[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol. 67, No. 12, pp. 1713~1719, 1993]

¹H-NMR によるシクロデキストリン包接複合体の 徐放性・耐熱性の評価

岡村睦雄, 丸山鋼志, 若林 茂*

幾島賢治**, 大倉一郎**

(京都大学化学研究所, *株式会社ヘキサケミカル, **東京工業大学生命理工学部)

平成 5 年 6 月 21 日 受 理

Evaluation by ¹H-NMR of the Effects of Cyclodextrin Inclusion Complexes on the Volatility and Thermal Stability of Guest Compounds

Mutsuo OKAMURA, Tetsushi MARUYAMA, Shigeru WAKABAYASHI*,

Kenji IKUSHIMA**, and Ichiro OKURA**

Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611

**Hekisa Chemical Co., Ltd., 153 Yokomakura-nishi, Higashi-Osaka 578*

***Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology,*

4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 227

Cyclodextrin inclusion complexes of volatile materials and unstable compounds are in commercial use in the food industry and elsewhere. Their inclusion properties are usually examined by HPLC and GC, for which samples must first be prepared by dissolution and extraction by solvents. We evaluated the use of high-resolution ¹H-NMR for the measurement of guest/host ratios of the inclusion complexes. This method made it possible to estimate the volatility of the compounds incorporated in the complexes and the thermal stability of the complexes. These properties of α - and β -cyclodextrin complexes of pyridine and benzaldehyde were estimated on the basis of changes in the guest/host ratio with storage time and temperature. The relationship between the stability constant of the inclusion complexes and the release properties was not a simple one. β -Cyclodextrin, which has a large space in the molecule, tended to allow an excess of the guest compound to be included, and the oxidation resistance depended on the mode of inclusion.

(Received June 21, 1993)

緒 言

シクロデキストリン(以下 CD と省略する)は, α -1,4-グリコシド結合したグルコースからなる環状オリゴ糖であり, 分子内に種々の有機化合物を取込んで, 包接複合体を形成する⁽¹⁻³⁾. 食品工業では, その包接複合体形成を揮発性物質の安定化や酸化防止および溶解性, 吸湿性の改変等に応用した商品開発が行われている⁽⁴⁾. 一方, 非食品部門では機能性薬剤包接複合体を樹脂に練込んだ付加価値樹脂の開発が行われており⁽⁵⁾, また触媒反応および光学異性体の分離等への応用研究開発も行われ

ている⁽⁶⁾.

CD 包接複合体のホスト/ゲスト比やその安定性あるいはゲスト化合物の放出速度等の精密解析は応用研究においても重要視されており, 主に各種クロマトグラフ・UV 分光法等によるゲスト化合物の定量分析によって行われている^(7,8). しかしながら, CD 包接複合体からのゲスト化合物の洗出し・抽出等の前処理が必要であり, その解析精度に影響を与えている. NMR 解析法は, そのような前処理が必要ないが, 従来は包接状態の解析手段⁽⁹⁾として利用されてきているのみだった. ところが, 非常に安定した測定のできる高分解能超伝導 NMR が

近年急速に進歩し普及してきたため、簡便かつ迅速な定量・定性分析手段として CD の応用分野でも利用可能となってきた。正確なホスト/ゲスト比の決定において問題となる CD 包接体の含水量変化や溶解・抽出操作は、サンプルに含まれる CD の存在量とゲストの存在量を同時に全量検出し比定できる NMR 法では問題とならない。ここでは、そのような利点を持つ ^1H -NMR 測定によりホスト/ゲスト比を決定し、その経時変化等から考察した包接複合体の徐放性・耐熱性および包接状態を議論する。

実験方法

1. 試料 CD は塩水港精糖社製 α -CD (デキンパール α -100, 純度 99% 以上), β -CD (デキンパール β -100, 純度 98% 以上) を 75°C で 24 時間減圧乾燥して使用した。ゲスト試薬として市販品のピリジン, ベンズアルデヒドおよび安息香酸を用いた。 ^1H -NMR スペクトルの測定用溶媒には重水素化率 99.8% 以上の重水および d_6 -ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。

