたりの水素結合エネルギーは約  $-9.9 \text{ kJ mol}^{-1}$  である。フェノール性水酸基と  $\beta$ -CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合一つのエネルギーは  $-8.4 \sim -5.9 \text{ kJ mol}^{-1}$  であると報告されており[41]、前述の水素結合エネルギーの結果と

近似した結果であることから、この複合体の安定化には分子間水素結合が大きく寄与することが明らかとなった。

EC- $\beta$ -CD について、第 1 章第 1 節第 3 項における DFT 法を用いた最適化計算では、EC\_A- $\beta$ -CD および EC\_B- $\beta$ -CD の 2 種の包接モードが推定され、ともに  $\beta$ -CD 空洞内を二級水酸基側から一級水酸基側まで揺れ動くことが推定された。このとき、EC は EGC に比べて  $\beta$ -CD との複合体形成における反応熱量は大きく、 $K_1$ 、 $\Delta H_1$  は EGC と同様に小さい ITC 結果と一致したが、ITC による解析では第 2 複合体の熱力学的パラメータの算出はできなかった。これは、EC の第 2 複合体は第 1 複合体に比べて形成されにくく、反応熱量が非常に小さいためだと考えられる。実際、DFT 法を用いた最適化計算において、EC\_A- $\beta$ -CD と EC\_B- $\beta$ -CD の各最適化構造中の分子間水素結合数を比較したとき、A 環を包接したほうが、同じ位置に B 環を包接した構造に比べ、分子間の水素結合数は多い。EC は A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された複合体構造が第 1 複合体であることが示唆された。

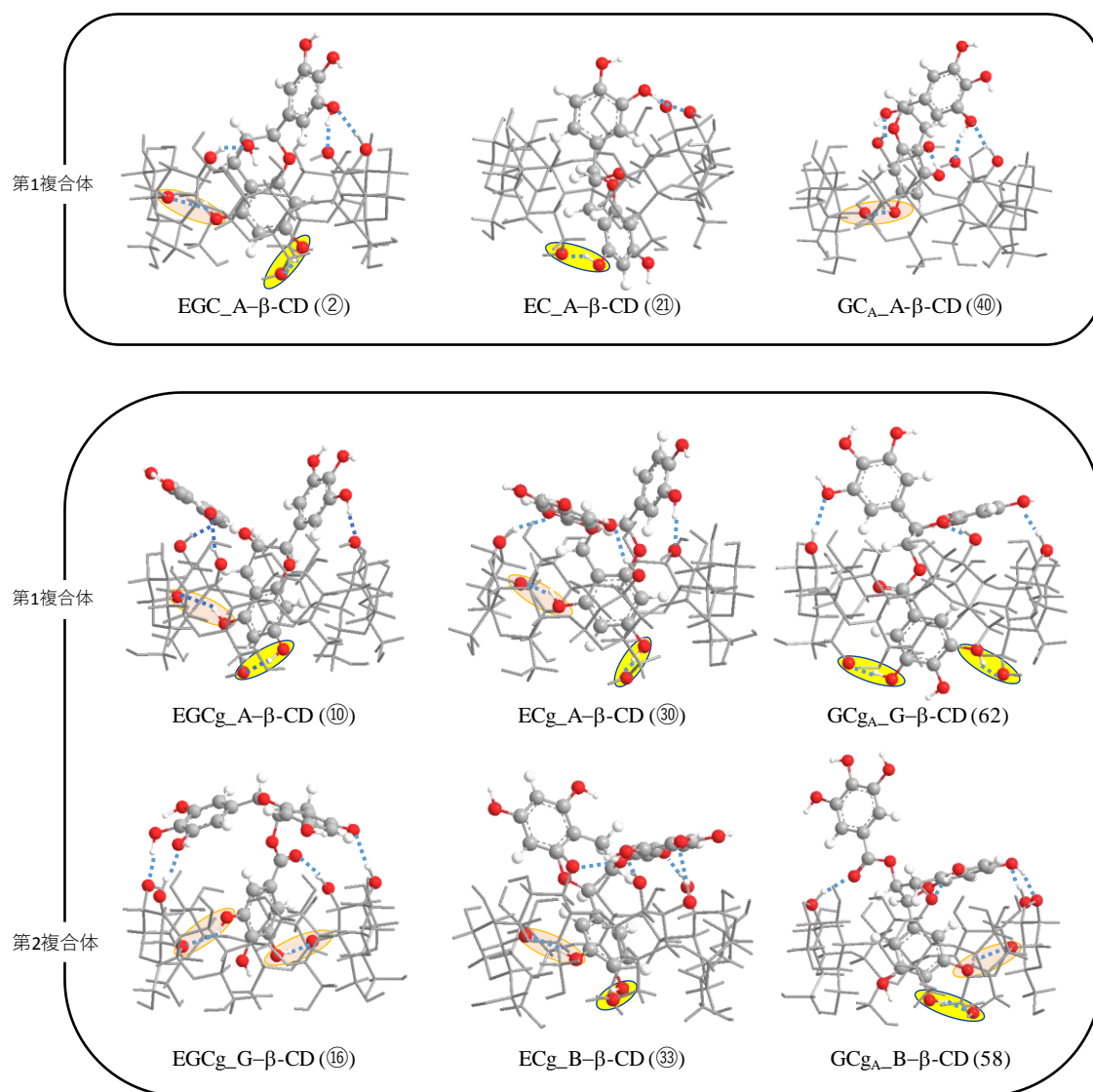
ECg- $\beta$ -CD について、第 1 章第 1 節第 3 項より水相中では EGCg の A 環、B 環およびガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された 3 種の包接モードが推定された。ECg の A 環や B 環は  $\beta$ -CD 空洞内深くに位置し、それぞれ 5 所および 6 か所の分子間水素結合を形成し安定な包接複合体を形成したが、ガロイル基は  $\beta$ -CD 空洞内中央から二級水酸基にかけて揺れ動くことが考えられる。このため、 $\Delta E$  値および  $r$  値を考慮し、第 1 複合体を ECg\_B- $\beta$ -CD、第 2 複合体を ECg\_A- $\beta$ -CD と仮定したとき、次の ITC 結果と一致した。① ECg- $\beta$ -CD の第 1 複合体形成における  $K_1$  値および各種熱力学的パラメータは、EGCg- $\beta$ -CD の第 1 複合体形成における対応するパラメータと同様であった。② ECg- $\beta$ -CD の  $K_1$  値および  $K_2$  値はほぼ同一であり、ともに安定な複合体を形成した。③  $\Delta H_1$

