

Study on Chemical and Anti-Oxidation Properties of Coffee-Derived Polyphenols

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/00059740

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博 士 論 文

コーヒー由来ポリフェノールの化学的性質と
抗酸化挙動に関する研究

Study on Chemical and Anti-Oxidation Properties
of Coffee-Derived Polyphenols

金沢大学大学院自然科学研究科

物質科学専攻

学籍番号	1123132303
氏名	一谷 正己
主任指導教員名	本田 光典
提出年月	2020 年 1 月

目次

第1章 緒言	5
1-1 コーヒーの生産工程.....	7
1-2 コーヒー生豆の生産.....	8
1-3 コーヒーの焙煎.....	9
1-4 コーヒーの抽出方法.....	9
1-5 コーヒー豆の成分組成.....	10
1-6 コーヒー生豆の化学組成.....	12
1-6-1 コーヒー生豆中の不揮発性化合物.....	12
1-6-2 クロロゲン酸類 (CGAs).....	13
1-7 焙煎時のコーヒー化学組成の変化.....	18
1-7-1 焙煎コーヒー中の揮発性化合物.....	18
1-7-2 コーヒー製品におけるチオール化合物.....	19
1-7-3 焙煎コーヒー中の不揮発性成分.....	20
1-8 参考文献.....	23
第2章 N-アセチルシステイン存在下での4-メチルカテコールの酸化反応により生成するチオール付加体の分光学的特性	28
2-1 緒論.....	28
2-2 実験.....	31
2-2-1 DPPHラジカル消去活性.....	31
2-2-2 過ヨウ素酸樹脂を用いた反応.....	32
2-2-3 分取HPLC.....	32
2-2-4 UV-Visスペクトル.....	33
2-2-5 LC-MS分析.....	33

2-2-6	NMRスペクトル	33
2-3	結果及び考察	33
2-3-1	MCのラジカル消去活性に対するチオールの効果	34
2-3-2	DPPHラジカル消去反応におけるLC-MSによる反応生成物の同定	36
2-3-3	主要なNACys付加体のHPLC単離およびNMRキャラクタリゼーション	38
2-3-4	過ヨウ素酸担持樹脂を用いたMC誘導体の酸化およびそれに続くNACys付加	43
2-3-5	過ヨウ素酸担持樹脂によるMC及びNACys付加体の酸化	43
2-3-6	MCおよびNACys MCキノンとNACysとの反応	46
2-4	結論	47
2-5	参考文献	48
第3章	アルコール存在下における4 - メチルカテコールの抗酸化反応機構	53
3-1	緒論	53
3-2	実験	54
3-2-1	DPPHラジカル消去活性	54
3-2-2	過ヨウ素酸樹脂を用いた反応	55
3-2-3	分取HPLC	55
3-2-4	UV-Visスペクトル	56
3-2-5	LC - MS分析	56
3-2-6	NMRスペクトル	56
3-3	結果及び考察	57
3-3-1	MCのラジカル消去活性に対するアルコールの効果	57
3-3-2	LC-MSによるDPPHラジカル消去反応生成物の推定	58
3-3-3	主要なメタノール付加体のHPLC単離およびキャラクタリゼーション	63
3-4	結論	71

3-5 参考論文.....	72
第4章 N- アセチルシステイン存在下におけるCQAsの抗酸化反応機構	74
4-1 緒論.....	74
4-2 実験.....	75
4-2-1 DPPHラジカル消去活性.....	75
4-2-2 過ヨウ素酸樹脂を用いた反応.....	75
4-2-3 分取HPLC.....	76
4-2-4 UV-Visスペクトル.....	76
4-2-5 LC - MS分析.....	76
4-2-6 NMRスペクトル.....	77
4-3 結果及び考察.....	77
4-3-1 5-CQAのラジカル消去活性に対するチオールの効果.....	77
4-3-2 過ヨウ素酸担持樹脂によるCQAの酸化反応.....	80
4-3-3 5-CQAの酸化反応における反応生成物のLC-MS解析.....	82
4-3-4 NACys付加5-CQAの分取HPLCによる単離およびNMRキャラクター ゼーション.....	87
4-3-5 コーヒー豆抽出液中のCQAsの酸化およびそれに続くNACys付加体形成.....	91
4-4 結論.....	96
4-5 参考文献.....	97
第5章 CQAsのシクロデキストリン包接挙動	99
5-1 緒論.....	99
5-2 実験.....	101
5-2-1 試薬.....	101
5-2-2 装置.....	101

5-2-3	包接化合物の会合定数.....	102
5-2-4	連続変化法(Jobプロット)	103
5-3	結果と考察.....	104
5-3-1	蛍光光度計を用いた安定度定数と化学量論の決定.....	104
5-3-2	UV-visを用いた連続変化法.....	107
5-3-3	^1H NMRを用いた連続変化法.....	111
5-3-4	包接複合体の構造決定.....	115
5-3-5	測定結果と考察	116
5-3-6	結論.....	124
第6章	結論	126
	謝辞	130

第1章

緒 言

第1章 緒言

コーヒーは世界で最も広く消費されている飲料の一つである。近年その消費量は世界的に拡大の方向にあり、生産量で世界第1位のブラジルは、消費量でも第2位となっている。また、アフリカ圏、アジア・オセアニア圏、メキシコ・中央アメリカ圏、ヨーロッパ圏、北アメリカ圏、でも消費は拡大し(Table 1)、日本においても同様に増加傾向にある。世界の生産国及び消費国が加盟する International Coffee Organization の調査では、2018年に消費量が9,920,700 トンに達し、生産量の10,140,060トンに近づいている[1]。

Table 1 世界のコーヒーの生産量と消費量の推移

	2015	2016	2017	2018 (ton)
PRODUCTION	9,299,760	9,517,500	9,622,560	10,140,060
Africa	945,360	1,003,740	1,042,560	1,098,240
Asia & Oceania	2,969,040	2,739,120	2,796,480	2,919,720
Mexico & Central America	1,026,360	1,219,320	1,303,500	1,280,700
South America	4,359,060	4,555,260	4,480,020	4,841,460
CONSUMPTION	9,329,460	9,518,520	9,753,300	9,920,700
Exporting countries	2,852,880	2,909,280	2,987,580	3,030,600
Importing countries	6,476,580	6,609,240	6,765,780	6,890,100
Africa	657,060	667,800	691,620	703,440
Asia & Oceania	1,971,780	2,074,380	2,141,820	2,204,520
Mexico & Central America	317,700	313,560	319,260	324,060
Europe	3,128,820	3,122,700	3,188,880	3,233,760
North America	1,736,040	1,773,540	1,796,460	1,827,240
South America	1,517,940	1,566,660	1,615,320	1,627,680

このようにコーヒー消費量が増加している理由としては、品種の選抜や改良、農業技術の改善によるカップ品質(コーヒーの官能特性)の向上、Tullys Coffee等のコーヒー専門店の創設、健康効果に

関する研究報告の増加によるコーヒーのイメージの向上などが挙げられる。今日、コーヒーは嗜好飲料のみならず健康機能性飲料としても認知されているが、これは主として、抗酸化性および他の有益な生理活性を発現する化合物が含有されていることが疫学的研究や生理学的研究結果により明らかにされたためである。その他に、焙煎コーヒー豆には約1000種類の揮発性化合物が確認されており、これらが発揚する特徴的な香りとその複雑性から、コーヒーは他に類を見ない魅力的な飲料となっている[2].

コーヒーノキはアカネ科、コーヒー属に属する植物で、世界には80種以上の種が発見されているが[3]、経済的に重要なのは二種のみである。その一種は、アラビカ種としても知られる *Coffea arabica* で、世界のコーヒー市場の約70%を占めている。もう一種は、ロブスタ種として知られる *Coffea canephora* であり、これに希少品種であるリベリカ種の *Coffea liberica* が加わり残りの30%を占めている[1,4]。コーヒー飲料の風味は、気温、日照、降雨、標高、土壌などの栽培環境、コーヒー豆の形状や密度などの物理的側面、含有化合物の組成、抽出方法等の影響を受けやすく複雑な香味を構成するが、地域あるいは個人の嗜好性に合わせて製品化し、上市されている。

ここでは、コーヒーの香り、品質、健康に重要な不揮発性および揮発性化合物の化学組成について概観するとともに、抗酸化作用を有する含有化合物の化学について述べる。

1-1 コーヒーの生産工程

コーヒーノキになる赤い果実をコーヒーチェリーとよび、その種子がコーヒー豆となる。収穫されたコーヒーチェリーから、最終的に飲料として消費者に届けられる形態に加工される過程には、一連の工程が存在する。この各工程を目的に応じて、制御・最適化することで、良質なコーヒー製品が生産されている。具体的には、農園から収穫後、コーヒーチェリーは精製工程とよばれる一次加工を受けて果肉と豆に分離され、続く乾燥工程により貯蔵に適した水分量まで乾燥する。この工程で得られるものが、いわゆるコーヒー生豆である。続いて焙煎工程を経てコーヒー特有の香味を

発現させた後、焙煎コーヒー豆として製品化される。缶コーヒーなどのいわゆる容器詰め飲料は、これに引き続いて焙煎コーヒー豆を粉碎、抽出、充填、殺菌などの飲料化工程を経て、製品化されている。

1-2 コーヒー生豆の生産

良質なコーヒーを生産するためには、収穫方法が重要である。コーヒーチェリーの成熟度と収穫、豆の乾燥、貯蔵中のカビ汚染の回避は特に重要である。カビ汚染は、カビ毒がヒトの健康に影響を及ぼす可能性があるため、最終飲料の香りだけでなく、その生理活性にも影響を及ぼす可能性がある[6-8]。

コーヒーチェリーは、手摘みあるいは大型機械で収穫される。手摘みは、良質なコーヒー豆を生産する傾向があり、ブラジルなどの大規模農園で行われている大型機械による収穫は、安価である反面、未成熟のチェリーの混在が起りやすい。カップ品質に関連する内因性欠点は、未成熟、黒色、酸味、黒色の未成熟、害虫による損傷、および破損などである。とりわけ黒色、黒色未熟、未熟豆は、重大な欠点と考えられている[8]。

収穫後、コーヒーチェリーは精製工程を経てコーヒー生豆となるが、湿式法と乾式法が最も一般的な精製法である。乾式法では、含水率が約10～12%になるまで天日または熱風乾燥器で乾燥する[9]。乾燥後は、果肉部分を脱殻した後、豆を機械的あるいは電子的に選別し、欠点豆を除去する。この方法は、日射量と大規模な平地が豊富で、チェリーが機械的に収穫されることが多いブラジルやアフリカでよく用いられている。一方、湿式法はより高度な方法であり、高品質な豆を生産できると言われている。貯水槽でコーヒーチェリーを比重選抜した後、果肉を除去し、さらに発酵槽で残ったぬめりを取り除く。つづいて洗浄し、天日あるいは熱風で乾燥させた後に脱殻し選別を行う。湿式法は、コロンビア、アジア、中央アメリカなど、豊富な水量を確保でき、手摘みによってコーヒーを収穫する地域で頻繁に用いられている。

1-3 コーヒーの焙煎

コーヒー生豆の香りは、「コーヒー」という言葉を聞いたときに想像されるものとは全く別物である。すなわち、焙煎工程を通して初めてコーヒーの特徴的な香りと風味が発現する。しかし、この香りと風味の発現の化学的なメカニズムは非常に複雑であり、いまだ完全には解明されていない。焙煎時の高温は豆に風味と生理活性に影響する様々な変化を引き起こす。焙煎初期には、自由水が蒸発する。豆の温度が130 °Cに達すると、カラメル化し、豆は褐色になり、膨張し始める。160 °Cより高温では、発熱反応と吸熱反応が起こり、豆は明褐色になり、その体積はかなり増加し、香り物質の生成が始まる。焙煎コーヒーの香りの原因となる化学反応は、およそ190 °C前後で起こる。炭水化物、タンパク質、その他の化合物が関与するメイラード反応とストレッカー分解では、メラノイジンなどの化合物の分解あるいは生成が同時に生じる。この過程で、淡褐色の豆は黒色に変化する[3]。さらに、均一の焙煎度を得るためには、焙煎機中のコーヒー豆の量、温度、焙煎時間などの焙煎パラメータの調整が重要となる。豆が所望の色に到達する速度おも、コーヒーの香りおよび生理活性に関与する物質の変化に影響を及ぼす。従って、同じコーヒー生豆から同一の焙煎度に焼いた2つのサンプルであっても、異なる焙煎パラメータを用いていた場合、異なる化学組成を有する可能性があるということである。例えば、高温で短時間焼いたコーヒーは、低温で長時間焼いたコーヒーに比べて、酸味が強く、可溶性固形物が多く、揮発性成分組成が異なる[26]。

1-4 コーヒーの抽出方法

抽出液の化学組成に影響するもう一つの要因は、抽出方法である。一般的に抽出方法には85 °C–95 °Cの熱湯を使用する。焙煎コーヒー豆の熱湯に対する割合は、地域または個人の嗜好によっても異なるが、通常コーヒー8~20gに対し100mLの熱湯を使用する。抽出に用いる粉碎コーヒー豆の

粒子径は、抽出方法により細挽きから粗挽きまで幅があり、抽出時間または速度とも合わせて、生理活性物質や香り物質の抽出率に影響する。一般的な抽出方法は、ドリップ式、ボイル式、サイフォン式、エスプレッソ、プレス式などである。ドリップ式では、中挽きコーヒーを、ドリッパーにセットした紙、布、またはナイロンフィルターに均等に広げ、熱湯をフィルターの中央に向かって円を描くようにコーヒーの上に注ぐ。ボイル式は、微粉碎または粉碎したコーヒーの上に水を注ぎ、鍋に入れて加熱する。エスプレッソは、粗挽きまたは中挽き程度粉碎コーヒー豆におよそ90℃と9気圧で加圧された熱水を通して抽出する。プレス式では、粗挽きコーヒー豆と熱湯をビーカー状の容器の中で数分間混合させた後、メッシュのついたプランジャーを押してビーカーの底部にコーヒー粉を分離し、上澄みの抽出液を飲む。また、容器詰飲料製造工程においては、抽出器の構造が単純であり、温度や抽出速度による風味の制御が任意に制御でき、生産性にも優れているドリップ式が一般的に採用されている。

1-5 コーヒー豆の成分組成

コーヒー生豆の基本的な成分組成は、主として種などの遺伝的側面や成熟度などの生理学的側面に依存することが知られている [10-12]。しかし、化学組成が特異な品種も見出されている。例えば、最近、カフェインを含まないアラビカ種の品種が発見された[11,13]。これらの内因性要因に加えて、土壌組成、気象条件、農業技術、貯蔵条件などの外因性要因も豆の代謝経路に影響し、化学組成の変化を引き起こす [13,14]。したがって、コーヒーの化学組成を比較する際には、これらの側面も考慮すべきである。例えば、高品質コーヒーの香りは、同じ品種であっても異なる地域、あるいは異なる農園で栽培した品種によって大きく異なる。これは気候および微生物叢を含む土壌が異なるため、微量に存在する化合物およびミネラルの濃度の分布に変化が生じた結果、植物の代謝が変化し、飲料化時の官能特性にまで影響する大きな変化をもたらしていると考えられる。コーヒーノキの代表的な種であるアラビカ種とカネフォラ種はさまざまな点で異なっている。カネフォラ種

の亜種の一つにロブスタ種があり、栽培されているカネフォラ種の大部分を占めており、カネフォラ種を別名としてロブスタ種と呼称することが多い。ロブスタ種は、ラテン語で力強いという意味をもつ。名前から示唆されるように、アラビカ種よりも気候変化に強く、害虫や病気に対して抵抗力があり、低高度(300-800m)でも栽培することができ、収穫量も多いという、より頑強な種であるといえる。その風味は、苦味が強く渋みがあり、ロブスタ臭とも呼ばれる麦茶に似た特有の香ばしい香りがある。ロブスタコーヒーには、抗酸化物質やカフェインも多く含まれている。さらに、ロブスタコーヒーは可溶性固形物を多く含んでおり、従来はインスタントコーヒーのボディ感(飲み応え、満足感、コク)を付与するためにブレンドされて用いられてきた。一方、アラビカコーヒーは、ボディ感を持つロブスタに比べ、酸味が強く、花のような甘い花の香りを持っており、標高1000-2000mの熱帯高地での栽培が適しているとされている。その上、霜、乾燥、病害虫などにも弱く、栽培が難しい品種であるといえる。その結果、ロブスタ豆の価格はアラビカ豆の約半分である[1]。しかし、注意深く収穫して加工したロブスタ豆は低品質のアラビカ豆よりも優れたカップ品質となる可能性もある。

アラビカ種に含有されている大部分の化合物はロブスタ種にも存在するが、その相対的割合は大きく異なる。さらに、ロブスタ種には、アラビカ種には存在しない少数の二次代謝物(例えば、少量のクロロゲン酸類(CGAs)およびジテルペン)が含まれている。これまでロブスタ種の抵抗性とアラビカ豆のカップ品質を組み合わせるための交配が試みられてきた。しかし、ロブスタ種の害虫抵抗性の原因とカップ品質の低下の部分的な原因は同一である可能性が高い。たとえば、ロブスタコーヒーのCGAs含量が高いと、微生物、昆虫、紫外線から植物を守ることができる[22]。CGAsは焙煎時に生成する良好な香気に重要であるが、CGAs含量が高い生豆は、カップ品質が低下する傾向があり、これは焙煎前の工程で生成される酸化生成物の濃度が高くなるためと考えられている[20]。加えて、タンパク質、多糖類などの細胞壁組成の違いも、焙煎時における風味に關与する成分の発現に影響する。

1-6 コーヒー生豆の化学組成

1-6-1 コーヒー生豆中の不揮発性化合物

コーヒー生豆の不揮発性画分は、主として水、炭水化物および繊維、タンパク質、ならびに遊離アミノ酸、脂質、ミネラル、有機酸、CGAs、トリゴネリン、およびカフェインから構成される(Table 2).

Table 2 コーヒー生豆の成分組成 (g/100g)

成分	アラビカ	ロブスタ
ショ糖	6.0-9.0	0.9-4.0
還元糖	0.1	0.4
多糖類	34-44	48-55
リグニン	3.0	3.0
ペクチン	2.0	2.0
タンパク質/ペプチド	10.0-11.0	11.0-15.0
遊離アミノ酸	0.5	0.8-1.0
カフェイン	0.9-1.3	1.5-2.5
トリゴネリン	0.6-2.0	0.6-0.7
コーヒーオイル(トリグリセリド, ステロール/トコフェロール)	15-17.0	7.0-10.0
ジテルペン(遊離およびエステル化)	0.5-1.2	0.2-0.8
ミネラル	3.0-4.2	4.4-4.5
CGAs	4.1-7.9	6.1-11.3
脂肪酸	1.0	1.0
キナ酸	0.4	0.4

出典: Clarke [19], Clifford [25], Trugo [137], Trugo [24], Clarke [3], Koelling-Speer [33], Speer [36], Farah [14], Farah [22], Holscher [39], Fischer [40].

また、これらは生理活性を有する物質が含まれており、焙煎後の飲料の風味にも寄与する重要な物質である。コーヒー生豆中からアントシアニンやリグナンなどの微量のフェノール化合物が果実の残留物として報告されている[22]。また、豆中にテオフィリン及びテオブロミンも確認され、カフェイン代謝物として報告されている[13]。

1-6-2 コーヒーポリフェノール

ポリフェノールは、同一分子内に2つ以上のフェノール性水酸基を有する物質の総称であり、植物に広く分布している。ポリフェノールは、フラボノイド、フェノール酸、ヒドロキシ桂皮酸、リグナンの4つのカテゴリーに大別できる(Fig. 1)[52].