2. 包接複合体の調製 (1) CD の 80°C における飽和水溶液にピリジンは CD に対し 10 モル当量を加え、CD-ゲスト試薬混合物の飽和水溶液を調製した。溶解度が低いベンズアルデヒドは、アルゴン雰囲気下、CD の 80°C における飽和水溶液に、CD に対して 1.4 モル当量を加えた後、混合物が完全に溶液になるまで水

を適宜加え 80°C の CD-ゲスト試薬混合物の飽和水溶液を調製した。放冷後、析出した沈殿(結晶)を吸引濾過により濾別し少量の冷水で洗浄した。得られた数 g の包接複合体をそのまま測定に用いた。

(2) 上記の調製に対する比較実験として、単純混合法による試料の調製: 1 g の CD に対し 2 モル当量のベンズアルデヒドおよび 2 モル当量, 5 モル当量のピリジンをそれぞれ直接に加えて乳鉢内で混合し、室温にて粉末化した。5 モル当量のピリジンを β -CD に加えた場合は CD がすべて飴状に溶解したが、他は一部のみの飴状化であった。いずれの場合も速やかなベンズアルデヒドおよびピリジンの蒸散が伴い、混練によって 30 分程度で粉末化された。安息香酸の揮発性の試験のため、CD と安息香酸を 1:1 モル比で乳鉢で十分混合したサンプルも調製した。

3. 測定機器 ^1H -NMR スペクトルはバリアン VXR-200 フーリエ変換 NMR 測定装置を用いて測定した。UV-vis スペクトルの測定には日立 U-3210 分光光度計を使用した。

結果

1. 包接複合体の安定度定数

NMR 測定管内で調製した CD の 0.1 M 重水溶液 (1 ml) に 25°C においてピリジンを数 μl ずつシリンジで加えると、糖の 3 位炭素上のプロトンについて、Fig.

Fig. 1. The Plots of the Changes in ^1H -NMR Chemical Shift of $\text{C}_3\text{-H}$ of Cyclodextrin Glucose at 25.0°C . Pyridine was added by a micro syringe. The curves are drawn by the least-squares curve fits. α -CD(open circles); β -CD(closed circles).

Table I. Stability Constants (K_s) of Cyclodextrin (CD) Complexes Determined by Means of NMR and UV Spectra

Guest substrate	Cyclodextrin	K_s^a (M ⁻¹)
Pyridine	α -CD	20 $\pm$ 1
	β -CD	38 $\pm$ 2
Benzaldehyde	α -CD	52 $\pm$ 3
	β -CD	238 $\pm$ 34

^a) $K_s = \text{Complex} [\text{CD}]^{-1} [\text{Guest}]^{-1}$, in distilled water at 25.0°C.

1 に示す ¹H-NMR 化学シフトの変化が観測された。ピリジンの CD への安定度定数 K_s は、その化学シフト

変化を包接平衡の理論式についてカーブフィットすることで決定された⁽¹⁰⁾。

ベンズアルデヒドの CD への安定度定数は UV-vis スペクトルの吸収強度変化に基づいて決定した。2 $\times$ 10⁻⁴ M のベンズアルデヒド水溶液と各種濃度の CD 水溶液を 2.00 ml ずつ混合し、25°C にて測定した。ベンズアルデヒドの 350 nm の吸光度が、ピリジンの場合と同様な飽和曲線を与える変化を示し、カーブフィットにより安定度定数が計算された⁽¹⁰⁾。結果を Table I に示す。

ピリジンよりもベンズアルデヒドのほうが CD に取込まれやすく、またいずれの場合も α -CD よりも β -CD のほうが安定度定数が大きかった。溶解度法で決定され

Fig. 2. Typical ¹H-NMR Spectra of Cyclodextrin Inclusion Complexes. a) Pyridine- α -CD inclusion complex (D₂O, rt.); b) benzaldehyde- β -CD inclusion complex (D₂O+d₆-DMSO, rt.).

Fig. 3. The Plots of the Changes of Molar Ratio of Pyridine Fixed in Cyclodextrin Inclusion Complexes. α -CD (open circles); β -CD (closed circles).

Fig. 4. The Plots of the Changes of Molar Ratio of Benzaldehyde and Its Derivatives Fixed in Cyclodextrin Inclusion Complexes. For α -CD (open marks); for β -CD (closed marks); PhCHO (circles); PhCOOH (squares); and other derivatives (triangles).