$= -44.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、 $\Delta H_2 = -48.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ であり、このすべてのエネルギーが分子間の水素結合によるものと仮定したとき、複合体構造の 1 か所あたりの水素結合エネルギーは約  $8.9 \text{ kJ mol}^{-1}$  および約  $8.0 \text{ kJ mol}^{-1}$  である。フェノール性水酸基と  $\beta$ -CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合エネルギーの結果とほぼ同様の値であり、この複合体の安定化には分子間水素結合が大きく寄与することが明らかとなった。

GC- $\beta$ -CD について、第 1 章第 1 節第 4 項 DFT 法を用いた最適化計算では、A 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された安定な 1 種の包接モードが推定された。このとき、GC は EGC や EC に比べて  $\beta$ -CD との複合体形成における反応熱量は大きく、 $K_1$  値、 $-\Delta H_1$  も大きい ITC 結果と一致した。

GCg- $\beta$ -CD について、第 1 章第 1 節第 4 項 DFT 法を用いた最適化計算では、B 環およびガロイル基が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された 2 種の包接モードが推定された。GCg<sub>A</sub>- $\beta$ -CD について、B 環は  $\beta$ -CD 空洞内を一級水酸基側から二級水酸基側まで揺れ動くが、GCg<sub>A</sub>-G- $\beta$ -CD について、ガロイル基は  $\beta$ -CD 空洞内深くに位置し、5 箇所の分子間水素結合を形成した安定な包接複合体を形成した。このため、 $\Delta E$  値および  $r$  値を考慮し、第 1 複合体を GCg<sub>G</sub>- $\beta$ -CD、第 2 複合体を GCg<sub>B</sub>- $\beta$ -CD と仮定したとき、次の ITC 結果と一致した。① 第 1 複合体の  $K_1$  値は第 2 複合体の  $K_2$  値に比べて約 3.7 倍大きく、より安定な包接複合体を形成した。②  $\Delta H_1 = -41.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  であり、このすべてのエネルギーが分子間の水素結合によるものと仮定したとき、複合体構造の 1 か所あたりの水素結合エネルギーは約  $8.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  である。フェノール性水酸基と  $\beta$ -CD の水酸基との間で形成される分子間水素結合エネルギーの結果とほぼ同様の値であり、この複合体の安定化には分子間水素結合が大きく寄与することが明らかとなった。

以上の結果、Fig. 71 に示すように、EGC、EC および GC は水相中で 1 種類の包接複合体を形成し、EGCg、ECg および GCg は 2 種類の包接複合体を形成することが明らかとなった。これらの複合体構造は複数の分子間水素結合を形成したが、 $\beta$ -CD 空洞内 ( $O^1$ ) および一級水酸基 ( $O^6$ ) とカテキンとの分子間水素結合に注目し、それぞれ橙色および黄色で示した。ガロイル基を有する EGCg、ECg および GCg についてそれぞれ計算結果の最適化構造を比較したとき、EGCg の第 2 複合体では  $\beta$ -CD の  $O^1$  と 2 か所、GCg の第 1 複合体では  $\beta$ -CD の  $O^6$  と 2 か所、その他は  $\beta$ -CD の  $O^1$  および  $O^6$  とそれぞれ 1 か所ずつ分子間水素結合を形成した。ITC の結果では、ガロイル基を有するカテキンは  $\beta$ -CD との反応熱量が高く、複合体結合定数は GCg の  $K_1$  が最も大きく、次いで ECg の  $K_1$ 、GCg の  $K_2$ 、ECg の  $K_2$ 、EGCg の  $K_1$ 、EGCg の  $K_2$  の順であった。 $\beta$ -CD の一級水酸基との分子間水素結合数が最も多い GCg の第 1 複合体は複合体形成定数が最も大きく、 $\beta$ -CD の一級水酸基との分子間水素結合を形成しない EGCg の第 2 複合体は複合体形成定数が最も小さかったことから、カテキンと  $\beta$ -CD との間に形成された分子間水素結合のなかでも、特に  $\beta$ -CD の一級水酸基とカテキンとの分子間水素結合が複合体の安定化に大きく寄与していることが明らかとなった。