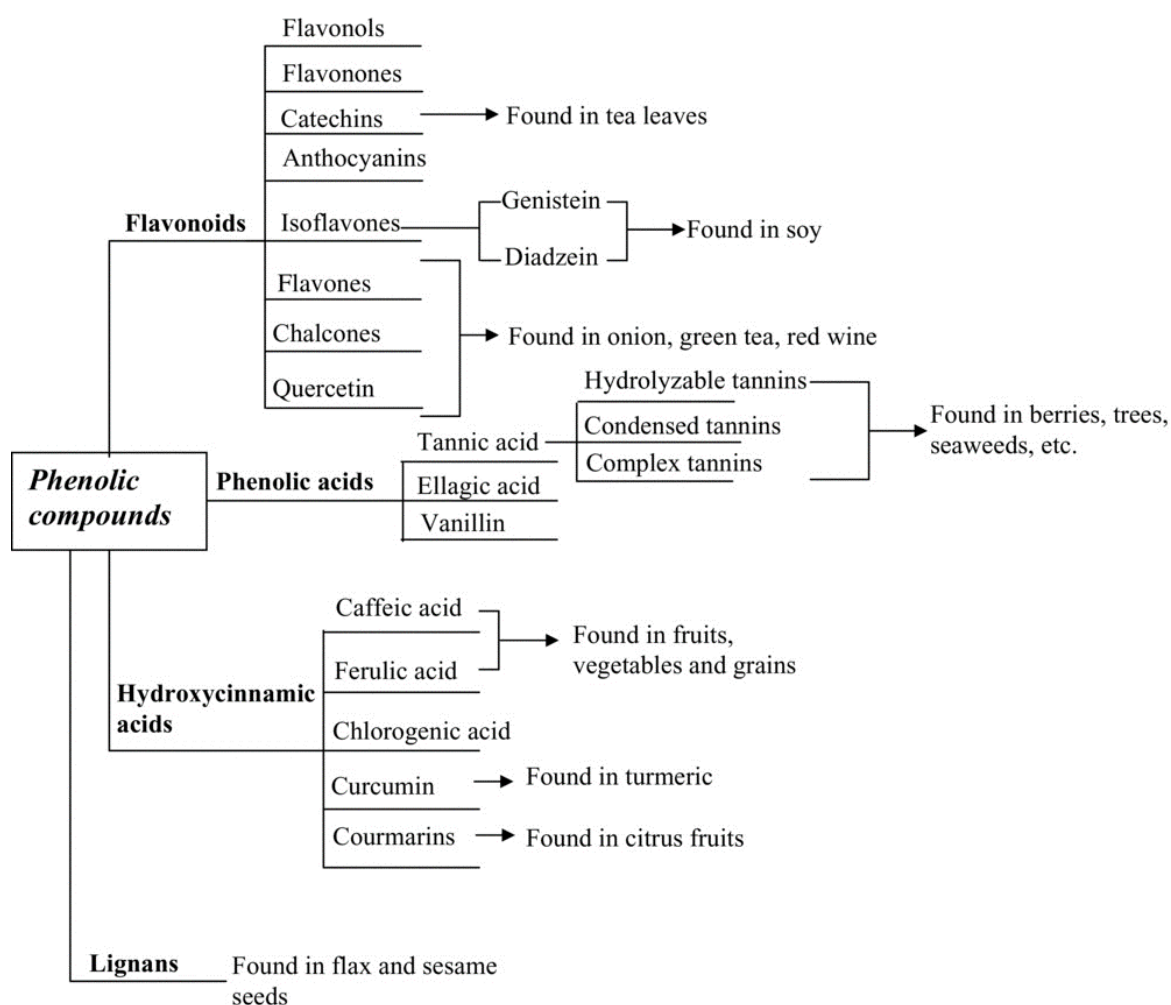
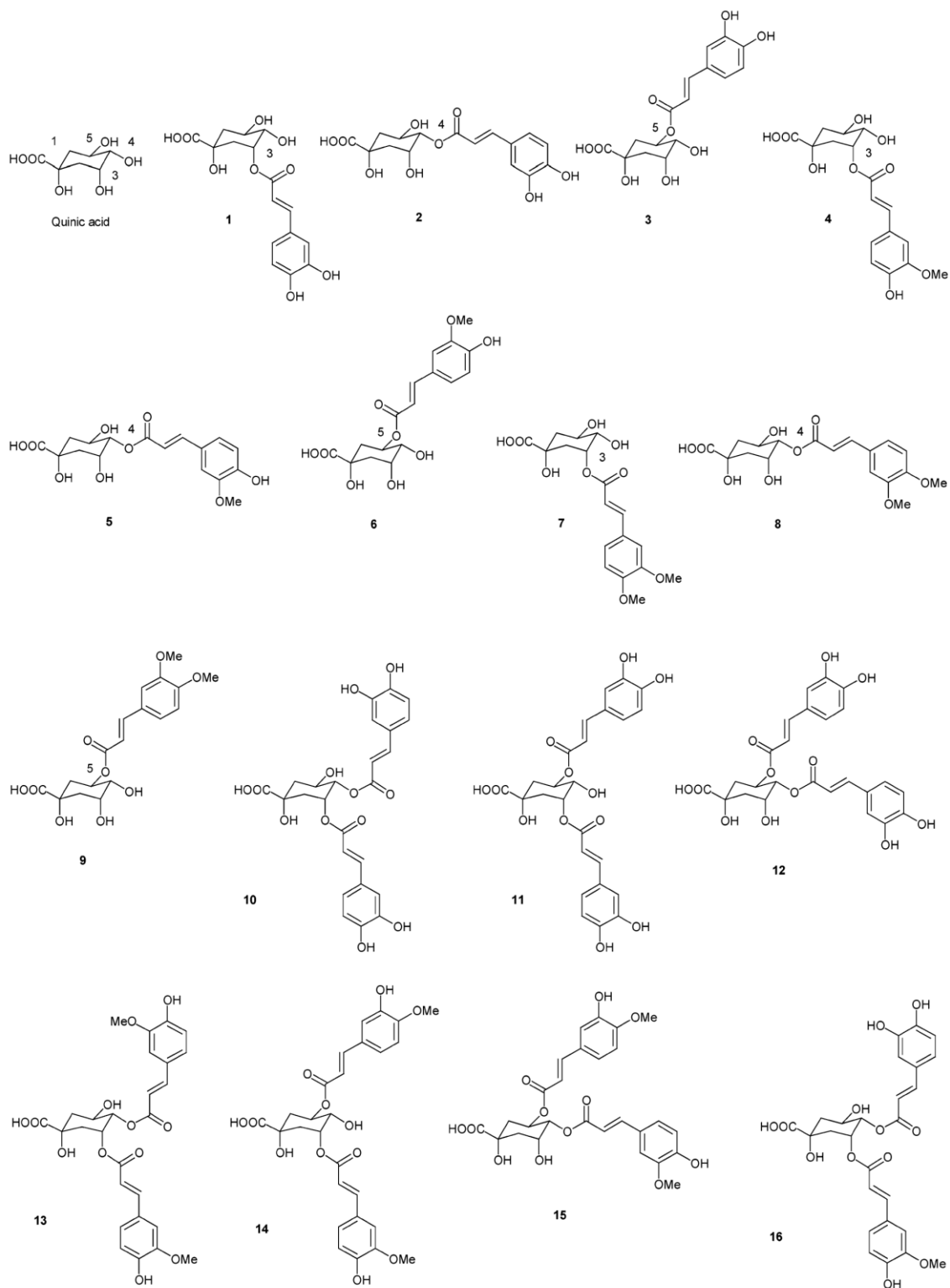
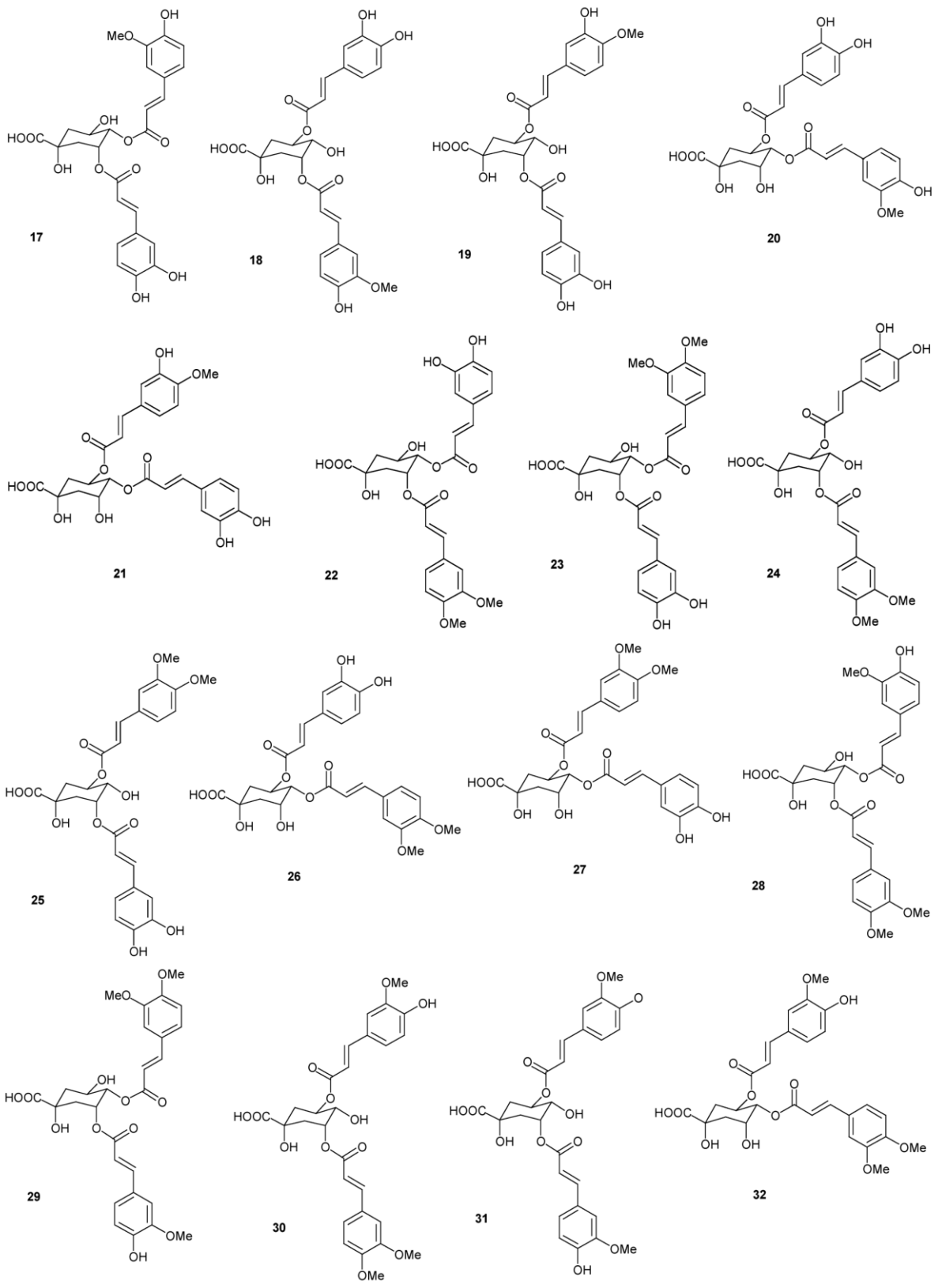


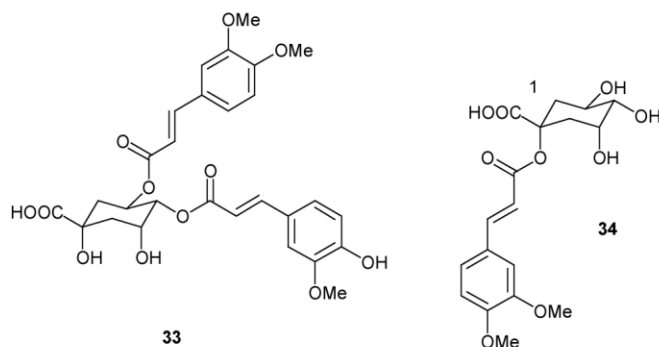
Fig. 1 ポリフェノールの分類

コーヒー中に最も豊富に含まれるポリフェノールは、クロロゲン酸類(CGAs)であり、コーヒー生豆の乾燥物重量の12%を占める。CGAsは、桂皮酸類(カフェ酸、フェルラ酸、および*p*-クマル酸)とキ

ナ酸とのエステル類であり、ヒドロキシ桂皮酸に分類されている。これらはカフェオイル基、シナモイル基、*p*-クマロイル基の数、キナ酸のシクロヘキサン環における結合位置によって細分される[47]。エステル結合は、C-5位ならびにC-3位およびC-4位に位置するヒドロキシ基部分で形成される。あまり一般的ではないが、C-1に位置するヒドロキシ基においてエステルが形成されることもある。コーヒー生豆から検出されるクロロゲン酸類の分子構造をFig. 2に示す[53]。その主な成分はカフェオイルキナ酸(CQAs, **1-3**)、ジカフェオイルキナ酸(**10-12**)、フェルロイルキナ酸(**4-6**)、および少量のカフェオイル-フェルロイルキナ酸(**16-21**)と*p*-クマロイルキナ酸およびそれらの位置異性体からなり、カフェオイルキナ酸類(CQAs)はCGAs含量の約80%を占める。特に、同定された最初の化合物である5-カフェオイルキナ酸(5-CQA)は、その約60%を占める。Cliffordらは、アラビカ種およびロブスタ種の生豆において、ジカフェオイルキナ酸、ジメトキシシナモイルキナ酸、カフェオイル-ジメトキシシナモイルキナ酸、ジフェルロイルキナ酸、およびフェルロイル-ジメトキシシナモイルキナ酸、シナモイルキナ酸、シナモイル-カフェオイルキナ酸、シナモイル-フェルロイルキナ酸、フェルロイル-シナモイルキナ酸、および*p*-クマル酸含有化合物を含む一連のマイナーなCGAsおよび関連化合物を同定した[20-23]。







Notes to Fig. 2

Name and abbreviation	Number	R ₁	R ₃	R ₄	R ₅
3-O-caffeoylquinic acid	1	H	C	H	H
4-O-caffeoylquinic acid	2	H	H	C	H
5-O-caffeoylquinic acid	3	H	H	H	C
3-O-feruloylquinic acid	4	H	F	H	H
4-O-feruloylquinic acid	5	H	H	F	H
5-O-feruloylquinic acid	6	H	H	H	F
3-O-dimethoxycinnamoylquinic acid	7	H	D	H	H
4-O-dimethoxycinnamoylquinic acid	8	H	H	D	H
5-O-dimethoxycinnamoylquinic acid	9	H	H	H	D
3,4-di-O-caffeoylquinic acid	10	H	C	C	H
3,5-di-O-caffeoylquinic acid	11	H	C	H	C
4,5-di-O-caffeoylquinic acid	12	H	H	C	C
3,4-di-O-feruloylquinic acid	13	H	F	F	H
3,5-di-O-feruloylquinic acid	14	H	F	H	F
4,5-di-O-feruloylquinic acid	15	H	H	F	F
3-O-feruloyl, 4-O-caffeoylquinic acid	16	H	F	C	H
3-O-caffeoyl, 4-O-feruloylquinic acid	17	H	C	F	H
3-O-feruloyl, 5-O-caffeoylquinic acid	18	H	F	H	C
3-O-caffeoyl, 5-O-feruloylquinic acid	19	H	C	H	F
4-O-feruloyl, 5-O-caffeoylquinic acid	20	H	H	F	C
4-O-caffeoyl, 5-O-feruloylquinic acid	21	H	H	C	F
3-O-dimethoxycinnamoyl, 4-O-caffeoylquinic acid	22	H	D	C	H
3-O-caffeoyl, 4-O-dimethoxycinnamoylquinic acid	23	H	C	D	H
3-O-dimethoxycinnamoyl, 5-O-caffeoylquinic acid	24	H	D	H	C
3-O-caffeoyl, 5-O-dimethoxycinnamoylquinic acid	25	H	C	H	D
4-O-dimethoxycinnamoyl, 5-O-caffeoylquinic acid	26	H	H	D	C
4-O-caffeoyl, 5-O-dimethoxycinnamoylquinic acid	27	H	H	C	D
3-O-dimethoxycinnamoyl, 4-O-feruloylquinic acid	28	H	D	F	H
3-O-feruloyl, 4-O-dimethoxycinnamoylquinic acid	29	H	F	D	H
3-O-dimethoxycinnamoyl, 5-O-feruloylquinic acid	30	H	D	H	F
3-O-feruloyl, 5-O-dimethoxycinnamoylquinic acid	31	H	F	H	D
4-O-dimethoxycinnamoyl, 5-O-feruloylquinic acid	32	H	H	D	F
4-O-feruloyl, 5-O-dimethoxycinnamoylquinic acid	33	H	H	F	D
1-O-dimethoxycinnamoylquinic acid	34	D	H	H	H

C = caffeoyl; D = dimethoxycinnamoyl; F = feruloyl; H = hydrogen

Fig. 2 コーヒー豆に含有されているクロロゲン酸類の分子構造

CGAsはコーヒー抽出液に渋味、苦味、酸味の官能特性を付与する。また、CGAsはフェノールやカテコールの前駆体であり、焙煎時に不快な香りの一部に変化する可能性がある[24]。なかでもカフェオイルキナ酸およびフェルロイルキナ酸は、焙煎前の生豆の時に酸化物あるいは分解物を生成し、焙煎時に不快な香気物質が生じることが報告されている[20]。

疫学および臨床的研究により、コーヒーの飲用がII型糖尿病[54-59]、パーキンソン病およびアルツハイマー病[27]、肝臓癌[28,29]のリスクを低下させることが報告されている。これらはCGAsの抗酸化活性などに起因するという*in vitro*および動物試験の結果がある[31,37]。さらに、デンマーク、米国、地中海諸国、日本、ブラジルで実施された研究では、コーヒーが食事における抗酸化物質摂取に最も寄与したことが報告されている[72,74-78]。疫学的研究がコーヒーの飲用と健康との関係を報告する以前から、CGAsとその代謝産物の抗変異原性は、一連の動物および*in vitro*試験によって実証されている[79-84]。しかしながら、CGAsが生体内においてどのような挙動を示し、どのような物質に変化して機能を発現しているのか、即ちクロロゲン酸類のバイオアベイラビリティについては未解明な部分が多い。

1-7 焙煎時のコーヒー化学組成の変化

1-7-1 焙煎コーヒー中の揮発性化合物

コーヒーの複雑な香りは、焙煎中の熱分解、ストレッカー分解、メイラード反応によって形成される。焙煎コーヒー中の揮発性化合物の種類と濃度は、生豆中の不揮発性化合物の組成と焙煎条件に依存する。また、コーヒーチェリーの生産地の気候、および成熟度は、焙煎コーヒーの揮発性成分に影響を及ぼす。コーヒーの種類、由来、焙煎度、使用した分析法によって、950種類以上の化合物が焙煎後に同定されている[3]。焙煎コーヒーに典型的に見られる揮発性化合物は、フランおよびピラン、ピラジン、ピロール、ケトンおよびフェノール、炭化水素、アルコール、アルデヒド、酸

および無水物，エステル，ラクトン，チオフェン，オキサゾール，チアゾール，ピリジン，アミン，ならびに種々の硫黄および窒素化合物である[8]。一般に焙煎により，炭水化物からはフラン，アルデヒド，ケトン，フェノールが生成する。タンパク質，ペプチド，アミノ酸からはケトン，ピロロール，ピラジンが生成する。脂質からはわずかな量のアルデヒドとケトンが生成する。CGAsはフェノール性揮発性化合物(例えば，カテコール，ピロガロール，フェノール)を生成する。トリゴネリンからはピロール，ピリジン，およびピラジンが生成する。

コーヒーの揮発性組成には，焙煎度および焙煎条件が影響する。浅煎りコーヒーの香りは深煎りコーヒーの香りとはかなり異なっており，焙煎程度の影響は容易に明らかになる。揮発性化合物の生成は，それらの前駆体の安定性および豆内の存在位置に依存する。さらに，同程度の焙煎度であっても異なる焙煎条件下で得たコーヒー豆は異なる揮発性化合物組成を示すことが確認されている。焙煎条件に影響され得る化合物には，ピリジン，2-メチルピラジン，フルフラール，フルフリルホルメート，2-フラノメタノールアセテート，5-メチル-フランカルバルデヒド，1-(2-フラニルメチル)-1H-ピロール，1-(1H-ピロール-2-イル)-エタノン，2-メトキシフェノール，および4-エチル-2-メトキシフェノールが含まれる。

1-7-2 コーヒー製品におけるチオール化合物

コーヒー製品の製造および保管流通時に生ずる主な課題は，特徴的な香気物質であるチオール化合物の変化であるといわれている[41,42]。これまでコーヒー抽出液におけるチオール減少のメカニズムを解明する研究が試みられ，チオールの揮発性に加えて，酸化反応性および共存化合物に対する反応性が，チオール減少の主要な原因であると推定されている。

有機溶媒中のチオールは，低温でも急速に酸化してジスルフィドに変化する[43]。Blankらはコーヒーを抽出する際に過酸化水素および遷移金属から生成されるヒドロキシルラジカルにより，2-フルフリルチオールが酸化され，ジフルフリルジスルフィドが生成することを報告した[44]。また，

メイラード反応生成物、メラノイジン、フェノールが、コーヒー抽出液におけるチオール減少の主な原因であることが報告されている[45,46, 47].

また、加熱殺菌を行う必要がある容器詰めコーヒー飲料中において、3-メルカプト-3-メチル-1-ブタノールのギ酸エステルは、その酢酸エステルよりも低い熱安定性を示した。これは、3-メルカプト-3-メチル-1-ブタノールの生成を伴うエステルの加水分解に起因しているとされている[48].

コーヒーにおけるチオール化合物の減少とコーヒーの官能特性にとの関連性が高いことにより、チオール化合物は焙煎コーヒーの鮮度を評価するマーカーとして使用されている。2-フルフリルチオールおよび2-フルフリルチオールとヘキサナールの比率は、コーヒーの鮮度評価マーカーとして報告されている[49].