たベンズアルデヒド/CD の安定度定数 (α -CD : 30, β -CD : 120)⁽¹¹⁾ と β -CD に関する値がかなり異なっているがその方法の解析ではゲスト/ホスト比が 2 : 3 であった。

2. 徐放性・耐熱性の評価

本研究において徐放性・耐熱性を、ゲスト/ホスト比の経時変化から検討し、飽和水溶液法で調製した包接複合体を直径 3 cm、深さ 4 cm のビーカーに入れ、室温または加熱状態で暗所開放静置した。随時に約 10 mg をサンプリングして、ピリジン-CD 包接複合体は 0.6 ml の重水に、ベンズアルデヒド-CD 包接複合体は 0.5

ml の重水+0.075 ml の d_6 -DMSO に溶解して ^1H -NMR スペクトルを測定した。その典型的なスペクトルを Fig. 2 に示す。化学シフトは DMSO および微量添加したアセトニトリルのメチルシグナルを内部標準とし、TSP- d_4 基準に換算している。各試薬に帰属されるシグナルの積分値 (プロトン数×試薬の存在量に比例) の比から、ゲスト/ホスト比等を計算した。得られた結果として、ピリジンについてはゲスト/ホスト比の経時変化を Fig. 3 に示す。ベンズアルデヒドについては空気酸化によって与えられた安息香酸等の派生物を含めたゲスト/ホスト比および派生物/ホスト比の経時変化を

Table II. The Changes of the Molar Ratio of Substrates in Cyclodextrin Complexes Prepared by Means of the Simple Mix Method

Cyclodextrin	Time (h)	[Pyridine]/[α -CD]	[Pyridine]/[β -CD]
α - or β -CD	0.5	0.57	0.44
	24	0.25	0.28
	24(75°C) ^{a)}	0.40	0.41
Cyclodextrin	Time (h)	[Benzoic acid]/[α -CD]	[Benzoic acid]/[β -CD]
α - or β -CD	0.5	1.05	1.13
	24	1.05	1.13
	24(100°C) ^{b)}	0.27	0.74
Cyclodextrin	Time (h)	[Benzaldehyde]/[CD]	[Benzoic acid] ^{c)} /[CD]
α -CD	0.5	0.39	0.09
	24	0.06	0.26
	24(100°C) ^{b)}	0.06	0.09
β -CD	0.5	0.31	0.02
	24	0.013	0.02
	24(100°C) ^{b)}	0.14	0.02

^{a)} 24h at 75°C; ^{b)} 24h at 100°C; ^{c)} Benzoic acid is obtained through an air oxidation of benzaldehyde.

Fig. 4 に示す。単純混合法で調製したサンプルについては、混合直後および 24 時間後（室温または加熱条件）に ¹H-NMR スペクトルを測定し比の変化を観察した。結果を Table II に示す。

考 察

1. ¹H-NMR スペクトル測定による包接物の定性・定量

¹H-NMR スペクトル測定では水のような溶媒も含めてサンプル中のすべてのプロトンが検出される。Fig. 2 に示すように、化学シフト（横軸上の位置）によって各試薬を区別同定し、各試薬の存在量をプロトン量（シグナルの積分値）によって定量するためホストとゲストの存在量を同時に定量でき、ゲスト/ホスト比を直接決定できる。この測定法は、通常利用されている包接物の定性・定量法である各種クロマトグラフ法の次のような欠点をほぼ克服している。クロマトグラフ法では一定量のサンプルからゲストを抽出し分析を行うという操作上の制約から、サンプルが CD とゲスト以外の溶媒等を含む場合に、正確なゲスト/CD 比を決定することが困難になっている。また CD とゲストが反応結合した場合やゲスト同志でポリマーを形成した場合に、それらを検出・同定することが困難である。

¹H-NMR スペクトルによる解析でも、ゲスト試薬等の化学シフトが CD の領域と完全に重なる場合の定量は困難である。しかしながら普通、芳香族プロトン（7～

9 ppm）や飽和脂肪族プロトン（1～3 ppm）が試薬に含まれており、化学シフトが 3.3～3.6 ppm（2,4-H）、3.5～4.0 ppm（3,5,6-H）、そして 4.9 ppm（1-H）の CD とは区別・定量が容易に行える。実際、ベンズアルデヒドが酸化されて生成した安息香酸等のシグナルも異なる化学シフトで検出されている。低価格化・測定の簡易化が進み、高分解能 NMR は単純な定性・定量分野でも有効な解析手段となってきた。

