

NMR による茶成分の抗酸化機構の解析

—安定ラジカルとポリフェノール類との反応—[†]

澤井 祐典

(平成 18 年 10 月 19 日受理)

NMR Analytical Approach to Clarify the Molecular Mechanisms of the Antioxidative and Radical-Scavenging Activities of Antioxidants in Tea: Reaction of Polyphenols with Stable Free Radicals

Yusuke Sawai

目 次

<p>I 緒 言.....24</p> <p>1 はじめに</p> <p>2 茶に含まれる抗酸化成分</p> <p>3 研究の経緯</p> <p>II DPPH を用いた (+)-catechin の抗酸化機構の NMR による解析28</p> <p>1 目 的</p> <p>2 方 法</p> <p>3 結果および考察</p> <p>III DPPH を用いたカテキン類の抗酸化機構の NMR による解析31</p> <p>1 目 的</p> <p>2 方 法</p> <p>3 結果および考察</p> <p>IV DPPH を用いた catechol 誘導体の抗酸化機構の NMR による解析33</p> <p>1 目 的</p> <p>2 方 法</p> <p>3 結果および考察</p>	<p>V DPPH を用いた pyrogallol 誘導体の抗酸化機構の NMR による解析37</p> <p>1 目 的</p> <p>2 方 法</p> <p>3 結果および考察</p> <p>VI DPPH を用いた ascorbic acid の抗酸化機構の NMR による解析41</p> <p>1 目 的</p> <p>2 方 法</p> <p>3 結果および考察</p> <p>VII DPPH を用いた α-tocopherol の抗酸化機構の NMR による解析47</p> <p>1 目 的</p> <p>2 方 法</p> <p>3 結果および考察</p> <p>VIII 総 括.....51</p> <p>摘要..... 53</p> <p>引用文献.....54</p> <p>Summary57</p>
--	--

〒 428-8501 静岡県島田市金谷 2769

茶生産省力技術研究チーム

[†] 本論文は岐阜大学大学院連合農学研究科学位審査論文を編集・加筆したものである。本報告の一部は、*J. Agric. Food Chem.*, 46, 111-114 (1998); *J. Agric. Food Chem.*, 48, 6247-6253 (2000); *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3598-3604 (2005) において発表した。

略 語 表

DPPH: 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

NMR: nuclear magnetic resonance

I 緒 言

1 はじめに

チャはツバキ科 (Theaceae), ツバキ属 (*Camellia*) のチャ節に分類されており, 本来照葉樹林の下生えとして自生する永年性の照葉樹である (中林ら, 1991). カフェインを含有するため, 新芽の加工品はコーヒー, ココアと並んで世界を三分する非アルコール性の嗜好飲料として広く飲用されている (伊奈ら, 2002) が, チャにはカフェイン以外にもカテキン類やテアニンなどのチャ特有の成分が高濃度に含まれている (岩浅, 1994).

コーヒー, ココアはそれぞれ豆を原料としているが, チャは新芽を摘んで加工することにより, ヒトが飲用するのに適した製品 (茶) となる (伊奈ら, 2002). 世界の茶産地では, 合計すると1年間に300万tもの茶が製造されている (袴田, 2003) が, 製法は地域により異なり, おもに2種類に分けられる. すなわち不発酵茶と発酵茶である.

茶の加工でいう「発酵」とは, パンや酒をつくる際の微生物による発酵とは異なり, チャの生の葉の中に存在する酵素による反応をさす. すなわち発酵茶の製造方法は, 摘んだチャの新芽を天日あるいは室内で萎れさせる (萎凋) 工程から始まる. 生の葉は萎れることで葉内の酵素が働くのである. 発酵茶は発酵の程度によってさらにウーロン茶に代表される半発酵茶と, 紅茶に代表される強発酵茶に分れる. 半発酵茶では萎凋後の葉を加熱することで酵素は失活するが, 強発酵茶では萎凋後の葉はさらに揉まれることでより酵素反応が進むことになる. このときおもに働く酵素はポリフェノールオキシダーゼであり, 酵素反応が進むことで葉内のカテキン類は酸化されて紅茶の赤い色素へと変化していくことになる.

一方不発酵茶は萎凋工程を行わず, 摘んだ生の葉はすぐに加熱されて葉内の酵素は失活する. 日本でつくられるのはおもにこの不発酵茶であり, 年間約9万tが生産される. 日本以外では不発酵茶は中国で50万tほど生産されているが, 世界の生産量のうちでは紅茶が80%程度を占めており, 不発酵茶を生産, 消費する国は少数派といえる (澤井, 2003).

以上のように世界の茶産地で栽培されるチャは, さ

らに耐寒性に強い中国種 (*var. sinensis*) と耐寒性に弱いアッサム種 (*var. assamica*) に大別することができる. 中国種は全般に葉が小さく, 中国, 日本を中心に栽培され, おもに不発酵茶の製造用として用いられている. 一方アッサム種は葉が大きく, インドやアフリカなどの熱帯, 亜熱帯で紅茶の製造用に栽培されている. これは, アッサム種は中国種よりもカテキン類の含量が高く, 紅茶の赤い色素の生成に適しているためである (伊奈ら, 2002) が, カテキン類は日光が当たることによりアミノ酸から生合成されると考えられており, 温帯と熱帯, 亜熱帯で日射量の違いからカテキン類の含量に差が生じ, 種の分化が起こったものと考えられる.

日本では一般的に春から秋にかけて4回ほどチャの芽を摘むことができるが, 春に摘む一番茶よりも, 夏に摘む二, 三番茶の方がカテキン類の含量が高い (中川ら, 1964). これは日射量によりカテキン類の生合成が支配されているためだが (中林ら, 1991), 考え方によってはカテキン類をたくさん生合成して紫外線から身を守っているのだともとらえることができる. 紫外線は活性酸素を発生させるひとつの要因だが, カテキン類は活性酸素を除去することができる (吉岡, 2000).

活性酸素は, DNAの損傷や, 脂質分子の酸化などの様々の障害を引き起こすと考えられており (吉岡, 2000), 植物のみならず動物にとってもがん (Wangら, 1989), 動脈硬化 (Miuraら, 2001), 高血圧 (Yokozawaら, 1994), 脳卒中 (Satoら, 1989; Suzukiら, 2001), 心臓病 (Nakachiら, 2000), 糖尿病 (坂井ら, 1995), 肥満 (Sayamaら, 1996), 肝機能障害 (Hikinoら, 1985), アレルギー (大須ら, 1990) など数多くの疾病の一因になる (吉川ら, 1999; 村田ら, 2001). また, 突然変異 (Leeら, 1997) や細菌の感染 (Shettyら, 1994) とも関係していると考えられている (Ohashiら, 2002). したがって, ヒトも茶を摂取することにより, カテキン類の活性酸素除去効果を得ることができる.

以下に, カテキン類など, 茶に含有され, 活性酸素の除去に寄与していると考えられている成分に関する知見を紹介する.

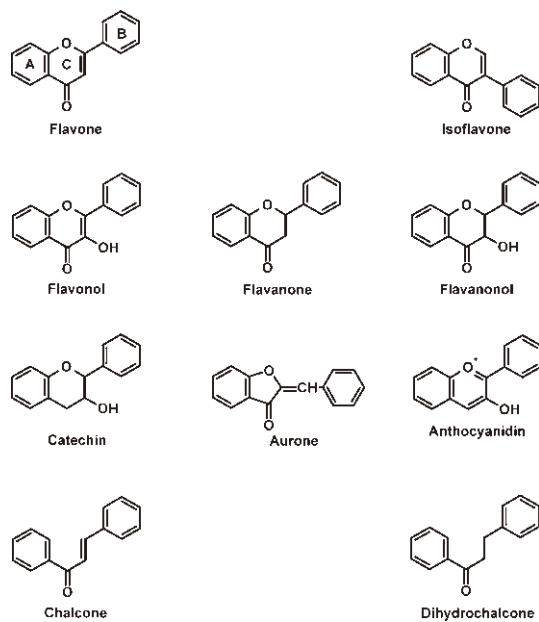
2 茶に含まれる抗酸化成分

a カテキン類

チャに含まれるカテキン類は, 化学構造的にはフラバン-3-オール骨格をもつ物質の総称とされ, フラボノイドの一種に分類される. フラボノイドとは, 狭義には, 3環性で4位がオキソ構造をもつ化合物をさす. したがっ

て、フラボン、フラボノール、フラバノン、フラバノール、イソフラボンの5種の基本骨格に分類される化合物群が狭義のフラボノイドである。これに対しカテキン類は3環性であるが、4位がオキソ構造をもたない骨格(フラバン骨格)であるため、広義のフラボノイドに分類される。同様に、1位の酸素原子がオキソニウム構造であるアントシアニンや、3, 4位に水酸基をもつロイコシアニン、2環性のカルコン類も広義のフラボノイドである(Fig. 1)(仲川ら, 2000)。カテキン類の化学構造は、heterocyclic ring (C環)の2, 3位に2個の不斉炭素原子をもつ光学活性体であり、そのため理論的には4種の立体配置を異にする光学異性体が存在するが、チャの葉にはこのうち(-)-epi体と(+)-体が報告されているのみである(伊奈ら, 2002)。チャに含まれる主要なカテキン類はいずれもC環の3, 5, 7位とB環の3', 4'位に水酸基をもち、(-)-epi体は(-)-epicatechin, (+)-epi体は(+)-catechinと呼ばれる。これに加え、B環の5'位にも水酸基をもつ(-)-epi体を(-)-epigallocatechinと呼ぶ。また、(-)-epicatechinと(-)-epigallocatechinの3位の水酸基に没食子酸がエステル結合した(-)-epicatechin gallateと(-)-epigallocatechin gallateが存在する。このうち(-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallateと(-)-epigallocatechin gallateは、チャ節植物にしか見出されない特徴的な成分である(Fig. 2)(岩浅, 1994)。

これら4種のカテキン類のうち最も多く含まれているのが(-)-epigallocatechin gallateであり、以下(-)-ep-

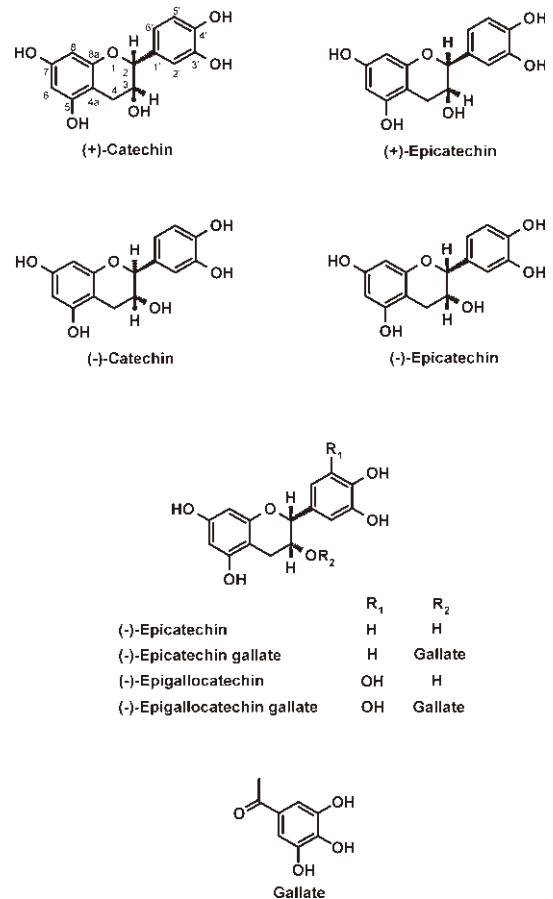


igallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epicatechinと続く(中川ら, 1964)。そのほかに(+)-catechinなどが微量に存在する。茶の乾物中の15~30%がカテキン類にあたり、そのうち約半分が(-)-epigallocatechin gallateである(岩浅, 1994)。茶の乾物中の40%が可溶分といわれており(岩浅, 1994)、そのうちカテキン類の占める割合がいかに高いかわかる。

カテキン類は、春に摘む一番茶よりも、夏に摘む二、三番茶の方が多く含まれており(中川ら, 1964)、また、同じ一番茶の中では、摘採時期が遅れるにしたがって、(-)-epigallocatechinと(-)-epicatechin(遊離型カテキン類)の含量は増加するが、(-)-epigallocatechin gallateと(-)-epicatechin gallate(エステル型カテキン類)は次第に減少し、カテキン類の総量としては漸減していくことになる(西條, 1981; 吉田ら, 1996)。

b ポリフェノール

カテキン類以外にもチャには様々なポリフェノールが含まれている。コーヒーに含まれるポリフェノールとして知られている chlorogenic acid は、caffeic acid と quinic



acidのエステルだが、コーヒーのみならず多くの双子葉類植物の果実、葉などに含まれ（今堀ら, 1990）、チャにも存在する（Roberts, 1956）。

また、フラボノールとしてkaempferol（大島ら, 1936; 大島ら, 1952; 中林, 1953; 大島ら, 1953a; 大島ら, 1953b; 大島ら, 1953c）、quercetin（大島ら, 1936; 大島ら, 1952; 中林, 1953; 大島ら, 1953a; 大島ら, 1953b; 大島ら, 1953c; Robertsら, 1951a; Robertsら, 1951b）、myricetin（Robertsら, 1956; 滝野ら, 1953; 滝野ら, 1954a; 滝野ら, 1954b; 滝野ら, 1954c; 滝野ら, 1962; Takinoら, 1962）も、配糖体のアグリコンとして存在している（中林ら, 1991）。フラボノールは日光を遮って育てたチャの芽にはあまり含まれず（中林, 1953）、こうした現象はカテキン類とよく似ており、フラボノールもチャが紫外線から身を守るために生合成されると考えられる。

さらに、大半が(-)-epigallocatechinまたは(-)-epicatechinとエステル結合して(-)-epigallocatechin gallateや(-)-epicatechin gallateとしてチャ中に見出される没食子酸(gallic acid)は、遊離の状態でもわずかに存在している（中林ら, 1991）。

こうしたカテキン類を除くポリフェノールはチャでは乾物中に数%含まれると考えられる（中林ら, 1991）。

c Ascorbic acid

前述のように、世界でつくられる茶は、製法によりおもに発酵茶と不発酵茶に分れ、概してアッサム種は発酵茶に適し、中国種は不発酵茶に適しているものの、品質を問題視しなければ、アッサム種を不発酵茶に加工することは不可能ではないし、中国種を発酵茶に加工することもできなくはない。要するにチャの葉内に存在するポリフェノールオキシダーゼによりカテキン類を酸化させてつくった茶を発酵茶と呼び、カテキン類を酸化させることなく摘んだチャをすぐに加熱して酵素を失活させてから製造した茶を不発酵茶（緑茶）と呼ぶ。

不発酵茶の製造上最も重要なポイントは、摘んだチャの葉をいかに早く加熱して酵素を失活させるかである。酵素の失活が遅れば、それだけカテキン類の酸化が起こり、その後製造された茶はカテキン類の酸化で生じた赤い色素を含んでおり、湯に浸出させれば赤い浸出液となって緑茶としては品質上の欠点となり、市場での価値が下がる原因となる。

不発酵茶の製造過程において、摘んだチャの葉がどれだけすみやかに加熱されて酵素が失活したかを知るために、野菜などの鮮度を表す指標としても用いられる

ascorbic acid（ビタミンC）の含量を測定する方法がある。不発酵茶である煎茶のascorbic acid含量は250 mg/100 gであるのに対し、半発酵茶（ウーロン茶）はわずかに8 mg/100 g、発酵茶（紅茶）にいたっては検出されなかった（岩浅, 1994）。Ascorbic acidは、チャの葉が摘採後に時間が経過して萎れることですみやかに酸化されることになる（中林ら, 1991）。Ascorbic acidは、茶に含まれる成分の中ではカテキン類と並ぶ抗酸化物質であり、チャの葉における酸化反応を抑制しているといえる。

日本でつくられる茶はほとんどが不発酵茶だが、その中にも煎茶や玉露などいくつかの茶種が存在する。玉露は煎茶とは異なり、チャの新芽を摘む前に20日間ほど日光を遮って育てなければならない。こうすることで渋み成分であるカテキン類の生合成が抑えられ、うまみ成分であるアミノ酸含量の高い高級茶ができるのである。興味深いことに、日光を当てて育てられた煎茶よりも日光を遮られて育てられた玉露の方がascorbic acid含量も少なくなる（岩浅, 1994）。これは、紫外線を多く当てて育てられたチャが、より多くの抗酸化成分を必要とするためだと考えられる。

d α -Tocopherol

Ascorbic acidが水溶性の天然抗酸化物質として知られる一方、脂溶性の抗酸化物質として知られる α -tocopherol（ビタミンE）もチャには豊富に含まれている（山内ら, 1976）。 α -Tocopherolはやはりascorbic acidやカテキン類と同様に、日光を遮られて育てられた玉露よりも日光を当てて育てられた煎茶の方が含量は高い（池ヶ谷ら, 1984; 河村ら, 1987）。 α -Tocopherolは水に溶けないため通常ヒトが飲用する際には摂取することはできないが、抹茶を飲用したり、粉末にした緑茶を菓子や料理などに混ぜることにより、ascorbic acidやカテキン類と一緒に人体内に摂取することができる。また、そもそもチャの生体組織中においては抗酸化成分として樹体を守る役割を十分に果たしているはずであり、蒸して乾燥された加工後の茶製品の段階では、消費前の貯蔵中に品質劣化を起こさないように、 α -tocopherolも抗酸化成分としての役割を十分に果たしていると考えられる。

3 研究の経緯

上述のように、茶には多種類の抗酸化成分が含まれており、茶の抗酸化性については、油脂の酸化抑制に関する報告（松崎ら, 1985）をはじめ、近年多くの研究が行

われてきた。そもそも活性酸素と呼ばれるものには、呼吸により生体内に入った酸素の一部(数%)が次々に一電子還元を受けることにより生じるスーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル($\bullet OH$)など種々がある。さらに、 $\bullet OH$ の反応性は高く、例えば脂質が酸化されると過酸化脂質ラジカル($LOO\bullet$)が生じ、また必須アミノ酸であるarginineから生成する一酸化窒素(NO)と O_2^- からはパーオキシナイトライト($ONOO^-$)などの活性酸素種が生じるといわれ(伊古田, 2002)、これらを対象としたカテキン類の抗酸化効果がこれまでに数多く検討されてきた(伊奈ら, 2002)。

しかし、こうした活性酸素種はいずれも短寿命で、これに対し、比較的長寿命で安定なラジカル種もよく実験に用いられている(伊奈ら, 2002)。安定ラジカルとして最もよく知られているのは1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)である。DPPHはラジカル消去物質が存在すると非ラジカル体(1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine)に変化するため(Fig. 3)、通常は電子スピン共鳴装置(ESR)により残存するラジカルをとらえ、ラジカル消去物質の活性を求めることができる(Nanjoら, 1996; Nanjoら, 1999)。またはその際にDPPHに由来する溶液の紫色が次第に退色していくため、分光光度計でラジカル消去活性を測定した報告も多い(食品総合研究所, 1999; Yoshidaら, 1989; Yokozawaら, 1998)。

概してカテキン類の抗酸化効果は、化学構造的にB環の3', 4'位の水酸基に加え、5'位にも水酸基をもち、かつ3位の水酸基に没食子酸がエステル結合した(-)-epigallocatechin gallateが最も高いとされるが、(-)-epigallocatechinと(-)-epicatechin gallateの間の優劣については諸説があり(伊奈ら, 2002)、しかしDPPH等の安定ラジカルを用いた研究では、(-)-epicatechin gallateの方が(-)-epigallocatechinよりも抗酸化活性が高いとする報告が多い(Nanjoら, 1996; Yoshidaら, 1989; Senbaら, 1999)。

フラボノールについても、B環の4'位にしか水酸基のないkaempferolは(-)-epicatechin、(+)-catechinよりも抗酸化効果は劣るが、quercetin, myricetinについ

ては、(-)-epigallocatechin gallateよりも劣るとする報告(Rice-Evansら, 1996)、優れるとする報告(Yangら, 2001)諸説ある。しかしフラボノールについては、Rice-Evansら(1996)、Yangら(2001)ともに、B環の3', 4', 5'に水酸基があるmyricetinよりもB環の3', 4'位にしか水酸基のないquercetinの方が抗酸化効果が高いとしており、それぞれ実験の条件が異なることにより結果を一概に比較することはできないと考えられる。

また、これまでESR(Nanjoら, 1996)や分光光度計(Yoshidaら, 1989)を用いて、ascorbic acidや α -tocopherolとポリフェノールの間でのDPPHラジカル消去活性を測定、比較した報告もいくつかあり、ascorbic acidや α -tocopherolよりもポリフェノールの方がラジカル消去活性が高いと結論づける報告が多い。さらに、(+)-catechinや(-)-epicatechinの方が、 α -tocopherolよりも油脂の酸化を抑制する活性が高いといわれる(松崎ら, 1985; 中山ら, 1994)。

上記のように、様々な活性酸素種を対象としているいろいろな成分の抗酸化効果を比較評価した研究は多く報告されてきたが、これまで、抗酸化成分がラジカルを消去するに際しての分子構造の変化について明らかにした研究は少ない。カテキン類の酸化生成物については、重合体などが単離され、生成機構についても研究されているものの(中山ら, 1994; 田中, 2002; Tanakaら, 2003)、そのメカニズムについてはブラックボックスとして残されている部分が存在していた。Nanjoら(1996)は、(+)-catechinや(-)-epicatechinの水酸基をアシル化もしくはグルコシル化することにより、B環の水酸基が誘導体化されたときだけ抗酸化活性が著しく低くなることを見出し、このことから、カテキン類の酸化はまずB環がキノンに変化することから始まると推測されてきた(中林ら, 1991; Senbaら, 1999)、具体的にその化学構造の変化を明らかにした例はなかった。

以上の知見を踏まえて、本研究では、抗酸化成分がラジカルを消去するメカニズムを明らかにするために、核磁気共鳴(NMR)を用いて抗酸化成分がDPPHと反応する様子を観測する手法を考案した。この方法により、セル内で抗酸化成分とDPPHを反応させ、NMR測定を行うことで、抗酸化成分がDPPHラジカルを消去する際の分子構造の変化を明らかにすることができると考えられた。

まず第二章では、カテキン類の最も単純なモデル化合物として(+)-catechinを研究に用いた。(+)-CatechinとDPPHを反応させて生成した化合物を誘導体化して

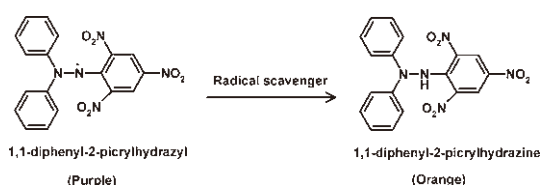


Fig.3 Reaction of DPPH.