また、CGAsなどから焙煎により生成するヒドロキシヒドロキノンが共存すると、コーヒー抽出液の貯蔵中にチオール減少することが報告されている[50,51]. しかしながら、その反応生成物の分子構造、およびその詳細な反応機構について完全には解明されていない。

1-7-3 焙煎コーヒー中の不揮発性成分

焙煎豆の成分組成は、熱分解、カラメル化反応、メイラード反応等により、焙煎中に劇的に変化する。その中には、生理活性化合物や抽出液の香りに重要な揮発性物質への変化が含まれる。焙煎コーヒーの最終組成は、原料、焙煎度とともに、用いた焙煎機の構造、焙煎プロファイル、および熱風速度等の焙煎条件によって異なる。

CGAsは熱不安定性のため、焙煎中に多くの変化、すなわち異性化、エピマー化、ラクトン化、フェノールやカテコール等の低分子化合物への分解(Fig. 3)、メラノイジンへの取り込みを受け、これらは色や香りの発現に影響する。市販の一般的な焙煎コーヒー中のCGAs含量は、種類によって0.5~6%の範囲にあるが、焙煎度の進行に伴い減少し、例えば深煎りコーヒー豆では元の含有量の1%未満になる。

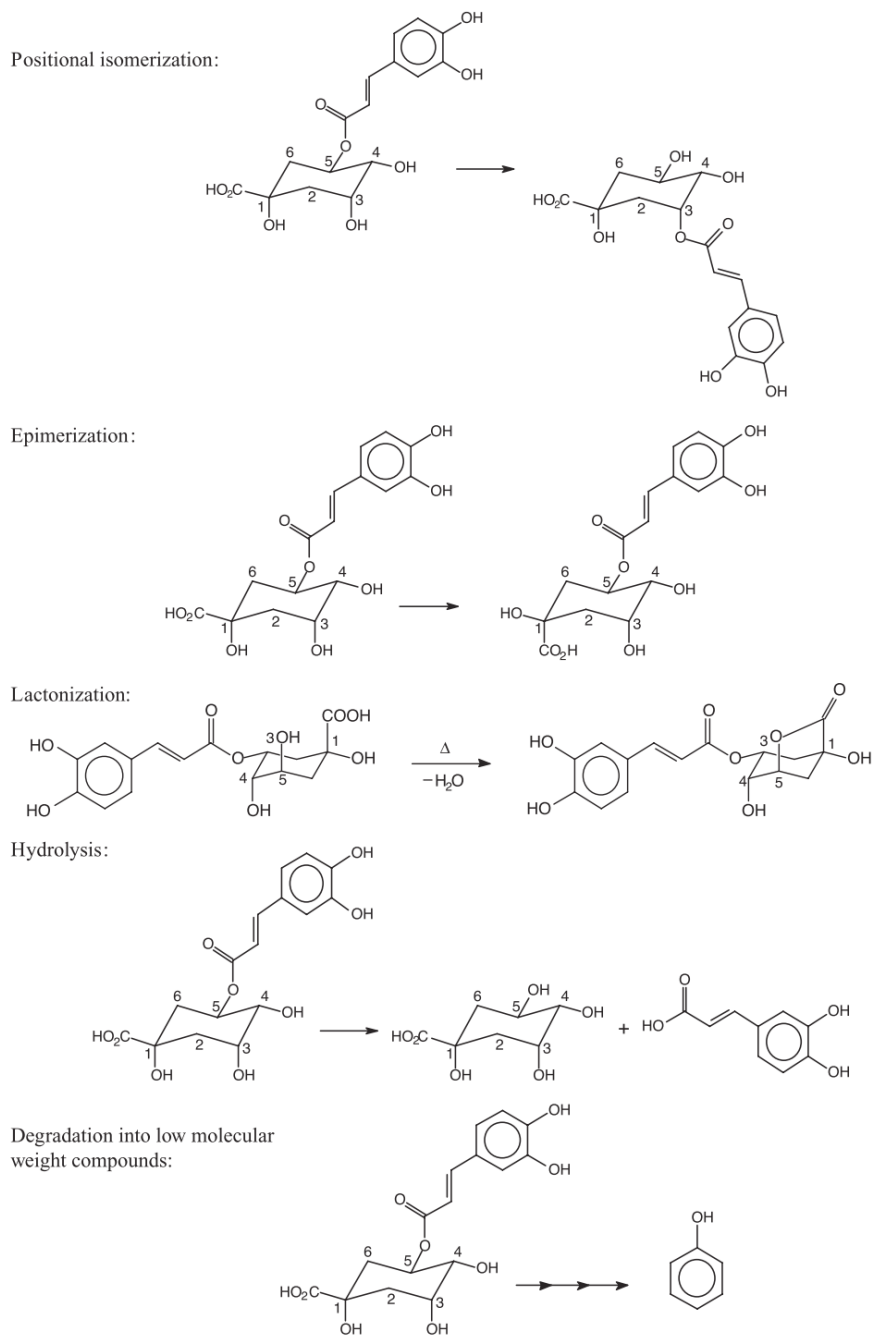


Fig. 3 焙煎中のCGAsの変化

CGAsは、キナ酸部に存在するカルボキシ基と水酸基間で脱水を伴う分子内エステル化が進行し、対応するラクトンへと変換される。コーヒー生豆中ではCGAsラクトン類が10%程度形成され、その主生成物は1,5-ラクトンであり(Fig. 3)、1,3-ラクトンの副生も確認されている[126]。CGAsラクトン

類はコーヒー飲料の苦味に寄与し、カップ品質に重要な影響を与える。また、これらのラクトンは、カフェインの薬理作用とは無関係に脳機能に影響を及ぼす可能性があるため、注目されている。

ここまで概観したように、コーヒー豆は多種多様な成分を含んでおり、さらに、それらの成分は焙煎・加工あるいは抽出過程を経て、複雑な生成物を与える。さらに、含有される物質間での反応も可能であるため、コーヒー製品に含まれる物質は、コーヒー豆の栽培から焙煎・加工、抽出過程から製品化のすべての反応プロセスの履歴を背負った複雑系と考えることができる。

本研究では、コーヒー豆の主要なポリフェノールであるCGAs(CQAs)の化学的挙動解明の一環として、その抗酸化作用の機構解明と包接複合体形成の制御を目指した。まず、工程中におけるCGAsの酸化生成物とコーヒー豆中に共存する求核性物質との反応のメカニズムの解明を検討するために、第2章では、CGAのモデル化合物として4-メチルカテコール (MC)、求核物質として*N*-アセチルシステイン(NACys)とりあげ、MCの酸化反応とそれに引き続く求核反応について検証した。第3章では、求核物質としてのアルコールの効果という観点から、CGAのアルコール溶液中でのラジカル消去活性の増強機構について明らかにする。第4章では、コーヒー抽出物に最も多く含有されているCGAの一種である5-CQAを対象物質として、5-CQAのDPPHラジカル消去活性に対して、求核剤として共存するチオールがおよぼす増強効果を検証する。一方、第5章においては、CQAsとシクロデキストリン(CyD)との包接複合体の形成とその分子機構について検討する。

1-8 参考文献

- [1] International Coffee Organization (ICO).www.ico.org
- [2] Yeretian, C., Jordan, A., Lindinger, W. *Int. J. Mass Spectr.* **2003**, 223–224, 115–139.
- [3] Clarke, R. J. Coffee: green coffee/roast and ground. In: Encyclopedia of Food Science and Nutrition, 2nd edition, Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P., eds. Oxford: Academic Press; **2003**, Vol. 3.
- [4] ABIC, 2011. Brazilian Association of Coffee Industry (Technical information).
- [5] Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., Iamanaka, B. T. *Int. J. Food. Microbiol.* **2003**, 82, 173–179.
- [6] Ferraz, M. B. M., Farah, A., Iamanaka, B. T., Perrone, D., Copetti, M. V., Marques, V. X., Vitali A. A., Taniwaki, M. H. *Food Control.* **2010**, 21, 872–877. Coffee Constituents 51
- [7] Cirilo, M. P. G., Coelho A. F. S., Ara'ujo C. M., Gonc,alves F. R. B., Nogueira F. D., Gl'oria M. B. A. *Food Chem.* **2003**, 82, 397–402.
- [8] Toci, A. T., Farah, A. *Food Chem.* **2008**, 108, 1133–1141.
- [9] Toci, A. T., Farah, A., Trugo, L. C. *Qu'umica Nova.* **2006**, 29, 965–971.
- [10] Ogita, S., Uefugi, H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H. *Nature* **2003**, 423, 823.
- [11] Silvarola, M. B., Mazzafera, P., Fazuoli, L. C. *Nature* **2004**, 249, 826.
- [12] National Coffee Association (NCA). U.S. Coffee Consumption. <http://www.ncausa.org>. (accessed March 2011).
- [13] Mazzafera, P., Baumann, T. W., Shimizu, M. M. *Tropical Plant Biol.* **2009**, 2, 63–76.
- [14] Farah, A., de Paulis, T., Trugo, L. C., Martin, P. R. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 374–381.
- [15] Farah, A., Perrone, D., Fernandes, J., Silanes, J. *Proc. 23rd Int. Conf. Coffee Sci.* **2010**. ASIC, 367–372. 2010., Bali, Indonesia.
- [16] Steinhart, H., Luger, A. *Proc. 17th Int. Sci. Coll. Coffee (Nairobi)*. ASIC, 155–160. **1997**. Paris.
- [17] Maier, H. G. *Proc. 15th Coll. Sci. Int. Caf'e*, ASIC, 567–576. **1994**. Montpellier, Paris.

- [18] Variyar, P. S., Ahmad, R., Bhat, R., Niyas, Z., Sharma, A. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 7945–7950.
- [19] Coffee Board of India. <http://www.indiacoffee.org/default.htm>. (accessed December 3, 2007).
- [20] Farah, A. Instituto de Qu'ímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Doctorate Thesis, 2004.
- [21] Toci, A. T., Silva, C. M., Fernandes, F., Farah, *Proc. 23rd Int. Conf. Coffee Sci.* ASIC, 500–503. **2009**. Trieste, Italy.
- [22] Farah, A., Donangelo, C. M. *Braz. J. Plant Physiol.* **2006**, 18, 23–36.
- [23] Shearer, J., Sellars, E., Farah, A., Graham, T. E., Wasserman, D. H. *Can. J. Phys. Pharm.* **2007**, 85, 823–830.
- [24] Trugo, L. C. Coffee Analysis. In: Encyclopedia of Food Science and Nutrition, 2nd edition, Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M., eds. Oxford, UK: Oxford Academic Press; **2003**, Vol. 2, p. 498.
- [25] Clifford, M. N. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1033–1043.
- [26] Agardh, E. E., Carlsson, S., Ahlbom, A., Efendic, S., Grill, V., Hammar, N., Hilding, A., Ostenson, C. *G. J. Intern. Med.* **2004**, 255, 645–652.
- [27] Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hebert, R., Helliwell, B., Hill, G. B., McDowell, I. *Am. J. Epidemiol.* **2002**, 156, 445–453.
- [28] Larsson, S. C., Wolk, A. *Gastroenterology*, **2007**, 132, 1740–1745.
- [29] Ranheim, T., Halvorsen, B. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, 274–284.
- [30] Hemmerle, H., Burger, H. J., Bellow, P., Schubert, G., Rippel, R., Schindler, P.W., *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 137–145.
- [31] Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. *J. Nutr.* **2003**, 133, 2812–2819.
- [32] Svilaas, A., Sakhi, A. K., Andersen, L. F., Svilaas, T., Strom, E. C., Jacobs, D. R., Jr., Ose, L., Blomhoff, R. *J. Nutr.* **2004**, 134, 562–567.

- [33] Wattenberg, L. W., Coccia, J. B., Lam, L.K. *Cancer Res.* **1980**, 40, 2820–2823.
- [34] Namiki, M. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1990**, 29, 273–300.
- [35] Kölling-Speer, L., Speer, K. The Raw Seed composition. In: Espresso Coffee, the Science of Quality. Illy, A., Viani, R., eds. Italy: Elsevier Academic Press; **2005**, pp. 148–178.
- [36] Speer, K., Kölling-Speer, I. *Braz. J. Plant Physiol.* **2006**, 18, 201–216.
- [37] Trugo, L. C., Macrae R. *Food Chem.* **1984**, 15, 219–227.
- [38] Sholz, B. M., Maier, H. G., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1990**, 190, 132–134.
- [39] Fischer, M., Reimann, S., Trovato, V., Redgwell, R. *J. Carbohydr. Res.* **2001**, 330, 93–101.
- [40] Holscher, W., Vitzthum, O. G., Steinhart, H. *Cafe, Cacao, The.* **1990**, 34, 205–212.
- [41] Hofmann, T.; Czerny, M.; Calligaris, S.; Schieberle, P. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (5), 2382–2386.
- [42] Hofmann, T.; Schieberle, P. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (2), 319–326.
- [43] Hofmann, T.; Schieberle, P.; Grosch, W. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44 (1), 251–255.
- [44] Blank, I.; Pascual, E. C.; Devaud, S.; Fay, L. B.; Stadler, R. H.; Yeretjian, C.; Goodman, B. A. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (8), 2356–2364.
- [45] Müller, C.; Hemmersbach, S.; Van't Slot, G.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (26), 10076–10085.
- [46] Müller, C.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55 (10), 4095–4102.
- [47] Müller, C.; Hemmersbach, S.; Van't Slot, G.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (26), 10076–10085.
- [48] Müller, C.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55 (10), 4095–4102.
- [49] Kumazawa, K.; Masuda, H. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (9), 2674–2678.
- [50] Müller, C.; Hemmersbach, S.; Van't Slot, G.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (26), 10076–10085.
- [51] Müller, C.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55 (10), 4095–4102.

- [52] Gaare, Manju & Hussain, Abdul & Mishra, Dr. Santosh & Ram, Chand. *Natural Antimicrobials For preservation of Food*. **2013**. 204-230.
- [53] Michael N. Clifford, Serena Marks, Susan Knight, Nikolai Kuhnert. *J. Agric. Food Chem.* **2006** 54 (12), 4095-4101

第2章

N-アセチルシステイン存在下での 4 - メチルカテコールの酸化反応により生成する チオール付加体の分光学的特性

第2章 N-アセチルシステイン存在下での4-メチルカテコールの酸化反応により生成するチオール付加体の分光学的特性

2-1 緒論

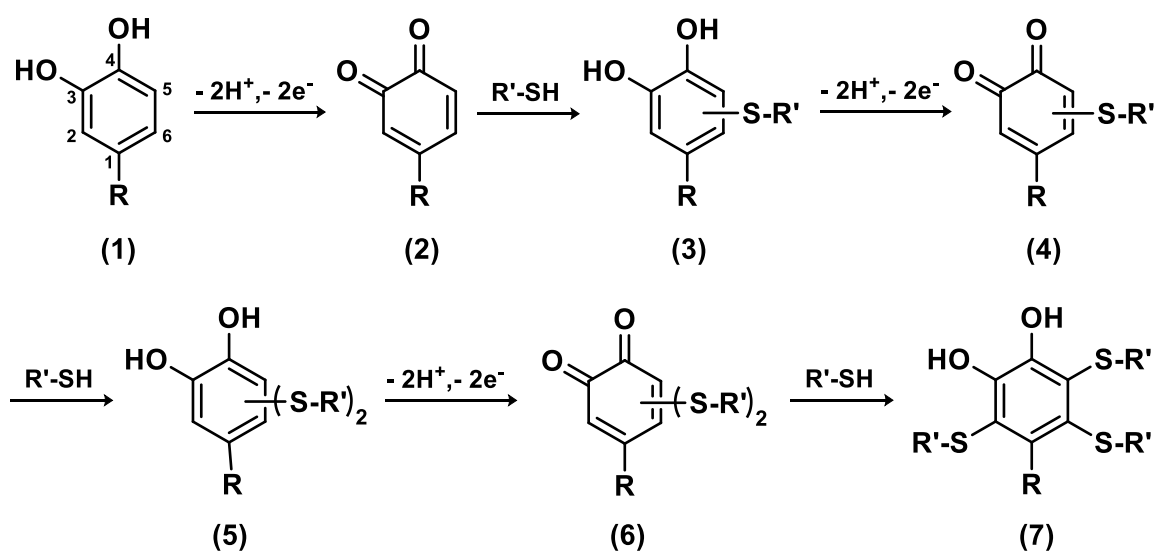
ポリフェノールは、植物界に非常に広く分布し、様々な薬草や食品の健康維持効果を持つ成分として古くから注目されており、なかでも低分子植物ポリフェノールはフラボノイド、フェノール酸およびヒドロキシ桂皮酸に大別されている。植物中で最も豊富に存在するフラボノイドはフラバン-3-オール類であるが、その代表的な物質として緑茶の茶葉中に含まれるカテキンがある。一方、ヒドロキシ桂皮酸には、生コーヒー豆中に見出されるクロロゲン酸類(CQAs)が代表的化合物として挙げられる[1-4]。フラボノイドやフェノール酸の健康作用は、強力な抗酸化作用[5]に由来するといわれている。とくに、これらの物質がもつ*o*-ジフェノール(カテコール)構造の水素供与性または電子供与性に関連するラジカル消去活性を介して、抗酸化作用を発現することが示唆されている。従って、分子中のカテコール部分は、抗酸化活性において重要な役割を果たしているといえる[6-9]。

ポリフェノールの抗酸化活性を評価するために最も一般的に使用される方法として、2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル消去法が知られている[10,11]。多くの論文が植物ポリフェノールのDPPHラジカル消去活性を報告しており、これらの知見は優れた総説[12-14]にまとめられている。

フェノール化合物の抗酸化活性は、分子中のヒドロキシル基の数および配置に依存することが先行研究において示されている[12,15-17]。また、活性測定における溶媒の種類、温度、および他の求核剤の存在などの実験条件は、DPPHラジカル消去活性にも影響を及ぼすといわれている[14]。さらにアミンおよびチオール化合物などの求核剤の共存により、ポリフェノールのDPPHラジカル消去活性の増強が報告されている。例えば、FujimotoおよびMasuda [18]は、カフェ酸エステルの抗酸化活性に対するシスティニルチオールの相乗効果を見出し、SaitoおよびKawabata[19]は、プロトカテ

ク酸のラジカル消去活性が、チオールおよびアミン化合物のような求核試薬の存在下で増加することを報告している。すなわち、DPPHラジカル消去活性の増強は、求核試薬の*o*-キノン中間体への付加反応から生じるカテコール構造の再生に起因する[18,19]。また、チオールは、アミンと比較してはるかに反応性が高いことも報告されている[20]。

チオールの存在下でのカテコール化合物のラジカル消去活性の増強に関しては、Scheme 1に示す反応機構が提案されている。



Scheme 1 チオール求核剤の存在下でのカテコール化合物のラジカル消去反応に対する推定

メカニズム

第1の反応過程において、カテコール(1)はDPPHによって酸化され、*o*-キノン(2)を形成する。求電子種である*o*-キノンは、チオールまたはアミンのような求核試薬による攻撃を受ける[21]。チオールの反応では、カテコールのチオール付加体(3)を与え、これはカテコール構造の再生をもたらす。過剰のDPPHおよびチオールの存在下では、一旦生成したチオール付加体(3)がさらに酸化されて、対応する*o*-キノン(4)を生成し、その後の二つ目のチオールが付加した化合物(5)を与える。1-置換カ

テコール(1)から出発する場合、理論的には、チオール3-付加体 (7)までを生成することができると考えられる。キノンへのチオール付加は、形式的にはキノンの二電子還元と見なすことができるので、連続的なチオール付加体形成は、ラジカル消去活性の増強をもたらすと考えられる。チオール基は求核剤としても還元剤としても作用するので、チオールによる o -キノンの還元もカテコール構造の再生として考慮すべきである[22]。

これまでの広範な研究にもかかわらず、チオールのカテコールへの付加位置が明確でない等、チオールの存在下でのポリフェノールのラジカル消去反応の反応機構は未だ十分解明されていない。CQAの酸化反応とそれに引き続く付加反応の生成物を単離し、それらの分光学的特性を詳細に検討することは、CQAのどの構造が抗酸化反応に寄与しているかを明らかにする反応機構の解明に不可欠な情報であると考えられる。

この章では、チオールのモデルとして N -アセチルシステイン(NACys)を用い、NACys存在下および非存在下での4-メチルカテコール(MC)とDPPHの反応に着目して検証した。MCは、カテキンおよびCQAの部分構造である o -ジフェノール構造を有するので、ポリフェノールのモデル化合物として用いた。

最初に、MCのDPPHラジカル消去活性に対するチオールの増強効果を検証した。つぎに、DPPHラジカル消去反応におけるMCの酸化生成物を、NACysの非存在下および存在下でLC-MSにより分析した。さらに、主要な反応生成物である、MC-NACys付加体を分取HPLCにより単離し、それらの分子構造を1Dおよび2D NMRスペクトルを用いて解析した。

また、MCの過ヨウ素酸酸化とそれに続く o -キノンとNACysとの反応について検証した。カテコール化合物の過ヨウ素酸酸化は、 o -キノンの形成を経由して進行することが報告されている[23–26]。しかし、過ヨウ素酸を用いた反応系では、Scheme 1に示した反応が連続的に起こり、各反応を段階的に観察することが困難である。また、有色な酸化剤が分光学的解析の阻害物質となる。そこで本研究では、過ヨウ素酸を担持した樹脂を調製し、これを酸化剤として用いた(Fig. 1)。本手法では濾

別によって、任意に酸化剤を反応系から分離することができ、酸化反応を段階的に進行させることが可能であるとともに、UV-Vis吸収分光法およびLC-MSを用いて、*o*-キノンの形成およびNACys付加の反応を段階的に追跡可能になると考えた。