**Fig. 71** 水相中におけるカテキンと  $\beta$ -CD との複合体  
 $\beta$ -CD 空洞内 ( $O^I$ ) および一級水酸基 ( $O^6$ ) とカテキンとの分子間水素結合をそれぞれ橙色および黄色で示した。



## 結論

本論文では、カテキンと  $\beta$ -CD による安定な包接複合体を形成する主要因として、分子間水素結合に注目し、計算化学を主体としたアプローチによって、包接複合体形成にはエンタルピー項が大きく寄与することを熱力学的に解明した。

$\beta$ -CD との複合体形成に最も重要なカテキンの構造的要因はガロイル基である。ガロイル基を有するカテキンについて、ガロイル基自身が  $\beta$ -CD 空洞内に包接する、あるいは A 環または B 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接することで、ガロイル基が  $\beta$ -CD の 2 級水酸基と分子間水素結合を形成することで、水溶液中で安定な包接複合体を形成した。

カテキンの B 環はカテコール基とピロガロール基の 2 種があるが、カテコール基の方がピロガロール基に比べ、より優位に  $\beta$ -CD と複合体を形成した。B 環の疎水性の増大による疎水性相互作用により、B 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接する。このため、水溶液中において ECg は A 環および B 環が  $\beta$ -CD 空洞内に包接された 2 種の包接モードが形成されることを明らかにした。

2,3-トランス型カテキンは B 環とガロイル基の立体配置が C 環に対してトランス位に位置することで、2,3-シス型カテキンに比べて B 環あるいはガロイル基が  $\beta$ -CD によって包接される。GCg のガロイル基は、 $\beta$ -CD の空洞内に深く包接されることで、ガロイル基の水酸基と  $\beta$ -CD の一級水酸基との間の分子間水素結合を 2 か所形成し、複合体を安定化させることを明らかにした。

$\beta$ -CD に対してゲスト分子の距離を変化させた複数の初期入力構造を作成し、それぞれに対して DFT 法を用いて構造最適化を行うことで、分子間水素結合に注目した各複合体の詳細な解析を可能とした。分子動力学計算は、水溶液中での各包接モードの安定性を正しく評価することを可能としたが、経時的にかつ動的に変化する構造に対する分子間の水素結合についての評価は困難であった。

pKa を有するゲスト分子に対して、 $\beta$ -CD との包接複合体形成メカニズムを明らかにするためには、分子モデリング計算によりイオン型の分子構造を明らかにすることが非常に有用である。これらの結果は、核磁気共鳴スペクトル測定を用いることで、包接複合体の形成および包接部位を特定することが可能である。また、等温滴定マイクロ熱量測定では化学量論比、複合体形成定数、反応エンタルピー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く複合体形成の起動力と包接部位を推定することが可能であり、これらを併用することで相互に検証することができる。ゲスト分子の複数の部位がそれぞれ  $\beta$ -CD によって包接される場合、それぞれの包接モードに対する実験値について考慮する必要があるため、分子モデリング計算により適切なモデルを作成して複合体形成過程を解析すれば、水溶液中における包接複合体の形成機構を明らかにする手法として計算化学は非常に有用性が高い。

## 謝辞

本研究の機会を与えられ、終始御懇篤なる御指導を賜りました福岡大学薬学部 安藝初美教授に衷心より感謝の意を表します。

本論文を完成するにあたり、御懇篤なる御助言および御校閲を賜りました福岡大学薬学部 藤岡稔大教授および 能田均教授に深く感謝いたします。

併せて、本研究および本論文作成において、親身な御指導、有益な御助言を戴きました福岡大学薬学部 池田浩人准教授に深く感謝いたします。

また、本研究の量子化学計算を行うにあたり、多大の御助言を戴きました 湯川美穂助教に感謝申し上げます。

本論文を完成するにあたり、NMR スペクトル測定にご協力いただきました福岡大学薬学部中央機器室 花園弘志氏に深く感謝いたします。

最後に、本研究の量子化学計算を行うにあたり、福岡大学情報基盤センター、九州大学情報基盤研究開発センター並びに自然科学研究機構岡崎共通研究施設 計算科学研究センターを利用させていただきましたことに感謝申し上げます。

## 計算の部

### 計算方法およびプログラム

#### CONFLEX 法

EGCg、EGC、ECg、EC、GCg、GC および  $\beta$ -CD の配座解析に使用した。CONFLEX 法は、熱振動を模倣した局所的な変形操作、環構造に対する corner flap と edge flip、直鎖や側鎖に対する stepwise rotation を行うことで、一つの初期入力構造から複数の構造（試行構造）を生成する計算方法である（Fig. 58）。創出される試行構造の数は、構造を構成する原子数、環構造の有無、直鎖や側鎖の長さなどの構造に応じて異なる。はじめに入力した初期入力構造を常に初期構造として用いるのではなく、配座探索の解析中に得られた構造を次々と初期構造として使用するため、創出される新しい配座異性体はエネルギー的に低い領域に集中される[83]。得られた各配座に対して分子の結合、変角、ねじれ角エネルギーおよび非結合相互作用エネルギーの和で表される立体エネルギーが算出され、最安定配座からのエネルギー差および立体エネルギーに基づく存在比率が得られる。プログラム CONFLEX VER.6.12a を使用した[84, 85]。