単離し、構造決定を行った。

第Ⅲ章では、(-)-epicatechin と (-)-epigallocatechin を試料に選択し、それぞれの DPPH との反応を ^{13}C -NMR を用いて観測した。

また、本研究では、この方法を発展させることで、抗酸化成分のラジカル消去能力に関して、もうひとつ重要な情報を得ることができた。それは、まず同一セル内で2種類の抗酸化成分を混合しておき、それらをあとで添加した DPPH と競争的に反応させ、セル内の様子を NMR を用いて非破壊計測することにより、2種類の成分のうちどちらが先に DPPH ラジカルを消去できたのかをダイレクトに明らかにできるということである。第Ⅲ章ではさらに、(-)-epicatechin と (-)-epigallocatechin を溶媒中で混合し、これに DPPH を加えることで、DPPH がどちらのカテキンと先に反応するかを NMR で直接的に調べた。

第Ⅳ章では、ポリフェノール化合物の構造と抗酸化機構の関係についてさらに詳細に研究を進めた。まず最も単純なポリフェノール構造として catechol をモデル化合物として選択し、DPPH との反応を ^{13}C -NMR を用いて観測した。その後、catechol 構造を有する ethyl protocatechuate や, quercetin について研究を進めた。Quercetin と化学構造が類似する化合物として, luteolin, eriodictyol, (+)-taxifolin も試料として選択した。Caffeic acid は quinic acid とのエステルとして植物中に存在していることを考慮し, methyl caffeate を合成して研究を行った。

さらに、これらの化合物から2種類ずつ選択して抗酸化能力の比較を行った。

第Ⅴ章では、第Ⅳ章で catechol 誘導体について調査したことを受けて、pyrogallol 誘導体について研究を進めた。まず最も単純なモデル化合物として pyrogallol を選択し、DPPH との反応を ^{13}C -NMR を用いて観測した。また、pyrogallol 構造にオレフィン二重結合が共役する化合物として myricetin を研究に用いた。一方没食子酸は pyrogallol 構造にカルボニル二重結合が共役する化合物であるが、大半がカテキン類とエステル結合していることを考慮して、ethyl gallate をモデル化合物に用いた。

さらに、これらの化合物から2種類ずつ選択して抗酸化能力を比較した。

最後には、catechol 誘導体の中で最も早くフリーラジカルを消去すると考えられる quercetin と、pyrogallol 誘導体の中で抗酸化能力の比較を行った。

第Ⅵ章では、ascorbic acid について、DPPH との反応を ^{13}C -NMR を用いて観測した。

また、ascorbic acid とポリフェノールの間で抗酸化能力の比較を行った。

さらに第Ⅵ章では新たに、ポリフェノールと DPPH が反応してポリフェノールがフリーラジカルにより酸化されたあとで、ascorbic acid を加えることにより、酸化されたポリフェノールを ascorbic acid が還元できるか試験した。

第Ⅶ章では、 α -tocopherol について、DPPH との反応を ^{13}C -NMR を用いて観測した。

また、 α -tocopherol と ascorbic acid, ポリフェノールから選択した2種類の成分の間で抗酸化能力を比較した。

さらに、第Ⅵ章と同様に、ポリフェノールと DPPH が反応してポリフェノールがフリーラジカルにより酸化されたあとで、 α -tocopherol を加えることにより、 α -tocopherol が酸化されたポリフェノールを還元できるか試験した。

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導をいただきました静岡大学農学部渡辺修治教授、京都大学化学研究所坂田完三教授、大韓民国全南大学校文齋鶴助教授に深く感謝いたします。

また、本論文をまとめるにあたり有用なご助言をいただきました岐阜大学応用生物科学部木曾眞教授、信州大学農学部廣田満教授、静岡大学理学部村井久雄教授、静岡大学農学部轟泰司助教授に深く感謝いたします。

Ⅱ DPPH を用いた (+)-catechin の抗酸化機構の NMR による解析

1 目 的

チャに含まれるカテキン類は、近年になって、抗がん (Wang ら, 1989), 動脈硬化抑制 (Miura ら, 2001), 血圧上昇抑制 (Yokozawa ら, 1994), 脳卒中の予防 (Sato ら, 1989) と進展抑制 (Suzuki ら, 2001), 心臓病予防 (Nakachi ら, 2000), 抗糖尿病 (坂井ら, 1995), 抗肥満 (Sayama ら, 1996), 肝機能保護 (Hikino ら, 1985), 抗アレルギー (大須ら, 1990), さらに抗菌 (Shetty ら, 1994), 抗ウイルス (手塚ら, 1997), 環境汚染物質除去 (恒成ら, 1992) 等の極めて多彩な薬理作用を示すことがわかってきており、その多くは、カテキン類の抗酸化作用によるものであるということが明らかになってきている。

チャに含まれる主要なカテキン類は、(-)-epigallocatechin gallate をはじめとして、(-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epicatechin であるが、そのほかに (+)-catechin も微量に存在する。本章ではま

ず、カテキン類の最も単純なモデル化合物として (+)-catechin を実験に用いた。 (+)-Catechin はチャのみならず多くの木本植物に含まれる化合物である (今堀ら, 1990)。 (+)-Catechin と DPPH を反応させて生成した化合物を誘導体化して単離し、構造決定を行った。

2 方法

a NMR 測定

測定試料は 5 φ セルに入れ、JEOL JSX-270 FT-NMR 装置を用いて、以下の条件で測定を行った：プロトンノイズデカップリング、パルス繰り返し時間 1 秒、照射パルス 45° パルス、測定範囲 17007 Hz、測定温度 27°C。

b 基準物質

内部標準物質として tetramethylsilane を用いた。

c 測定試料の調製

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中に (+)-catechin (0.015 mmol) を溶解させ、 ^{13}C -NMR 測定を行った後に、DPPH (0.030 mmol) を加え、DPPH の紫色があせた時点で再度 ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 4)。

(+)-Catechin: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 67.5 MHz) δ 157.7,

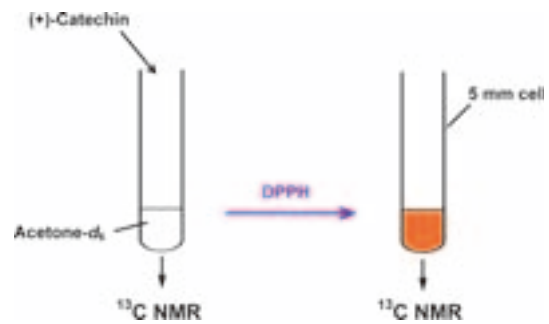


Fig.4 Sample preparation for NMR measurement.

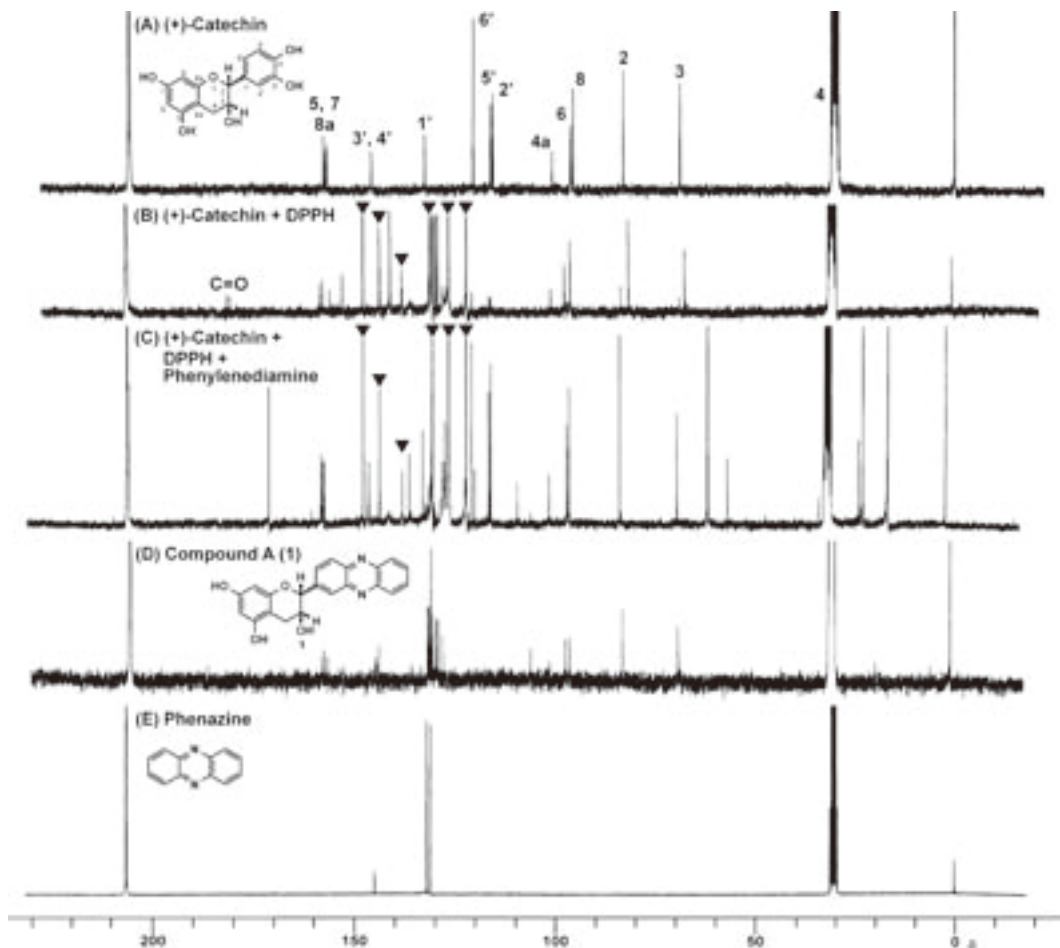


Fig.5 ^{13}C NMR spectra of (+)-catechin, its reaction mixtures, compound A (1) and phenazine (acetone- d_6 , 67.5 MHz). (A), (+)-catechin (0.015 mmol); (B), reaction mixture of (+)-catechin (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol); (C), 1, 2-phenylenediamine (0.015 mmol) was added to a mixture of (+)-catechin (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol); (D), compound A (1); (E), phenazine.

▼, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine.

157.2, 156.9 (C-5, -7, -8a), 145.7, 145.6 (C-3', -4'), 132.2 (C-1'), 120.1 (C-6'), 115.7 (C-5'), 115.2 (C-2'), 100.7 (C-4a), 96.1 (C-6), 95.4 (C-8), 82.7 (C-2), 68.3 (C-3), 28.9 (C-4) (Porter ら, 1982) (Fig. 5-A).

d 化合物 A (1) の単離

Acetone 中で (+)-catechin (0.15 mmol) と DPPH (0.30 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点でさらに 1, 2-phenylenediamine (0.15 mmol) と反応させた。反応液を濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフ (CHCl₃/MeOH) に供し、(+)-catechin よりも極性の低い化合物 A を単離した。化合物 A (1) [4.0mg; R_f=0.4, silica gel GF₂₅₄ (Merck), CHCl₃:MeOH=9:1] EI-MS: *m/z* (%) 360 (M⁺, 100), 222 (95), 193 (44), 169 (53), 139 (25); HR-EIMS: *m/z* 360.1090 (M⁺, -2.0 mmu for C₂₁H₁₆N₂O₄); ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 67.5 MHz): δ 158.0, 157.3, 156.5 (C-5, -7, -8a), 127.6-131.5 (phenazyl), 96.6 (C-6), 95.5 (C-8), 82.4 (C-2), 68.3 (C-3) (Fig. 5-D); ¹H-NMR (acetone-*d*₆, 270 MHz): δ 7.80-8.50 (phenazyl), 6.12 (H-8), 6.05 (H-6), 5.09 (H-2), 4.35 (H-3).

3 結果および考察

a (+)-Catechin と DPPH の反応

Acetone-*d*₆ (0.70 mL) 中で (+)-catechin (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ¹³C-NMR 測定を行った (Fig. 5-B). 測定結果を標品である (+)-catechin のスペクトル (Fig. 5-A) (Porter ら, 1982) と比較したところ、(+)-catechin の B 環に由来するシグナル [C-2' (δ 115.2), C-5' (δ 115.7), C-6' (δ 120.1), C-1' (δ 132.2), C-3', 4' (δ 145.6, 145.7)] が小さくなり、ふたつのカルボニルシグナル (δ 180.5, 181.2) が新しく見出された。いくつかのシグナル (δ 121.4, 125.8, 129.2, 129.9, 137.3, 142.9, 147.1) は、標品との比較の結果、DPPH に帰属されるシグナル (δ

129.2) および DPPH が還元されてできた 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine (▼) のシグナルであった。このことから、Nanjo ら (1996) も誘導体を用いて明らかにしているように、(+)-catechin は B 環のふたつの水酸基でラジカルを消去することが示唆された。

b (+)-Catechin の抗酸化機構の解明

新しく現れたふたつのカルボニルシグナルから、(+)-catechin の B 環は DPPH と反応するとキノン構造に変化すると考えられた。これを証明するために、acetone-*d*₆ (0.70 mL) 中で (+)-catechin (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させた後に、1, 2-phenylenediamine (0.015 mmol) を加えた。¹³C-NMR を測定すると、ふたつのカルボニルシグナル (δ 180.5, 181.2) は消失し、(+)-catechin に由来するシグナル (C-1', -2', -3', -4', -5', -6', など) が再び現れ、一度キノン構造となった (+)-catechin は、ほとんどもとの (+)-catechin に還元されたと考えられた (Fig. 5-C). しかし、この中には、キノン構造となった (+)-catechin に phenylenediamine が付加した化合物が少量ながら含まれているとも考えられた。

この推測に従い、acetone 中で (+)-catechin (0.15 mmol) と DPPH (0.30 mmol) を反応させ、さらに 1, 2-phenylenediamine (0.15 mmol) を加えた反応液から、シリカゲルカラムクロマトグラフにより、(+)-catechin よりも極性の低い化合物 A を単離し、¹³C-NMR 測定を行った (Fig. 5-D). 標品の phenazine (Fig. 5-E) とスペクトルを比較した結果、A は、DPPH と反応してキノン構造となった (+)-catechin に phenylenediamine が付加した化合物 (1) であると考えられた。EI-MS スペクトルにより、A は、分子量 360 であることがわかった。また *m/z* 222 (95%) のフラグメントは、Fig. 6 に示すように 1 が開裂してできた phenazine 部分のピークであると考えられた。さらに高分解能 EI-MS スペクトルにより、分子式は C₂₁H₁₆N₂O₄ であることがわかり、化合物 A の構造

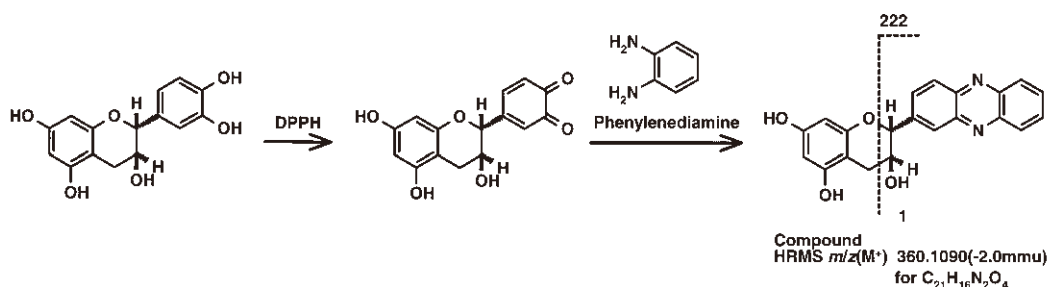


Fig.6 Reaction of (+)-catechin with DPPH and then with 1, 2-phenylenediamine.

は1であることが明らかとなった。

以上のことから (+)-catechin は B 環のふたつの水酸基でラジカルを消去し、キノン構造となることが確認された (Fig. 6)。

Ⅲ DPPH を用いたカテキン類の抗酸化機構の NMR による解析

1 目 的

前章では、(+)-catechin の DPPH に対する抗酸化機構を明らかにできたが、カテキン類には、(+)-catechin のエピマーである (-)-epicatechin に加え、B 環の 5' 位にも水酸基をもつ (-)-epigallocatechin や、(-)-epicatechin と (-)-epigallocatechin の 3 位の水酸基に没食子酸がエステル結合した (-)-epicatechin gallate と (-)-epigallocatechin gallate など、化学構造の異なる化合物がいくつも存在し、種類によって抗酸化機構も異なると推測される。

本章では、遊離型カテキン類である (-)-epicatechin と (-)-epigallocatechin を試料に選択し、それぞれの DPPH との反応を ^{13}C -NMR を用いて観測した。前章で、(+)-catechin は B 環のふたつの水酸基が抗酸化性の活性部位と確認できたことから、DPPH はそれぞれのカテキン類の B 環の水酸基の数に応じて反応させることにした。すなわち、(-)-epicatechin はモル比 2 倍量の DPPH と反応させ、(-)-epigallocatechin はモル比 2 倍量、3 倍量と DPPH を徐々に反応させ、その都度 ^{13}C -NMR 測定を行った。

また、(-)-epicatechin と (-)-epigallocatechin を溶媒中で混合し、これに DPPH を加えることで、DPPH がどちらのカテキンと先に反応するかを NMR で直接的に調べることができると考えた。

2 方 法

a ^{13}C -NMR 測定

測定試料は 5 ϕ セルに入れ、JEOL JNM-LA 500 FT-NMR 装置を用いて、以下の条件で測定を行った：プロトンノイズデカップリング、パルス繰り返し時間 1 秒、照射パルス 45° パルス、測定範囲 33898 Hz、測定温度 30°C。

b 基準物質

WILMAD の coaxial inserts に、0.015 mmol/0.06 mL の濃度で acetone- d_6 に溶解した 1, 4-dioxane を 0.015 mmol

加えた外部標準法を用いた。

1, 4-Dioxane: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 67.6 (C-2, -3, -5, -6)。

C 測定試料の調製

1) (-)-Epicatechin と DPPH の反応

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中に (-)-epicatechin (0.015 mmol) を溶解させ、 ^{13}C -NMR 測定を行った後に、DPPH (0.030 mmol) を加え、DPPH の紫色があせた時点で再度 ^{13}C -NMR 測定を行った。

(-)-Epicatechin: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 157.6, 157.2 (C-5, -7, -8a), 145.4 (C-4'), 145.3 (C-3'), 132.4 (C-1'), 119.4 (C-6'), 115.5 (C-5'), 115.3 (C-2'), 99.8 (C-4a), 96.2 (C-6), 95.7 (C-8), 79.5 (C-2), 67.0 (C-3), 29.0 (C-4) (Porter ら, 1982) (Fig. 7-A)。

2) (-)-Epigallocatechin と DPPH の反応

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中に (-)-epigallocatechin (0.015 mmol) を溶解させ、 ^{13}C -NMR 測定を行った後に、DPPH (0.045 mmol) を加え、DPPH の紫色があせた時点で再度 ^{13}C -NMR 測定を行った。

(-)-Epigallocatechin: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 157.6 (C-5, -7, -8a), 146.2 (C-3', -5'), 133.0 (C-4'), 131.6 (C-1'), 107.0 (C-2', -6'), 100.0 (C-4a), 96.2 (C-6), 95.8 (C-8), 79.5 (C-2), 67.1 (C-3), 28.9 (C-4) (Porter ら, 1982) (Fig. 7-C)。

3) (-)-Epicatechin と (-)-epigallocatechin の抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で、(-)-epicatechin (0.015 mmol) と (-)-epigallocatechin (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.045 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 8)。