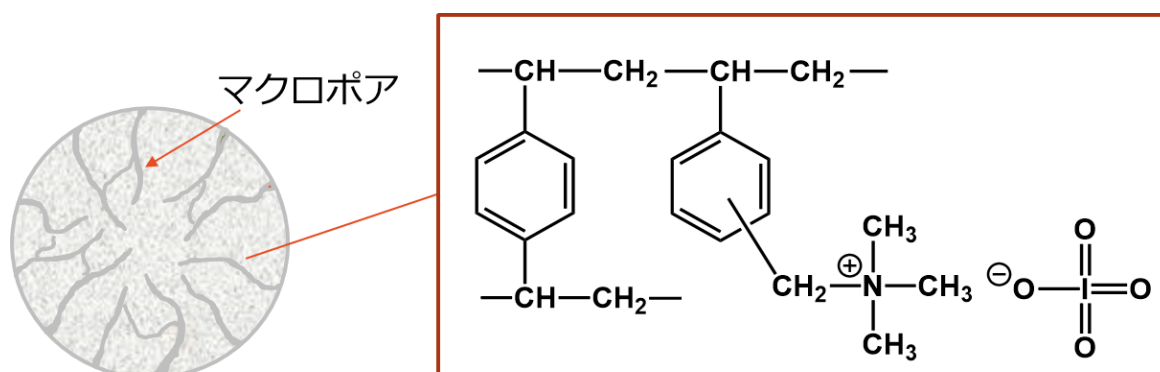


Fig. 1 過ヨウ素酸担持樹脂の化学構造

2-2 実験

2-2-1 DPPHラジカル消去活性

試料のラジカル消去活性は、Mensorら[27]によって提案された方法を一部改変して測定した。すなわちDPPH (19.7 mg)をエタノールに溶解し、100 mLのメスフラスコに定容した (500 μ M)。DPPH溶液は用時調製し、暗所で室温下に保管して使用した。MCおよびチオール化合物はそれぞれ50%エタノールに溶解し、MCについては12.5 μ M、チオール化合物については25 μ Mの濃度に溶解し調製した。試験管にMC (2 mL)およびチオール化合物(2 mL)を予め混合した後、1 mLのDPPH溶液を添加した。溶液をボルテックスミキサーで激しく混合し、暗所かつ室温下においてDPPHを投入後30分間インキュベートした。次いでShimadzu UV-2500分光光度計を用いて混合溶液の517 nmにおける吸光度変化を、室温下で測定した。DPPHを用いたラジカル消去活性は、次式を用いて算出した。

$$\text{ラジカル消去活性(Scavenging Activity, SA, \%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

ここで、 A_{sample} および A_{control} は、それぞれ試料溶液または同量の溶媒と混合された DPPH 溶液の吸光度である。全てのサンプルは 3 回測定した。

2-2-2 過ヨウ素酸樹脂を用いた反応

Harrison[28]の手法にわずかな修正を加えて、過ヨウ素酸担持樹脂を調製した。すなわち200 mLの超純水に20 gの過ヨウ素酸ナトリウム(Wako Chemicals, Japan)を溶解した後、25 gの高多孔性陰イオン交換樹脂(Diaion HPA25, Mitsubishi Chemical, Japan)を投入し、混合した。その溶液を室温で2時間攪拌し、次いで定性濾紙 (No. 2, 15 cm ϕ , Advantec, Japan)を用いて樹脂を濾取した。このようにして得られた樹脂を200 mLの超純水で4回洗浄し、次に100 mLのTHFで2回、そして100 mLのエーテルで2回洗浄した。樹脂を50 mLの試験管に移し、35°Cの真空オーブン中で一晩乾燥させ過ヨウ素酸担持樹脂を得た。

MCおよびMC-NACys付加体の各溶液は、所定量の各サンプルをアセトニトリルに溶解することによって調製した。過ヨウ素酸樹脂をそれらの溶液に添加し、所定の反応時間攪拌した。反応が平衡に達することを確認した後、樹脂を溶液から濾別し、濾液にNACysを添加した。NACysを添加した溶液と添加しない溶液を、UV-Vis分光計およびLC-MSによってそれぞれ分析に供した。

2-2-3 分取HPLC

生成した主要なMC-NACys付加体は、Waters 2487 Dual Absorbance Detector (Waters, USA), YMC Triart C18カラム(250×20 mm ID, 5 μm 粒径, YMC, Japan)を備えたEFヘッド付き1525 バイナリHPLCポンプ(Waters, USA)による逆相分取HPLCを用いて単離した。

2-2-4 UV-Visスペクトル

紫外可視吸収スペクトルは、石英キュベット(光路長, 1 cm)を用いて, 2 nmのバンド光路幅を有するUV-2500分光光度計(Shimadzu, Japan)を用いて測定した。全ての測定は, 室温で200~700 nmの波長範囲で行った。

2-2-5 LC-MS分析

LC-MSは, 飛行時間型質量分析計Synapt HDMS (Waters, USA)に連結された AcquityUPLC (Waters, USA)を用いて行った。分析物を, YMC Triart C18カラム(100×2.1mm ID, 粒子径1.9 μ m, YMC, Japan)を使用して分離した。データは, 質量範囲m/z 50~1000においてScan time (0.2 ms) およびInter-scan delay (0.1 ms)で, centroidモードで収集した。MassLynx 4.1ソフトウェアパッケージ (Waters, Manchester, UK)をデータ取得および処理に使用した。

2-2-6 NMRスペクトル

^1H 及び ^{13}C NMR測定は, CD_3OD 溶液中でJNM-ECA 500分光計 (JEOL Ltd., Japan, 500MHz(^1H)及び125MHz(^{13}C))を用い, 化学シフト値は, テトラメチルシラン(TMS)を基準 ($\delta = 0$) とした相対値としてppmスケールで得た。スピン結合定数はJ値(Hz)で得た。2D-NMR(^1H - ^1H COSY, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence spectroscopy (HMQC)および ^1H - ^{13}C Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy (HMBC))スペクトルも上記の装置を使用して測定した。

2-3 結果及び考察

2-3-1 MCのラジカル消去活性に対するチオールの効果

カテコール化合物のラジカル消去活性におけるチオールの存在による相乗効果は、以下の様に評価した。MCおよびチオールのDPPHラジカル消去活性(Scavenging Ability, SA)をそれぞれ個別に測定して計測値SA(MC)およびSA(チオール)を得た。これらと同じ条件下で、チオール共存下でのMCの消去活性を測定し、得られた値SA(MC+チオール)をSA(MC)とSA(チオール)の和と比較した。4種のチオール抗酸化剤*N*-アセチル-L-システイン(NACys), L-システイン(Cys), グルタチオン(GSH)および*S*-カルボキシメチル-L-システイン(CMC)をチオールとして選択した。NACys, CysおよびGSHは遊離チオール基を有するが、CMCでは、チオール基の水素原子はカルボキシメチル基で置換されている。Fig.2は、MCと各抗酸化剤の消去活性の実測値SA(MC+チオール)、および理論値 (MCの消去活性と各抗酸化剤の消去活性の和, SA(MC)+SA(チオール)) の比較について示している。

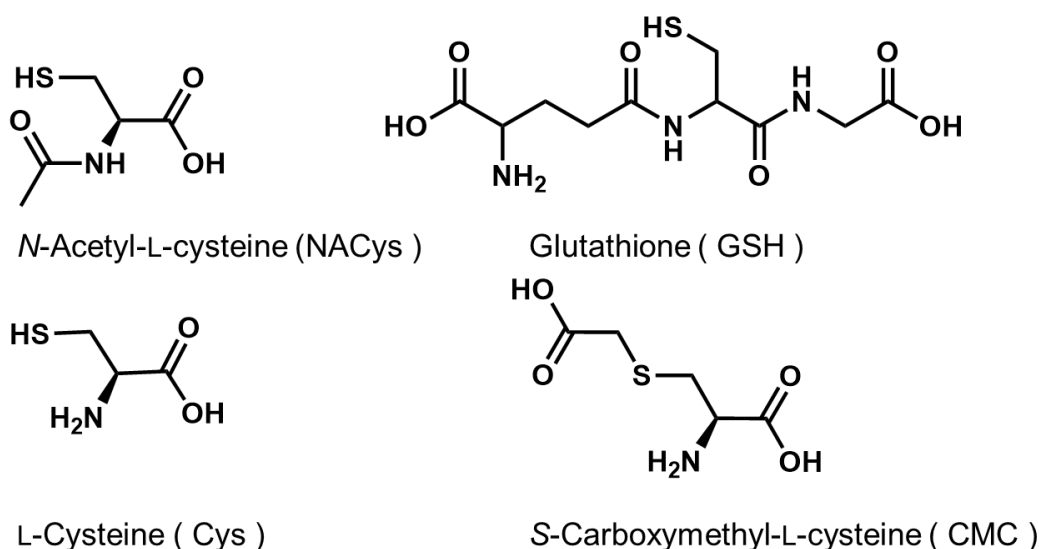


Fig. 2 種々のチオール化合物の分子構造

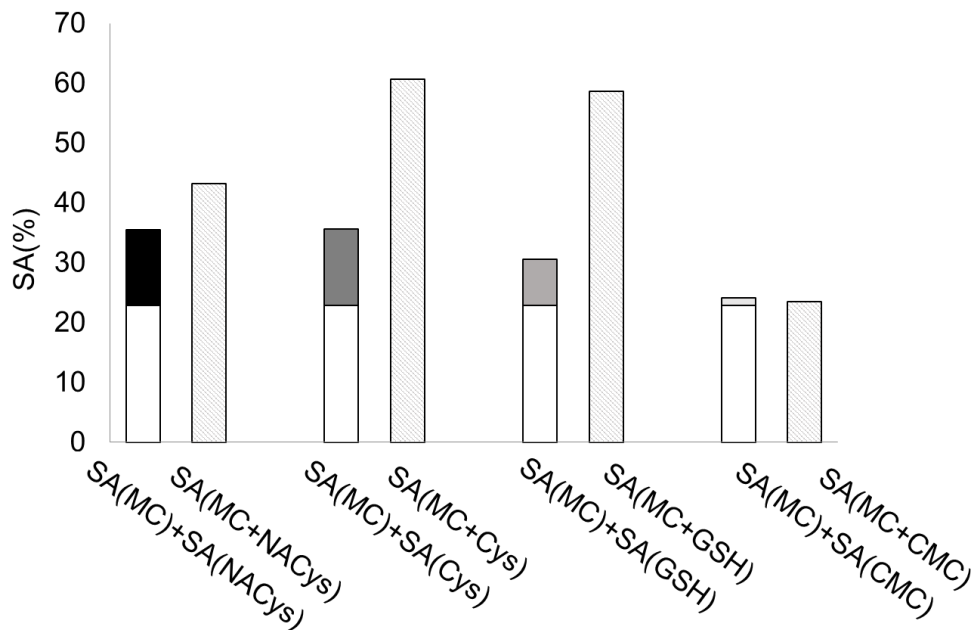


Fig. 3 MCと種々のチオール化合物の組合における理論的および実験的な消去活性の比較

Hamdoら [29]は、相乗効果が実測SA値と理論SA値との間の差、すなわち $\Delta SA = SA(MC+チオール) - \{SA(MC)+SA(チオール)\}$ によって評価されると定義している。すなわち $\Delta SA > 0$ の場合、抗酸化剤間に相乗効果があり、 $\Delta SA \leq 0$ の場合、抗酸化剤間に相乗効果がないということである[30]。Fig. 3からNACys, Cys, またはGSHを含む混合溶液は、それぞれ+7.7%, +25.0%および+28.2%の正の ΔSA 値を示した。すなわちMCのラジカル消去活性が、他のチオール化合物の共存によって高まっていることが示唆された。一方、CMCを用いた混合溶液は、-0.7%の負の ΔSA 値を示した。これらの結果は、正の相乗効果を得るためには遊離チオール基が不可欠であることを示唆している。

2-3-2 DPPHラジカル消去反応におけるLC-MSによる反応生成物の同定

MCおよびDPPHを、NACysの存在下または非存在下で反応させ、得られた反応液をHPLC測定およびLC-MS測定に供した。Fig. 4(a)は、種々の濃度比でのMCおよびDPPHの反応混合液の反応開始120分後におけるクロマトグラムを示している。Fig. 4(b)は、NACys (4当量)を反応混合液([MC]:[DPPH]=1:1)に添加して8時間後のクロマトグラムを示している。

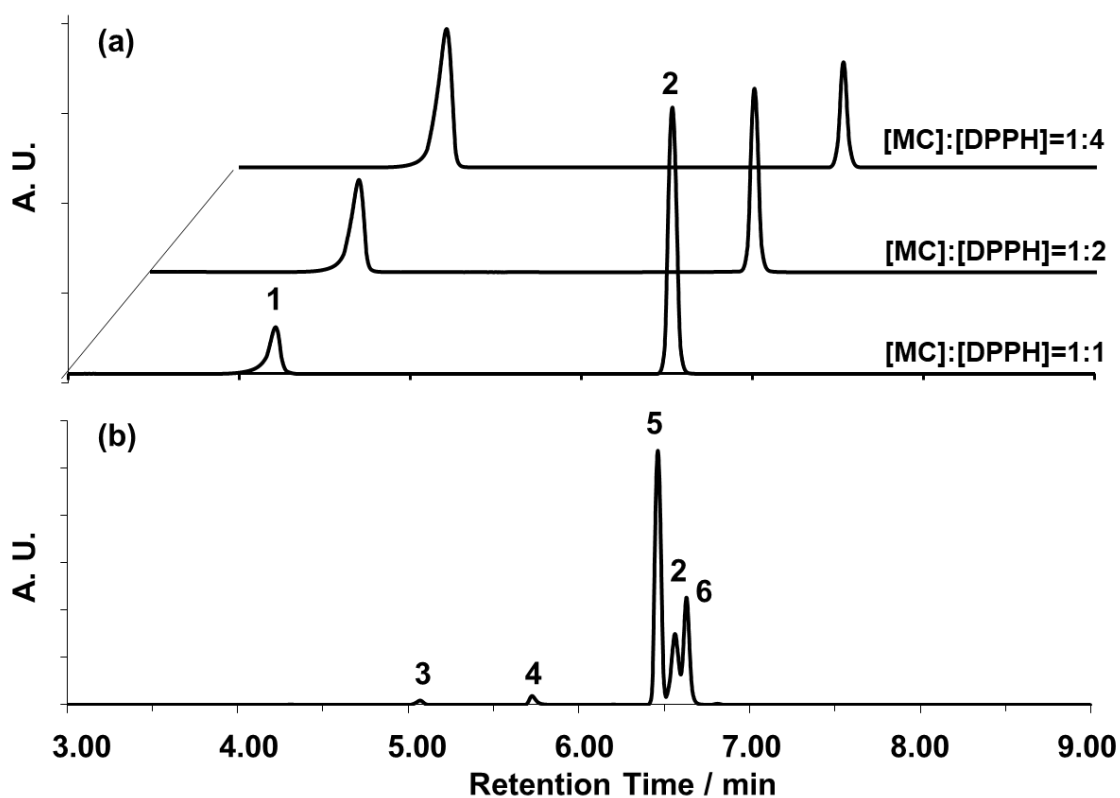


Fig.4 NACys非存在下(a)およびNACys存在下(b)でのMCとDPPHとの反応混合物のHPLC分析(UV 280nm)ピーク2 = MC

反応溶液の最終濃度は、MC、DPPHおよびNACysについてそれぞれ1.25 mM、2.5 mMおよび5.0 mMであった。それぞれのHPLCピークについてのMSおよびUVデータをTable 1に示す。

Table 1 HPLCピーク (Fig. 4) のMSおよびUVデータ

ピークNo.	t_R (min)	λ_{max} (nm)	分子量	[M-H] ⁻ (m/z)	帰属 ^{1,2)}
1	4.23	397.9	122.04	123.00	MCキノン
2	6.57	281.9	124.05	123.00	MC
3	5.07	307.1	446.08	445.05	di-NACys付加体-1
4	5.73	316.9	607.10	606.16	tri-NACys付加体
5	6.46	293.9, 253.9	285.07	284.02	mono-NACys付加体
6	6.63	284.02	446.08	445.10	di-NACys付加体-2

1) mono-NACys付加体, di-NACys付加体およびtri-NACys付加体はそれぞれNACysの1分子, 2分子および3分子付加体を示す.

2) di-NACys付加体-1および-2は異なる位置異性体を示す.

Fig. 4(a)に示すように, MCおよびDPPHの反応混合物について, 約4.2 minおよび6.6 minの保持時間で, 2つのピークのみが観察される. DPPHラジカル消去反応は, *o*-キノンの形成を介して進行することが知られており[31,32], ピーク1と2はMCとMCキノンのいずれかであると考えられる. ピーク2は, 282 nmで吸収極大値を示すとともに, 脱プロトン分子 [M-H]⁻(m/z 123)を示し, これらはいずれもMCに特徴的なピークであるため未反応MCと帰属される. ピーク2(MC)の面積は, DPPHの相対濃度が増加するにつれ減少するが, ピーク1の面積は, 逆に増加する. この実験事実とピーク1が390 nmでの特徴的なUV吸収帯をもつことに基づいて, ピーク1がMCキノンであると判断した. しかし, 質量分析においてピーク1の[M-H]⁻イオンは, MCと同じ質量数であるm/z 123に観察された. Albarranら [33]は1,2-ベンゾキノンについて, イオン化過程で水素化物付加体が生成と報告して

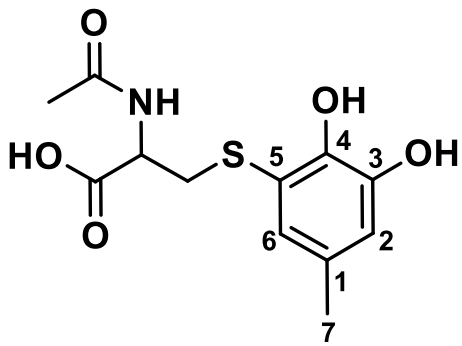
おり、MCキノンはイオン化においてMCへと変化するため、MCキノン由来の質量数が観測できなかったと考えられる。一方、MCキノンは、MC (6.58 min)よりもはるかに短い保持時間(4.15 min)を有することは興味深いデータである。これは、*o*-ベンゾキノンは、カテコール(2.62 min)と比較して、ベンゼン[34]中で非常に強い双極子モーメント(5.1 D)を有することが報告されており[35]、*o*-ベンゾキノンの大きな双極子モーメント値は、*o*-キノンがより短い保持時間をとっている1つの理由であると考えられる。

NACysの存在下の反応では、Fig. 4(b)のクロマトグラムが示すように、いくつかの生成物の存在が確認された。各ピークのMSスペクトル測定により、ピーク5はNACが一分子反応したmono-NACys付加体と帰属した。ピーク3および6はそれぞれNAC二分子が反応したdi-NACys付加体の位置異性体(di-NACys付加体-1, 2)であると帰属した。同様に5.73 minにわずかに検出されたピーク4は、三分子のNACが反応したTri-NACys付加体と帰属した。これらのピーク面積を比較し、ピーク6 (di-NACys付加体-2)が主要生成物であると推定した。上述の結果は、NACysの存在下でのMCとDPPHの反応におけるチオール付加体の連続的形成を示唆している。

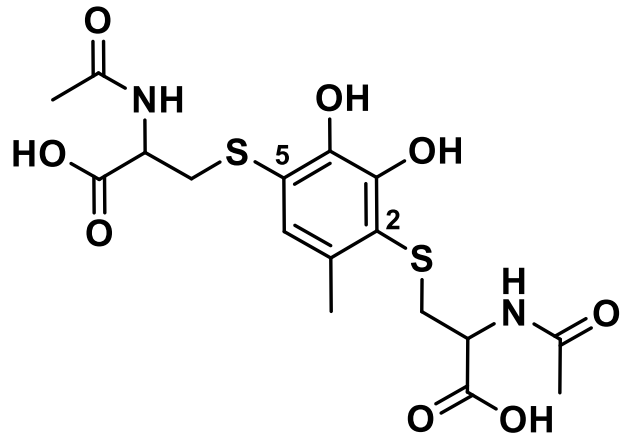
2-3-3 主要なNACys付加体のHPLC単離およびNMRキャラクタリゼーション

分取HPLCを使用して、mono-NACys付加体(ピーク5)、2つのdi-NAC付加体(ピーク3および6)、およびtri-NACys付加体(ピーク4)を単離し、それぞれのNMRスペクトルより、その分子構造を解析した。一方、MCキノンは、その高い反応性および不安定性のために単離に成功しなかった。

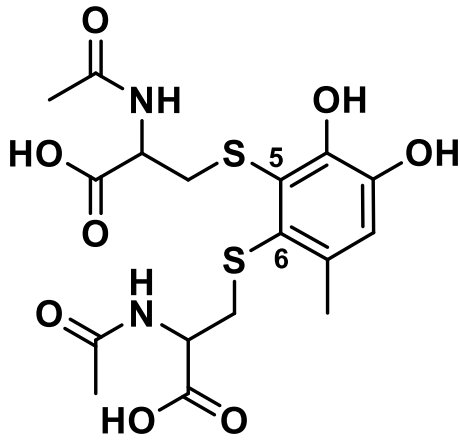
得られたNACys付加体のNMRデータをTable 2にまとめた。従前の文献に記載された同定との比較を容易にするために、カテコール環の位置番号はFig. 5に示したとおりとする。



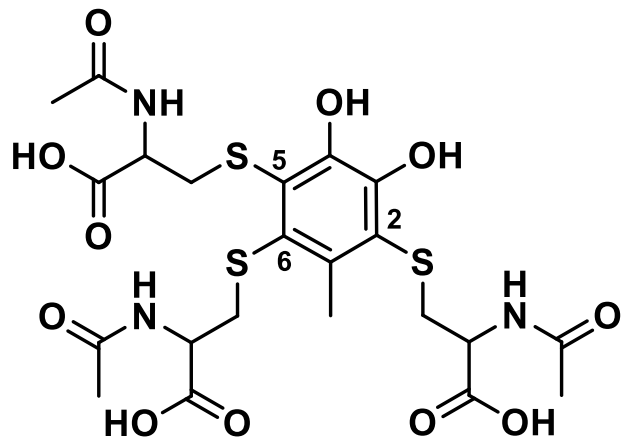
5-NACys MC



2,5-NACys MC



5,6-NACys MC



2,5,6-NACys MC

Fig. 5 NACys存在下でのMCとDPPHの反応における単離生成物の構造

Table 2 単離されたmono-NACys付加体, di-NACys付加体-1および-2, およびtri-NACys付加体のNMRデータ

5-NACys MC (ピーク5)

^1H NMR (CD_3OD) δ 6.76 (1H, s, H-6), 6.69 (1H, s, H-2), 4.39 (1H, dd, $J=4.5, 8.0$ Hz, NACys -CH-), 3.36-3.32 (1H, m, NACys -CH₂-), 3.15-3.10 (1H, m, NACys -CH₂-), 2.12 (3H, s, H-7), 1.84 (3H, s, NACys CH₃-CO).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 174.0 (NACys CH₃-CO-), 173.4 (NACys -COOH), 146.5 (C-3), 144.7 (C-4), 130.7 (C-1), 126.4 (C-6), 120.7 (C-5), 117.6 (C-2), 54.2 (NACys -CH-), 37.1 (NACys -CH₂-), 22.5 (NACys -CH₃), 20.9 (C-7).