2. ビリジンおよびベンズアルデヒドの徐放性・耐熱性

（1）飽和水溶液法で調製した包接複合体のうち、 β -CD 包接複合体は Fig. 3, 4 に示すように室温で 5 日以上ビリジン、ベンズアルデヒドを 1:1 以上のモル比で含有していた。Fig. 3 にみられるように、ビリジンの場合は室温にて数日で放出されてしまったが、ベンズアルデヒドでは、その過剰分の放出は緩やかであった。揮発性はビリジン、ベンズアルデヒド両方であるが、揮発性の相違が過剰分の放出性の相違の原因とは考えにくい。揮発性の大きさは Table II に示す単純混合実験でそれらの残存量が非常に少ないことにも表れている。一方、Table I に示す β -CD との安定度定数はビリジンよりベンズアルデヒドのほうが一桁大きい。したがって、安定度定数と過剰包接分の放出性是对応関係にあり、 α -CD より大きい β -CD の空洞の一部が過剰包接に関与していることが示唆される。

（2）過剰分の放出後、ビリジンの放出速度は室温で

は α -CD/ β -CD で同程度であったが、75°C に加熱すると、 α -CD 包接複合体でその放出の一次的加速がみられた。100°C への加熱では β -CD 包接複合体でも放出の加速が起ったが、その変化はやや α -CD より遅れた。29 日以後の変化が、 α - と β -CD で同様であることから、100°C において β -CD 包接複合体の結晶に何らかの変化が起きたことが考えられる。精油成分 (d-フェンコン) の CD 包接複合体の熱分析において、結晶水放出に由来すると考えられるブロードな吸熱ピークが 100°C 付近に観測されたこと、およびゲストの急激な放出が 250°C を越えてから観測されたことが報告されている⁽¹²⁾。包接複合体をそれ単体としてではなくマクロな結晶として扱った研究が必要である。水溶液中で観測された安定度定数がピリジン- α -CD よりピリジン- β -CD のほうが 2 倍程度大きい事実は、 α -CD のほうがピリジンの放出が 75°C 以下でやや速い事実と見かけ上対応している。しかしながら、上述のように固体状態での包接の安定性に結晶構造の寄与が考えられるため、その放出性の差の原因を断定することはできない。

単純混合実験では、 α - と β -CD で大きな相違はみられないが、75°C 静置のほうが室温静置よりもピリジンの残存量が多いという面白い結果が得られている。これは、ピリジンが CD の空洞内に入っていくために熱エネルギーが必要なことを示す結果であると考えられる。同様の結果はベンズアルデヒド/ β -CD の単純混合実験でも得られた。やはり、加熱により空洞内への取込みが促進されたものと思われる。加熱により α -CD へベンズアルデヒドが取込まれる現象がみられないのは、 α -CD で安定度定数が小さいこと、あるいは、空洞がやや小さいことが原因であると考えることができる。

(3) ベンズアルデヒドの場合、室温での放出は緩やかであった。放出を促進させる目的で、75°C に加熱したところ、 β -CD 包接複合体では、ベンズアルデヒドの過剰包接分に相当する量が安息香酸に酸化され観測された。その後安息香酸の顕著な増減がないこと、 α -CD 包接複合体で安息香酸の生成がみられないことから、空洞に保持されているベンズアルデヒドは空気酸化から完全に保護されており⁽¹³⁾、不安定な状態で過剰包接されているベンズアルデヒドのみが酸化されたと結論できる。さらに、 α - と β -CD とともにベンズアルデヒドの減少分に相当する安息香酸の生成がそれ以後にみられないことから、75°C 以上でのベンズアルデヒドの複合体外への放