3 結果および考察

a (-)-Epicatechin と DPPH の反応

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で、(-)-epicatechin (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 7-B)。測定結果を標品である (-)-epicatechin のスペクトル (Fig. 7-A) (Porter ら, 1982) と比較したところ、(-)-epicatechin の B 環に由来するシグナル [C-2' (δ 115.3), C-5' (δ 115.5), C-6' (δ 119.4), C-1' (δ 132.4), C-3' (δ 145.3), C-4' (δ 145.4)] が小さくなり、ふたつのカルボニルシグナル (δ 180.4, 181.4) が新しく見出された。このことから、(+)-catechin と同様に、(-)-epicate-

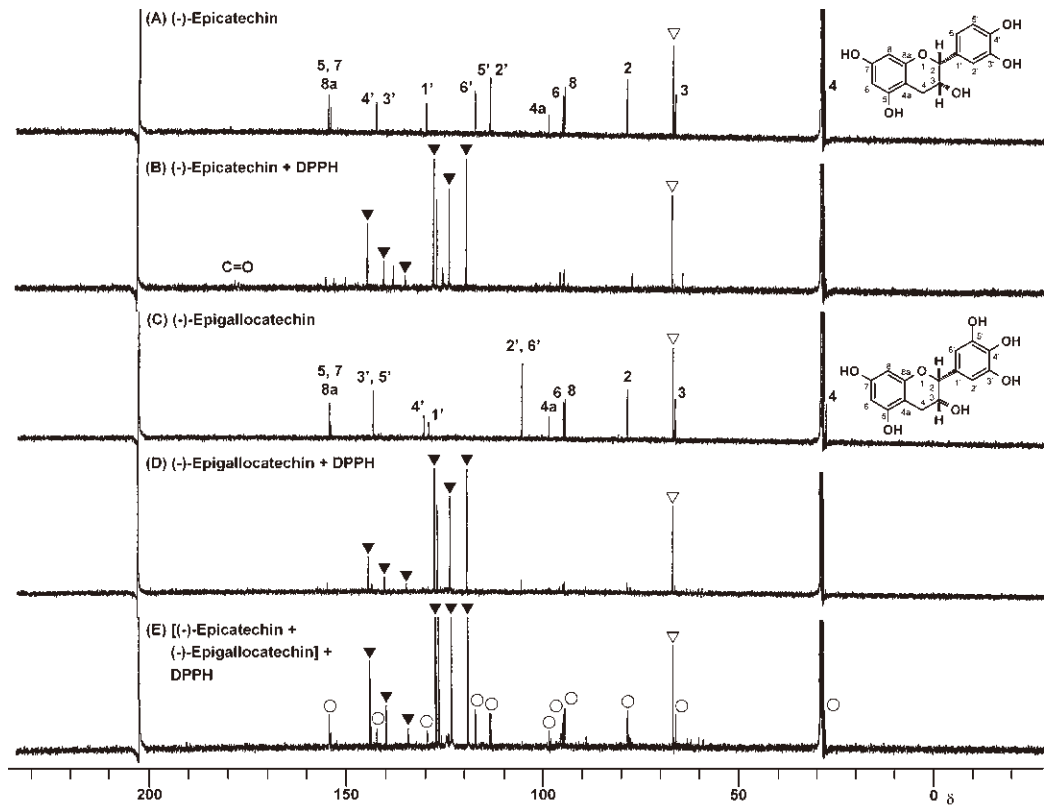


Fig.7 ^{13}C NMR analyses (acetone- d_6 , 125 MHz) to examine the reactivity of (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin with DPPH.

(A), (-)-epicatechin (0.015 mmol); (B), reaction mixture of (-)-epicatechin (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol); (C), (-)-epigallocatechin (0.015 mmol); (D), reaction mixture of (-)-epigallocatechin (0.015 mmol) and DPPH (0.045 mmol); (E), DPPH (0.045 mmol) was added to a mixture of (-)-epicatechin (0.015 mmol) and (-)-epigallocatechin (0.015 mmol).

▽, 1, 4-dioxane (external standard); ▼, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine; ○, remaining peaks of (-)-epicatechin.

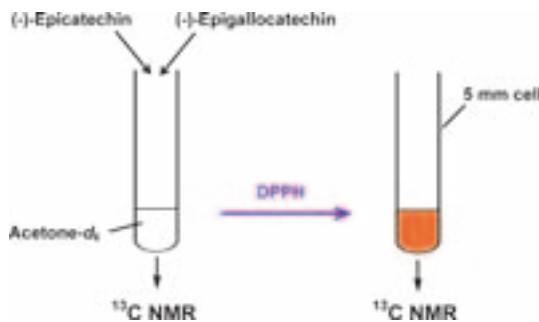


Fig.8 Sample preparation for NMR measurement.

chin は、B 環のふたつの水酸基がキノン構造に変化することによりラジカルを消去することがわかった。

b (-)-Epigallocatechin と DPPH の反応

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で、(-)-epigallocatechin (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (データ省略)。測定結果を (-)-epigallocatechin のスペクトル (Fig.

7-C) (Porter ら, 1982) と比較したところ、B 環に由来するシグナルのみならず、(-)-epigallocatechin 由来のすべてのシグナルが小さくなり、新しいシグナルが現れることはなかった。さらに DPPH (0.015 mmol) を反応させて ^{13}C -NMR 測定を行っても、(-)-epigallocatechin 由来のすべてのシグナルがさらに小さくなるだけで、新しいシグナルが現れることはなかった (Fig. 7-D)。このことから、B 環に catechol 構造をもつ (-)-epicatechin と、pyrogallol 構造をもつ (-)-epigallocatechin の抗酸化機構は異なることが推察された。(-)-Epigallocatechin は、B 環に 3 個の水酸基が存在するために、2 倍量の DPPH と反応した際には、2 種類の *o*-キノン構造が平衡状態となり、常に電子の移動が起こっている常磁性となって、NMR シグナルが観測できない状態にあると考えられた。また、3 倍量の DPPH と反応した場合にも、Fig. 9 のようにラジカルとして安定化していると考えられ、NMR シグナルとして現れないと推測された。

c (−)-Epicatechin と (−)-epigallocatechin の抗酸化能力の比較

(−)-Epicatechin (0.015 mmol) と (−)-epigallocatechin (0.015 mmol) を acetone- d_6 (0.54 mL) 中で混合し、これに DPPH (0.045 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 7-E). こうして DPPH がどちらの化合物と先に反応するかを調べることにより、2 種類の成分の抗酸化能力を直接的に比較することができる。標品である (−)-epicatechin (Fig. 7-A), (−)-epigallocatechin (Fig. 7-C) のスペクトルと比較した結果、(−)-epigallocatechin 由来のシグナルは小さくなり、(−)-epicatechin 由来のシグナル (○) に変化はなかった。(−)-Epicatechin が DPPH と反応したときに現れるふたつのカルボニルシグナルも現れることはなかった。すなわち、(−)-epigallocatechin は (−)-epicatechin よりも先に DPPH と反応しており、pyrogallol 構造をもつ (−)-epigallocatechin は catechol 構造をもつ (−)-epicatechin よりも早くフリーラジカルを消去できることが確認できた。

IV DPPH を用いた catechol 誘導体の抗酸化機構の NMR による解析

1 目的

前章までに、カテキン類の抗酸化機構について検討を行い、特に (+)-catechin や (−)-epicatechin について、DPPH と反応した際には B 環のふたつの水酸基がキノン構造に変化することが NMR で確認できた。しかし、チャには、カテキン類以外にも様々なポリフェノールが含まれており、quercetin など、カテキン類と同じフラボノイドでありながら、C 環の構造の異なるフラボノールなどの抗酸化機構が、カテキン類と同様であるのか、興味をもたれるところである。

本章では、NMR を用いて、明確にキノン構造への変化が観測されたカテキン類の B 環の catechol 構造に注目し、まず最も単純なポリフェノール構造として catechol をモデル化合物として選択し、DPPH との反応を ^{13}C -NMR を用いて観測した。その後、catechol 構造を有する ethyl protocatechuate や, quercetin について研究を進めた。Quercetin と化学構造が類似する化合物として、luteolin, eriodictyol, (+)-taxifolin も試料として選択した。Caffeic acid は quinic acid とのエステルとして植物中に存在していることを考慮し、methyl caffeate を合成して研究を行った。

さらに、これらの化合物から 2 種類ずつ選択して抗酸化能力の比較を行った。

2 方法

a ^{13}C -NMR 測定

Ⅲ章に準じる。

b 基準物質

Ⅲ章に準じ、1, 4-dioxane を用いた。

c Methyl caffeate と methyl hydrocaffeate の合成

Caffeic acid と hydrocaffeic acid をそれぞれ 30mg ずつ 5% の塩酸メタノール 1mL に溶かし、70°C で 1 時間反応させた。反応液はシリカゲルカラムクロマトグラフ (CHCl_3 / MeOH) に供し、生成物であるメチルエステルを単離した。

d 測定試料の調製

1) ポリフェノールと DPPH の反応

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中に catechol (0.015 mmol) を溶解させ、 ^{13}C -NMR 測定を行った後に、DPPH (0.030 mmol)

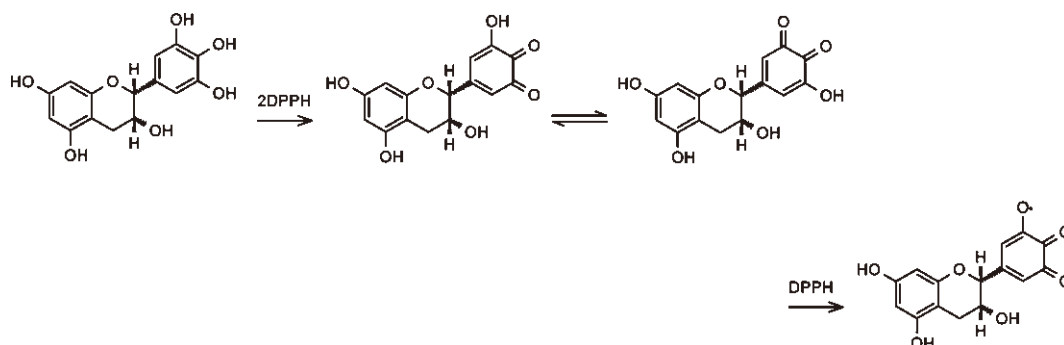


Fig.9 Plausible structure of an (−)-epigallocatechin radical generated by DPPH.

を加え, DPPH の紫色があせた時点で再度 ^{13}C -NMR 測定を行った. Ethyl protocatechuate, quercetin, (+)-taxifolin, luteolin, eriodictyol, methyl caffeate, methyl hydrocaffeate についても同様の測定を行った.

Catechol: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 146.0 (C-1, -2), 120.8 (C-4, -5), 116.2 (C-3, -6) (Materska ら, 2003) (Fig. 10-A).

Ethyl protocatechuate: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 166.5 (C=O), 150.7 (C-4), 145.6 (C-3), 123.3 (C-1, -6), 117.2 (C-2), 115.7 (C-5), 60.9 (-CH₂-), 14.6 (-CH₃) (Materska ら, 2003) (Fig. 10-C).

Quercetin: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 176.6 (C-4), 165.0 (C-7), 162.3 (C-5), 157.8 (C-8a), 148.3 (C-4'), 146.9 (C-2), 145.8 (C-3'), 136.8 (C-3), 123.8 (C-1'), 121.5 (C-6'), 116.2 (C-5'), 115.8 (C-2'), 104.2 (C-4a), 99.2 (C-6), 94.5 (C-8) (Markham ら, 1976) (Fig.

12-A).

(+)-Taxifolin: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 198.2 (C-4), 167.8 (C-7), 165.0 (C-5), 164.2 (C-8a), 146.6 (C-4'), 145.7 (C-3'), 129.8 (C-1'), 120.8 (C-6'), 115.9, 115.8 (C-2', -5'), 101.6 (C-4a), 97.1 (C-6), 96.0 (C-8), 84.5 (C-2), 73.2 (C-3) (Markham ら, 1976) (Fig. 12-C).

Luteolin: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 181.8 (C-4), 163.7 (C-7), 162.2 (C-5), 157.5 (C-8a), 148.9 (C-4'), 146.9 (C-2), 145.3 (C-3'), 122.6 (C-1'), 119.0 (C-6'), 115.4 (C-5'), 112.9 (C-2'), 104.2 (C-4a), 103.0 (C-3), 98.4 (C-6), 93.4 (C-8) (Materska ら, 2003).

Eriodictyol: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 196.0 (C-4), 166.2 (C-7), 164.1 (C-5), 163.2 (C-8a), 145.2 (C-4'), 144.8 (C-3'), 130.4 (C-1'), 118.1 (C-6'), 114.9 (C-5'), 113.5 (C-2'), 102.1 (C-4a), 95.6 (C-6), 94.7 (C-8), 78.8 (C-2), 42.4 (C-3) (Matsuda ら, 2002).

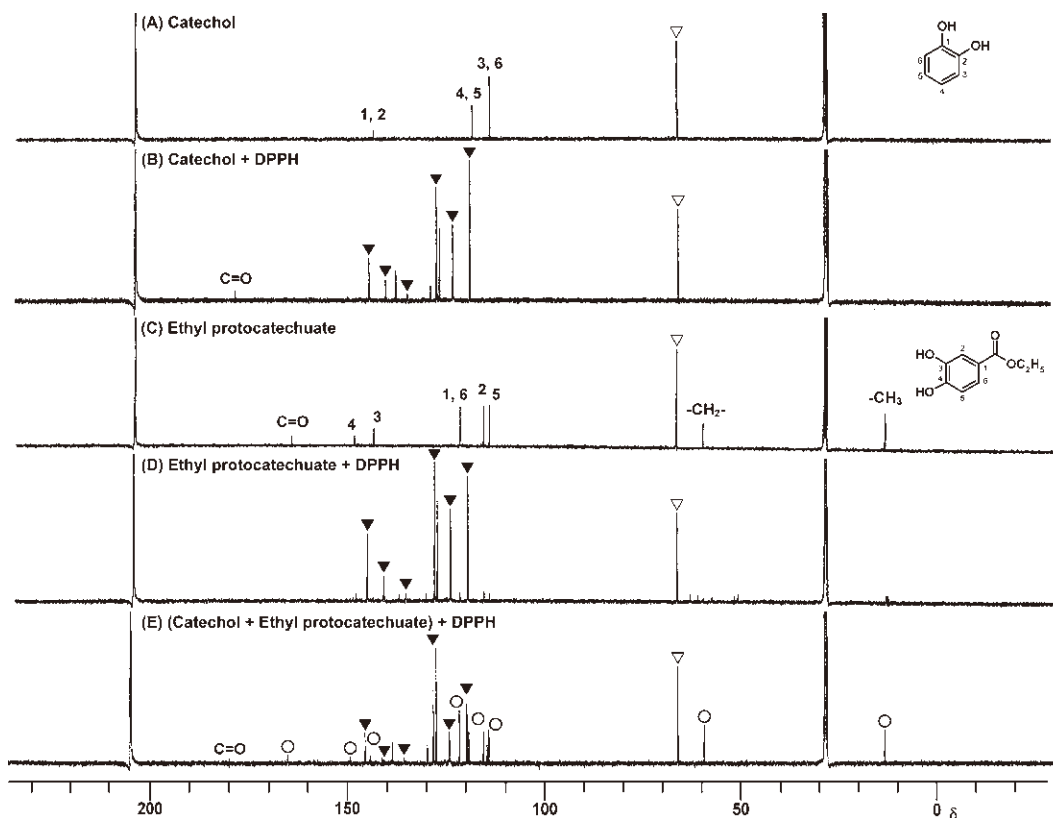


Fig.10 ^{13}C NMR analyses (acetone- d_6 , 125 MHz) to examine the reactivity of catechol and ethyl protocatechuate with DPPH.

(A), catechol (0.015 mmol); (B), reaction mixture of catechol (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol); (C), ethyl protocatechuate (0.015 mmol); (D), reaction mixture of ethyl protocatechuate (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol); (E), DPPH (0.030 mmol) was added to a mixture of catechol (0.015 mmol) and ethyl protocatechuate (0.015 mmol).

▽, 1, 4-dioxane (external standard); ▼, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine; ○, remaining peaks of ethyl protocatechuate.

Methyl caffeate: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 166.6 (C-9), 147.7 (C-7), 145.2 (C-4), 144.5 (C-3), 126.3 (C-1), 121.3 (C-6), 115.1 (C-5), 114.0 (C-2), 113.9 (C-8), 50.2 (-CH₃) (Ravn ら, 1988).

Methyl hydrocaffeate: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 172.3 (C-9), 144.4 (C-4), 142.9 (C-3), 132.2 (C-1), 119.1 (C-6), 114.9 (C-5), 114.8 (C-2), 50.3 (-CH₃), 35.3 (C-8), 29.8 (C-7) (Ravn ら, 1988).

2) 2種類のポリフェノールの抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で, catechol (0.015 mmol) と ethyl protocatechuate (0.015 mmol) を混合し, これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った. Quercetin と (+)-taxifolin, luteolin と eriodictyol, methyl caffeate と methyl hydrocaffeate についても同様の測定を行った.

3 結果および考察

a Catechol と DPPH の反応

ポリフェノールの最も単純な基本構造のモデルとして最初に 1, 2-dihydroxybenzene (catechol) を選択した.

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で, catechol (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 10-B). 測定結果を標品である catechol のスペクトル (Fig. 10-A) (Materska ら, 2003) と比較したところ, catechol のすべてのシグナル (δ 116.2, 120.8, 146.0) が完全に消失し, 新しいシグナル (δ 131.5, 140.2, 181.2) が見出された. カルボニルシグナル (δ 181.2) が現れたことから, catechol は, (+)-catechin や (-)-epicatechin の B 環と同様に, DPPH と反応して *o*-キノンに変化すると考えられた.

b Ethyl protocatechuate と DPPH の反応

天然由来の catechol 構造をもつ簡単な化合物として protocatechuic acid があげられる. また protocatechuic acid のエチルエステルである ethyl protocatechuate は, 酸化防止剤として加工食品などに用いられる. 今回の実験では ethyl protocatechuate を用いた.

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で, ethyl protocatechuate (0.015

mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 10-D). 測定結果を ethyl protocatechuate のスペクトル (Fig. 10-C) (Materska ら, 2003) と比較したところ, ethyl protocatechuate のすべてのシグナル [-CH₃ (δ 14.6), -CH₂- (δ 60.9), C-5 (δ 115.7), C-2 (δ 117.2), C-1, 6 (δ 123.3), C-3 (δ 145.6), C-4 (δ 150.7), C=O (δ 166.5)] が小さくなったが, catechol とは異なり新しいシグナルが現れることはなかった. このことから, 同じ catechol 構造をもつ化合物でも, カルボニル基がベンゼン環と共役する ethyl protocatechuate は, DPPH と反応してもキノン構造として安定化せず, catechol とは抗酸化機構が異なると考えられた. すなわち Ethyl protocatechuate は, カルボニル基が catechol 構造と共役していることにより, DPPH と反応した際には, 電子の移動がエステルカルボニルまで起こるために, *o*-キノン構造が NMR によって観測できないのだと考えられた (Fig. 11).

c Catechol と ethyl protocatechuate の抗酸化能力の比較

Catechol (0.015 mmol) と ethyl protocatechuate (0.015 mmol) を acetone- d_6 (0.54 mL) 中で混合し, これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行い, DPPH がどちらの化合物と先に反応するかを比較した (Fig. 10-E). 標品である catechol (Fig. 10-A), ethyl protocatechuate (Fig. 10-C) のスペクトルと比較した結果, catechol 由来のシグナルは小さくなり, ethyl protocatechuate 由来のシグナル (○) に変化はなかった. カルボニルシグナル (δ 181.2) が現れたことから, catechol が先に DPPH と反応したことがわかった. すなわち, catechol にカルボニル基が共役した化合物よりも共役のない化合物の方が早くフリーラジカルを除去できることがわかった.

d Quercetin と DPPH の反応

Quercetin は, 茶にはもちろんのこと, 多くの植物に含まれるフラボノール的一种であり, (+)-catechin や (-)-epicatechin と同じ *o*-dihydroxyl flavonoid でありな

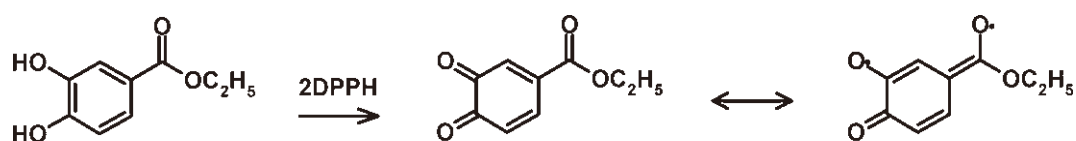


Fig.11 Plausible structure of an ethyl protocatechutate radical generated by DPPH.