5,6-NACys MC (ピーク3)

^1H NMR (CD_3OD) δ 6.75 (1H, s, H-2), 4.52 (1H, dd, $J=4.5, 7.3$ Hz, NACys -CH-), 4.42 (1H, dd, $J=4.0, 8.0$ Hz, NACys -CH-), 3.37-3.27 (3H, m, NACys -CH₂-), 3.11-3.07 (1H, m, NACys -CH₂-), 2.40 (3H, s, H-7), 1.98 (3H, s, NACys CH₃-CO), 1.96 (3H, s, NACys CH₃-CO).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 173.5 (NACys CH₃-CO-), 173.3 (NACys CH₃-CO-), 173.0 (NACys -COOH), 172.9 (NACys -COOH), 146.9 (C-3), 146.5 (C-4), 136.8 (C-1), 127.5 (C-6), 125.5 (C-5), 118.7 (C-2), 53.6 (NACys -CH-), 53.5 (NACys -CH-), 38.9 (NACys -CH₂-), 38.5 (NACys -CH₂-), 22.5 (NACys -CH₃), 22.2 (NACys -CH₃), 22.0 (C-7).

2,5-NACys MC (ピーク6)

^1H NMR (CD_3OD) δ 6.84 (1H, s, H-6), 4.53 (1H, dd, $J = 4.5, 8.5$ Hz, NACys -CH-), 4.43 (1H, dd, $J = 4.0, 8.0$ Hz, NACys -CH-), 3.40-3.36 (1H, m, NACys -CH₂-), 3.30-3.26 (1H, m, NACys -CH₂-), 3.15-3.11 (1H, m, NACys -CH₂-), 3.07-3.03 (1H, m, NACys -CH₂-), 2.36 (3H, s, H-7), 1.94 (3H, s, NACys CH₃-CO), 1.94 (3H, s, NACys CH₃-CO).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 175.1 (NACys CH₃-CO-), 173.4 (NACys CH₃ -CO-), 173.2 (NACys -COOH), 173.1 (NACys -COOH), 147.8 (C-3), 144.1 (C-4), 134.4 (C-1), 125.6 (C-6), 122.3 (C-5), 119.7 (C-2), 53.9 (NACys -CH-), 53.6 (NACys -CH-), 36.8 (NACys -CH₂-), 36.0 (NACys -CH₂ -), 22.2 (NACys -CH₃), 20.6 (NACys -CH₃), 20.6 (C-7).

2,5,6-NACys MC (ピーク4)

^1H NMR (CD_3OD) δ 4.50 (1H, dd, $J = 4.5, 8.0$ Hz, NACys -CH-), 4.45 (1H, dd, $J = 5.0, 8.0$ Hz, NACys -CH-), 4.40 (1H, dd, $J = 4.0, 8.5$ Hz, NACys -CH-), 3.41-3.35 (2H, m, NACys -CH₂-), 3.34-3.27 (2H, m, NACys -CH₂-), 3.13-3.07 (2H, m, NACys -CH₂-), 2.71 (3H, s, H-7), 1.98 (3H, s, NACys CH₃ -CO), 1.96 (3H, s, NACys CH₃ -CO), 1.95 (3H, s, NACys CH₃ -CO).

^{13}C NMR ($\text{CD}_3 \text{OD}$) δ 173.6 (NACys CH₃ -CO-), 173.5 (NACys CH₃ -CO-), 173.5 (NACys CH₃ -CO-), 173.3 (NACys -COOH), 173.3 (NACys -COOH), 173.2 (NACys -COOH), 149.0 (C-3), 146.3 (C-4), 140.5 (C-1), 128.7 (C-6), 127.2 (C-5), 121.9 (C-2), 53.9 (NACys -CH-), 53.8 (NACys -CH-), 53.7 (NACys -CH-), 39.1 (NACys -CH₂-), 38.5 (NACys -CH₂-), 36.8 (NACys -CH₂ -), 22.5 (NACys -CH₃), 22.5 (NACys -CH₃), 22.4 (NACys -CH₃), 21.3 (C-7).

mono-NACys付加体(ピーク5)の¹H NMRスペクトルでは、芳香族領域に2種類のプロトンのシグナルが観察され、これはNACysの付加がベンゼン環上で起きていることを示している。また、この2つのプロトンにはAB結合パターンが観測されないので、付加はおそらく5位または6位のいずれかで起きていると考えられる。さらに、HMBCスペクトルでは、22.5 ppmのCH₃-炭素(C-7)は6.76 ppm(H-6)と6.69 ppm(H-2)の2つのシングレットの芳香族プロトンとの相関を示した。これらの知見は、NACysの付加位置がメチル基に隣接しておらず、5位であることを示唆した。以上の考察により、mono-NACys付加体は5-NACys MCとして同定された。

di-NACys付加体-1(ピーク3)の¹H NMRスペクトルは、6.75 ppmにシングレットの芳香族プロトンのみを示す。HMBCスペクトルにおいて、このプロトンシグナルは、146.5 ppmのC-4および127.5 ppmのC-6との相関を示した。これらのNMRデータから、di-NACys付加体-1は5,6-NACys MCと同定された。

di-NACys付加体-2(ピーク6)は、¹H NMRスペクトルにおいて、6.84 ppmでシングレットの芳香族プロトンのみを示す。HMBCスペクトルにおいて、119.7 ppmのC-2、144.1 ppmのC-4、および20.6 ppmのC-7は、このプロトンシグナルとの相関を示した。これらのNMRデータから、di-NACys付加体-2は2,5-NACys MCと同定された。

tri-NACys付加体(ピーク4)については¹H NMRスペクトルにおいて芳香族部分では、プロトンシグナルは観察されなかった。C-2、C-5およびC-6位の3つのNACys基に由来するプロトンは、別々のシグナルセットとして観察された。これらの知見は、2,5-6-tri-NACys MCの構造を決定的な証拠である。

以上のように、NACysの存在下でのMCのDPPH酸化による反応生成物として、5-NACys MC、2,5-NACys MC、5,6-NACys MCおよび2,5,6-NACys MCを単離し、構造解析することに成功した。

チオール求核剤の α -キノンへの付加反応は広く研究されており、Yangらによって包括的に解説されている[36]。その他の先行研究では、この反応の位置選択性に関する研究に焦点を当てている。酵素的に生成されたドーパキノンとシステインとの反応についての生成物に関する分析結果は、5-

システィニルドーパが一次生成物であり、2-システィニルドーパが位置異性体として生成されることを明らかにしている[37,38]. また, Huangらは, *N*-アセチルシステインの存在下での*N*-アセチルドーパミンの電気化学的酸化を研究し, 主要な付加体が5-付加体であることを実証した[39]. *N*-アセチルシステインと*N*-アセチルドーパミンキノンの反応も同様の生成物を与える[40]. 従って, 本研究で得られた反応生成物は, システィニルドーパについて確認されたものと同様の位置選択性を示している.

2-3-4 過ヨウ素酸担持樹脂を用いたMC誘導体の酸化およびそれに続くNACys付加

MCの酸化のための酸化剤としてDPPHに代え過ヨウ素酸担持樹脂を使用した. 所定の反応時間後に, 酸化剤担持樹脂を濾過によって反応系中から除去し, 次いで, NACysを混合して反応させた. 緒論で述べたように, 過ヨウ素酸担持樹脂の使用によって, UV吸収スペクトルおよびLC-MS測定を用いて, *o*-キノン形成およびNACys付加反応の過程を段階的に追跡することが可能になる.

2-3-5 過ヨウ素酸担持樹脂によるMC及びNACys付加体の酸化

Fig. 4(a)に示すように, CH₃CN溶液中のMCは, フェノール化合物の π - π^* 電子遷移の特徴である284 nm(ϵ 2,600)の吸収帯を示す. 過ヨウ素酸樹脂をMC溶液に添加すると, 無色のMC溶液は淡黄色に変わり, 391 nmの吸収帯の強度が増加するにつれて黄色の吸収帯の強度が徐々に減少した. 反応は120分のインキュベーション後に平衡に達し, さらなるスペクトル変化は観察されなかった. MCの電気化学的酸化についても同様のスペクトル変化が報告されており[26,41], 391 nmでの吸収は*o*-キノンの π - π^* 遷移と帰属した[42]. このUV-Visスペクトル変化には, 明確な等吸収点は観察されず, *o*-キノンに加えてその他の酸化生成物も生成していることを示唆している. MCキノンが唯一の酸化生成物であるので, HPLC分析のMCピークの減少率に基づいて, 約95%のMCがMCキノンに変換さ

れると推算できる。反応開始後120分経過した反応混合物についてLC-MS測定を行った結果、その

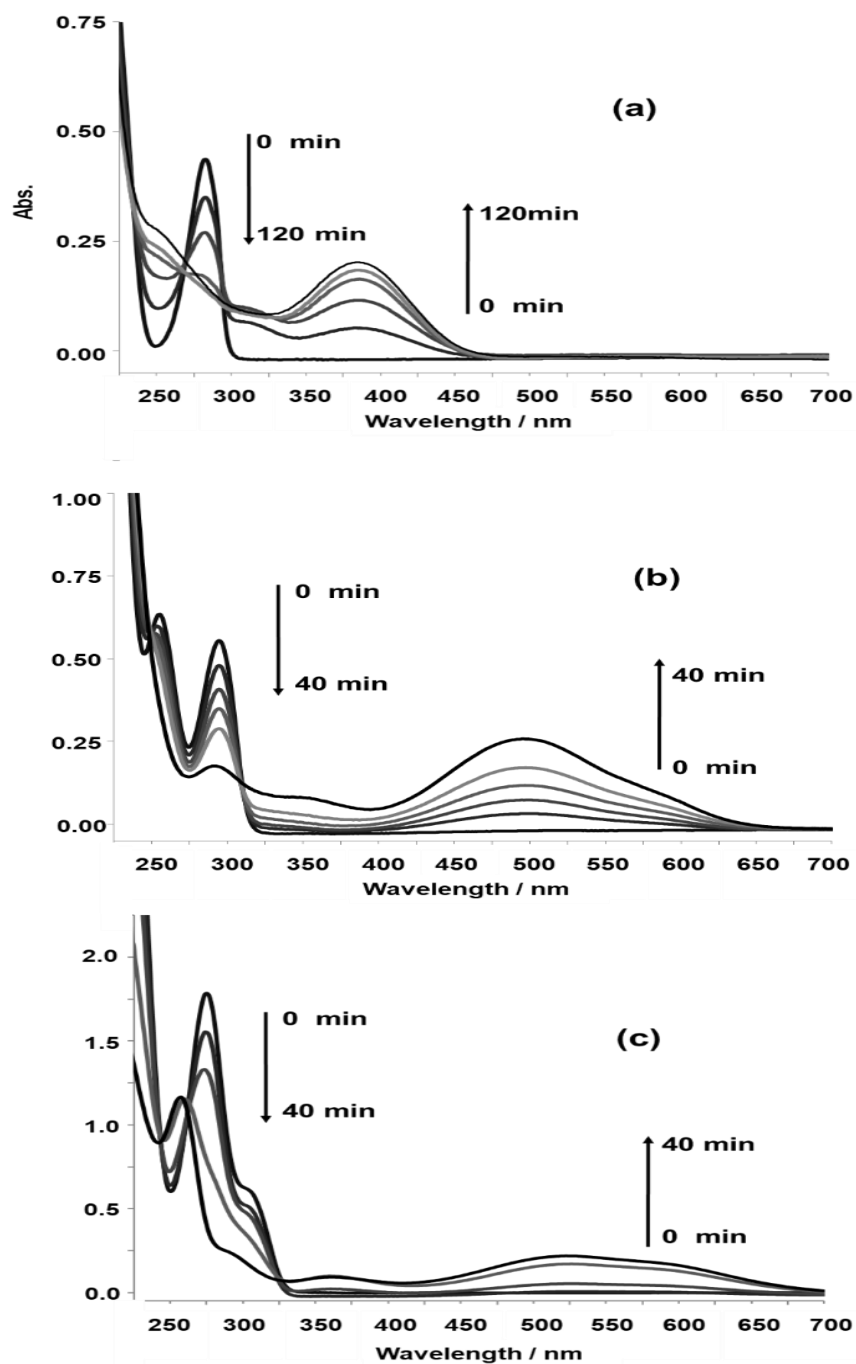


Fig. 4 CH_3CN 中のMCおよびそのNACys付加体と過ヨウ素酸樹脂との反応中のUV-Vis吸収スペクトル変化 (a) MC (b) 5-NACys MC (c) 2,5-NACys MC

クロマトグラム上に、MCキノンおよびMCに帰属可能な2つのピークが現れた。これらは、それぞれFig. 3に示したHPLC上の保持時間4.23 minのピーク1(m/z 123 [M-H]⁻)および6.57 minのピーク2 (m/z 123 [M-H]⁻)に対応する。

過ヨウ素酸担持樹脂を5-NACys MC溶液に添加すると、無色の5-NACys MC溶液は橙色に変わった。Fig. 4(b)に示すように、5-NACys MCは255 nm (ϵ 3,200)と295 nm (ϵ 2,800)で二つの吸収を示し、これらの吸収帯の強度は次第に減少し、502 nmを中心とする新たな幅広の吸収帯が出現した。これは5-NACys MCキノンの π - π^* 遷移に帰属できる。反応を追跡したところ、開始から40分後、スペクトルに変化がほとんど生じなくなり、この時間で平衡に達することが明らかとなった。反応混合物のLC-MS分析では、5.30 min (m/z 282 [M-H]⁻)と6.46 min (m/z 284 [M-H]⁻)の2つのピークが認められ、それぞれ5-NACys MCキノンおよび5-NACys MCに帰属できる。5-NACys MCの5-NACys MCキノンへの転化率は、98%と推定した。

さらに過ヨウ素酸担持樹脂を2,5-NACys MC溶液に添加すると、無色の2,5-NACys MC溶液が淡紫色に変化した。Fig. 4(c)に示すように、2,5-NACys MCは、305 nm (ϵ 3,240)にショルダーを持つ277 nm (ϵ 9,150)に吸収を示した。過ヨウ素酸樹脂を添加すると、これらの吸収帯は強度が徐々に減少し、新たに525 nmに中心を持つ幅広の吸収帯と260 nmに鋭い吸収帯が出現し、それらは2,5-NACys MCキノンの π - π^* 遷移に帰属できる。反応開始から40分後に平衡に達し、その反応混合物のLC-MS解析から5.69 min (m/z 443 [M-H]⁻)と6.64 min (m/z 445 [M-H]⁻)に2つのピークが得られ、それぞれ2,5-NACys MCキノンと2,5-NACys MCに合理的に帰属できた。HPLCの測定結果より、2,5-NACys MCの2,5-NACys MCキノンへの転化率は96%であった。

o-キノン種の吸収極大はMCキノンの391 nmから5-NACys MCキノンの502 nmと2,5-NACys MCキノンの525 nmに移動した。電子供与性置換基は一般に共役系の π - π^* 吸収帯をより長波長側にシフトさせる[42]。したがって、置換基であるNACys基が電子供与基として働くため、置換基数が増大するにつれ、吸収極大値が長波長側にシフトしたと考察した。

2-3-6 MCおよびNACys MCキノンとNACysとの反応

前項で述べた反応において、各種キノンへの酸化反応が平衡に達し過ヨウ素酸担持樹脂を除去後、NACysを溶液に添加した際に可視領域におけるキノン吸収の急速な消失を含むUVスペクトル変化が観測された。本節では、これらの反応試料のUVおよびLC-MSスペクトルについて論じる。NACysとキノンの反応混合物のUV-Vis吸収スペクトルおよびHPLCクロマトグラムをFig. 5 に示す。

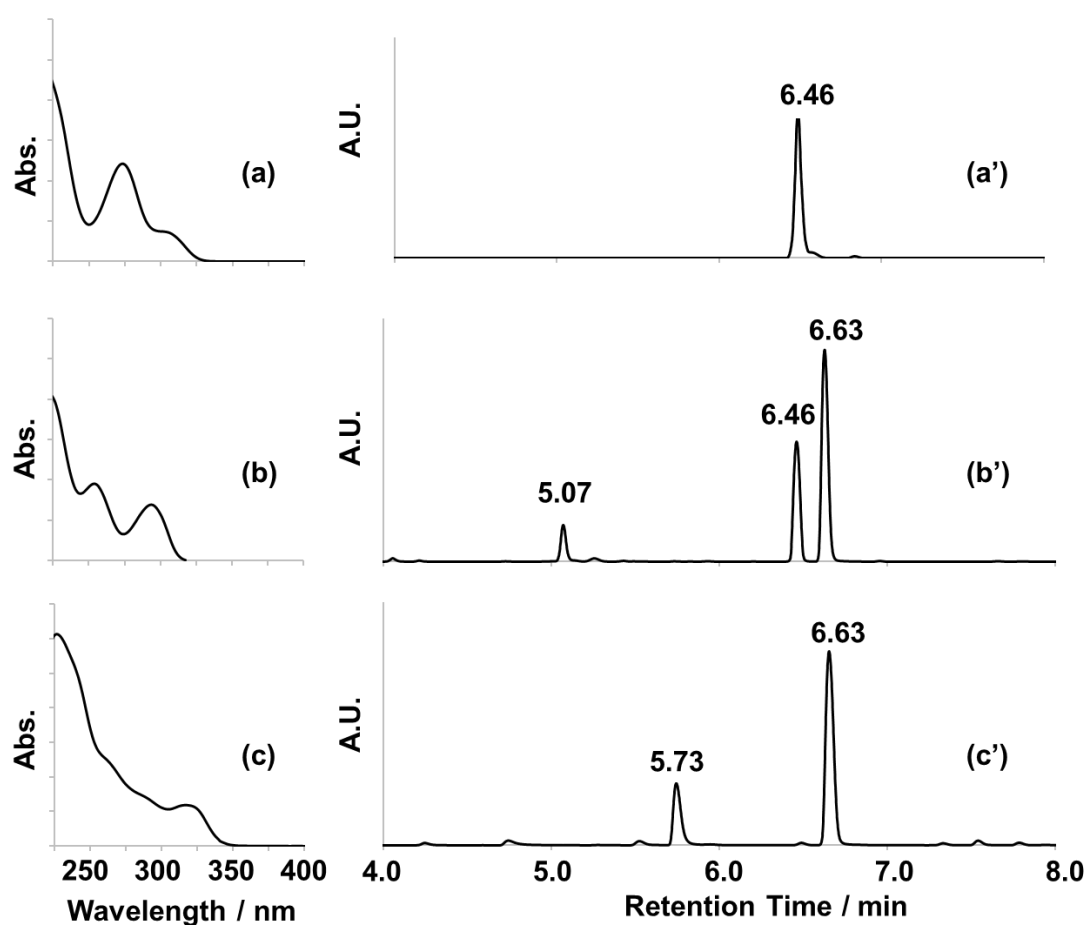


Fig. 5 NACysとキノンの反応混合物のUV-Vis吸収スペクトルおよびHPLCクロマトグラム
(a), (a') : NACys (4当量)をMCキノンの溶液に添加し、120分後
(b), (b') : NACys (4当量)を5-NACys MCキノンの溶液に添加し、40分後
(c), (c') : NACys (4当量)を2,5-NACys MCキノンの溶液に添加し、40分後

Fig. 5(a)および5(a')は、NACysをMCキノン溶液に添加して120分後に得られたUV吸収スペクトル

およびHPLCクロマトグラムを示す。UV吸収スペクトルでは、255 nmおよび295 nmに2つの吸収帯を示し、これらは5-NACys MCに特徴的である。HPLCクロマトグラムは、6.46 minに、 m/z 284 [M-H]⁻を有する単一のピークを示した。これらの結果は、過ヨウ素酸酸化反応において形成されたMCキノンが、5-NACys MCに優先的に変換されることを示している。