配座解析によって得られた多くの構造のうち、 $i$  番目の配座の存在比率  $x_i$  は、最もエネルギー的に安定な配座を基準とした Gibbs 自由エネルギーの差  $\Delta G_i$  からボルツマン分布則によって以下の(2) 式から算出される。

$$x_i = \frac{\exp(-\Delta G_i / RT)}{\sum_j \exp(-\Delta G_j / RT)} \dots\dots\dots(2)$$

ただし、最もエネルギー的に安定な配座を基準としたとき、 $j$  番目の配座の Gibbs 自由エネルギー差を  $\Delta G_j$  とした。 $\Delta G_i$  算出は膨大な計算資源を必要とする基準振動解析を行なわなければならないため、構造異性体間のエントロピー差を 0 と

みなして、エンタルピー差に相当する立体エネルギー $\Delta E_i$  を $\Delta G_i$  の代わりに近似して用いた。

### **Parametric method 3 (PM3 法)**

配座解析によって得られた数百種類の配座、およびカテキンと  $\beta$ -CD との複合体初期構造について、気相中での構造最適化および最安定構造の推定に使用した。半経験的分子軌道法は、シュレーディンガー方程式の解である波動関数を近似的に求める方法である。計算資源や計算時間を軽減するため、あらかじめ参照となる分子群の物性値（実験値）を再現するように決められたパラメータを用い、298 K の標準状態で各元素から 1 mol の化合物が生成される際の気相中の生成熱をエネルギー評価に用いる。H、C および O を含む 12 種の原子について、パラメータを使用した計算が可能である。プログラム GAMESS Ver.12 を使用した[86]。

### **Density functional theory (DFT 法)**

PM3 法を用いて得られた気相中での最適化構造について、DFT 法 (B3PW91/cc-pVDZ レベル) による水中での構造最適化を行った。密度汎関数法は電子密度を試行関数に用いることで、波動関数を経由することなく実質的には分子軌道法と同等の物性計算を可能にする計算方法である。分子を構成する原子核と電子についての全エネルギー (hartree) が算出される。原子数に比例して計算資源および計算時間が必要となるため、実座標として水分子を取り込んだ計算は難しいが、分子の形状に合わせた空洞表面の表面電荷として計算する polarizable continuum model (PCM 法) を用いることで、近似的に水中での最安定構造を算出した[86]。プログラム Gaussian 09 rev E.01 を使用した[87]。

### **Molecular dynamics (MD) 計算**

EGCg または EGC と  $\beta$ -CD との複合体について、水分子を用いた系の経時変化を MD 計算で求めた。分子動力学法は物質系を構成するそれぞれの原子や分子に対する運動方程式を解くことで、位置や速度の時間変化やエネルギー変化をコンピュータ上で再現する[83]。プログラム SCIGRESS ME 2.0 を用いた。

### **Parametric method 5 (PM5 法)**

EGCg について、カウンターイオンとして Na イオンを用いた構造最適化に用いた。PM3 法では Na 原子についての測定パラメータがないため、Na を含む 37 種の原子について計算が可能な PM5 法を用いた構造最適化計算を行った[86]。プログラム GAMESS Ver.12 では、PM5 法を用いた計算ができないため、プログラム Spartan '16 を使用した。

### **配座解析**

配座探索のエネルギー上限値は、 $12.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  とした。配座解析によって生成した数百種類の配座のうち、最安定配座からのエネルギー差が  $12.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  のエネルギーレベルにある配座について、二次解析を行った。すなわち、それぞれの構造について PM3 法による気相中での構造最適化を行い、その後、DFT 法による水中での構造最適化を行った。各配座について算出された全エネルギーを比較し、最小の全エネルギーを有する構造を最安定構造とした。

### EGC、EC および GC と $\beta$ -CD の初期複合体作成および構造最適化

ガロイル基を有さない EGC、EC および GC について、A 環の  $C^6$  および B 環の  $C^{4'}$  を基準原子とし、基準原子と  $\beta$ -CD 内に設定された基準平面との間の距離  $r$  を、+300 pm から -500 pm に 100 pm 毎に近づけた複合体構造を作成した。作成したそれぞれの構造に対して構造最適化を行った。

### EGCg、ECg および GCg と $\beta$ -CD の初期複合体作成および構造最適化

ガロイル基を有する EGCg、ECg および GCg の A 環、B 環およびガロイル基の 6 位炭素原子 ( $C^6$ )、4' 位炭素原子 ( $C^{4'}$ ) および 4'' 位炭素原子 ( $C^{4''}$ ) を基準原子とした。 $\beta$ -CD 空洞内のグリコシド結合を構成する酸素原子 3 点から成る平面を基準平面とした。また、ガレート型カテキンの基準原子から  $\beta$ -CD 内に設定された基準平面との間の距離を  $r$  (pm) とした。ガレート型カテキンはその立体構造から、各環を  $\beta$ -CD 空洞内の奥深くに挿入することができないため、 $r$  値は +300 pm から -100 pm までの 5 つの複合体の構造を作成した。作成したそれぞれの構造に対して構造最適化を行った。