がら、2, 3 位に B 環と共役した二重結合を有するなど、ethyl protocatechuate と化学構造的に共通した特徴をもっている。Ethyl protocatechuate が catechol とは異なる抗酸化機構であることが明らかになったことから、今回 quercetin についても調査を試みた。

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で、quercetin (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 12-B)。測定結果を標品である quercetin のスペクトル (Fig. 12-A) (Markham ら, 1976) と比較したところ、quercetin のすべてのシグナルが消失し、ethyl protocatechuate と同様にカルボニルシグナルは現れなかった。このことから、catechol 構造に 2, 3 位のオレフィン二重結合が共役する quercetin も、ethyl protocatechuate と同様に、DPPH と反応してもキノン構造として安定化せず、catechol とは抗酸化機構が異なると考えられた。すなわち quercetin も、オレフィン二重結合が catechol 構造と共役していることにより、DPPH と反応した際には、電子の移動が C 環まで起こ

るために、*o*-キノン構造が NMR によって観測できないのだと考えられた。

e (+)-Taxifolin と DPPH の反応

Dihydroquercetin として (+)-taxifolin が天然中に存在する。Catechol 構造に共役する二重結合の存否で抗酸化機構が異なることを確認するために、(+)-taxifolin を実験に用いた。

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で、(+)-taxifolin (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 12-D)。測定結果を (+)-taxifolin のスペクトル (Fig. 12-C) (Markham ら, 1976) と比較したところ、B 環に由来するシグナル [C-2', 5' (δ 115.8, 115.9), C-6' (δ 120.8), C-1' (δ 129.8), C-3' (δ 145.7), C-4' (146.6)] が小さくなり、ふたつのカルボニルシグナル (δ 180.5, 180.8) が新しく見出された。このことから、B 環に共役する 2, 3 位のオレフィン二重結合のない (+)-taxifolin は、

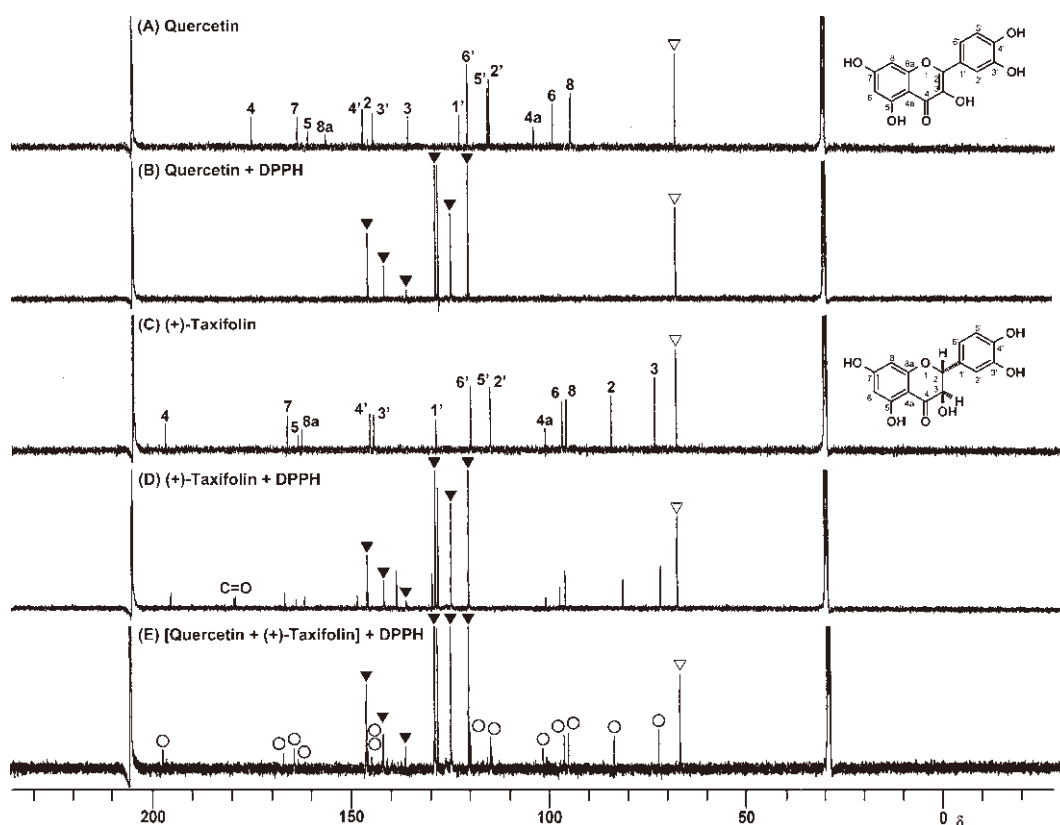


Fig.12 ^{13}C NMR analyses (acetone- d_6 , 125 MHz) to examine the reactivity of quercetin and (+)-taxifolin with DPPH. (A), quercetin (0.015 mmol); (B), reaction mixture of quercetin (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol); (C), (+)-taxifolin (0.015 mmol); (D), reaction mixture of (+)-taxifolin (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol); (E), DPPH (0.030 mmol) was added to a mixture of quercetin (0.015 mmol) and (+)-taxifolin (0.015 mmol). ∇ , 1, 4-dioxane (external standard); \blacktriangledown , 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine; \circ , remaining peaks of (+)-taxifolin.

quercetinとは異なり、(+)-catechinや(-)-epicatechinと同様に、B環がキノン構造に変化することでラジカルを消去することがわかった。したがって、catechol構造に共役する二重結合の存在が、化合物の抗酸化機構に大きく関係していることが強く示唆された。

この説を補強するために、quercetin、(+)-taxifolinと比較して、3位の水酸基がないluteolin (0.015 mmol)とeriodictyol (0.015 mmol)を、それぞれDPPH (0.030 mmol)と反応させた。¹³C-NMR測定の結果、2, 3位二重結合を有するluteolinのすべてのシグナルは消失し、カルボニルシグナルは現れなかった(データ省略)。これはquercetinと同じ結果であった。一方2, 3位二重結合のないeriodictyolは、B環がキノン構造に変化し、(+)-taxifolinと同じ結果になることがわかった(データ省略)。

f Methyl caffeateとDPPHの反応

Caffeic acidは、quinic acidとのエステル(chlorogenic acid)として多くの植物に含まれ、茶にも存在する。Catechol構造とオレフィン二重結合が共役しているため、methyl caffeateをモデル化合物として次の実験に用いた。

Acetone-*d*₆ (0.54 mL)中で、methyl caffeate (0.015 mmol)とDPPH (0.030 mmol)を反応させた。¹³C-NMR測定の結果、methyl caffeateのすべてのシグナルが消失し、カルボニルシグナルは現れなかった(データ省略)。この結果はethyl protocatechuate, quercetin, luteolinと同じであった。

g Methyl hydrocaffeateとDPPHの反応

続いて、methyl hydrocaffeateをモデル化合物として実験を行った。

Acetone-*d*₆ (0.54 mL)中で、methyl hydrocaffeate (0.015 mmol)とDPPH (0.030 mmol)を反応させた。¹³C-NMR測定の結果、methyl hydrocaffeateのほとんどのシグナル[C-7 (δ 29.8), C-8 (δ 35.3), C-2 (δ 114.8), C-5 (δ 114.9), C-6 (δ 119.1), C-1 (δ 132.2), C-3 (δ 142.9), C-4 (144.4)]が消失し、ふたつのカルボニルシグナル(δ 179.0, 179.8)が新しく見出された(データ省略)。このことから、catechol構造に共役する二重結合のないmethyl hydrocaffeateは、catecholなどと同様に、キノン構造に変化することでラジカルを消去することがわかった。

以上のことから、catechol構造に共役する二重結合の存在が、化合物の抗酸化機構に関係していることがわかった。

h Quercetinと(+)-taxifolinの抗酸化能力の比較

Acetone-*d*₆ (0.54 mL)中で、quercetin (0.015 mmol)と(+)-taxifolin (0.015 mmol)を混合し、これにDPPH (0.030 mmol)を反応させ、DPPHの紫色があせた時点で¹³C-NMR測定を行い、DPPHがどちらの化合物と先に反応するかを比較した(Fig. 12-E)。標品であるquercetin (Fig. 12-A)、(+)-taxifolin (Fig. 12-C)のスペクトルと比較した結果、quercetin由来のシグナルは消失し、(+)-taxifolin由来のシグナル(○)に変化はなかった。カルボニルシグナルが現れなかったことから、quercetinの方が(+)-taxifolinよりも先にDPPHと反応したことがわかった。すなわち、catechol構造に2, 3位のオレフィン二重結合が共役した化合物の方が、共役のない化合物よりも早くフリーラジカルを消去できることがわかった。

Luteolinとeriodictyolについても比較したところ、同様にcatechol構造にオレフィン二重結合が共役するluteolinの方が早くフリーラジカルを消去した(データ省略)。

Methyl caffeateとmethyl hydrocaffeateについても同様にmethyl caffeateの方が早くフリーラジカルを消去することがわかった(データ省略)。

Catecholが、ethyl protocatechuateよりも先にフリーラジカルを消去できることを考えると、catechol構造に共役する二重結合がカルボニル基かオレフィンかの違いで、共役のない化合物よりも抗酸化能力が強くなったり弱くなったりすることは興味深い結果である。

V DPPHを用いたpyrogallol誘導体の抗酸化機構のNMRによる解析

1 目的

前章では、catecholとその誘導体を中心に研究を行い、catechol構造に共役する二重結合の有無によりcatechol誘導体の抗酸化機構が異なるという興味深い知見を得た。

しかし、III章では、catechol構造をもつ(-)-epicatechinよりも(-)-epigallocatechinの方が早くフリーラジカルを消去することが確認できており、ポリフェノールの抗酸化機構を明らかにするには、さらにpyrogallolの誘導体についても詳しく研究を進める必要がある。

本章では、まず最も単純なモデル化合物としてpyrogallolを選択し、DPPHとの反応を¹³C-NMRを用いて観測した。また、pyrogallol構造にオレフィン二重結合が共役する化合物としてmyricetinを研究に用いた。一方没

食子酸は pyrogallol 構造にカルボニル二重結合が共役する化合物であるが、大半がカテキン類とエステル結合していることを考慮して、ethyl gallate をモデル化合物に用いた。

さらに、これらの化合物から2種類ずつ選択して抗酸化能力を比較した。

最後には、catechol 誘導体の中で最も早くフリーラジカルを消去すると考えられる quercetin と、pyrogallol 誘導体の間で抗酸化能力の比較を行った。

2 方法

a ^{13}C -NMR 測定

Ⅲ, Ⅳ章に準じる。

b 基準物質

Ⅲ, Ⅳ章に準じ、1, 4-dioxane を用いた。

c 測定試料の調製

1) ポリフェノールと DPPH の反応

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中に pyrogallol (0.015 mmol) を溶解させ、 ^{13}C -NMR 測定を行った後に、DPPH (0.045 mmol) を加え、DPPH の紫色があせた時点で再度 ^{13}C -NMR 測定を行った。Ethyl gallate についても同様の測定を行った。Myricetin については 0.030 mmol の DPPH を加えた。

Pyrogallol: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 146.8 (C-1, -3), 133.8 (C-2), 120.0 (C-5), 108.1 (C-4, -6) (Materska ら, 2003) (Fig. 13-A) .

Myricetin: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 176.5 (C-4), 165.0 (C-7), 162.3 (C-5), 157.7 (C-8a), 146.9 (C-2), 146.4 (C-3', 5'), 136.9 (C-4'), 136.4 (C-3), 122.8 (C-1'), 108.3 (C-2', -6'), 104.1 (C-4a), 99.1 (C-6), 94.4 (C-8) (Kazuma ら, 2003) (Fig. 13-C) .

Ethyl gallate: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 166.7 (C=O), 146.1 (C-3, -5), 138.6 (C-4), 122.1 (C-1), 109.7 (C-2, -6), 60.9 (-CH₂-), 14.6 (-CH₃) (Nishikawa ら, 1998) (Fig. 14-A) .

2) 2種類のポリフェノールの抗酸化能力の比較

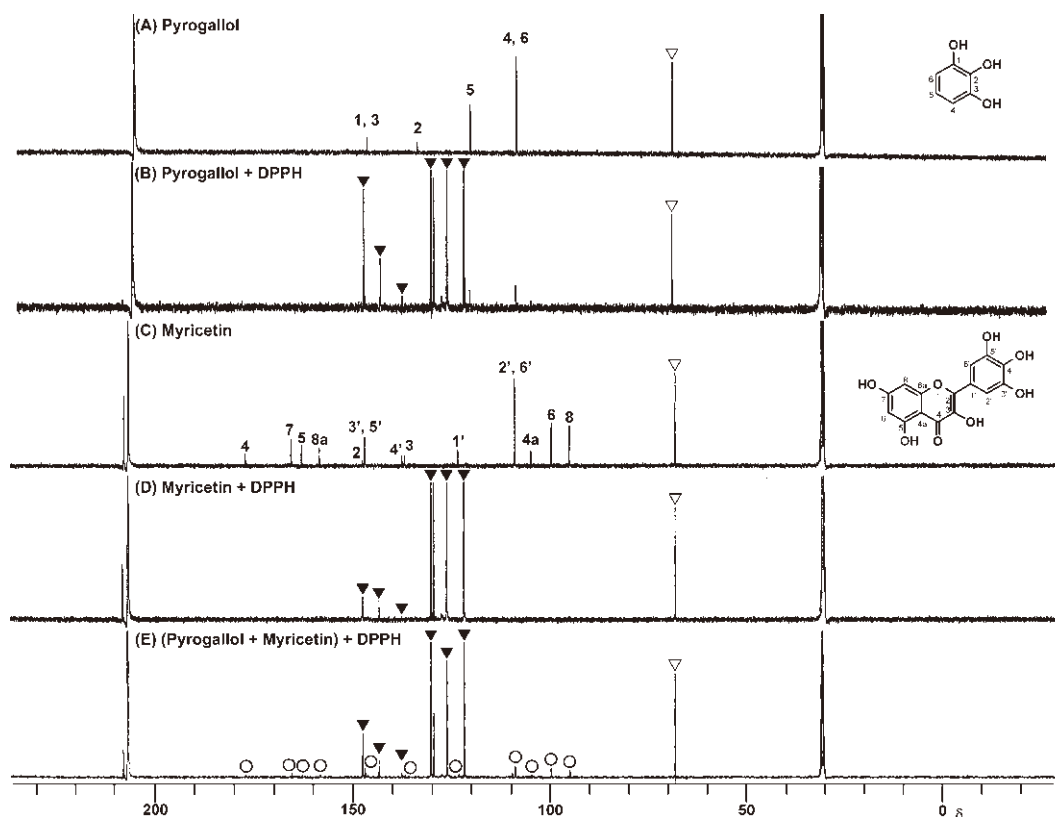


Fig.13 ^{13}C NMR analyses (acetone- d_6 , 125 MHz) to examine the reactivity of pyrogallol and myricetin with DPPH.

(A), pyrogallol (0.015 mmol); (B), reaction mixture of pyrogallol (0.015 mmol) and DPPH (0.045 mmol); (C), myricetin (0.015 mmol); (D), reaction mixture of myricetin (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol); (E), DPPH (0.045 mmol) was added to a mixture of pyrogallol (0.015 mmol) and myricetin (0.015 mmol) .

∇, 1, 4-dioxane (external standard); ▼, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine; ○, remaining peaks of myricetin.

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で, pyrogallol (0.015 mmol) と myricetin (0.015 mmol) を混合し, これに DPPH (0.045 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った. Ethyl gallate と quercetin についても同様の測定を行った. Myricetin と ethyl gallate については 0.030 mmol の DPPH を加えた.

3 結果および考察

a Pyrogallol と DPPH の反応

まず, ベンゼン環に水酸基が3つ結合した vicinal-trihydroxyl 芳香族化合物のうち, 最も単純な構造であるモデル化合物として, pyrogallol を実験に用いた.

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で, pyrogallol (0.015 mmol) と DPPH (0.045 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 13-B). 測定結果を標品である pyrogallol のスペクトル (Fig. 13-A) (Materska ら, 2003) と比較したところ, pyrogallol のシグナルは小さくなり, 新しいシグナルは現れなかった. このことから, pyrogallol は, DPPH と反応してもキノン構造として安定化することではなく, (-)-epigallocatechin と同様ラジカルとして安定化するものと考えられた.

b Myricetin と DPPH の反応

Myricetin は茶に含まれるフラボノールの一種である. Vicinal-trihydroxyl flavonol のモデル化合物として実験に用いた.

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で, myricetin (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 13-D). 測定結果を myricetin のスペクトル (Fig. 13-C) (Kazuma ら, 2003) と比較したところ, myricetin のすべてのシグナルが消失し, 新しいシグナルは現れなかった. このことから, myricetin も, pyrogallol と同様に, DPPH と反応してもキノン構造としては安定化することではなく, ラジカルとして安定化するものと考えられた. Catechol 誘導体の場合とは異なり, pyrogallol に共役するオレフィン二重結合の有無は, 抗酸化機構には見かけ上影響はないように考えられた.

c Pyrogallol と myricetin の抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で, pyrogallol (0.015 mmol) と myricetin (0.015 mmol) を混合し, これに DPPH (0.045 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -

NMR 測定を行い, DPPH がどちらの化合物と先に反応するかを比較した (Fig. 13-E). 標品である pyrogallol (Fig. 13-A), myricetin (Fig. 13-C) のスペクトルと比較した結果, pyrogallol 由来のシグナルは小さくなり, myricetin 由来のシグナル (○) に変化はなかった. したがって, pyrogallol の方が, myricetin よりも先に DPPH と反応したことがわかった. このことから, pyrogallol 構造に二重結合が共役する化合物よりも, 共役のない化合物の方が先にフリーラジカルを消去すると考えられた. Catechol 構造の場合では, オレフィン二重結合が共役する化合物の方が, 共役のない化合物よりも早くフリーラジカルを消去できたのに対し, pyrogallol 構造の場合は興味深い結果となった. これは, pyrogallol と catechol の抗酸化機構の違いに原因があるものと考えられた. すなわち, catechol は DPPH と反応することによりキノン構造に変化するが, pyrogallol は DPPH と反応してもキノン構造として安定化せず, pyrogallol の方が catechol よりも抗酸化能力が優れることから, それぞれの構造にオレフィン二重結合が共役した際の抗酸化能力の変化に差が出てくるものと推測される.

d Ethyl gallate と DPPH の反応

没食子酸 (gallic acid) は多くの植物に含まれるポリフェノールの一種であり, 茶にはおもに, (-)-epicatechin や (-)-epigallocatechin と 3 位でエステル結合して, (-)-epicatechin gallate や (-)-epigallocatechin gallate として存在する. 今回, モデル化合物として ethyl gallate を選択し, 実験を行った.

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で, ethyl gallate (0.015 mmol) と DPPH (0.045 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 14-B). 測定結果を標品である ethyl gallate のスペクトル (Fig. 14-A) (Nishikawa ら, 1998) と比較したところ, ethyl gallate のすべてのシグナルが小さくなり, 新しいカルボニルシグナルは現れなかった. このことから, ethyl gallate は, DPPH と反応してもキノン構造としては安定化することではなく, Yoshida ら (1989) の ESR を用いた研究にあるように, ラジカルとして安定化するものと考えられた.

これまでの実験から, pyrogallol 構造をもつ化合物はすべて, キノン構造には変化せずにフリーラジカルを消去すると推察された.

e Myricetin と ethyl gallate の抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で, myricetin (0.015 mmol) と ethyl gallate (0.015 mmol) を混合し, これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行い, DPPH がどちらの化合物と先に反応するかを比較した (Fig. 14-C). 標品である myricetin (Fig. 13-C), ethyl gallate (Fig. 14-A) のスペクトルと比較した結果, myricetin 由来のシグナルは小さくなり, ethyl gallate 由来のシグナル (○) に変化はなかった. したがって, myricetin の方が ethyl gallate よりも先に DPPH と反応したことがわかった. このことから, pyrogallol 構造にカルボニル基が共役する化合物よりも, pyrogallol 構造にオレフィン二重結合が共役する化合物の方が抗酸化能力は優れると考えられた. これは catechol 誘導体のときと同様の結果であった.

また, 以上のことから, pyrogallol は, ethyl gallate よりも早くフリーラジカルを消去できると考えられ, (-)-epigallocatechin gallate については, galloyl 基よりも B 環でまずフリーラジカルを消去すると考えられた. した

がって, (-)-epigallocatechin gallate は, B 環の構造が同じ (-)-epigallocatechin と同程度の抗酸化能力であると考えられた.

f Ethyl gallate と quercetin の抗酸化能力の比較

Catechol 誘導体と pyrogallol 誘導体で, どちらが早くフリーラジカルを消去できるかを知るために, 次の実験を行った. 実験に用いたのは, 上記の実験により, pyrogallol 誘導体のうち最も抗酸化能力が劣るとされた ethyl gallate と, IV 章の実験により, catechol 誘導体のうち, luteolin などとともに最も抗酸化能力が優れるとされた quercetin である.