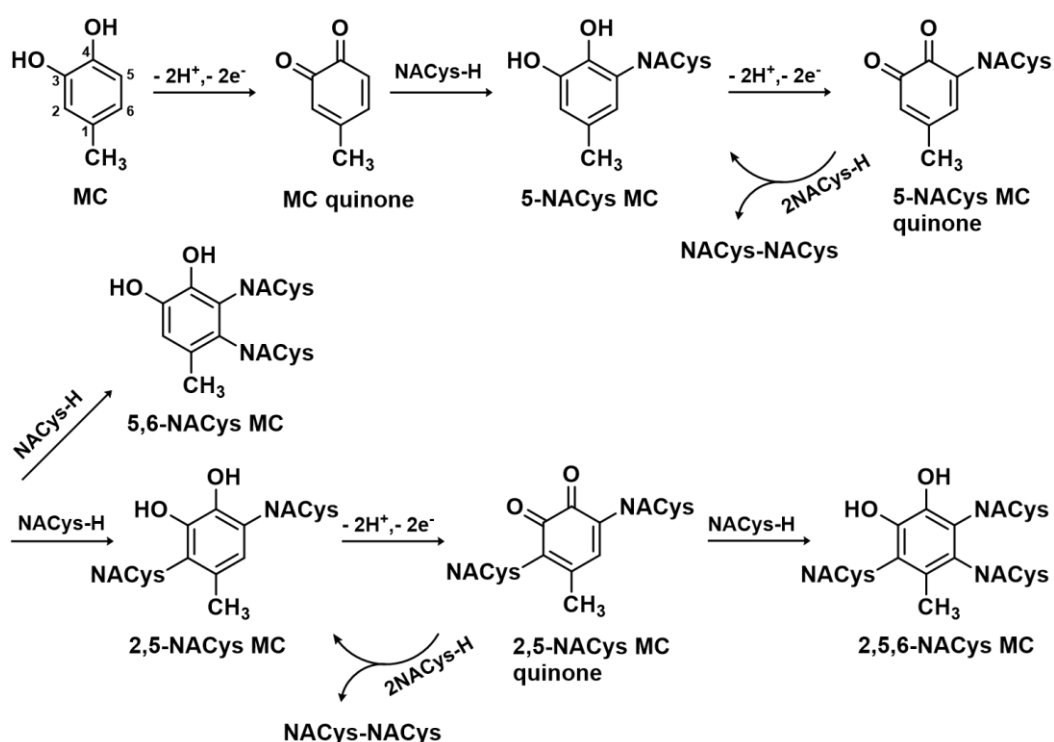
NACysと5-NACys MCキノンとの反応では、Fig. 5(b)に示すように、295 nmでの吸収を有するかなり不明瞭なUVスペクトルパターンを生じる。HPLCピークは6.46 min (m/z 284 [M-H]⁻)および6.63 min(m/z 445 [M-H]⁻)に観察され、5.07 minにわずかなピーク(m/z 445 [M-H]⁻)を有する。これらのピークの保持時間は、それぞれ、5-NACys MC、2,5-NACys MCおよび5,6-NACys MCに対応する。これらの結果は、過ヨウ素酸酸化反応で形成された5-NACys MCキノンが、主および副反応生成物としてそれぞれ2,5-NACys MCおよび5,6-NACys MCに変換されることを示している。一方、相当量の5-NACys MC(出発物質)も検出されているので、一旦生成した5-NACys MCキノンの一部は、NACysによって5-NACys MCに還元されると考えた。

2,5-NACys MCキノンとNACysとの反応は、Fig. 5(c)に示すように、かなり未分解のスペクトルパターンを生じる。主成分として6.63 min(m/z 445 [M-H]⁻)で、副成分として5.73 min(m/z 606 [M-H]⁻)で、前者は2,5-NACys MCに、後者は2,5,6-NACys MCに帰属される。これらの知見は、過ヨウ素酸酸化反応で形成された2,5-NACys MCキノンが主に2,5-NACys MCに還元され、いくつかはNACysの付加により2,5,6-NACys MCに変換されることを示している。

2-4 結論

本論文において、MCの酸化およびその後のNACysとの反応において、Scheme 2に示されるメカニズムを提案する。この研究で使用される反応条件下で、MCは酸化を受けて o -キノン(MCキノン)を形成し、次いで、NACysのその後の求核付加は、主要なmono-NACys付加体として5-NACys MCを生成する。次の酸化サイクルでは、5-NACys MCは5-NACys MCキノンに変換される。このキノンは過

剰のNACysの求核付加反応により、主生成物である2,5-NACys MCに変換される。このとき、5,6-NACys MCを副生成物として生じる。一方、この反応過程では、LC-MSの測定データからNACysによる5-NACys MCキノンの直接還元も進行することを確認している。2,5-NACys MCを酸化すると2,5-NACys MCキノンが生成し、続いてNACysと反応すると直接還元され、主に2,5-NACys MCと少量の2,5,6-NACys MCが生成する。



Scheme 2. NACysの存在下でのMCのDPPHラジカル消去反応のための可能な反応機構

求核付加段階におけるNACys付加体の生成は、カテコール構造の再生を意味する。NACys付加体形成の1つの工程は、形式的な2電子還元に対応する。従って、連続的なNACys付加体形成は、DPPHラジカル消去活性の増強をもたらす。

2-5 参考文献

- [1] Clifford, M. N. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1033-1043.
- [2] Svilaas, A.; Sakhi, A. K.; Andersen, L. F.; Svilaas, T.; Ström, E. C.; Jacobs, D. R. Jr.; Ose, L.; Blomhoff, R. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 562-567.
- [3] Clifford, M. N.; Knight, S.; Sururu, B.; Kuhnert, N. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1957-1969.
- [4] Farah, A.; Donangelo, C. M. *Braz. J. Plant Physiol.* **2006**, *18*, 23-36.
- [5] Thavasi, V.; Bettens, R. P. A.; Leong, L. P. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 3068-3077.
- [6] Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572-584.
- [7] Rice-Evans, C. A.; Miller, N.; Paganga, G. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 152-159.
- [8] Villano, D.; Fernandez-Pachon, M. S.; Troncoso, M. A.; García-Parrilla, M. C. *Anal. Chim. Acta.* **2005**, *538*, 391-398.
- [9] Natella, F.; Nardini, M.; Di Felice, M.; Scaccini, C. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1453-1459.
- [10] Koleva, I. I.; van Beek, T. A.; Linssen, J. P.; de Groot, A.; Evstatieva, L. N. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 8-17.
- [11] Clarke, G.; Ting, K. N.; Wiart, C.; Fry, J. *Antioxidants* **2013**, *2*, 1-10.
- [12] Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933-956.
- [13] Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N. K. *Food Chem.* **2012**, *130*, 1036-1043.
- [14] Liang, N.; Kitts, D. D. *Molecules* **2014**, *19*, 19180-19208.
- [15] Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22*, 749-760.
- [16] Kondo, K.; Kurihara, M.; Fukuhara, K. *Meth. Enzymol.* **2001**, *335*, 203-217.
- [17] Perron, N. R.; Brumaghim, J. L. *Cell Bioche. Biophys.* **2009**, *53*, 75-100.
- [18] Fujimoto, A.; Inai, M.; Masuda, T. *Food Chem.* **2013**, *138*, 1483-1492.
- [19] Saito, S.; Kawabata, J. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8163-8168.
- [20] Friedman, M. *J. Agri. Food Chem.* **1996**, *44*, 631-653.
- [21] Pierpoint, W. S. *Biochem. J.* **1966**, *98*, 567-580.

- [22] Stanic, A.; Uhlig, S.; Solhaug, A.; Rise, F.; Wilkins, A. L.; Miles, G. O. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7556-7566.
- [23] Weidman, S. W.; Kaiser, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5820-5827.
- [24] Fulcrand, H.; Cheminat, A.; Brouillard, R.; Cheynier, V. *Phytochem.* **1994**, *35*, 499-505.
- [25] Bassil, D.; Makris, D. P.; Kefalas, P. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 395-402.
- [26] Jongberg, S.; Gislason, N. E.; Lund, M. N.; Skibsted, L. H.; Waterhouse, A. L. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6900-6905.
- [27] Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitao, G. G.; Reis, A. S.; dos Santos, T. C.; Coube, C. S.; Leitao, S. G. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 127-130.
- [28] Harrison, C. R.; Hodge, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1982**, *1*, 509-511.
- [29] Hamdo, H. H.; Khayata, W.; Al-Assaf, Z. *Int. J. Chem. Tech. Res.* **2014**, *6*, 2539-2545.
- [30] Liu, D.; Shi, J.; Ibarra, A. C.; Kakuda, Y.; Xue, S. J. *LWT-Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 1344-1349.
- [31] Nishida, J.; Kawabata, J. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 193-202.
- [32] Sawai, Y.; Moon, J.-H. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6247-6253.
- [33] Albarran, G.; Boggess, W.; Rassolov, V.; Schuler, R. H. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 7470-7478.
- [34] Nagakura, S.; Kuboyama, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1003-1005.
- [35] Lander, J. J.; Svirbely, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, *67*, 322-324.
- [36] Yang, J.; Cohen Stuart, M. A.; Kamperman, M. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 8271-8298.
- [37] Ito, S.; Prota, G. *Experientia* **1977**, *33*, 1118-1119.
- [38] Kato, T.; Ito, S.; Fujita, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *881*, 415-421.
- [39] Huang, X.; Xu, R.; Hawley, M. D.; Hopkins, T. L.; Kramer, K. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *352*, 1930.
- [40] Sugumaran, M.; Dali, H.; Semensi, V. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1989**, *11*, 127-137.
- [41] Li, Y.; Jongberg, S.; Andersen, M. L.; Davies, M. J.; Lund, M. N. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *97*, 148-157.
- [42] Reichenbacher, M.; Popp, J. *Challenges in Molecular Structure Determination*, Springer-Verlag, Berlin and

Heidelberg, pp 182-183, 2012.

第3章

アルコール存在下における4 - メチルカ テコールの抗酸化反応機構

第3章 アルコール存在下における4-メチルカテコールの抗酸化反応機構

3-1 緒論

前章では、非プロトン性のアセトニトリル溶媒中で4-メチルカテコール(MC)のDPPHラジカル消去活性をチオール化合物の共存下で測定し、ラジカル消去活性がMCの活性とチオールの活性の理論的単純和よりはるかに増強されることを示した。また、ラジカル消去活性増強のメカニズムを明らかにするため、チオール化合物として*N*-アセチルシステイン(NACys)、MCの酸化剤としてDPPHおよび過ヨウ素酸担持樹脂を用いた反応を行い、単離精製した反応生成物の詳細な分子構造を解析した。その結果、MCの酸化中間体であるMCキノンにNACysが求核付加することにより、還元活性を有するカテコール構造が再生することを明らかにした。

Saitoらは一連の論文で、カテコール化合物としてプロトカテク酸類を用いてプロトン性および非プロトン性溶媒中でのDPPHラジカル消去のメカニズムを検討している。彼らは、DPPHによる酸化を受けて生じるキノン中間体がアルコール存在下では、ヘミアセタール[1]やアルコールの求核付加物[2]へと変換されることにより、反応系中でカテコール構造が再生すると考察している[3]。プロトカテク酸類(Protocatechuic acid derivatives)は、電子求引性のカルボニル基を有するカテコールで、その置換基効果により*o*-キノンの求電子性が高まり、求核付加反応が促進されたと推定している。しかし、MCのような電子供与性置換基を有するカテコールについて詳細な検証はなされていない。

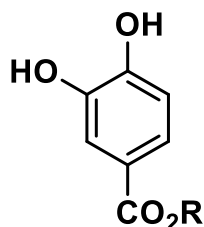


Fig. 1 Protocatechuic acid derivatives
R= H, Me

本章では、カテコール環上に電子供与基であるメチル基を有する4-メチルカテコール(MC)を用いて、アルコール溶液中でのラジカル消去活性の増強機構について調査する。さらに、前章のNACys共存下での反応と比較し、反応過程や生成物の相違を通して、ラジカル消去活性に対するアルコール分子の効果を検証する。

具体的にはDPPH (2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル)ラジカル消去活性を非プロトン性のアセトニトリルおよび4種のプロトン性溶媒 (メタノール, エタノール, 1-プロパノール, 1-ブタノール) を用いて比較検討した。つぎに、メタノール溶液中におけるMCとDPPHラジカルの反応をHPLC, LC-MSを用いて経時的に追跡した。また、酸化剤として過ヨウ素酸担持樹脂を用いた場合において、反応経過をUV-Visスペクトルにより解析した。さらに反応生成物を分取し、二次元NMR分光法により構造解析をおこなった。これらの結果からアルコール溶液中におけるMCのラジカル消去機構を明らかにした。

3-2 実験

3-2-1 DPPHラジカル消去活性

試料のラジカル消去活性は、Mensorら[27]によって提案された方法を一部改変して測定した。すなわちDPPH(19.7 mg)を所定の溶媒(メタノール, エタノール, プロパノール, ブタノールまたはアセトニトリル)に溶解し、100 mLのメスフラスコに定容した (500 μ M)。DPPH溶液は用時調製し、暗所で室温下に保管して使用した。MCおよびチオール化合物はそれぞれ所定の溶媒の50%水溶液に溶解し、MCについては12.5 μ M, チオール化合物については25 μ Mの濃度に溶解し調製した。試験管にMC(2 mL)およびチオール化合物(2 mL)を予め混合した後、1 mLのDPPH溶液を添加した。溶液をボルテックスミキサーで激しく混合し、暗所かつ室温下においてDPPHを投入後30分間インキュベートした。次いでShimadzu UV-2500分光光度計を用いて混合溶液の517 nmにおける吸光度変化

を、室温下で測定した。DPPHを用いたラジカル消去活性は、次式を用いて算出した。

$$\text{ラジカル消去活性(Scavenging Activity, SA, \%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

ここで、 A_{sample} および A_{control} は、それぞれ試料溶液または同量の溶媒と混合されたDPPH溶液の吸光度である。全てのサンプルは3回測定した。

3-2-2 過ヨウ素酸樹脂を用いた反応

Harrison[28]の手法にわずかな修正を加えて、過ヨウ素酸担持樹脂を調製した。すなわち200 mLの超純水に20 gの過ヨウ素酸ナトリウム(Wako Chemicals, Japan)を溶解した後、25 gの高多孔性陰イオン交換樹脂(Diaion HPA25, Mitsubishi Chemical, Japan)を投入し、混合した。その溶液を室温で2時間攪拌し、次いで定性濾紙 (No. 2, 15 cm ϕ , Advantec, Japan)を用いて樹脂を濾取した。このようにして得られた樹脂を200 mLの超純水で4回洗浄し、次に100 mLのTHFで2回、そして100 mLのエーテルで2回洗浄した。樹脂を50 mLの試験管に移し、35°Cの真空オーブン中で一晩乾燥させ過ヨウ素酸担持樹脂を得た。

MCおよびMC-NACys付加体の各溶液は、所定量の各サンプルをアセトニトリルに溶解することによって調製した。過ヨウ素酸樹脂をそれらの溶液に添加し、所定の反応時間攪拌した。反応が平衡に達することを確認した後、樹脂を溶液から濾別し、濾液にNACysを添加した。NACysを添加した溶液と添加しない溶液を、UV-Vis分光計およびLC-MSによってそれぞれ分析に供した。

3-2-3 分取HPLC

反応生成物は、示唆屈折計, YMC Hydrosphere C18カラム(250×10 mm ID, 5 μ m粒径, YMC, Japan)を備えたRECYCLING PREPARATIVE HPLC, LC-9210 NEXT (日本分析化学工業, Japan)による逆相分取HPLCを使用し、流速3.5 mL/min, カラム温度 室温, 注入試料量は3.0 mLの条件において単離

した。データ処理はJDS-50(日本分析化学工業, Japan)を使用した。

3-2-4 UV-Visスペクトル

紫外可視吸収スペクトルは、石英キュベット(光路長, 1 cm)を用いて、2 nmのバンド光路幅を有するUV-2500分光光度計(Shimadzu, Japan)を用いて測定した。全ての測定は、室温で200~700 nmの波長範囲で行った。

3-2-5 LC-MS分析

LC-MSは、飛行時間型質量分析計Synapt HDMS (Waters, USA)に連結された AcquityUPLC (Waters, USA)を用いて行った。分析物を、YMC Triart C18カラム(100×2.1mm ID, 粒子径1.9 μ m, YMC, Japan)を使用して分離した。データは、質量範囲m/z 50~1000においてScan time (0.2 ms) およびInter-scan delay (0.1 ms)で、centroidモードで収集した。MassLynx 4.1ソフトウェアパッケージ (Waters, Manchester, UK)をデータ取得および処理に使用した。

3-2-6 NMRスペクトル

¹H及び¹³C NMR測定は、CD₃OD溶液中でJNM-ECA 500分光計 (JEOL Ltd., Japan, 500MHz(¹H)及び125MHz(¹³C))を用い、化学シフト値は、テトラメチルシラン(TMS)を基準 ($\delta = 0$) とした相対値としてppmスケールで得た。スピン結合定数はJ値(Hz)で得た。2D-NMR(¹H-¹H COSY, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence spectroscopy (HMQC)および¹H-¹³C Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy (HMBC))スペクトルも上記の装置を使用して測定した。

3-3 結果及び考察

3-3-1 MCのラジカル消去活性に対するアルコールの効果

アルコール溶媒（メタノール，エタノール，1-プロパノール，1-ブタノール），非アルコール溶媒（アセトニトリル）中におけるMCのDPPHラジカル消去活性(Scavenging Ability, SA)値の経時変化を Fig. 2に示す.

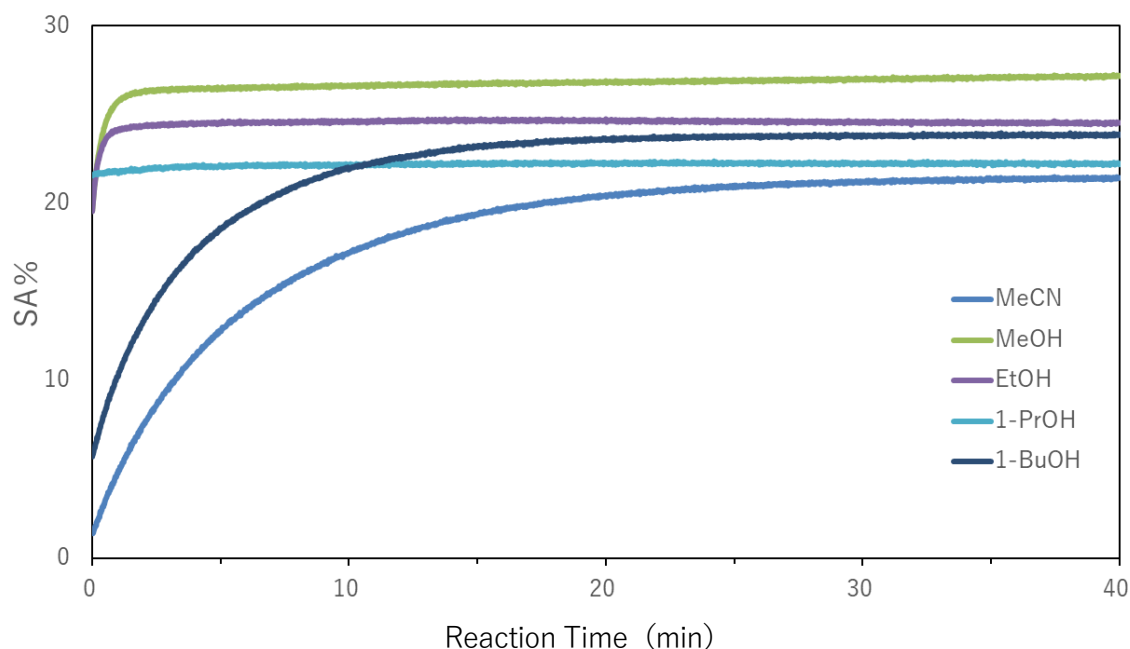


Fig. 2 各反応溶液中におけるMCのSA値の経時変化

SA値はメタノール，エタノール，1-プロパノール，1-ブタノール溶液とも反応開始から30 min後にほぼ平衡に達し，その値はそれぞれ27%，25%，22%，24%で，いずれもアセトニトリルの21%より若干高い値を示した．また，メタノール，エタノール，1-プロパノール中では，反応開始後3分で平衡に達したが，アセトニトリル中では反応が遅く，平衡に達するまでに30分要した．このようにMCのプロトン性溶媒中でのラジカル消去活性の増加は，プロトン性溶媒の極性の違いによるものか，NACysによるラジカル消去活性の増強の機構と同様に，生成した o -キノンにアルコール

分子が付加し、カテコール構造が再生することによるものかは現時点では明らかでない。

3-3-2 LC-MSによるDPPHラジカル消去反応生成物の推定

メタノール溶液中でのMCとDPPHラジカルの反応溶液をLC-MSを用いて追跡し、経時的に分析した。データを2時間間隔で収集し、検出にはフォトダイオードアレイ検出器を用いた。得られたクロマトグラムをFig. 3に示す。