### 分子動力学法による経時的変化

$\beta$ -CD を 1 分子と水分子を 700 分子挿入した立方体ユニットセルの系を作成した。水分子は SPCE water を用い、剛体として取り扱った。周期的境界条件を適用し、カットオフ距離 1,000 pm、圧力 1013 hPa、温度 298 K の NTP アンサンブルを使用し、時間間隔 0.2 fs としてシミュレーションを行った。系が平衡状態に達したのち、 $r=0$  pm の位置に EGCg または EGC の A 環、B 環またはガロイル基を配置し、さらにシミュレーションを行った。EGCg または EGC を配置し

た系について平衡状態に達した後、500 ps 間の複合体構造について  $r$  値の算出を行った。

### 紫外可視吸収スペクトル

EGCg の最安定構造を用い、各環の水酸基を脱プロトン化し、Gaussian 09 revision D.01 を用いて時間依存密度汎関数 (TD-DFT) 法により紫外可視吸収スペクトルを算出した。TD-DFT 法を用いることで、EGCg について励起状態のエネルギー計算を行い、紫外可視吸収スペクトルを算出した[87]。

### EGCg(Na) を用いた $\beta$ -CD との複合体計算

UV-vis スペクトル測定により得られたイオン型 EGCg を用いて、カウンターイオンとしてナトリウムイオンを付加した EGCg(Na) を作成し、EGCg(Na) の A 環またはガロイル基と  $\beta$ -CD との  $r$  値を 100 pm ずつ変更させた複数の初期入力構造を作成した。それぞれの初期入力構造について構造最適化を行った。



## 実験の部

### 核磁気共鳴スペクトル測定法

はじめに EGCg、EGC、 $\beta$ -CD、EGCg と  $\beta$ -CD の混合溶液 (EGCg+ $\beta$ -CD)、および EGC と  $\beta$ -CD の混合溶液 (EGC+ $\beta$ -CD) の各  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルおよび ROESY スペクトルを 308 K、 $\text{D}_2\text{O}$  中で測定し、テトラメチルシランを内部標準としてケミカルシフト ( $\delta$ ) を決定した。次に、酸性領域および塩基性領域の ROESY スペクトルについて、EGCg+ $\beta$ -CD または EGC+ $\beta$ -CD の混合溶液を、それぞれ pH 3.0 HCl 溶液および pH8.5  $\text{NaHCO}_3$  溶液を用いて調製し、presaturation 法を用いた測定を行った。NMR 試料管として 2 重管を使用し、2 重管の外管には EGCg+ $\beta$ -CD または EGC+ $\beta$ -CD の混合溶液を入れ、 $\text{D}_2\text{O}$  溶液およびテトラメチルシランを内管に入れた。ROESY 測定の測定条件はスキャン数：16、サンプルポイント数：256、遅延時間：1.5 秒、およびミキシング時間：250 ms と設定した。測定は、全て 308 K で行った。 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルおよび ROESY スペクトルの測定は JNM-ECZ600R (日本電子, Japan) を用い、解析は Delta NMR Processing and Control Software v5.0.5.1. を使用した。

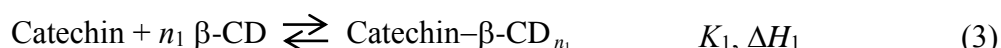
### 等温滴定マイクロ熱量測定法

ITC による反応熱量の測定は、Thermal Activity Monitor 2277 型 (Thermometric 社製, Sweden) を用いて、298.15 K で行った。はじめに、熱量計内の反応セルに 0.1 mM ~ 0.9 mM の EGCg 溶液または EGC 溶液を 3.0 mL の入れ、15 mM の  $\beta$ -CD 溶液を 15  $\mu\text{L}$  ずつ、15 分毎に 16 回、滴下速度 1.00  $\mu\text{L sec}^{-1}$  で滴下した。40 rpm で攪拌しながらセル内の反応熱量を測定した。同様の手順で精製水を用いた対照実験を行い、希釈熱の測定を行ったが、 $\beta$ -CD 溶液の希釈熱は観測されな

かった。次に、pH4.5 から pH8.5 に調製した  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$  緩衝液を用いて調製した 0.5 mM EGCg 溶液、0.5 mM EGC 溶液および 10 mM  $\beta$ -CD 溶液を用い、反応熱量を測定した。各緩衝液を用いた対照実験により希釈熱の測定を行ったが、希釈熱は観測されなかった。8 種類のカテキン (EGCg、EGC、ECg、EC、GCg、GC、Cg および C) を精製水を用いて 0.5 mM に調製し、10 mM の  $\beta$ -CD 溶液で滴定し、反応熱量を測定した。