Acetone- d_6 (0.54 mL) 中で, ethyl gallate (0.015 mmol) と quercetin (0.015 mmol) を混合し, これに DPPH (0.045 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行い, DPPH がどちらの化合物と先に反応するかを比較した (Fig. 14-D). 測定結果を標品である quercetin (Fig. 12-A), ethyl gallate (Fig. 14-A) のスペクトルと比較した結果, ethyl gallate 由来のシグナルは小さ

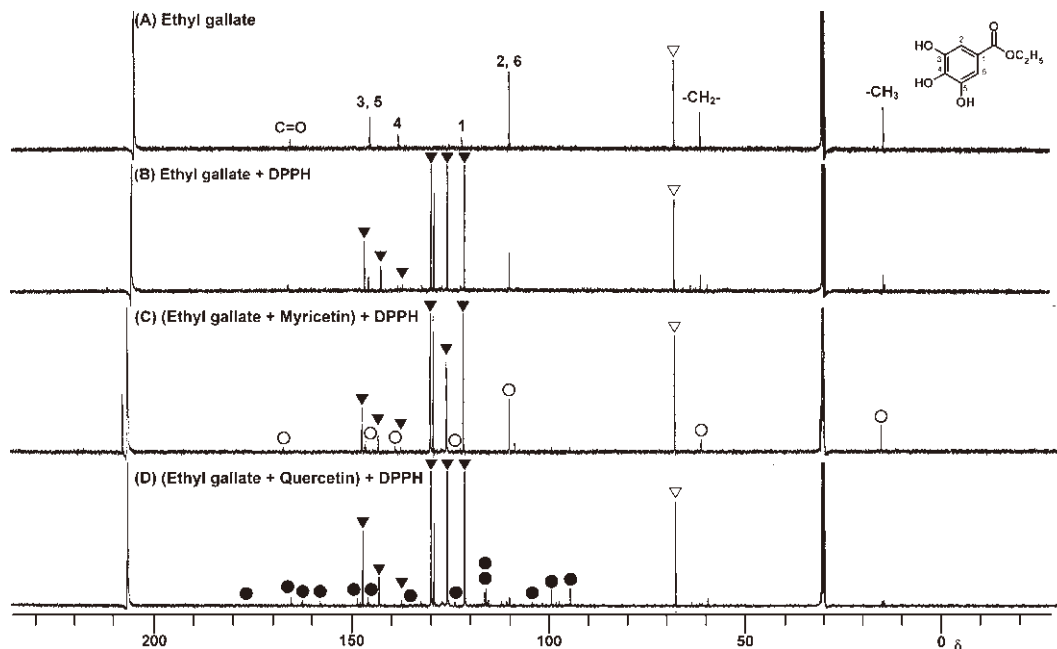


Fig.14 ^{13}C NMR analyses (acetone- d_6 , 125 MHz) to examine the reactivity of ethyl gallate, myricetin, and quercetin with DPPH.

(A), ethyl gallate (0.015 mmol); (B), reaction mixture of ethyl gallate (0.015 mmol) and DPPH (0.045 mmol); (C), DPPH (0.030 mmol) was added to a mixture of ethyl gallate (0.015 mmol) and myricetin (0.015 mmol); (D), DPPH (0.030 mmol) was added to a mixture of ethyl gallate (0.015 mmol) and quercetin (0.015 mmol).

▽, 1, 4-dioxane (external standard); ▼, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine; ○, remaining peaks of ethyl gallate; ●, remaining peaks of quercetin.

くなり、quercetin由来のシグナル(●)に変化はなかった。したがって、ethyl gallateの方がquercetinよりも先にDPPHと反応したことがわかった。このことから、catechol構造を有する化合物よりもpyrogallol構造を有する化合物の方が抗酸化能力が優れることが示唆された。

以上のことから、quercetinよりもmyricetinの方が抗酸化能力が優れることがわかった。Rice-Evansら(1996)、Yangら(2001)の報告とは結果が逆であり、実験系の違いによるものと推察された。

また、ethyl gallateは、(-)-epicatechinよりも早くフリーラジカルを消去できると考えられ、(-)-epicatechin gallateについては、(-)-epigallocatechin gallateの場合とは逆に、B環よりもgalloyl基でまずフリーラジカルを消去すると考えられた。

以上の結果をFig. 15にまとめて示す。これまでESR(Nanjoら, 1996; Nanjoら, 1999)や分光光度計(Yoshidaら, 1989; Yokozawaら, 1998)を用いてDPPHラジカルの消去活性を測定した報告は多く、たいてい(-)-epigallocatechinよりも(-)-epicatechin gallateの方がラジカル消去活性が高いと結論づけているが、本研究では、(-)-epigallocatechinの方が(-)-epicatechin gallateよりも早くDPPHラジカルを消去できると考えられた。これは、(-)-epigallocatechinと(-)-epicatechin gallateのそれぞれが消去できるラジカルの総数を個別に測定して比較した報告と、同一セル内で(-)-epigallocatechinと(-)-epicatechin gallateの2種類のカテキンのうちどちらが先にDPPHを消去できるかを調べた本研究の違いによるものと考えられる。本研究のような手法により、NMRを用いてラジカル消去能力を直接的に比較した例はまれであり、これにより、どちらのポリフェノールがDPPHラジカルを先に消去するか、その順序をFig. 15のように新しくまとめることができた。

VI DPPHを用いたascorbic acidの抗酸化機構のNMRによる解析

1 目的

前章までにカテキン類をはじめとしたポリフェノール化合物について、その抗酸化機構を解明し、またそれぞれの抗酸化能力を比較して構造活性相関を明らかにしてきたが、チャにはascorbic acidなど非ポリフェノール性の抗酸化成分も含まれており、ascorbic acidとポリフェノール化合物の相互の抗酸化能力を比較しなければチャ

成分の抗酸化作用を明らかにすることはできない。

本章では、ascorbic acidについて、DPPHとの反応を ^{13}C -NMRを用いて観測した。

また、ascorbic acidとポリフェノールの間で抗酸化能力の比較を行った。

さらに、ポリフェノールにDPPHを反応させてポリフェノールがフリーラジカルにより酸化されたあとで、ascorbic acidを加えることにより、酸化されたポリフェノールをascorbic acidが還元できるか試験した。

2 方法

a ^{13}C -NMR測定

III, IV, V章に準じる。

b 基準物質

内部標準物質としてtetramethylsilaneを用いた。

ただし、Fig. 18については、III, IV, V章に準じ、1, 4-dioxaneを用いた。

c 測定試料の調製

1) Ascorbic acidとDPPHの反応

Methanol- d_4 (0.35 mL)中に溶解させたascorbic acid (0.015 mmol)とacetone- d_6 (0.35 mL)中に溶解させたDPPH (0.030 mmol)を反応させ、DPPHの紫色があせた時点で ^{13}C -NMR測定を行った。

Ascorbic acid: ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 125 MHz) δ 173.6 (C-1), 155.1 (C-3), 119.9 (C-2), 77.0 (C-4), 70.8 (C-5), 63.7 (C-6) (Nishikawaら, 1998) (Fig. 16-A)。

Dehydroascorbic acid: ^{13}C NMR (methanol- d_4 , 125 MHz, dehydroascorbic acidは2位で溶媒和してbicyclic dehydroascorbic acidのエナンチオマーに変化する) δ 172.5 (C-1), 107.4 (C-3), 95.2 (C-2), 89.5 (C-4), 77.1 (C-6), 74.8 (C-5); δ 171.6 (C-1), 106.9 (C-3), 94.7 (C-2), 89.3 (C-4), 77.0 (C-6), 74.7 (C-5) (Nishikawaら, 1998) (Fig. 16-C)。

2) Ascorbic acidと(+)-catechinの抗酸化能力の比較

Methanol- d_4 (0.35 mL)中に溶解させたascorbic acid (0.015 mmol)とacetone- d_6 (0.35 mL)中に溶解させた(+)-catechin (0.015 mmol)を混合し、これにDPPH (0.030 mmol)を反応させ、DPPHの紫色があせた時点で ^{13}C -NMR測定を行った。

Acetone- d_6 (0.35 mL)中に溶解させた(+)-catechin (0.015 mmol)にDPPH (0.030 mmol)を反応させ、DPPH

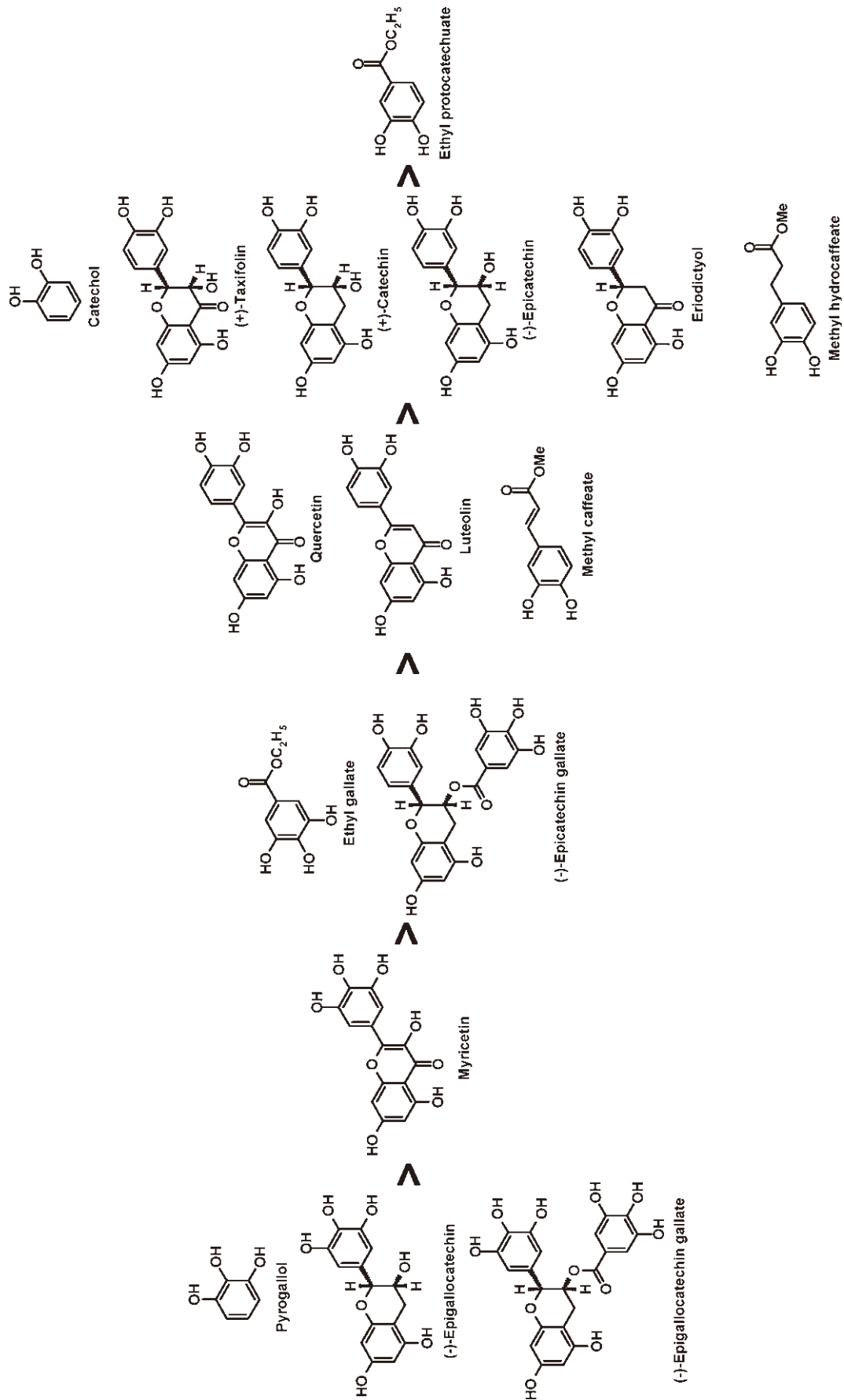


Fig.15 The suggested order of radical-scavenging ability (speed) .

の紫色があせた時点で、methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

Methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と、acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、(+)-catechin (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

3) Ethyl gallate と (+)-catechin の抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中に溶解させた (+)-catechin (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、ethyl gallate (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中に溶解させた ethyl gallate (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、(+)-catechin (0.015 mmol) を

加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

4) Ascorbic acid と ethyl gallate の抗酸化能力の比較

Methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた ethyl gallate (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った。

Acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた ethyl gallate (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

Methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と、acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、ethyl gallate (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -

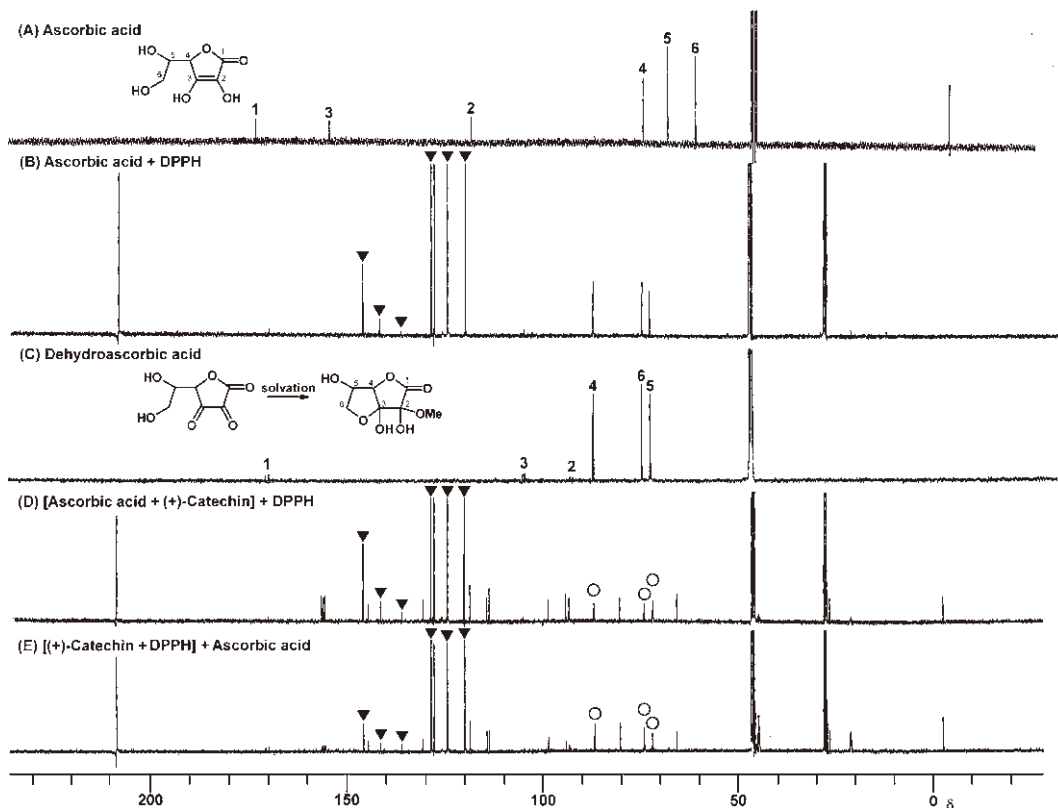


Fig.16 ^{13}C NMR analyses (125 MHz) to examine reactivity of ascorbic acid and (+)-catechin with DPPH.

(A), ascorbic acid (0.015 mmol) in methanol- d_4 ; (B), reaction mixture of ascorbic acid (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol) [acetone- d_6 :methanol- d_4 = 1:1 (v/v)]; (C), dehydroascorbic acid (0.015 mmol) in methanol- d_4 ; (D), DPPH (0.030 mmol) was added to a mixture of ascorbic acid (0.015 mmol) and (+)-catechin (0.015 mmol) [acetone- d_6 :methanol- d_4 = 1:1 (v/v)]; (E), ascorbic acid (0.015 mmol) was added to a reaction mixture of (+)-catechin (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol) [acetone- d_6 :methanol- d_4 = 1:1 (v/v)].
 ▼, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine; ○, C-2 solvated bicyclic dehydroascorbic acids.

NMR 測定を行った。

5) Ascorbic acid と pyrogallol の抗酸化能力の比較

Methanol- d_4 (0.27 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と acetone- d_6 (0.27 mL) 中に溶解させた pyrogallol (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った。

3 結果および考察

a Ascorbic acid と DPPH の反応

Methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 16-B)。測定結果を標品である ascorbic acid のスペクトル (Fig. 16-A) (Nishikawa ら, 1998) と比較したところ、ascorbic acid に由来するシグナル (δ 63.7, 70.8, 77.0, 119.9, 155.1, 173.6) が完全に消失し、新しいシグナル (δ 74.6, 74.8, 76.7, 76.9, 89.2, 89.3, 106.8, 171.1) が現れた。これらの新しいシグナルは、dehydroascorbic acid の2位が methanol- d_4 と溶媒和してできた bicyclic dehydroascorbic acid (Fig. 16-C) と帰属された (Nishikawa ら, 1998)。このことから、ascorbic acid は、DPPH と反応すると、まず dehydroascorbic acid に変化し、それが methanol- d_4 と溶媒和していると考えられた。したがって、ascorbic acid は、2, 3 位の水酸基でラジカルを消去し、dehydroascorbic acid に変化することがわかった。

b Ascorbic acid と (+)-catechin の抗酸化能力の比較

Methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた (+)-catechin (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 16-D)。標品である (+)-catechin (Fig. 5-A), ascorbic acid (Fig. 16-A) のスペクトルと比較した結果、ascorbic acid 由来のシグナルは完全に消失し、新たに bicyclic dehydroascorbic acid のシグナル (○) が現れていることがわかった。(+) -Catechin 由来のシグナルに変化はなく、(+)-catechin が DPPH と反応したときに現れるふたつのカルボニルシグナルも現れることはなかった。すなわち、ascorbic acid は、(+)-catechin よりも先に DPPH と反応して dehydroascorbic acid に変化し、その後溶媒和して bicyclic dehydroascor-

bic acid になることが確認できた。つまり ascorbic acid は、(+)-catechin よりも早くフリーラジカルを消去することがわかった。

(+) -Catechin (0.015 mmol) は DPPH (0.030 mmol) と反応すると、B 環がキノン構造に変化することでフリーラジカルを消去する (Fig. 5)。その後これに ascorbic acid を加えることで、(+)-catechin の構造がどのように変化するかを確認するために、次の実験を行った。Acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた (+)-catechin (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) を加えた。 ^{13}C -NMR の測定結果 (Fig. 16-E) を (+)-catechin (Fig. 5-A), ascorbic acid (Fig. 16-A) のスペクトルと比較したところ、(+)-catechin が DPPH と反応して B 環がキノン構造に変化することにより生じていたふたつのカルボニルシグナル (δ 180.5, 181.2) は消失し、(+)-catechin は本来の構造にもどっていることがわかった。一方、ascorbic acid 由来のシグナルは完全に消失し、新たに bicyclic dehydroascorbic acid のシグナル (○) が現れていることがわかった。すなわち、ascorbic acid は、dehydroascorbic acid に変化することで、先に DPPH によりキノン構造に酸化されていた (+)-catechin を、還元できることが確認できた。

一方、methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と、acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、(+)-catechin (0.015 mmol) を加えた。その結果、ascorbic acid は、DPPH と反応した際に、dehydroascorbic acid に変化し、その後溶媒和して bicyclic dehydroascorbic acid に変化しており、その後 (+)-catechin を加えても bicyclic dehydroascorbic acid に変化は起こらなかった。新しくカルボニルシグナルは現れず、(+)-catechin の B 環はキノン構造に変化することはなかった。したがって、(+)-catechin は、DPPH によって酸化された ascorbic acid を再び還元することはできなかった (データ省略)。

c Ethyl gallate と (+)-catechin の抗酸化能力の比較

Catechol 構造を有する (+)-catechin よりも、pyrogallol 構造を有する ethyl gallate の方が早く DPPH ラジカルを消去できることは V 章で述べた。Ascorbic acid が DPPH により酸化された (+)-catechin を還元できたことか

ら、同様に ethyl gallate が DPPH により酸化された (+)-catechin を還元できるかを確認するために、次の実験を行った。Acetone- d_6 (0.70 mL) 中に溶解させた (+)-catechin (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、ethyl gallate (0.015 mmol) を加えた。 ^{13}C -NMR の測定結果 (Fig. 17-A) を標品である (+)-catechin (Fig. 5-A), ethyl gallate (Fig. 14-A) のスペクトルと比較したところ、(+)-catechin が DPPH と反応して B 環がキノン構造に変化することにより生じていたふたつのカルボニルシグナル (δ 180.5, 181.2) は消失し、(+)-catechin は本来の構造にもどっていることがわかった (○)。すなわち、ethyl gallate は、ascorbic acid と同様に、先に DPPH によりキノン構造に酸化されていた (+)-catechin を、還元できることが確認できた。

Ethyl gallate と DPPH の反応については V 章で述べた。Acetone- d_6 (0.70 mL) 中で ethyl gallate (0.015 mmol) と、DPPH (0.030 mmol) を反応させると、ethyl gallate 由来のすべてのシグナルの強度は減少し、ethyl gallate はラジカルとして安定化していると考えられる。これに (+)-catechin (0.015 mmol) を加えても、減少した ethyl gallate のシグナルに変化は起こらず、(+)-catechin の

B 環もキノン構造に変化することはなかった。したがって、(+)-catechin は、DPPH によって酸化された ethyl gallate を再び還元することはできなかった(データ省略)。

d Ascorbic acid と ethyl gallate の抗酸化能力の比較

Methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた ethyl gallate (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 17-B)。測定結果を標品である ethyl gallate (Fig. 14-A), ascorbic acid (Fig. 16-A) のスペクトルと比較した結果、ascorbic acid 由来のシグナルの強度は減少し、新たに bicyclic dehydroascorbic acid のシグナル (●) が現れていることがわかった。Ethyl gallate 由来のシグナルに変化はなかった。すなわち、ascorbic acid は、ethyl gallate よりも先に DPPH と反応して dehydroascorbic acid に変化し、その後溶媒和して bicyclic dehydroascorbic acid になることが確認できた。つまり ascorbic acid は、ethyl gallate よりも早くフリーラジカルを消去できることがわかった。

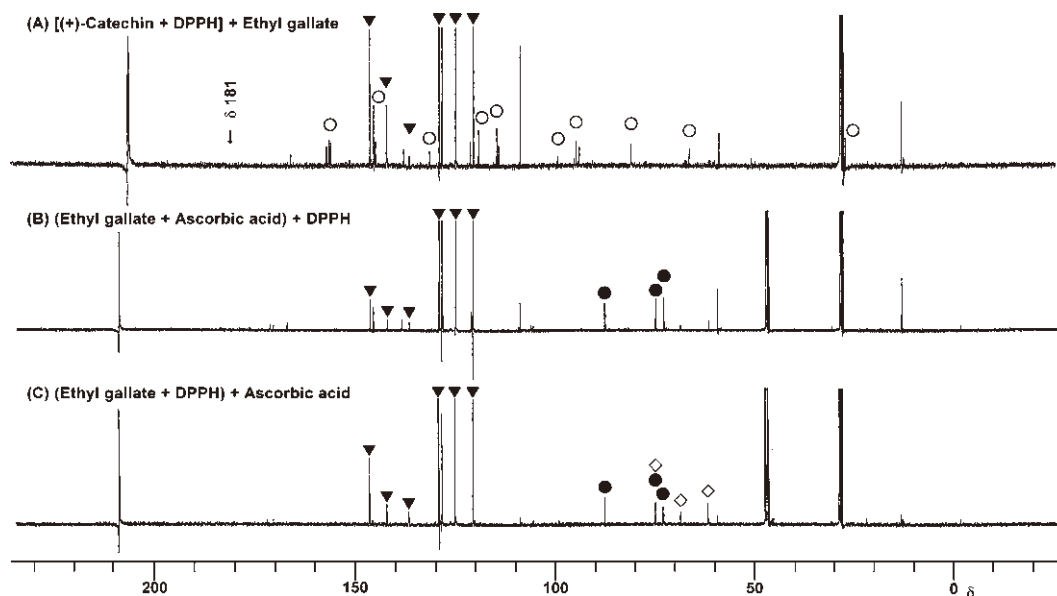


Fig.17 ^{13}C NMR analyses (125 MHz) to examine the reactivity of ethyl gallate, (+)-catechin, and ascorbic acid with DPPH.