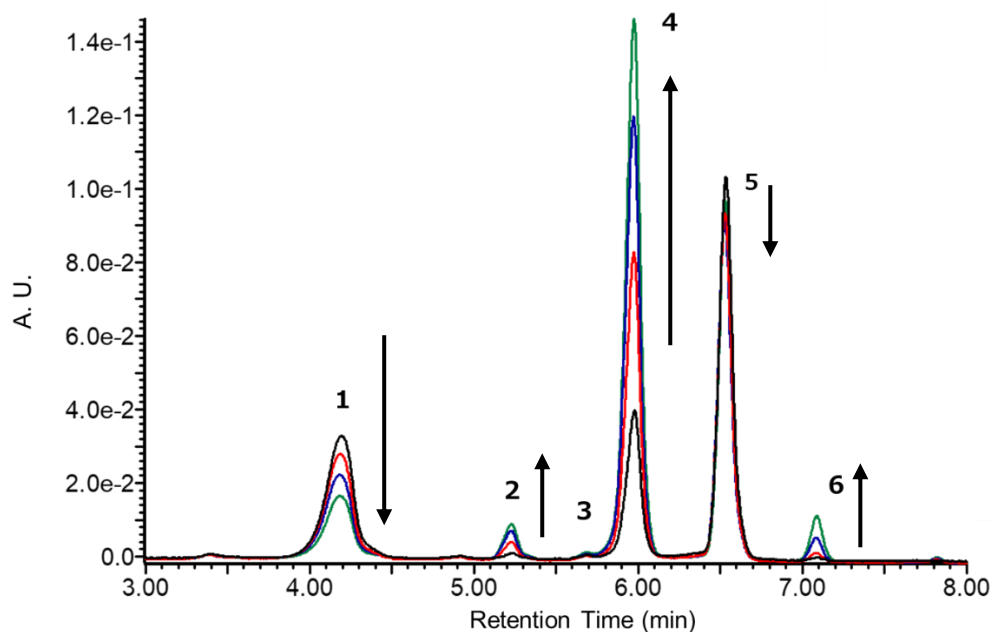


Fig. 3 メタノール溶液中、MCのDPPHラジカル酸化反応溶液のHPLCクロマトグラム（検出波長：280 nm）

各ピークのMSスペクトルおよびUV-Visスペクトルの結果をFig. 4に示す。また、これらのスペクトルデータから推定した帰属をTable 1に示す。クロマトグラムには6本のピークが観測される。ピーク5（6.5 min）は、UV-Visスペクトルの λ_{\max} (280 nm)とMSスペクトルの m/z 123からMCのシグナルである。ピーク1（4.2 min）は、MCから2つの水素原子を失った質量数 m/z 123.061 ($M+H$)⁺を示し、UV-

Visスペクトルにおいて o -キノン構造に特徴的な $\pi - \pi^*$ 遷移に由来する401.8 nmの吸収帯を有していることから、MC キノンと帰属できる。この結果から、2章のアセトニトリル溶液中におけるMCのDPPH酸化反応と同様に、メタノール溶液中でもMCがDPPHにより酸化され、MCキノンが生成することを示している。同様にUV-Visスペクトルの λ_{\max} 値とMSスペクトルから得た質量数 m/z より、ピーク2はmono-MeOH付加体-1、ピーク3はdi-MeOH付加体、ピーク4はmono-MeOH付加体キノン、ピーク6はピーク3の異性体であるmono-MeOH付加体-2と帰属した。

Fig. 3のピーク強度の経時変化に注目すると、ピーク1 (MCキノン) が反応開始直後から出現し、反応時間の経過にしたがってピーク5 (MC) の減少と共に緩やかにピーク高さが減少する。これはMCキノンが酸化反応により一旦生成するものの、逐次的に次の反応が起こっていることを示している。ピーク1の分子構造について確認するために分取HPLCを用いてピーク1成分の単離を試みた。しかし、単離操作中に溶液の色調が褐色に変化し、分子構造が変化したため、成功しなかった。ピーク1は分取クロマトグラフィー法で精製するには不安定な性質を有していたためであると考えた。

HPLC プロファイルの経時的変化(Fig. 5)から、ピーク1のエリア面積が減少するとともに、ピーク2(5.2 min)、ピーク4(5.9 min)、ピーク6(7.1 min)が増加することが判明した。そのうちピーク4が最大の高さを示し、主生成物であった。これらの結果は、mono-MeOH付加体が速やかにmono-MeOH付加体キノンに変化することを示している。

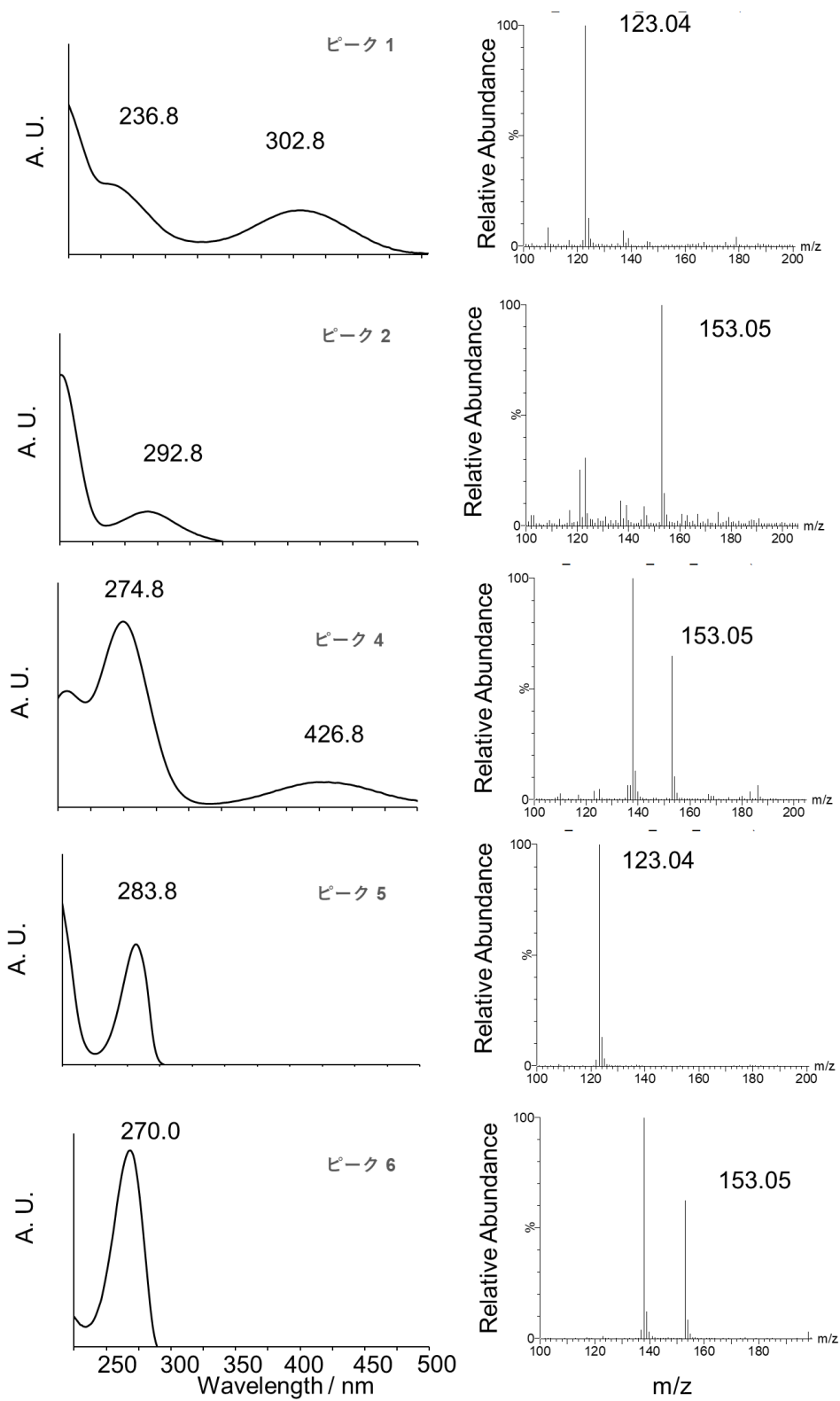


Fig. 4 HPLCピーク1, 2, 4, 5, 6(Fig. 1)のUV-VisスペクトルおよびMSスペクトル

Table 1 HPLCピーク(Fig. 2)のMSおよびUVデータ

ピーク No.	保持時間 t_R (min)	吸収極大 λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	帰属
1	4.2	302.8	123.04	MC キノン
2	5.2	292.8	153.05	mono-MeOH付加体-1
4	5.9	426.8	153.05	mono - MeOH付加体キノ
5	6.5	283.8	123.04	MC
6	7.1	270.0	153.05	mono-MeOH付加体-2

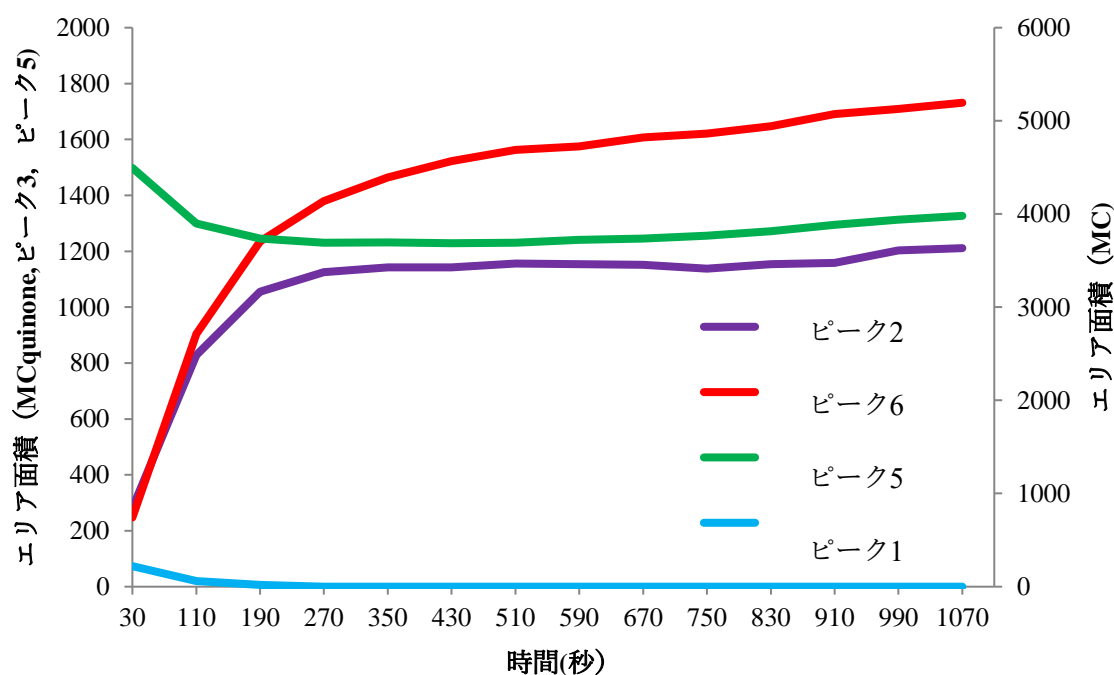


Fig. 5 反応溶液中における HPLC ピーク No.1, 2, 5, 6 のエリア面積の時間変化

C-1 位に電子求引基を有するプロトカテク酸エステルはアルコール溶媒中での DPPH ラジカル消去反応により、キノン、および C-2 位へのアルコール付加体が生じることが知られている[2].

MC を用いた反応では、どの位置にメタノール分子が付加しているか調査するため、主生成物であるピーク 4 について分取 HPLC を使用した単離操作を試みた。しかしながら MC キノンの場合と同様に、その高い反応性と不安定性のために分取中に構造が変化し、ピーク 4 の単離には至らなかった。

3-3-3 主要なメタノール付加体のHPLC単離およびキャラクタリゼーション

DPPH ラジカルを酸化剤として使用した場合、反応系内に DPPH ラジカルが存在し続けるため、反応途中で停止が困難であること、また単離精製の際の実験操作が煩雑になることなどの欠点があった。そこで、DPPH に代えて過ヨウ素酸担持樹脂を酸化剤として使用した。所定の反応時間後に、濾過によって酸化剤担持樹脂を反応溶液から除去することで、酸化反応を制御することができる。

原料であるMC、酸化後、およびメタノール添加後のUV-VisスペクトルをFig. 5(a)に示した。

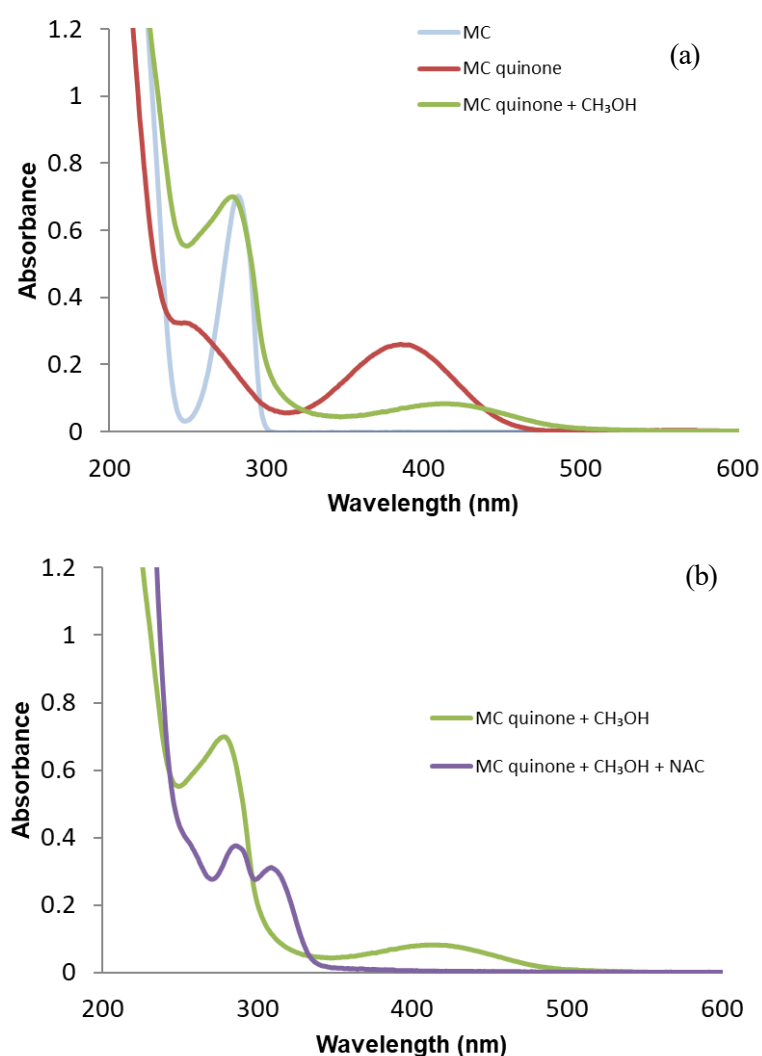


Fig. 5 MeOH存在下での過ヨウ素酸樹脂を用いた酸化反応におけるUV-Visスペクトルの変化

MCはフェノール化合物の $\pi-\pi$ 電子遷移の特徴である278 nmの吸収帯を示す。過ヨウ素酸樹脂をMC溶液に添加すると、無色のMC溶液は淡黄色に変化し、*o*-キノンの $\pi-\pi^*$ 遷移の特徴である391 nmの吸収帯の強度が出現した。反応が平衡に達した120分後の溶液に、求核剤としてメタノールを添加すると*o*-キノンの吸収極大が18時間をかけて緩やかに408 nmに移動した。反応混合物のLC-MS測定より、mono-MeOH付加体MCキノンの生成が推定できることから、この吸収帯の変化は、第二章のNACys付加体と同様に、電子供与性のアルコキシ基の付加による置換基効果によるものと考察した。

mono-MeOH付加体MCキノンは、不安定な性質であるため、そのまま単離することは困難であった。よって、mono-MeOH付加体MCキノンのNACsyを付加させ、安定なカテコール構造のNACys付加体へと変換した後、メタノールの付加位置を推定した。Fig. 5(b) にmono-MeOH付加体MCキノンのNACysを添加して120分後に得られたUV吸収スペクトルを示した。添加後のUV-Vis吸収スペクトルは、408 nmのキノンの吸収が消失し、391 nmおよび311 nmに2つの吸収帯が出現した。これらの事実よりmono-MeOH付加体MCキノンのmono-MeOH-NACys付加体MCへ変化したと推定した。

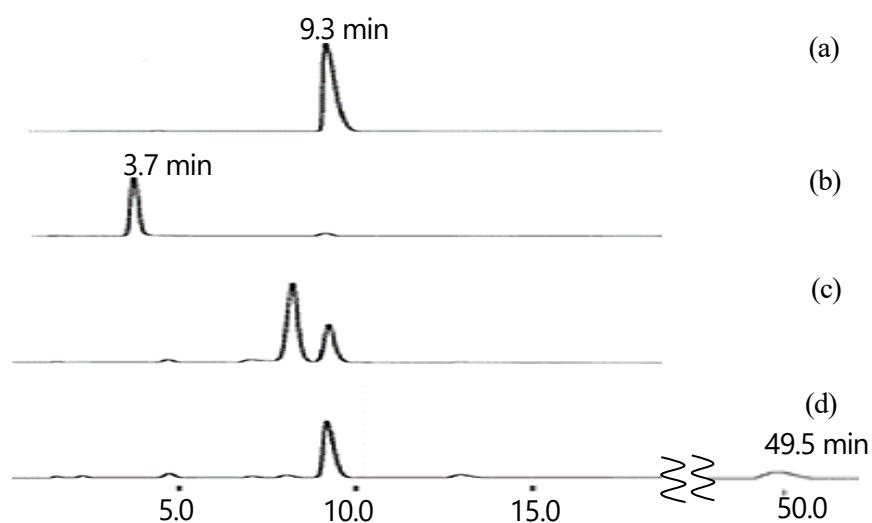
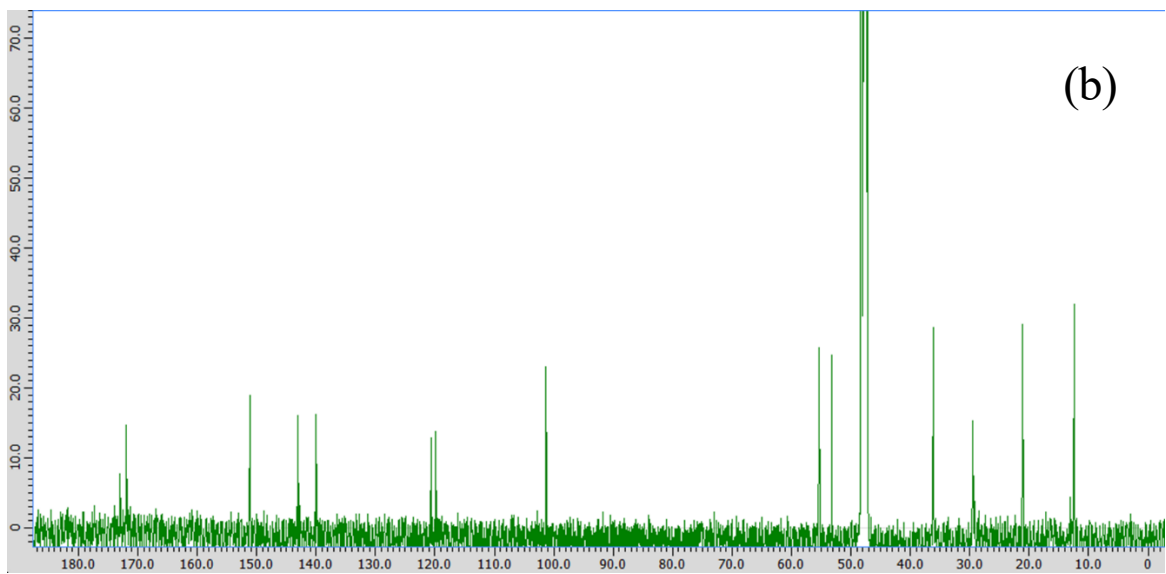
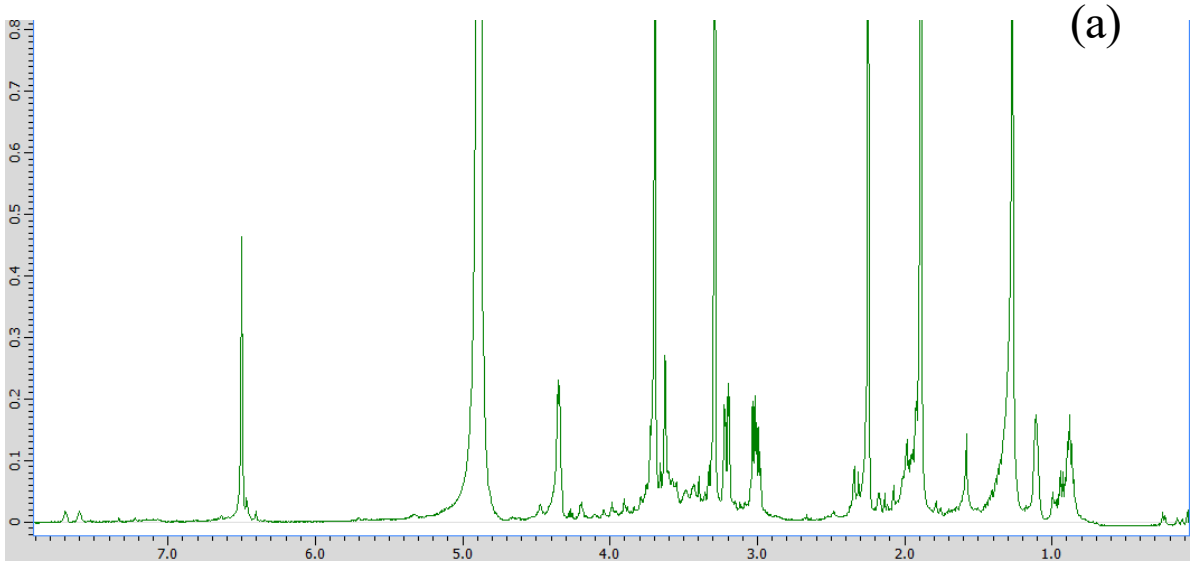