### 複合体形成熱量の解析

測定によって得られた滴定曲線は 1 種類または 2 種類の複合体を形成するモデルを想定した解析を行い、複合体形成定数 ( $K$ ) および熱力学的パラメータ ( $\Delta G$ 、 $\Delta H$  および  $\Delta S$ ) を算出した。Catechin 分子と  $\beta$ -CD との複合体形成反応において 1 種類の複合体が形成するモデルを想定したとき、その複合体 (Catechin- $\beta$ -CD) の形成はそれぞれ以下の式で表すことができる。

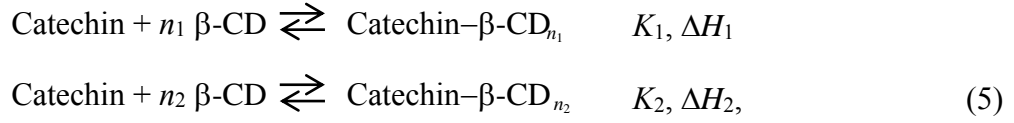


このとき、 $K_1$  は第 1 複合の複合体形成定数を表す。反応熱量 ( $\Delta Q$ ) は複合体形成量に比例し、 $\beta$ -CD の濃度 ( $[\text{CD}]$ ) の関数として表すことができる[88]。

$$\Delta Q = [\text{Catechin}]_t V \left( \frac{n_1 \Delta H_1 K_1 [\text{CD}]_f}{1 + K_1 [\text{CD}]_f} \right) \quad (4)$$

このとき、 $[\text{Catechin}]_t$  は用いたカテキンの総濃度を表し、 $[\text{CD}]_f$  は溶液中の  $\beta$ -CD 単体濃度を表し、 $V$  はカテキンの溶液総体積を表す。 $n_1$ 、 $K_1$  および  $\Delta H_1$  は非線形最小二乗法を用いて算出した。

2 種類の複合体が形成するモデルを想定したとき、その複合体 (Catechin- $\beta$ -CD) の形成はそれぞれ以下の式で表すことができる。



このとき、 $K_1$  および  $K_2$  ( $K_1 > K_2$  とする) は第 1 複合体および第 2 複合体の複合体形成定数をそれぞれ表す。反応熱量 ( $\Delta Q$ ) は複合体形成量に比例し、 $\beta$ -CD の濃度 ( $[\text{CD}]$ ) の関数として表すことができる。

$$\Delta Q = [\text{Catechin}]_t V \left( \frac{n_1 \Delta H_1 K_1 [\text{CD}]_f}{1 + K_1 [\text{CD}]_f} + \frac{n_2 \Delta H_2 K_2 [\text{CD}]_f}{1 + K_2 [\text{CD}]_f} \right) \tag{6}$$

このとき、 $[\text{Catechin}]_t$  は用いたカテキンの総濃度を表し、 $[\text{CD}]_f$  は溶液中の $\beta$ -CD 単体濃度を表し、 $V$  はカテキン溶液の総体積を表す。 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $K_1$ 、 $K_2$ 、 $\Delta H_1$  および  $\Delta H_2$  は非線形最小二乗法を用いて算出した。自由エネルギー変化量  $\Delta G$  および エントロピー変化量  $\Delta S$  は(7) 式および(8) 式を用いて算出した。

$$\Delta G = -RT \ln K \tag{7}$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \tag{8}$$

ただし、 $R$  は気体定数 ( $8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )、 $T$  は 298 K である。

## 参考文献

1. Inaba S., Fukada H., Oda M., *J. Therm. Anal. Calorim.*, **131**, 335-341 (2018).
2. Yamanishi Y., *Yakuzaigaku*, **78**, 77-81 (2018).
3. Kawai K., Takahashi Y., *YAKUGAKU ZASSHI*, **136**, 107-112 (2016).
4. Towaki H., *YAKUGAKU ZASSHI*, **13**, 1149-1150 (2011).
5. Fukuzawa K., Nakamoto T., Kato A., Mochizuki Y., Tanaka S., *J. Comput. Chem. Jpn.*, **6**, 185-198 (2007).
6. Hori K., *Journal of Computer Aided Chemistry*, **2**, 37-44 (2001).
7. Linus P., "The nature of the chemical bond" ed. by Cornell University Press, New York, pp. 407-456.
8. Chihaya H., Onishi S., "Chemical Bonding" ed. by Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, pp. 201-213.
9. Ikeda H., Moriwaki H., Matsubara T., Yukawa M., Iwase Y., Yukawa E., Aki H., *Yakugaku Zasshi*, **132**, 145-153 (2012).
10. Hatsumi A., Yasuhiro O., Takayoshi K., *J. Therm. Anal. Cal.*, **32**, 190-198 (2006).
11. Ikeda H., Matsubara T., Moriwaki H., Yukawa M., Yukawa E., Aki H., *Netsu Skutei*, **39**, 6-8 (2012).
12. Paul S., Heng PW., Chan LW., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **64**, 163-171 (2009).
13. El-Barghouthi MI., Masoud NA., Al-Kafawein JK., Zuughul MB., Badwan AA., *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **53**, 15-22 (2005).
14. Ohata T., Ikeda H., Inenaga M., Mizobe T., Yukawa M., Fujisawa M., Aki H., *Thermochimica Acta*, **653**, 1-7 (2017).