(A), ethyl gallate (0.015 mmol) was added to a reaction mixture of (+)-catechin (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol) in acetone- d_6 ; (B), DPPH (0.030 mmol) was added to a mixture of ethyl gallate (0.015 mmol) and ascorbic acid (0.015 mmol) [acetone- d_6 :methanol- d_4 = 1:1 (v/v)]; (C), ascorbic acid (0.015 mmol) was added to a reaction mixture of ethyl gallate (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol) [acetone- d_6 :methanol- d_4 = 1:1 (v/v)].

▼, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine; ○, (+)-catechin; ●, C-2 solvated bicyclic dehydroascorbic acids; ◇, remaining peaks of ascorbic acid.

Acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた ethyl gallate (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) を加えた。 ^{13}C -NMR の測定結果 (Fig. 17-C) を ethyl gallate (Fig. 14-A), ascorbic acid (Fig. 16-A) のスペクトルと比較したところ、新たに bicyclic dehydroascorbic acid のシグナル (●) が現れているものの、ascorbic acid のシグナル (◇) も残存しており、DPPH と反応することにより減少した ethyl gallate のシグナルに変化は見られなかった。このことから、一度 DPPH により酸化された ethyl gallate は、(+)-catechin の場合とは異なり、ascorbic acid を用いても容易には還元できないと考えられた。

一方、methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と、acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、ethyl gallate (0.015 mmol) を加えた。その結果、ascorbic acid は、DPPH と反応した際に、dehydroascorbic acid に変化し、その後溶媒和して bicyclic dehydroascorbic acid に変化しており、その後 ethyl gallate を加えても bicyclic dehydroascorbic acid に変化は起こらなかった。Ethyl gallate のシグナルにも変化はなかった。したがって、ethyl gallate は、DPPH によって酸化された ascorbic acid を再び還元することはできなかった (データ省略)。

e Ascorbic acid と pyrogallol の抗酸化能力の比較

Methanol- d_4 (0.27 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と acetone- d_6 (0.27 mL) 中に溶解させた pyrogallol (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 18)。測定結果を標品である pyrogallol (Fig. 13-A), ascorbic acid (Fig. 16-A) のスペクトルと比較した結果、ascorbic acid 由来のシグナルは完

全に消失し、新たに bicyclic dehydroascorbic acid のシグナル (○) が現れていることがわかった。Pyrogallol 由来のシグナルに変化はなかった。すなわち、ascorbic acid は、pyrogallol よりも先に DPPH と反応して dehydroascorbic acid に変化し、その後溶媒和して bicyclic dehydroascorbic acid になることが確認できた。つまり ascorbic acid は、pyrogallol よりも早くフリーラジカルを消去できることがわかった。

V 章の研究において、最も早くフリーラジカルを消去するポリフェノールの化学構造的条件として、共役する二重結合をもたない pyrogallol 構造があげられていた。今回、ascorbic acid が pyrogallol よりも早くフリーラジカルを消去できたことから、ascorbic acid は、いかなるポリフェノールよりも早くフリーラジカルを消去できると推測された。

これまで ESR (Nanjo ら, 1996) や分光光度計 (Yoshida ら, 1989) を用いて、ascorbic acid とポリフェノールの DPPH ラジカル消去活性を測定した報告はいくつかあり、たいいてい ascorbic acid よりもポリフェノールの方がラジカル消去活性が高いと結論づけているが、本研究では、ascorbic acid の方がいかなるポリフェノールよりも早く DPPH ラジカルを消去できると考えられた。これは、ascorbic acid や各ポリフェノールのそれぞれが消去できるラジカルの総数を個別に測定して比較した報告と、同一セル内で ascorbic acid とポリフェノールのうちどちらが先に DPPH を消去できるかを調べた本研究の違いによるものと考えられる。

今日、缶やペットボトルなどの茶系飲料の製造工程では、酸化防止剤として ascorbate を必ず添加するが (袴田, 1993)、茶浸出液中のカテキン類の酸化を防ぐ目的で ascorbate を添加する製造法は、本研究の結果と一致する理にかなった手法といえ、この観点から、複数の成分が混在した食品中や、生体内を想定し、複数の抗酸化成分のうちどれがまず先にラジカルを除去するのかを追

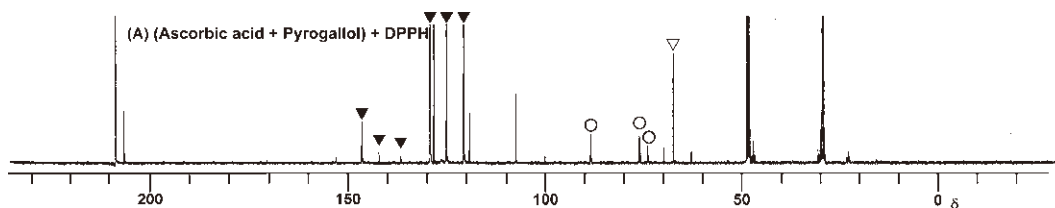


Fig.18 ^{13}C NMR analysis (125 MHz) to examine the reactivity of ascorbic acid and pyrogallol with DPPH.

(A), DPPH (0.030 mmol) was added to a mixture of ascorbic acid (0.015 mmol) and pyrogallol (0.015 mmol) [acetone- d_6 :methanol- d_4 = 1:1 (v/v)].

▽, 1, 4-dioxane (external standard); ▼, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine; ○, C-2 solvated bicyclic dehydroascorbic acids.

究する研究について今後より重要視されるべきである。また、本研究では、2種類の抗酸化成分を同量混合させて試験したが、*in vivo*ではもちろんそれぞれの含量は多様であり、双方の量的な検討も今後の課題である。茶においても、茶にもともと含まれている ascorbic acid では、カテキン類の酸化を防ぐには量的に不十分であるため、缶やペットボトルの製造工程で ascorbate の添加が行われる。今後、複数の抗酸化成分のうちどれがまず先にラジカルを除去するのか、その順序がさらに明らかにされ、また複数の成分の量的な関係も明らかにされていくにつれて、様々な食品中にどのような種類の抗酸化成分がどのような割合で含まれていれば最も効果的なのか、ベストバランスを見出すことができるかもしれない。

Ⅷ DPPH を用いた α -tocopherol の抗酸化機構の NMR による解析

1 目 的

前章では ascorbic acid の抗酸化機構について述べたが、ascorbic acid が水溶性の天然抗酸化物質として知られる一方、脂溶性の抗酸化物質として知られる α -tocopherol (ビタミン E) もチャには豊富に含まれている (山内ら, 1976)。 α -Tocopherol は水に溶けないため通常ヒトが飲用する際には摂取することはできないが、抹茶を飲用したり、粉末にした緑茶を菓子や料理などに混ぜることで、ascorbic acid やカテキン類と一緒に人体内に摂取することができる。また、そもそもチャの生体組織中においては抗酸化成分として樹体を守る役割を十分に果たしているはずであり、蒸して乾燥された加工後の茶製品の段階では、消費前の貯蔵中に品質劣化を起こさないように、 α -tocopherol も抗酸化成分としての役割を十分に果たしていると考えられる。その際には、ascorbic acid やカテキン類など他の抗酸化成分と相互的な役割が果たされているはずであり、NMR のセル中で相互の抗酸化能力を比較することはチャ成分の抗酸化作用を明らかにするために意義深いことである。

本章では、 α -tocopherol について、DPPH との反応を ^{13}C -NMR を用いて観測した。

また、 α -tocopherol と ascorbic acid、ポリフェノールから選択した2種類の成分の間で抗酸化能力を比較した。

さらに、前章と同様に、ポリフェノールと DPPH が反応してポリフェノールがフリーラジカルにより酸化されたあとで、 α -tocopherol を加えることにより、 α -tocopherol が酸化されたポリフェノールを還元でき

るか試験した。

2 方 法

a ^{13}C -NMR 測定

Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ章に準じる。

b 基準物質

内部標準物質として tetramethylsilane を用いた。

c 測定試料の調製

1) α -Tocopherol と DPPH の反応

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中で、 α -tocopherol (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った。

α -Tocopherol: ^{13}C NMR (acetone- d_6 , 125 MHz) δ 146.2 (C-8a), 145.9 (C-6), 122.8 (C-8), 122.4 (C-7), 120.4 (C-5), 117.7 (C-4a), 74.8 (C-2), 40.3 (C-1', -11'), 38.1 (C-3', -5', -7', -9'), 33.3 (C-4', -8'), 32.4 (C-3), 28.6 (C-12'), 25.5 (C-10'), 25.0 (C-6'), 24.1 (C-2a), 22.9 (C-12' a, -13'), 21.7 (C-4, -2'), 20.0 (C-4' a, -8' a), 12.7 (C-7a), 12.0 (C-8b), 11.8 (C-5a) (松尾, 1983) (Fig. 19-A) .

2) Ascorbic acid と α -tocopherol の抗酸化能力の比較

Methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた α -tocopherol (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った。

Acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた α -tocopherol (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

Methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と、acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、 α -tocopherol (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

3) α -Tocopherol と (+)-catechin の抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中で、 α -tocopherol (0.015 mmol) と (+)-catechin (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った。

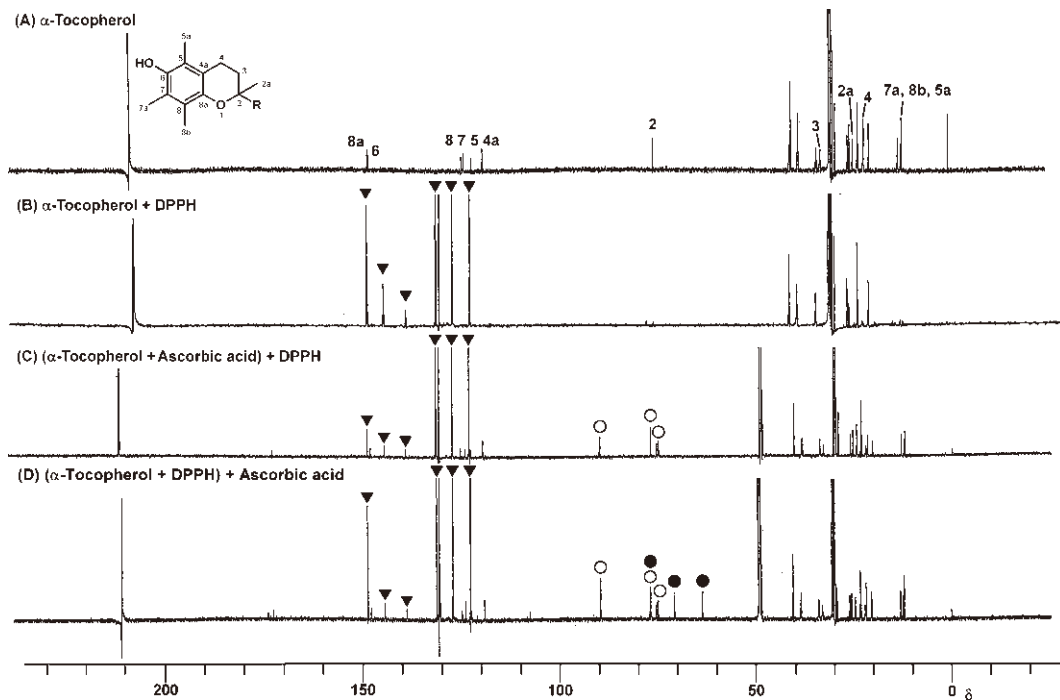


Fig.19 ^{13}C NMR analyses (125 MHz) to examine the reactivity of α -tocopherol and ascorbic acid with DPPH.

(A), α -tocopherol in acetone- d_6 ; (B), reaction mixture of α -tocopherol (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol) in acetone- d_6 ; (C), DPPH (0.030 mmol) was added to a mixture of α -tocopherol (0.015 mmol) and ascorbic acid (0.015 mmol) [acetone- d_6 :methanol- d_4 = 1:1 (v/v)]; (D), ascorbic acid (0.015 mmol) was added to a reaction mixture of α -tocopherol (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol) [acetone- d_6 :methanol- d_4 = 1:1 (v/v)].

▼, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine; ○, C-2 solvated bicyclic dehydroascorbic acids; ●, remaining peaks of ascorbic acid; R, $\text{C}_{16}\text{H}_{32}$.

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中に溶解させた (+)-catechin (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、 α -tocopherol (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中に溶解させた α -tocopherol (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、(+)-catechin (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

4) α -Tocopherol と ethyl gallate の抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中に溶解させた α -tocopherol (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、ethyl gallate (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

Acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた ethyl gallate (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で、 α -tocopherol (0.015 mmol) を加え、その後 ^{13}C -NMR 測定を行った。

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中で、 α -tocopherol (0.015

mmol) と ethyl gallate (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った。

5) α -Tocopherol と pyrogallol の抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中で、 α -tocopherol (0.015 mmol) と pyrogallol (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.045 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った。

6) α -Tocopherol と quercetin の抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中で、 α -tocopherol (0.015 mmol) と quercetin (0.015 mmol) を混合し、これに DPPH (0.045 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った。

3 結果および考察

a α -Tocopherol と DPPH の反応

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中で、 α -tocopherol (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ、DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 19-B)。測

定結果を標品である α -tocopherol のスペクトル (Fig. 19-A) (松尾, 1983) と比較したところ, α -tocopherol の chroman 環に由来するシグナル [C-5a (δ 11.8), C-8b (δ 12.0), C-7a (δ 12.7), C-4 (δ 21.7), C-2a (δ 24.1), C-3 (δ 32.4), C-2 (δ 74.8), C-4a (δ 117.7), C-5 (δ 120.4), C-7 (δ 122.4), C-8 (δ 122.8), C-6 (δ 145.9), C-8a (δ 146.2)] が小さくなっていることがわかった. 残りの側鎖に由来するシグナルにはほとんど変化は見られなかった. α -Tocopherol 1 分子は 2.0 から 2.5 分子のラジカルを補足し (Burton ら, 1981; Niki ら, 1984; Moon ら, 1998), 自身は α -tocopherylquinone に変化すると報告されている (Liebler ら, 1990; Matsuo ら, 1987; Yamauchi ら, 1990) が, Fig. 19-B ではカルボニルシグナルは観測されなかった. このことから, 今回の反応では, α -tocopherol は, DPPH ラジカルを, おもに chroman 環で消去し, α -tocopheroxyl radical (Yamauchi, 1997) として安定化していると考えられた.

b Ascorbic acid と α -tocopherol の抗酸化能力の比較

Methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた α -tocopherol (0.015 mmol) を混合し, これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行った (Fig. 19-C). 標品である ascorbic acid (Fig. 16-A), α -tocopherol (Fig. 19-A) のスペクトルと比較した結果, ascorbic acid 由来のシグナルは完全に消失し, 新たに bicyclic dehydroascorbic acid のシグナル (○) が現れていることがわかった. α -Tocopherol 由来のシグナルに変化はなかった. すなわち, ascorbic acid は, α -tocopherol よりも先に DPPH と反応して dehydroascorbic acid に変化し, その後溶媒和して bicyclic dehydroascorbic acid になることが確認できた. つまり ascorbic acid は, α -tocopherol よりも早くフリーラジカルを消去できることがわかった.

一方, acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた α -tocopherol (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で, methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) を加えた. ^{13}C -NMR の測定結果 (Fig. 19-D) を ascorbic acid (Fig. 16-A), α -tocopherol (Fig. 19-A) のスペクトルと比較したところ, DPPH と反応することによりシグナル強度が減少していた α -tocopherol の chroman 環に由来するシグナル [C-5a (δ 11.8), C-8b (δ 12.0), C-7a (δ 12.7), C-4 (δ 21.7),

C-2a (δ 24.1), C-3 (δ 32.4), C-2 (δ 74.8), C-4a (δ 117.7), C-5 (δ 120.4), C-7 (δ 122.4), C-8 (δ 122.8), C-6 (δ 145.9), C-8a (δ 146.2)] がもともどり, bicyclic dehydroascorbic acid のシグナル (○) が現れているものの, ascorbic acid のシグナル (●) もまだ残存していることがわかった. このことから, ascorbic acid は, 一度 DPPH により酸化された α -tocopherol を, 完全には還元できていないことがうかがえた.

また, methanol- d_4 (0.35 mL) 中に溶解させた ascorbic acid (0.015 mmol) と, acetone- d_6 (0.35 mL) 中に溶解させた DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で, α -tocopherol (0.015 mmol) を加えた. その結果, ascorbic acid は, DPPH と反応した際に, dehydroascorbic acid に変化し, その後溶媒和して bicyclic dehydroascorbic acid に変化しており, その後 α -tocopherol を加えても, bicyclic dehydroascorbic acid に変化は起こらなかった. α -Tocopherol のシグナルにも変化はなかった. したがって, α -tocopherol は, DPPH によって酸化された ascorbic acid を再び還元することはできなかった (データ省略).

c α -Tocopherol と (+)-catechin の抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中で, α -tocopherol (0.015 mmol) と (+)-catechin (0.015 mmol) を混合し, これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で ^{13}C -NMR 測定を行い, DPPH がどちらの化合物と先に反応するかを比較した (Fig. 20-A). 標品である (+)-catechin (Fig. 5-A), α -tocopherol (Fig. 19-A) のスペクトルと比較した結果, α -tocopherol の chroman 環に由来するシグナル [C-5a (δ 11.8), C-8b (δ 12.0), C-7a (δ 12.7), C-4 (δ 21.7), C-2a (δ 24.1), C-3 (δ 32.4), C-2 (δ 74.8), C-4a (δ 117.7), C-5 (δ 120.4), C-7 (δ 122.4), C-8 (δ 122.8), C-6 (δ 145.9), C-8a (δ 146.2)] が小さくなっていることがわかった. α -Tocopherol の側鎖に由来するシグナルにはほとんど変化は見られず, (+)-catechin 由来のシグナル (●) にも変化はなかった. (+)-Catechin が DPPH と反応したときに現れるふたつのカルボニルシグナルも観測されなかった. このことから, α -tocopherol が (+)-catechin よりも先に DPPH と反応したことがわかった.