出はいったん起れば不可逆であり、その場所で安息香酸へ酸化されるために必要な空洞外保持時間はほとんどないと考えなければならない。

(4) ベンズアルデヒドの量はアルデヒドプロトン (ca. 10 ppm) の積分値から求められ、また、安息香酸の量はその 2,6-H (ca. 7.9~8.2 ppm) のピークから計算されるので、安息香酸以外のベンズアルデヒドからの反応物量は、芳香族領域の全シグナルのプロトン量からベンズアルデヒドと安息香酸のプロトン量を差し引くことで見積られる。反応物は 75°C に加熱以降に現れはじめたが、¹H-NMR スペクトルの解析のみではそれらの検出にとどまり同定できなかった。反応物はダイマー化したものや CD と反応したもの等が考えられるが、量的には顕著な増加はなかった。

(5) 包接とは直接関係なく、単純に混合するのみでベンズアルデヒドの安息香酸への酸化を β -CD が抑制している兆候がみられた。Table II に示すように、 α -CD との単純混合では直後から安息香酸が観測され、室温 24 時間後には相当量になっている。一方、 β -CD との単純混合では 0.5 時間、24 時間後のどちらもほとんど安息香酸はみられない。室温 24 時間後にベンズアルデヒド/ホスト比は β -CD では 0.013 で 0.5 時間後の 0.31 より大きく減少しており、完全な包接複合体によって酸化が抑制されたとは考えにくい (Table II)。 β -CD の場合はアルデヒド部分のみを空洞内に挿入した状態が容易に発生すると考えることが最も妥当ではないだろうか。すでに前述した 100°C で静置したほうがベンズアルデヒドの残存量が多い結果は、いま考えた前包接状態を完全な包接にするために加熱が必要なことを示唆すると思われる。このような考察の証明には、固体 NMR 法による解析が有望である⁽¹⁴⁾。これらの解析は単純混合による包接複合体の調製法の改良につながり、実用的な包接複合体の調製法の基礎データとなるであろう。

要 約

揮発性物質や不安定物質の CD 包接複合体化は、食品工業等で利用され商品化されているが、本包接複合体の基本性質の研究手段としては、手間のかかる前処理を必要とする各種クロマトグラフが用いられていることが多い。そこで本論文では、CD 包接複合体のゲスト/ホスト比の決定を容易に行える手段として高分解能 ¹H-NMR を用い、徐放性・耐熱性を評価した。その結果、

ベンズアルデヒドおよびビリジンの α - および β -CD 包接複合体の徐放性・耐熱性を、ゲスト/ホスト比の経時変化としてとらえることができた。また空洞の大きな β -CD による過剰包接や、包接形態に関係した耐空気酸化性の相違が観測された。

-
- (1) 掘越弘毅, 中村信之: 化学と生物, **17**, 300—305 (1979).
- (2) 小林昭一: 澱粉科学, **22**, 126—132 (1975).
- (3) 久下 喬, 竹尾健一: 澱粉科学, **21**, 151—168 (1974).
- (4) 原 耕三: 食品と開発, **20**, 21—26 (1986).
- (5) 小林尚博, 浅井俊博, 関矢忠良, 幾島賢治: 特開平 2-196863.
- (6) A. Harata, M. Furue, and S. Nozakura: *Polym. J.*, **13**, 777—781 (1978).
- (7) 原 耕三, 桑原宣洋, 石神 博, 屋敷幾雄, 藤田孝輝: フードケミカル, **7**, 50—60 (1987).
- (8) D. Gao, Y. Yamamoto, and K. Hayashi: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **10**, 910—911 (1990).
- (9) Y. Yamamoto and Y. Inoue: *J. Carbohydr. Chem.*, **8**, 29—46 (1989).
- (10) R. J. Bergeron, M. A. Channing, G. J. Gibeily, and D. M. Pillor: *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5146—5151 (1977).
- (11) 上釜兼人: 薬学雑誌, **101**, 857—873 (1981).
- (12) 池田陽一, 松本孝次, 国弘和雄, 不破 亨, 上釜兼人: 薬学雑誌, **102**, 83—88 (1982).
- (13) J. Szejtli: in "Inclusion Compounds," Vol. 3, ed. by J. L. Atwood, J. E. D. Davies, and D. D. MacNicol, Academic Press, Hungary, 1984, p. 331.
- (14) F. O. Garces, V. P. Rao, M. A. Garcia-Garibay, and N. J. Turro: *Supramol. Chem.*, **1**, 65—72 (1992).
-