15. Ikeda H, Tsuji E, Matsubara T, Yukawa M, Fujisawa M, Yukawa E, Aki H., *J. Therm. Anal. Calorim.*, **113**, 1135-1138 (2013).
16. Ikeda H, Sano Y, Matsubara T, Kawahara M, Yukawa M, Fujisawa M, Yukawa E, Aki H., *J. Therm. Anal. Calorim.*, **123**, 1847-1850 (2016).
17. Osakabe N., *Kagaku to Seibutsu*, **54**, 726-731 (2016).
18. Tsujimura H., *Kagaku to Seibutsu*, **54**, 691-695 (2016).
19. Sakamoto A., Inoue H., Nakagawa M., *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **59**, 326-330 (2012).
20. Yanagise S., *Toyosyokuhinkenkyuzyo*, **31**, 131-133 (2016).
21. Balentine DA. Wiseman SA., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **37**, 693-704 (1997).
22. Nakai M, Fukui Y, Asami S, Toyoda-Ono Y, Iwashita T, Shibata H, Hashimoto F, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4593-4598 (2005).
23. Chen ZY., Zhu QY., Tsang D., Huang Y., *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 447-482 (2001).
24. Ikigami H., Toda M., Okubo S., Hara Y., Shimamura T., *Nippon Saikingaku Zasshi*, **45**, 913-919 (1990).
25. Hayashi N., Chen R., Hiraoka M., Ujihara T., Ikezaki H., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 8351-8356 (2010).
26. Saijo R., *Tea research journal*, **107**, 1-18 (2009).
27. Hara Y., *Food Preservation Science*, **26(1)**, 47-54 (2000).
28. Yokozawa T., Cho J E., Hara Y., Kitani K. *J Agric Food Chem*, **48**, 5068-5073 (2000).
29. Lee L S., Kim S H., Kim Y B., Kim Y C. *Molecules*, **19**, 9173-9186 (2014).
30. Kobayashi M., Nishizawa M., Inoue N., Hosoya T., Yoshida M., Ukawa Y., Sagesaka M Y., Doi T., Nakayama T., Kumazawa S., Ikeda I. *J Agric Food Chem.*, **62**, 2881-2890 (2014).

31. Asahi Y., Noiri Y., Miura J., Maezono H., Yamaguchi M., Yamamoto R., Azakami H., Hayashi M., Ebisu S. *J. Appl. Microbiol.*, **116**, 1164-1171 (2014).
32. Tamura M., Saito H., Kikuchi K., Ishigami T., Toyama Y., Takami M., Ochiai K. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 638-643 (2011).
33. Khan N., Mukhtar H. *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 6141-6147 (2013).
34. Ashida H., *J. Jpn. Nutr. Food Sci.*, **70**, 213-223 (2017).
35. Harada K., “Cyclodextrin tyobunshi no kouzoukagaku” ed. by Industrial Publishing and Consulting. Inc., Tokyo, pp. 119-164.
36. Sancho MI., Andujar S., Porasso RD., Enriz RD. *J. Phys. Chem. B*, **120**, 3000-3011 (2016).
37. Yukawa M., Moriwaki H., Murakami T., Ikeda H., Iwase Y., Aki H. *Koubunshi Ronbunshu*, **67**, 192-197 (2010).
38. Melania O., Aura T., Daniela G., Ovidiu M., Mihaela H., *J. Phys. Chem. B*, **106**, 257-263 (2002).
39. Uekama K., *YAKUGAKU ZASSHI*, **101**, 857-873 (1981).
40. Terao K., Komiyama M., “Applied Technology of Cyclodextrin” ed. by Cmcbooks, Tokyo, pp. 78-91.
41. Ross OD., Rekharsky MV., *Biophys. J.*, **71**, 2144-2154 (1996).
42. Fujiwara T., *Nipponkeshyogakukaishi*, **24**, 54-64 (1982).
43. Uekama K., *YAKUGAKU ZASSHI*, **132**, 85-105 (2012).
44. Uekama K., Otagiri M., *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**, 1-40 (1987).
45. Uekama K., Hirayama F., Irie T., *Chem. Rev.*, **98**, 2045-2076 (1998).
46. Aree T., Jongungruangchok S., *Carbohydrate Polymers*, **194**, 24-33 (2018).