一方, acetone- d_6 (0.70 mL) 中に溶解させた (+)-catechin (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で, α -tocopherol (0.015

mmol)を加えた。 ^{13}C -NMRの測定結果 (Fig. 20-B) を (+)-catechin (Fig. 5-A), α -tocopherol (Fig. 19-A) のスペクトルと比較したところ, (+)-catechin が DPPH と反応して B 環がキノン構造に変化することにより生じていたふたつのカルボニルシグナル (δ 180.5, 181.2) は消失し, (+)-catechin は本来の構造 (●) にもどっていることがわかった. すなわち, α -tocopherol は, ascorbic acid や ethyl gallate と同様に, 先に DPPH によりキノン構造に酸化されていた (+)-catechin を, 還元できることが確認できた (Fig. 21).

逆に, acetone- d_6 (0.70 mL) 中で α -tocopherol (0.015 mmol) と, DPPH (0.030 mmol) を反応させ, その後 (+)-catechin (0.015 mmol) を加えても, DPPH と反応して強度が減少した α -tocopherol の chroman 環に由来するシグナル [C-5a (δ 11.8), C-8b (δ 12.0), C-7a (δ 12.7), C-4 (δ 21.7), C-2a (δ 24.1), C-3 (δ 32.4), C-2 (δ 74.8), C-4a (δ 117.7), C-5 (δ 120.4), C-7 (δ 122.4), C-8 (δ 122.8), C-6 (δ 145.9), C-8a (δ 146.2)] や, α -tocopherol の側鎖に由来するシグナル, (+)-catechin 由来のシグナルには変化はなかった. (+)-catechin の B 環もキノン構造に変化することはなかった. したがって, (+)-catechin

は, DPPH によって酸化された α -tocopherol を還元することはできなかった (データ省略).

d α -Tocopherol と ethyl gallate の抗酸化能力の比較

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中に溶解させた α -tocopherol (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で, ethyl gallate (0.015 mmol) を加えた. ^{13}C -NMR の測定結果 (Fig. 20-C) を ethyl gallate (Fig. 14-A), α -tocopherol (Fig. 19-A) のスペクトルと比較したところ, α -tocopherol は chroman 環に由来するシグナル [C-5a (δ 11.8), C-8b (δ 12.0), C-7a (δ 12.7), C-4 (δ 21.7), C-2a (δ 24.1), C-3 (δ 32.4), C-2 (δ 74.8), C-4a (δ 117.7), C-5 (δ 120.4), C-7 (δ 122.4), C-8 (δ 122.8), C-6 (δ 145.9), C-8a (δ 146.2)] が小さくなったままで, ethyl gallate のシグナル (○) にも変化はなかった. すなわち, ethyl gallate は, 先に DPPH により酸化されていた α -tocopherol を還元することはできなかった.

一方, acetone- d_6 (0.70 mL) 中に溶解させた ethyl gallate (0.015 mmol) に DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPH の紫色があせた時点で, α -tocopherol (0.015

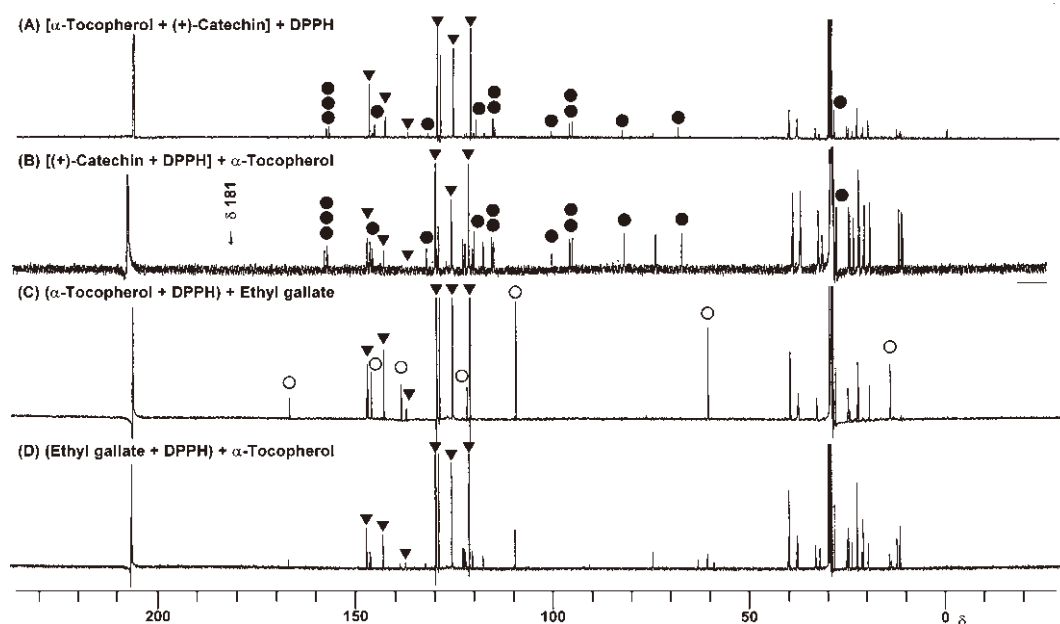


Fig.20 ^{13}C NMR analyses (acetone- d_6 , 125 MHz) to examine the reactivity of α -tocopherol, (+)-catechin, and ethyl gallate with DPPH.

(A), DPPH (0.030 mmol) was added to a mixture of α -tocopherol (0.015 mmol) and (+)-catechin (0.015 mmol); (B), α -tocopherol (0.015 mmol) was added to a reaction mixture of (+)-catechin (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol); (C), ethyl gallate (0.015 mmol) was added to a reaction mixture of α -tocopherol (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol); (D), α -tocopherol (0.015 mmol) was added to a reaction mixture of ethyl gallate (0.015 mmol) and DPPH (0.030 mmol).

▼, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine; ●, (+)-catechin; ○, remaining peaks of ethyl gallate.

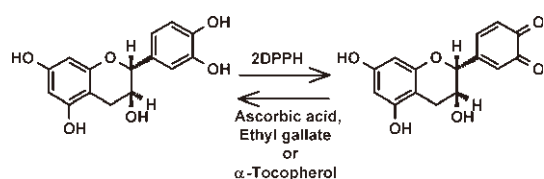


Fig.21 Reaction of (+)-catechin.

mmol)を加えたところ, ethyl gallateのすべてのシグナルは小さくなったまま変化せず, α -tocopherolのシグナルにも変化はなかった. Chroman環に由来するシグナル [C-5a (δ 11.8), C-8b (δ 12.0), C-7a (δ 12.7), C-4 (δ 21.7), C-2a (δ 24.1), C-3 (δ 32.4), C-2 (δ 74.8), C-4a (δ 117.7), C-5 (δ 120.4), C-7 (δ 122.4), C-8 (δ 122.8), C-6 (δ 145.9), C-8a (δ 146.2)]も小さくなることはなかった (Fig. 20-D). すなわち, α -tocopherolは, 先にDPPHにより酸化されていたethyl gallateを還元することはできなかった.

さらに, acetone- d_6 (0.70 mL) 中で α -tocopherol (0.015 mmol) と ethyl gallate (0.015 mmol) を混合し, これに DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPHの紫色があせた時点で ^{13}C -NMR測定を行ったが, シグナルにはっきりとした変化は見られず, DPPHがどちらと先に反応する傾向にあるのかはわからなかった (データ省略).

以上のことから, 今回の反応系では, α -tocopherol と ethyl gallate はほぼ同じ抗酸化能力を有すると考えられた.

また, α -tocopherolについては, pyrogallol や quercetin と同様に抗酸化能力の比較を行ったが, ethyl gallate と似た結果であった (データ省略). すなわち今回の研究においては, α -tocopherolの抗酸化能力は, ascorbic acidより劣り, (+)-catechin や catecholよりは優れているものの, (+)-catechin や catecholより抗酸化能力が優れている他のポリフェノールすべてとは優劣をつけることはできず, 似たような能力を有しているのではないかと考えられた.

本研究において, どの化合物よりも先にDPPHラジカルを消去できたのは ascorbic acidであった. Ascorbic acidは, すでにDPPHにより酸化されてしまった(+)-catechinを, もとに還元してもどすことが可能であった. しかし, すでにDPPHにより酸化されてしまったethyl gallate や α -tocopherolについては, ascorbic acidをもつてしても完全にもとに還元することは難しいようであった. これは, 本章において明らかになった抗酸化能力の序列 [ascorbic acid > α -tocopherol = ethyl gallate > (+)-catechin] を如実に表す結果であるし, 同時に2種類の

抗酸化機構 (DPPHにより酸化されてキノン構造に変化するか, それともラジカルとして安定化するか) の差をうかがわせる結果でもある.

過去の文献によれば, ascorbic acid, α -tocopherol, 各種ポリフェノールをそれぞれDPPHと反応させ, 吸光度を測定すると, α -tocopherolは, (+)-catechin や (-)-epicatechinよりもラジカル消去活性が低く, ascorbic acidよりは活性が高いという結果が得られる (Yoshidaら, 1989). また, (+)-catechin や (-)-epicatechinの方が, α -tocopherolよりも油脂の酸化を抑制する活性が高いといわれる (松崎ら, 1985; 中山ら, 1994). 本研究とは結果が逆であるが, これは各化合物が消去できるラジカル総数を個別に測定して比較したものと, 同一セル内で2種類の化合物のうちどちらが先にDPPHを消去できるかを調べた本研究の違いによるものと考えられる.

VIII 総括

茶には, ポリフェノール化合物や ascorbic acid, α -tocopherol など, 多種類にわたる抗酸化成分が含まれているが, その抗酸化機構に関わる分子構造の変化をNMRを用いて明らかにした例は少ない. 本研究では, 抗酸化成分とフリーラジカルDPPHの反応液をNMR測定する手法を用いて, その抗酸化機構の解明を試みた.

第二章

茶に含まれる抗酸化物質の中で, その含量の多さもあって最も注目されてきた成分はカテキン類である. 第二章では, カテキン類のうち最も単純な構造をもつモデル化合物として (+)-catechin を試料として選択した.

Acetone- d_6 (0.70 mL) 中で, (+)-catechin (0.015 mmol) と DPPH (0.030 mmol) を反応させ, DPPHの紫色があせた時点で ^{13}C -NMR測定を行った. 測定結果を標品である (+)-catechinのスペクトルと比較したところ, (+)-catechinのB環に由来するシグナルが小さくなり, ふたつのカルボニルシグナルが新しく見出された. これに 1, 2-phenylenediamine を反応させ, 誘導体を単離, 同定することにより, (+)-catechinの抗酸化機構は, B環が最初にキノン構造をとることによることと示された.

第三章

(-)-Epicatechinについても (+)-catechinと同様の結果が得られた. しかし, (-)-epigallocatechinについては, DPPHと反応してもカルボニルシグナルは現れず,

このことから、B環に catechol 構造をもつ (+)-catechin や (-)-epicatechin と、pyrogallol 構造をもつ (-)-epigallocatechin の抗酸化機構は異なると考えられた。(-)-Epigallocatechin は、DPPH と反応した際には、*o*-キノン構造として安定化することなく、ラジカルとして安定化していると推測された。また、(-)-epicatechin と (-)-epigallocatechin の混合液を、DPPH と反応させて NMR 測定することにより、(-)-epicatechin と (-)-epigallocatechin のどちらが先に DPPH のフリーラジカルを捕捉できるかを明らかにすることができる。反応液の NMR スペクトルは、(-)-epicatechin のシグナルには変化はなく、(-)-epigallocatechin のシグナル強度が減少しており、このことから (-)-epigallocatechin の方が (-)-epicatechin よりも先に DPPH と反応したことがわかった。すなわち、B環に pyrogallol 構造をもつカテキン類は、catechol 構造をもつカテキン類よりも早くフリーラジカルを消去できることがわかった。

第IV章

同様に、catechol 構造を有する catechol, (+)-taxifolin, eriodictyol, methyl hydrocaffeate も catechol 構造のキノンへの変化が観測されたが、quercetin, luteolin, methyl caffeate, ethyl protocatechuate は、catechol 構造を有しているにもかかわらず、DPPH と反応させてもカルボニルシグナルは現れず、別の抗酸化機構が存在することが示唆された。これらふたつの異なった NMR 上での挙動は、catechol 構造に共役するオレフィン二重結合あるいはカルボニル基の存在の有無に起因すると考えられた。Quercetin と (+)-taxifolin の混合液に DPPH を加えたところ、DPPH は quercetin と先に反応したことが認められ、catechol 構造に共役するオレフィン二重結合 (2, 3 位) を有する化合物の方が、有しない化合物よりも早くフリーラジカルを消去できると考えられた。しかし、catechol は ethyl protocatechuate よりも早く DPPH のフリーラジカルを消去でき、catechol 構造にカルボニル基が共役した場合は、ラジカル消去能は減退すると考えられた。

第V章

Pyrogallol 誘導体については、pyrogallol, myricetin, ethyl gallate のいずれも、DPPH と反応しても *o*-キノン構造として安定化することなく、この順に、フリーラジカルを先に消去することができた。Catechol 構造の場合では、オレフィン二重結合が共役する化合物の方が、共役のない化合物よりも早くフリーラジカルを消去でき

たのに対し、pyrogallol 構造の場合は、pyrogallol 構造に二重結合が共役する化合物よりも、共役のない化合物の方が先にフリーラジカルを消去する結果となった。また、(-)-epigallocatechin は ethyl gallate よりも早くフリーラジカルを消去できると考えられ、このことから、(-)-epigallocatechin gallate は、galloyl 基よりも B環でまずフリーラジカルを消去すると考えられた。また、ethyl gallate の方が quercetin よりも先にフリーラジカルを消去でき、このことから、catechol 構造を有するいかなる化合物よりも pyrogallol 構造を有する化合物の方がラジカル消去能が優れると考えられた。したがって、ethyl gallate は、(-)-epicatechin よりも早くフリーラジカルを消去できると考えられ、(-)-epicatechin gallate については、(-)-epigallocatechin gallate の場合とは逆に、B環よりも galloyl 基でまずフリーラジカルを消去すると考えられた。

第VI章

Ascorbic acid は、dehydroascorbic acid に変化することによって DPPH のフリーラジカルを消去すると考えられた。また、ascorbic acid は、pyrogallol や ethyl gallate, (+)-catechin よりも先にフリーラジカルを消去でき、いかなるポリフェノールよりも早くフリーラジカルを消去できると考えられた。(+) -catechin は、DPPH と反応すると B環がキノン構造に酸化されるが、ascorbic acid を添加することにより、もとの構造に還元されることがわかった。Ethyl gallate も同様に、(+)-catechin よりも先にフリーラジカルを消去でき、DPPH により B環がキノン構造に酸化された (+)-catechin は、ethyl gallate を添加することにより、もとの構造に還元することができた。しかし、一度 DPPH により酸化されてしまった ethyl gallate は、ascorbic acid を用いても容易には還元できないと推察された。

第VII章

α -Tocopherol を DPPH と反応させると、 α -tocopherol はおもに chroman 環でフリーラジカルを消去している様子が ^{13}C -NMR で観測できる。 α -Tocopherol は DPPH と反応して、 α -tocopheroxyl radical として安定化していると考えられた。Ascorbic acid は、 α -tocopherol よりも先にフリーラジカルを消去できたが、一度 DPPH により酸化されてしまった α -tocopherol は、ascorbic acid を用いても完全には還元できないようであった。 α -Tocopherol は、先に DPPH により酸化されていた ethyl gallate を還

元することはできなかった。また、ethyl gallate は、先に DPPH により酸化されていた *a*-tocopherol を還元することはできず、*a*-tocopherol と ethyl gallate はほぼ同等の抗酸化能力を有すると考えられた。同様の調査の結果、*a*-tocopherol のラジカル消去能力は、ascorbic acid より劣り、(+)-catechin や catechol よりは優れているものの、(+)-catechin や catechol よりラジカル消去能力が優れているその他のポリフェノールすべてとは優劣をつけることはできず、似たような能力を有しているのではないかと考えられた。

以上、NMR を用いた本研究の手法には、おもにふたつの大きな特徴がある。

ひとつは、DPPH と反応した直後の抗酸化成分の構造的な変化を分子レベルで明らかにできるということである。本研究では、ascorbic acid が DPPH と反応して dehydroascorbic acid に変化することを明確に示し、(+)-catechin や (-)-epicatechin など、catechol 構造に共役する二重結合をもたない化合物が、DPPH と反応した際には、catechol 構造が *o*-キノンに変化し、catechol 構造に共役する二重結合をもつ化合物や、pyrogallol 誘導体とは抗酸化のメカニズムが異なるということを明らかにすることができた。また、(+)-catechin や (-)-epicatechin の抗酸化活性部位が B 環であることを容易に示すことができた。さらにこの手法を敷衍することで (-)-epigallocatechin gallate や (-)-epicatechin gallate などの活性部位も推測することが可能であった。

ふたつ目は、同一セル内で2種類の抗酸化成分を DPPH と競争的に反応させることにより、抗酸化能力の比較が可能ということである。これにより本研究で抗酸化成分のラジカル消去能力を新しい尺度で評価することができ、ポリフェノールについてラジカル消去の構造活性相関を明らかにすることができた。すなわち第一に、pyrogallol 誘導体は catechol 誘導体よりもすばやく DPPH ラジカルを消去することができた。第二に、pyrogallol 構造あるいは catechol 構造にカルボニル基が共役するとラジカル消去能力は減退した。第三に、pyrogallol 構造にオレフィン二重結合が共役すると同様にラジカル消去能力は減退したが、catechol 構造にオレフィン二重結合が共役するとラジカル消去能力は逆に向上した。Pyrogallol 構造にオレフィン二重結合が共役した化合物は、pyrogallol 構造にカルボニル基が共役した化合物よりもラジカル消去能力は優れていた。

摘 要

茶には、ポリフェノール化合物など、多種類にわたる抗酸化成分が含まれている。本研究では、抗酸化成分とフリーラジカル DPPH の反応液を NMR 測定する手法を用いて、その抗酸化機構の解明を試みた。

(+)-Catechin と DPPH を反応させ、これを ¹³C-NMR 測定すると、(+)-catechin の B 環のシグナルの消失とともにふたつのカルボニルシグナルが現れた。*o*-Phenylenediamine の付加物の単離、同定により、(+)-catechin の抗酸化機構は、B 環が最初にキノン構造をとることによると示された。

同様に、catechol、(+)-taxifolin、eriodictyol、methyl hydrocaffeate も catechol 構造のキノンへの変化が観測されたが、quercetin、luteolin、methyl caffeate、ethyl protocatechuate のように、catechol 構造にオレフィン二重結合あるいはカルボニル基が共役する化合物については、DPPH と反応させてもカルボニルシグナルは現れず、*o*-キノン構造として安定化することなく、ラジカルとして安定化していると推測された。Quercetin と (+)-taxifolin の混合液に DPPH を加えたところ、DPPH は quercetin と先に反応したことが認められ、catechol 構造に共役するオレフィン二重結合 (2, 3 位) を有する化合物の方が、有しない化合物よりも早くフリーラジカルを消去できると考えられた。しかし、catechol は ethyl protocatechuate よりも早く DPPH のフリーラジカルを消去でき、catechol 構造にカルボニル基が共役した場合は、ラジカル消去能は減退すると考えられた。

Pyrogallol 誘導体については、pyrogallol、myricetin、ethyl gallate のいずれも、DPPH と反応しても *o*-キノン構造として安定化することなく、この順に、フリーラジカルを先に消去することができた。Catechol 構造の場合では、オレフィン二重結合が共役する化合物の方が、共役のない化合物よりも早くフリーラジカルを消去できたのに対し、pyrogallol 構造の場合は、pyrogallol 構造に二重結合が共役する化合物よりも、共役のない化合物の方が先にフリーラジカルを消去する結果となった。また、ethyl gallate の方が quercetin よりも先にフリーラジカルを消去でき、このことから、catechol 構造を有するいかなる化合物よりも pyrogallol 構造を有する化合物の方がラジカル消去能が優れることがわかった。

Ascorbic acid は、dehydroascorbic acid に変化することによって DPPH のフリーラジカルを消去できることがわかった。また、*a*-tocopherol は、DPPH と反応し

て、 α -tocopheroxyl radicalとして安定化していると考えられた。Ascorbic acid, α -tocopherol, ethyl gallateは、(+)-catechinよりも先にフリーラジカルを消去できることがわかった。(+)catechinは、DPPHと反応するとB環がキノン構造に酸化されるが、ascorbic acidまたは α -tocopherol, ethyl gallateを添加することにより、もとの構造に還元されることが確認できた。Ascorbic acidは、 α -tocopherolやethyl gallateよりも先にフリーラジカルを消去できたが、一度DPPHにより酸化されてしまった α -tocopherolやethyl gallateは、ascorbic acidを用いても容易には還元できないと推察された。またascorbic acidは、pyrogallolよりも先にフリーラジカルを消去できたことから、ascorbic acidは、いかなるポリフェノールよりも早くフリーラジカルを消去できると考えられた。

α -Tocopherolは、先にDPPHにより酸化されていたethyl gallateを還元することはできず、また、ethyl gallateは、先にDPPHにより酸化されていた α -tocopherolを還元することはできないため、 α -tocopherolとethyl gallateはほぼ同じ抗酸化能力を有すると考えられた。同様の調査の結果、 α -tocopherolのラジカル消去能力は、ascorbic acidより劣り、(+)-catechinやcatechol, ethyl protocatechuateよりは優れているものの、(+)-catechinやcatecholよりラジカル消去能力が優れているその他のポリフェノールすべてとは優劣をつけることはできず、似たような能力を有しているのではないかと考えられた。

引用文献

- Burton, G. W., K. U. Ingold (1981) : The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6472–6477.
- 袴田勝弘 (1993) : 新製品の開発および茶の利用場面の拡大. 研究ジャーナル, **16**, 30–34.
- 袴田勝弘 (2003) : お茶の力, 化学工業日報社.
- Hikino, H., Y. Kiso, T. Hatano, T. Yoshida, T. Okuda (1985) : Antihepatotoxic actions of tannins. *J. Ethnopharmacol.*, **14**, 19–29.
- 池ヶ谷賢次郎・高柳博次・阿南豊正 (1984) : 抹茶・玉露および煎茶のトコフェロール含量. 日食工誌, **31**, 459–461.
- 伊古田暢夫 (2002) : レドックス制御の観点で生体の影響を研究. 放医研ニュース, **63**, 7.
- 今堀和友・山川民夫 (1990) : 生化学辞典第2版, 東京化学同人.
- 伊奈和夫・坂田完三・富田 勲・伊勢村護 (2002) : 茶の化学成分と機能, 弘学出版.
- 岩浅 潔 (1994) : 茶の栽培と利用加工, 養賢堂.
- 河村眞也・故倉宏至・松村康生・森 友彦 (1987) : 茶芽の葉位および茶樹の部位による α -トコフェロール含量の変化. 農化, **61**, 1567–1569.
- Kazuma, K., N. Noda, M. Suzuki (2003) : Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, **62**, 229–237.
- Lee, I. P., Y. M. Kim, M. H. Kang, C. Roberts, J. S. Shim, J. K. Roh (1997) : Chemopreventive effect of green tea (*Camellia sinensis*) against cigarette smoke-induced mutations (SCE) in humans. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **27**, 68–75.
- Liebler, D. C., P. F. Baker, K. L. Kaysen (1990) : Oxidation of vitamin E: evidence for competing autooxidation and peroxy radical trapping reactions of tocopheroxyl radical. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6995–7000.
- Markham, K. R., B. Ternai (1976) : ¹³C NMR of flavonoids-II: Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. *Tetrahedron*, **32**, 2607–2612.
- Materska, M., S. Piacente, A. Stochmal, C. Pizza, W. Oleszek, I. Perucka (2003) : Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annuum* L.. *Phytochemistry*, **63**, 893–898.
- Matsuda, H., T. Morikawa, I. Toguchida, S. Harima, M. Yoshikawa (2002) : Medicinal flowers. VI. Absolute stereostructures of two new flavanone glycosides and a phenylbutanoid glycoside from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L.: Their inhibitory activities for rat lens aldose reductase. *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 972–975.
- 松尾光芳 (1983) : 薬学におけるNMRの応用. 化学の領域増刊, **141**, 111–130.
- Matsuo, M., S. Matsumoto (1987) : Oxygenation of vitamin E (α -tocopherol) and its model compound 2, 2, 5, 7, 8-pentachroman-6-ol in the presence of superoxide radical solubilized in aprotic solvents: unique epoxidations and recyclizations. *J. Org. Chem.*, **52**, 3514–3520.
- 松崎妙子・原 征彦 (1985) : 茶葉カテキン類の抗酸化作用について. 農化, **59**, 129–134.
- Miura, Y., T. Chiba, I. Tomita, H. Koizumi, S. Miura, K. Umegaki, Y. Hara, M. Ikeda, T. Tomita (2001) : Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr.*, **131**, 27–32.
- Moon, J. H., J. Terao (1998) : Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5062–5065.
- 村田 晃・井上由貴・神田康三・加藤富民雄・山口史子・田中信之・柴田 萬 (2001) : 新芽と荒茶のバイオアッセイ法による抗酸化活性の測定. 茶業研究報告, **90**, 9–14.
- 中林敏郎 (1953) : 茶葉中のカテキン及び色素の研究(其の4) ルチンの分離及び定量. 農化, **27**, 274–276.
- 中林敏郎・伊奈和夫・坂田完三 (1991) : 緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能, 弘学出版.
- Nakachi, K., S. Matsuyama, S. Miyake, M. Suganuma, K. Imai (2000) : Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors*, **13**, 49–54.
- 仲川清隆・宮沢陽夫 (2000) : カテキンの抗酸化作用. 食の科学, **272**, 44–51.
- 中川致之・鳥井秀一 (1964) : 茶のカテキンに関する研究(第3報) 品種によるカテキン含量の差異. 茶業研究報告, **22**, 101–114.
- 中山 充・廣瀬裕子 (1994) : カテキン類の抗酸化活性とその酸化生成物から推定される抗酸化機構. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, **161**, 4–12.
- Nanjo, F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai, Y. Hara (1996) : Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology & Medicine*, **21**, 895–902.
- Nanjo, F., M. Mori, K. Goto, Y. Hara (1999) : Radical scaveng-

- ing activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1621–1623.
- 31) Niki, E.; T. Saito, A. Kawakami, Y. Kamiya (1984) : Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J. Biol. Chem.*, **259**, 4177–4182.
- 32) Nishikawa, Y., T. Kurata (1998) : Structure and chemical characteristics of dehydro-L-ascorbic acid in solutions. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **4**, 155–158.
- 33) Nonaka, G., M. Muta, I. Nishioka (1983) : Myricatin, a galloyl flavanonol sulfate and prodelfinidin gallates from *Myrica rubra*. *Phytochemistry*, **22**, 237–241.
- 34) Ohashi, Y., K. Yoshinaga, H. Yoshioka, H. Yoshioka (2002) : Kinetic analysis of the effect of (–)-epigallocatechin gallate on the DNA scission induced by Fe (II). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 770–776.
- 35) 大島康義・何 芳陔 (1936) : 茶葉中にKempferolの存在に就て. 農化, **12**, 975–976.
- 36) 大島康義・中林敏郎 (1952) : 茶葉中のカテキン及び色素の研究 (其の3) 茶葉中の没食子酸及びフラボノイド色素の比色定量法. 農化, **26**, 377–381.
- 37) 大島康義・中林敏郎 (1953a) : 茶葉中のカテキン及び色素の研究 (其の5) 茶葉フラボンのペーパークロマトグラフ. 農化, **27**, 754–756.
- 38) 大島康義・中林敏郎 (1953b) : 茶葉中のカテキン及び色素の研究 (其の6) カラムクロマトグラフによる茶葉フラボンの分離. 農化, **27**, 756–759.
- 39) 大島康義・中林敏郎 (1953c) : 茶葉中のカテキン及び色素の研究 (其の7) クロマトパイルによる茶葉フラボンの分離. 農化, **27**, 759–761.
- 40) 大須博文・竹尾忠一・杉山 清・横田正美 (1990) : 緑茶成分の抗アレルギー作用に関する研究. *Fragrance J.*, **11**, 50–53.
- 41) Porter, L. J., R. H. Newman, L. H. Foo, H. Wong (1982) : Polymeric proanthocyanidins. ¹³C N.M.R. studies of procyanidins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1217–1221.
- 42) Ravn, H., L. Brimer (1988) : Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subsp. *major*. *Phytochemistry*, **27**, 3433–3437.
- 43) Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, G. Paganga (1996) : Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 933–956.
- 44) Roberts, E. A. H. (1956) : The chlorogenic acids of tea and maté. *Chem. and Ind.*, **37**, 985–986.
- 45) Roberts, E. A. H., D. J. Wood (1951a) : A study of the polyphenols in tea leaf by paper chromatography. *Biochem. J.*, **49**, 414–422.
- 46) Roberts, E. A. H., D. J. Wood (1951b) : Oxidation of anthoxanthins by tea-oxidase. *Nature*, **167**, 608.
- 47) Roberts, E. A. H., R. A. Cartwright, D. J. Wood (1956) : The flavonols of tea. *J. Sci. Food Agric.*, **7**, 637–646.
- 48) 西條了康 (1981) : 茶葉の生育に伴うカテキン類の変動. 茶葉技術研究, **61**, 28–30.
- 49) 坂井美和・原 征彦 (1995) : 茶カテキンの糖類分解酵素に対する阻害作用. 食品工業, **38**, 77–81.
- 50) Sato, Y., H. Nakatsuka, T. Watanabe, S. Hisamichi, H. Shimizu, S. Fujisaku, Y. Ichinowatari, Y. Ida, S. Suda, K. Kato, M. Ikeda (1989) : Possible contribution of green tea drinking habits to the prevention of stroke. *Tohoku J. Exp. Med.*, **157**, 337–343.
- 51) 澤井祐典 (2003) : 茶の加工と包装 (2) 不発酵茶 (緑茶). 食品と容器, **44**, 613–619.
- 52) Sayama, K., K. Ozeki, M. Taguchi, I. Oguni (1996) : Effects of green tea and tea catechins on the development of mammary gland. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 169–170.
- 53) Senba, Y., T. Nishishita, K. Saito, H. Yoshioka, H. Yoshioka (1999) : Stopped-flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and the model compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1369–1374.
- 54) Shetty, M., K. Subbannayya, P. G. Shivananda (1994) : Antibacterial activity of tea (*Camellia sinensis*) with special reference to *Salmonella typhimurium*. *J. Commun. Dis.*, **26**, 147–150.
- 55) Suzuki, M., M. Tabuchi, K. Umegaki, N. Hara, I. Tomita, M. Ikeda, T. Tomita (2001) : Ameliorative effects of tea catechins on stroke in transient mid cerebral artery occluded rats (MCAO-Rats). *Proc. Intern. Conf. O-CHA (Tea) Culture and Science*, **III**, 26–29.
- 56) 食品総合研究所 (1999) : 食品の機能性評価マニュアル集, 農林水産省技術会議事務局.
- 57) 滝野慶則・今川 弘・吉田宏之 (1953) : 茶葉のAnthoxanthinに関する研究 (第1報) Anthoxanthinの分離. 農化, **27**, 150–154.
- 58) 滝野慶則・今川 弘・吉田宏之 (1954a) : 茶葉のAnthoxanthinに関する研究 (第2報) 摘採時期を異にした茶葉からAnthoxanthinの分離. 農化, **28**, 182–185.
- 59) 滝野慶則・今川 弘・吉田宏之 (1954b) : 茶葉のAnthoxanthinに関する研究 (第3報) Kaempferol配糖体に就て. 農化, **28**, 186–189.
- 60) 滝野慶則・今川 弘・吉田宏之 (1954c) : 茶葉のAnthoxanthinに関する研究 (第4報) Quercetin配糖体に就て. 農化, **28**, 190–192.
- 61) 滝野慶則・今川 弘・吉田宏之 (1962) : 茶葉のFlavonoidに関する研究 (第5報) Kaempferol配糖体kaempferin及びquercetin配糖体quertrinについて. 農化, **36**, 943–946.
- 62) Takino, Y., H. Imagawa, H. Yoshida (1962) : Studies on the flavonids in tea leaves. Part VI. On the myricetin-glycoside. *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 699–704.
- 63) 田中 隆 (2002) : 緑茶カテキンの酸化と紅茶色素の生成. 化学と生物, **40**, 513–518.
- 64) Tanaka, T., I. Kouno (2003) : Oxidation of tea catechins: Chemical structures and reaction mechanism. *Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 128–133.
- 65) 手塚雅勝・鈴木弘美・鈴木康夫・原 征彦・岡田昌二 (1997) : 茶葉カテキン類のインフルエンザウイルスに対する不活化作用. 衛生化学, **43**, 311–315.
- 66) 恒成茂行・木林和彦・吉沢世理子 (1992) : 日本茶とその有効成分のエピガロカテキンガレートによるパラコート毒性の抑制効果. 法中毒, **10**, 84–85.
- 67) Wang, Z. Y., W. A. Khan, W. A., D. R. Bickers, H. Mukhtar (1989) : Protection against polycyclic aromatic hydrocarbon-induced skin tumor initiation in mice by green tea polyphenols. *Charcinogenesis*, **10**, 411–415.
- 68) Yamauchi, R. (1997) : Vitamin E: Mechanism of its antioxidant activity. *Food. Sci. Technol. Int. Tokyo*, **3**, 301–309.
- 69) Yamauchi, R., T. Matsui, K. Kato, Y. Ueno (1990) : Reaction products of α -tocopherol with methyl linoleate-peroxy radicals. *Lipids*, **25**, 152–158.
- 70) 山内 亮・松下雪郎 (1976) : 野菜, 果実中のトコフェロール含量. 農化, **50**, 569–570.
- 71) Yang, B., A. Kotani, K. Arai, F. Kusu (2001) : Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Anal. Sci.*, **17**, 599–604.
- 72) Yokozawa, T., C. P. Chen, E. Dong, T. Tanaka, G. Nonaka, I. Nishioka (1998) : Study on the inhibitory effect of tannins and

- flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 213–222.
- 73) Yokozawa, T., H. Oura, S. Sakanaka, S. Ishigaki, M. Kim (1994). Depressor effect of tannin in green tea on rats with renal hypertension. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 855–858.
- 74) 吉田優子・木曾雅昭・長嶋 等・後藤哲久(1996) : 茶芽の生育に伴う化学成分含量の変化. 茶業研究報告, **83**, 9–16.
- 75) 吉川敏一・谷川 徹 (1999) : 活性酸素・フリーラジカルと疾患. 化学と生物, **37**, 475–481.
- 76) 吉岡 寿 (2000) : 茶カテキンの抗酸化の機構を探る. 茶, **35**, 30–31.
- 77) Yoshida, T., K. Mori, T. Hatano, T. Okumura, I. Uehara, K. Komagoe, K. Fujita, T. Okuda (1989) : Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1919–1921.

NMR Analytical Approach to Clarify the Molecular Mechanisms of the Antioxidative and Radical-Scavenging Activities of Antioxidants in Tea: Reaction of Polyphenols with Stable Free Radicals

Yusuke Sawai

Summary

Tea (*Camellia sinensis*) leaves contain various antioxidants such as ascorbic acid, α -tocopherol and polyphenols. In this study, we have tried to clarify the molecular mechanisms underlying the antioxidative and radical-scavenging activities of these antioxidants and directly compared the reactivities of each antioxidant against the stable free-radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) using nuclear magnetic resonance (NMR) analysis.

Tea catechins (flavan-3-ol derivatives) are a major constituent of tea polyphenols. In recent years, they have attracted much attention for their potential beneficial effects in disease prevention. In particular, the antioxidant activities of catechins seem to be most important in terms of their physiological function.

First of all, (+)-catechin (0.015 mmoles) was reacted with DPPH (0.030 mmoles) in acetone- d_6 (0.7 ml) as a model reaction of tea catechins to elucidate the molecular mechanisms underlying the antioxidative and radical-scavenging activities of antioxidants. After the reaction, the purple color of DPPH faded gradually. The reaction mixture was subjected to ^{13}C NMR analysis. The spectra were compared with those of (+)-catechin. The characteristic signals of the B-ring disappeared, although the signals ascribable to the A and C-rings remained unchanged, and two carbonyl signals were clearly detected in the spectrum. These strongly suggest that two hydroxyl groups in the B-ring are more important as a radical scavenger among the four phenolic hydroxyl groups of (+)-catechin and the B-ring was changed to a quinone structure. We substantiate this by trapping the compound as an adduct of a 1,2-phenylenediamine to an *o*-quinone.

(-)-Epicatechin was also confirmed to give a similar result. The appearance of two carbonyl signals indicated the same conclusion.

Furthermore, (-)-epigallocatechin was reacted with DPPH. But no carbonyl signals appeared, although many original carbon signals decreased. The antioxidation mechanism of (-)-epigallocatechin (pyrogallol structure) is likely to be different from those of (+)-catechin and (-)-epicatechin (catechol structures). (-)-Epigallocatechin seems to give a rather stable radical and was not stabilized as an *o*-quinone. We clarified that the differences in their antioxidative activities were due to the differences of the antioxidation mechanisms.

A mixture of (-)-epicatechin (0.015 mmol) and (-)-epigallocatechin (0.015 mmol) was reacted with DPPH (0.030 mmol) and subjected to ^{13}C NMR analysis. Their relative radical-scavenging abilities were directly assessed by comparing the resulting spectrum with those of (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin. The intensities of most of the original carbon signals ascribable to (-)-epigallocatechin decreased. However, the signals of (-)-epicatechin, not only those of the A-ring but also those of the B-ring, remained. Therefore, this observation suggests that radicals of DPPH are scavenged more rapidly by (-)-epigallocatechin than by (-)-epicatechin.

To further clarify the molecular mechanisms underlying the antioxidative and radical-scavenging activities of tea polyphenols, we investigated other model polyphenols with more simple structures. Catechol, (+)-taxifolin, eriodictyol and methyl hydrocaffeate were oxidized to *o*-quinone by DPPH. However, quercetin, luteolin, methyl caffeate and ethyl protocatechuate were not stabilized as an *o*-quinone, even though they possess a catechol structure. Thus, the difference in their antioxidation mechanisms may depend on the presence or absence of the conjugated olefinic or carbonyl double bond. The radical-scavenging ability of *o*-dihydroxy phenolic compounds with a conjugated olefinic double bond (e.g. quercetin) was superior to that of compounds without this bond [e.g. (+)-taxifolin], while the ability of *o*-dihydroxy phenolic compounds possessing a conjugated carbonyl bond (ethyl protocatechuate) was inferior to that of compounds lacking this bond (catechol).

The molecular mechanisms underlying the antioxidative and radical-scavenging activities of vicinal-trihydroxyl phenolic compounds were further investigated. All vicinal-trihydroxyl phenolic compounds (pyrogallol, myricetin and ethyl gallate) do not seem to be stabilized as *o*-quinone and produce a rather stable radical. Vicinal-trihydroxyl phenolic compounds with a conjugated olefinic double bond (e.g. myricetin) had an inferior scavenging ability as compared with compounds lacking this bond (e.g. pyrogallol), but myricetin was a better scavenger than compounds with a conjugated carbonyl double bond (e.g. ethyl gallate). In addition, vicinal-trihydroxyl phenolic compounds (e.g. ethyl gallate) were superior to *o*-dihydroxyl phenolic compounds (e.g. quercetin), and that the gallate moiety is more important than the *o*-dihydroxyl group in the B-ring as a radical-scavenging active site in the (-)-epicatechin gallate structure.

The order of radical-scavenging ability suggested by these results is summarized as follows: (-)-Epigallocatechin, pyrogallol > myricetin > (-)-epicatechin gallate, ethyl gallate > quercetin, luteolin, methyl caffeate > (-)-epicatechin, (+)-catechin, (+)-taxifolin, eriodictyol, methyl hydrocaffeate, catechol > ethyl protocatechuate.

Ascorbic acid is also known to possess potent antioxidative activity. When ascorbic acid was reacted with DPPH, it was oxidized to dehydroascorbic acid by DPPH. Ascorbic acid scavenged DPPH radical faster than (+)-catechin. When ascorbic acid was added to the reaction mixture of (+)-catechin and DPPH, the two carbonyl signals ascribable to (+)-catechin in the oxidized form completely disappeared, suggesting that (+)-catechin in the oxidized form after radical-scavenging can be reduced to (+)-catechin by ascorbic acid. Ethyl gallate scavenged DPPH radical faster than (+)-catechin and ethyl gallate reduced the oxidized (+)-catechin. Ascorbic acid also scavenged DPPH radical more rapidly than ethyl gallate. However, when ascorbic acid was added to the reaction mixture of ethyl gallate and DPPH, the signals of ascorbic acid did not disappear completely and ethyl gallate was not easily regenerated from the oxidized form generated after radical-scavenging. Ascorbic acid also scavenged radicals more rapidly than pyrogallol; in other words, ascorbic acid possesses more potent antioxidative activity than all of the polyphenols described above.

α -Tocopherol is stabilized as α -tocopheroxyl radicals when it is reacted with DPPH. Ascorbic acid scavenged radicals faster than α -tocopherol. However, α -tocopherol was not likely to be regenerated from α -tocopherol radical after radical-scavenging, even if it was present with ascorbic acid. α -Tocopherol scavenged DPPH radicals faster than (+)-catechin and α -tocopherol reduced the oxidized (+)-catechin. The radical-scavenging ability of α -tocopherol was inferior to ascorbic acid but superior to (+)-catechin (and ethyl protocatechuate). However, α -tocopherol and other polyphenols (e.g. ethyl gallate) except them had almost identical antioxidative activities.

The results of our ^{13}C NMR study of the mechanisms of antioxidative effects of several antioxidants using DPPH can be summarized as follows. First, the structural changes of antioxidants after scavenging of radicals can be directly observed at the molecular level. This allowed us to determine the active site of each antioxidant in each radical-scavenging reaction. Second, the relative radical-scavenging activity (speed) can be compared between antioxidants.