47. Ohata T., Ikeda H., Mizobe T., Yukawa M., Aki H., *J. Therm. Anal. Calorim.*, doi.org/10.1007/s10973-018-7602-3.
48. Ikeda H., Ohata T., Yukawa M., Fujisawa M., Aki H., *J. Therm. Anal. Calorim.*, doi.org/10.1007/s10973-018-7680-2.
49. Kriz Z., Koca J., Imberty A., Charlot A., Auzely R., *Organic & Biomolecular Chemistry*, **1**, 2590-2595 (2003).
50. Junior O. V., Dantas J. H., Barão C. E., Zanoelo E. F., Cardozo-Filho L., Moraes F. F., *Journal of Supercritical Fluids*, **121**, 10-18 (2017).
51. Yukawa M., Moriwaki H., Murakami T., Ikeda H., Iwase Y., Aki H. *Kobunshi Ronbunshu*. **67**, 192-197 (2010).
52. Małgorzata WR. *J. Therm. Anal. Calorim.*, **127**, 1825–1834 (2017).
53. Ikeda H., Fukushige Y., Matsubara T., Inenaga M., Kawahara M., Yukawa M., Fujisawa M., Yukawa E., Aki H. *J. Therm. Anal. Calorim.*, **123**:1847–1850 (2016).
54. Laura S., Lucreția U., Ionuț L., Zoltan S., Adriana F., Claudiu S. *J. Therm. Anal. Calorim.*, **123**, 2377–2390 (2016).
55. Ajay S., Yuveraj ST., Mona S. *J. Therm. Anal. Calorim.*, **115**, 2471–2478 (2014).
56. Jun X., Tianwei T., Jan-Christer J., Lennart K., and Corine S., *Carbohydrate Research* , **342**, 843-850 (2007).
57. Christian FC., Juan G., Herna´n S., Carolina J., Claudio OA., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **78**, 287-298 (2014).
58. Ohata T., Ikeda H., Yukawa M., Inenaga M., Aki H., Abstracts of papers, International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry, Florida, August 2016, P-46.
59. Ishizu T., Hirata C., Yamamoto H., Harano K. *Magn. Reson. Chem.*, **44**, 776-783 (2006).

60. Ishizu T., Kintsu K., Yamamoto H., *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8992-8997 (1999).
61. Kihata K., Mine S., Ujihara T., Horie H., *Tea research journal*, **96**, 69-74 (2003).
62. Ilja CWA., Betty P., Peter CHH., *J. Agric. Food. Chem.*, **48**, 1752-1757 (2000).
63. Wang H., Helliwell K., *Food Chemistry*, **70**, 337-344 (2000).
64. Cremer D., Pople JA., *Journal of American Chemical Society*, **97**, 1354-1358 (1975).
65. Xu JZ., Yeung SY., Chang Q., Huang Y., Chen ZY., *Br. J. Nutr.*, **91**, 873-881 (2004).
66. Matsuzaki T., Hara Y., *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **59**, 129-134 (1985).
67. Guo Q., Zhao B., Shen S., Hou J., Hu J., Xin W., *Biochim Biophys Acta.*, **1427**, 13-23 (1999).
68. Chen CW., Ho CT., *Journal of Food Lipids*, **2**, 35-46 (1995).
69. Valcic S., Muders A., Jacobsen NE., Liebler DC., Timmermann BN. *Chemical Research in Toxicology*, **12**, 382-386 (1999).
70. Roy MK., Koide M., Rao TP., Okubo T., Ogasawara Y., Juneja LR. *Journal of Food Sciences and Nutrition*, **61**, 109-124 (2010).
71. Iwasawa Y., “Kagakubinran Kisohen Kaitei 5han” ed. by Maruzen Publishing, Tokyo, pp. 888.
72. Aree T., Jongrungruangchok S., *Carbohydrate Polymers*, **151**, 1139-1151 (2016).
73. Aree T., Jongrungruangchok S., *Carbohydrate Polymers*, **140** 362-373 (2016).
74. Adam J. S., Padmini K., Kapildev KA., Sheshanka K., Jun T., Michael J. Z., R. Douglas S., *Mol. Pharmaceutics*, **10**, 2948-2961 (2013).
75. Bondi A., *Journal of Physical Chemistry*, **68**, 441-451 (1964).
76. Tsutsumi H., *YAKUGAKU ZASSHI*, **132**, 925-931 (2012).
77. Ishizu T., Kajitani S., Tsutsumi H., Sato T., Yamamoto H., Hirata C., *Planta Med.*, **77**, 1099-1109 (2011).



78. Okumura H., Ichitani M., Takihara T., Kunimoto K. *Jpn. J. Food. Chem.*, **14**, 128-133 (2007).
79. Inoue B M., Inoue M., Fernando Q., Valcic S., Timmermann N B. *J. Inorg. Biochem.*, **88**, 7-13 (2002).
80. Ishizu T., Tsutsumi H., Yamamoto H., Harano K., *Magnetic Resonance in Chemistry*, **47**, 283-287 (2009).
81. Cordon-Cardo C., O'Brien JP., Casals D., Rittman Grauer L., Biedler JL., Melamed MR., Bertino JR. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 695-698 (1989).
82. Ikeda K., "Handbook of Calorimetry and Thermal Analysis" ed. by The Japan Society of Calorimetry and Thermal Analysis, Tokyo, pp. 63-72.
83. Murata S., "The Fifth Series of Experimental Chemistry" ed. by The Chemical Society of Japan, Tokyo, pp. 276-369.
84. Goto H., Osawa E., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8950-8951 (1989).
85. Goto H., Osawa E., *J. Chem. Soc.*, **2**, 187-198 (1993).
86. Murata S., "The Fifth Series of Experimental Chemistry" ed. by The Chemical Society of Japan, Tokyo, pp. 54-65.
87. 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).

88. Aki H., Niiya T., Iwase Y., Kawasaki Y., Kumai K., Kimura T. *Thermochimica Acta*, **416**, 87-92 (2004).