Fig. 6 過ヨウ素酸担持樹脂を用いた反応のHPLCによる経時変化

(a): MC, (b): 酸化反応後, (c):メタノールの添加後, (d): NACysの添加後

この反応をHPLCにて追跡した結果をFig. 6に示す。Fig. 6 (a)は、MCのアセトニトリル溶液のクロマトグラムを示しており、9.3 minに現れたピークはMCを示している。Fig. 6 (b)は、過ヨウ素酸樹脂を用いてMCの酸化反応を行い120分経過後の溶液のクロマトグラムを示した。MCのピークが減少し、3.7 minに新たなピークが出現した。これまでの結果から、3.7 minのピークはMCキノンであると推定される。引き続き反応混合物にメタノールを加えて18時間経過後のクロマトグラムをFig. 6 (c)に示した。3.7 minのMCキノンのピークがほぼ消失し、新たに8.2 minのピークが出現するとともに、9.3 minのMCのピークが増加した。8.2 minに現れたピークは、mono-MeOH付加体キノンであると考えられる。さらにこの反応溶液にNACysを投入し、120分後のクロマトグラムをFig. 6 (d)に示した。mono-MeOH付加体キノンのピーク(8.2 min)が減少し、49.5 minに新たにピークが出現した。前節の結果から、このピークは、mono-MeOH付加体キノンにNACysが付加した物質と推定し、このピークについて分取HPLCによる単離を試みたところ、精製中において安定であり、構造が変化すること無く得られた。得られた物質についてNMRを用いて分子構造を解析した。得られた各スペクトルをFig. 8に、データをTable 2にまとめて示した。



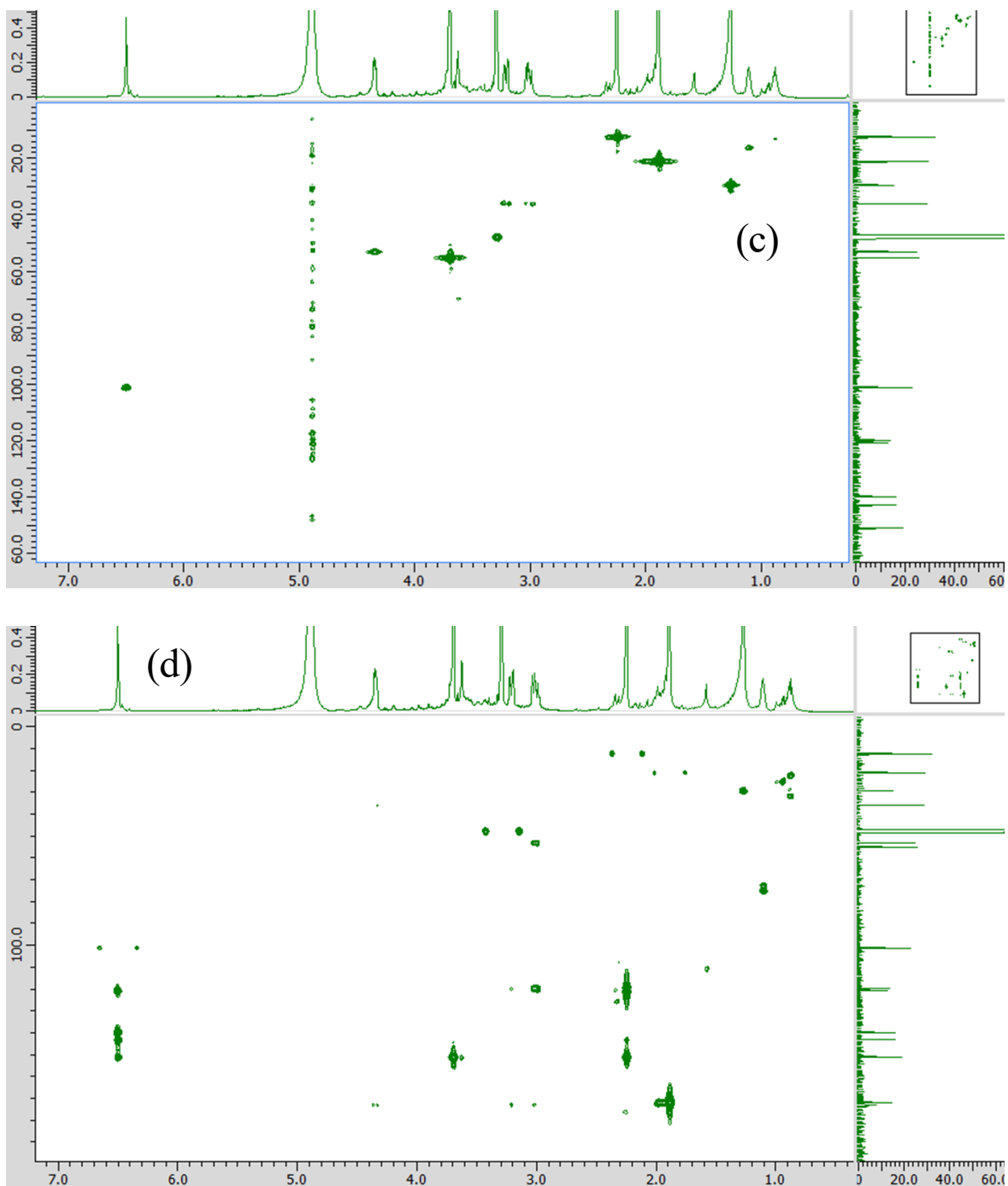
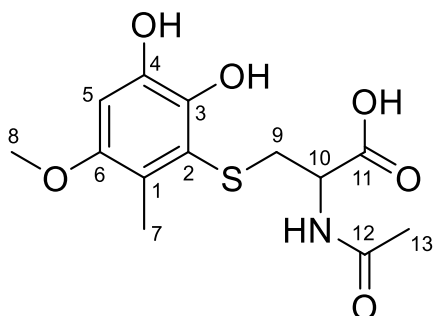


Fig. 8 生成物 I のNMRスペクトル (a) ^1H NMR, (b) ^{13}C NMR, (c)HMQC, (d)HMBC

メタノール- d_4 中での ^1H NMRスペクトル(Fig. 8(a))では、6.52 ppmにシングレットの芳香族プロトンのみが観察され、メタノールとNACysがMCに1つずつ付加した構造であることが分かる。HMQC

スペクトル(Fig. 8(c))においてこのプロトンのシグナルはC-5と相関していることが判明した。また、HMBCスペクトル(Fig. 8(d))では、このプロトンシグナルが144.4 ppmのC-6および121.2 ppmのC-2との相関を示した。これらの結果から、分取HPLCにて単離した化合物は、メタノールとNACysがそれぞれMCの6位および2位に付加した2-NACys-5-MeO-MCと同定された。

Table 2 単離されたMeOH-NACys付加体のNMRデータ



2-NACys-6-MeO-MC

MS (ESI) calcd for $C_{13}H_{17}NO_6S$ ($[M+H]^+$) 316.0777 found 316.0474.

1H NMR (CD_3OD) δ 6.52 (1H, s, H-5), 4.37 (1H, dd, $J = 5.0, 7.5$ Hz, H-10), 3.71 (3H, s, H-8), 3.25-3.21 (1H, m, H-9), 3.05-3.01 (1H, m, H-9), 2.26 (3H, s, H-7), 1.91 (3H, s, H-13).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 174.3(NACys CH_3 -CO-), 173.2(NACys CH_3 -CO-), 152.5 (C-6), 144.4 (C-3), 141.3 (C-4), 122.0 (C-2), 121.2 (C-1), 102.6 (C-5), 56.6 (C-8), 54.5 (C-10), 37.4 (C-9), 22.4 (C-13), 13.7 (C-7).

第2章では、MCは酸化を受けて*o*-キノン(MCキノン)を形成し、続いてNACysがC-5位に求核付加し、mono-NACys付加体として5-NACys MCが生成することを明らかにした。本章での検証の結果、メタノール存在下において、MCは酸化によりキノン体に変換されたのち、さらに反応が進み、C-6位へメタノール分子が付加することによってカテコール構造が再生し、ラジカル消去が増強されることがわかった。この付加位置は、一般的なMichael付加反応の求核反応部位に対応している。さらに、Fig. 3のピーク2はmono-MeOH付加体MCであり、ピーク4はmono-MeOH付加体MCキノンであることから、生成したメタノール付加MCは、共存する*o*-キノンによる酸化を受け、速やかにキノン体へ変換されることが明らかになった。

3-3-4 種々のアルコール溶媒中における過ヨウ素酸付樹脂を用いたMCの酸化反応

その他のアルコール溶媒中における酸化反応について検討した。アルコール溶媒として、メタノールに加えてエタノール、2-プロパノール、1-ブタノールを用いて前節のメタノール溶媒の反応と同様の操作を行い、反応溶液を直接LC-MS分析に供し、それぞれの反応溶液から得たクロマトグラムをFig. 9に示した。いずれのアルコール溶液中においても、メタノール溶液中での反応と同様に、MCおよびMCキノンのピークのほかに、2本のピーク（ピークA、ピークB）を認めた。LC-MS分析の結果から、ピークAはアルコール付加体のキノン、Bはアルコール付加体MCであると帰属した。付加位置については現在のところ不明である。ピークA、ピークBの保持時間を比較すると、メタノール>エタノール、2-プロパノール>1-ブタノールとなり、アルコール分子のアルキル鎖の短い順に溶出していることが確認された。すなわち、求核剤の種類によって、ポリフェノールの疎水性が制御される可能性を示唆している。ポリフェノールの疎水性は、消化管内における吸収や代謝に関与するため、生体内利用率（バイオアベイラビリティ）の機構解明の基礎的知見となる可能性がある。

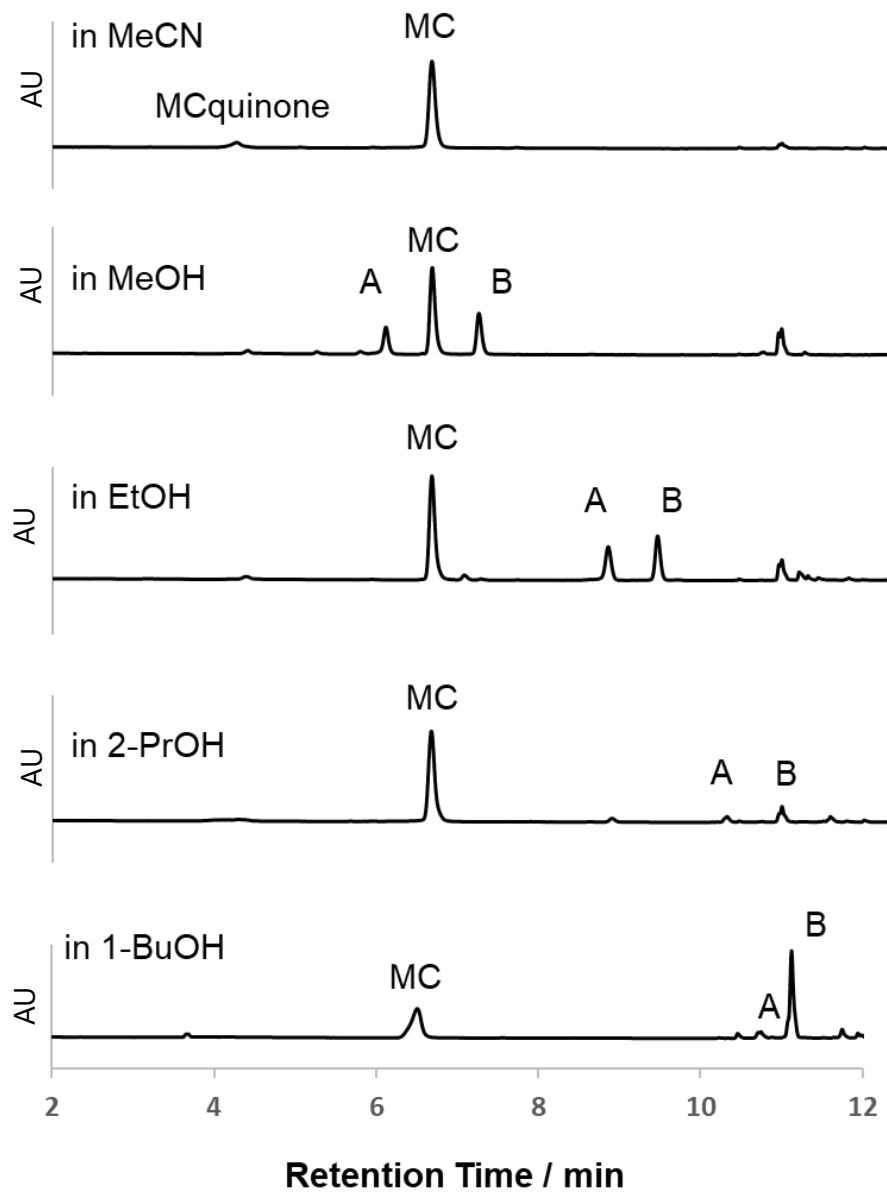
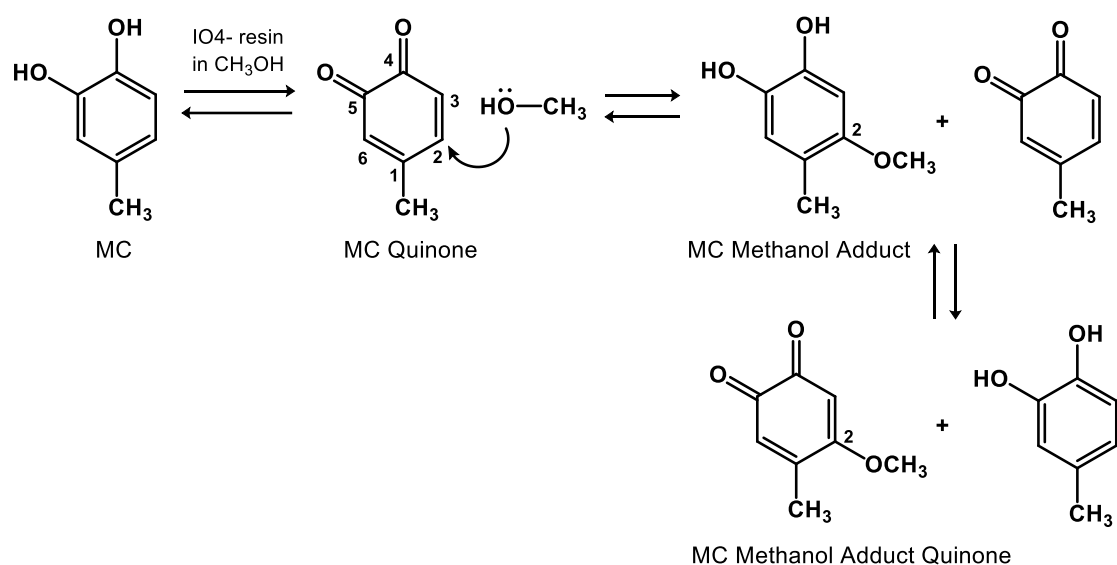


Fig. 9 各アルコール分子存在下における酸化反応溶液のHPLCプロファイル

3-4 結論

上述の結果より、MCの酸化およびそれに引き続くアルコール分子との反応についてScheme 1に示した反応メカニズムを提案する。

この反応では、MCは酸化剤によって酸化され、MCキノンを生成する。求電子種である o -キノン



Scheme 1 アルコールの存在下でのMCの酸化反応機構

は、MeOHによる求核攻撃を受け、MeOH付加体が生成し、一旦カテコール構造が再生する。この付加位置は、一般的なMichael付加反応の求核反応部位に対応している。その後、MeOH付加MCは残存するMCキノンとの間で酸化・還元反応が起こり、MeOH付加MCキノンとMCが共存することになる。以上に述べたように一連のカテコール構造の再生により、DPPHによる酸化反応が当初のMCの当量以上に進行する。その結果としてアルコール中でのMCのラジカル消去活性の増強をもたらしたと考えられる。

日本国内において、DPPH法は食品サンプルや食品添加物の抗酸化力価評価の標準法としての適用が検討されており、反応溶媒には、通常エタノールが用いられている。しかし、Shimamuraらは、ポリフェノールを含有する食品評価についてDPPH法と2,2'-azino-bis(3-benzthiazoline-6-sulfonic acid)

(ABTS) 法を比較した結果, DPPH法がABTS法より高い値を与えることを報告している。本章の結果は, DPPH法とABTS法の差異の原因を示唆するものであり, 分子内にカテコール構造を有する化合物を含有する食品の活性測定の精度に関しては, 今後更なる検証の必要性がある。

3-5 参考論文

- [1] Saito, S.; Okamoto, Y.; Kawabata, J.; Kasai, T. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2003**, 67 (7), 1578–1579.
- [2] Saito, S.; Kawabata, J. *Helvetica Chimica Acta* **2006**, 89 (7), 1395–1407.
- [3] Saito, S.; Okamoto, Y.; Kawabata, J. *BioFactors* **2004**, 21 (1–4), 321–323.
- [4] Saito, S.; Kawabata, J. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (26), 8163–8168.
- [5] Saito, S.; Kawabata, J. *Tetrahedron* **2005**, 61 (34), 8101–8108.
- [6] Saito, S.; Okamoto, Y.; Kawabata, J. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2004**, 68 (6), 1221–1227.
- [7] Saito, S.; Kawabata, J. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2008**, 72 (7), 1877–1880.
- [8] Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitao, G. G.; Reis, A. S.; dos Santos, T. C.; Coube, C. S.; Leitao, S. G. *Phytother. Res.* **2001**, 15, 127–130.
- [9] Harrison, C. R.; Hodge, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1982**, 1, 509–511.
- [10] Shimamura, T.; Matsuura, R.; Tokuda, T.; Sugimoto, N.; Yamazaki, T.; Matsufuji, H.; Matsui, T.; Matsumoto, K.; Ukeda, H. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2007**, 54 (11), 482–487.
- [11] Shimamura, T.; Sumikura, Y.; Yamazaki, T.; Tada, A.; Kashiwagi, T.; Ishikawa, H.; Matsui, T.; Sugimoto, N.; Akiyama, H.; Ukeda, H. *Analytical Sciences* **2014**, 30 (7), 717–721.
- [12] Yamauchi, R.; Fukamizu, S.; Kohama, Y.; Shimamura, T.; Kashiwagi, T.; Ukeda, H.; Akiyama, H.; Matsui, T.; Ishikawa, H. *Nihon Shokuhin Hozo Kagaku Kaishi* **2014**, 40 (2), 55–63.

第4章

N-アセチルシステイン存在下における
CQAs の抗酸化反応機構

第4章 *N*-アセチルシステイン存在下におけるCQAsの抗酸化反応機構

4-1 緒論

この章までで、得られた知見は以下のようにまとめられる。

1) コーヒーポリフェノールとよばれるクロロゲン酸類のモデル化合物としてMCを用いたところ、DPPHによる酸化反応が*o*-キノンを經由して起こる。

2) 過ヨウ素酸を用いたMCの酸化も同様に*o*-キノンを經由する。酸化剤として過ヨウ素酸担持樹脂を用いると、酸化反応を段階的に進行させることができ、樹脂をろ過により除去することで酸化反応の各ステップの分光学的データを得ることが可能になった。

3) チオール化合物が共存するとMCキノンの2-または5-位への付加が起こり、アルコールの存在下では6-位への求核付加が起こることを明らかにした。

本章では、まず、5-CQAのDPPHラジカル消去活性に対するチオールの増強効果を検証した。続いて、酸化反応における5-CQAの酸化生成物を、NACysの非存在下および存在下でLC-MSにより分析した。主要な反応生成物である5-CQA-NACys付加体を分取HPLCにより単離し、それらの構造をそれらの1Dおよび2D NMRスペクトルから解析した。

また、5-CQAの過ヨウ素酸酸化とそれに続く*o*-キノンのNACysとの反応について検証した。2章および3章でも述べたが、カテコール化合物の過ヨウ素酸酸化は、*o*-キノンの形成を經由して進行することが知られている[23–26]。そこで前章と同様に、過ヨウ素酸担持樹脂を使用した反応を行い、反応系からの任意に酸化剤を除去することにより、UV-VisスペクトルおよびLC-MSスペクトルを測定し、*o*-キノンの形成およびNACys付加の反応を段階的に追跡した。

最後に生豆に含有されるCQAの酸化と引き続くNACysの反応について検討した。

4-2 実験

4-2-1 DPPHラジカル消去活性

試料のラジカル消去活性はMensorら[27]によって提案された方法を一部改変して測定した。すなわちDPPH (19.7 mg)をエタノールに溶解し、100 mLのメスフラスコに定容した (500 μ M)。DPPH溶液は用時調製し、暗所で室温下に保管して使用した。5-CQAおよびチオール化合物はそれぞれ50%エタノールに溶解し、5-CQAについては12.5 μ M、チオール化合物については25 μ Mの濃度に溶解し調製した。試験管に5-CQA (2 mL)およびチオール化合物(2 mL)を予め混合した後、1 mLのDPPH溶液を添加した。溶液をボルテックスミキサーで激しく混合し、暗所かつ室温下においてDPPHを投入後30分間インキュベートした。次いでShimadzu UV-2500分光光度計を用いて混合溶液の517 nmにおける吸光度変化を、室温下で測定した。DPPHラジカルによる消去活性は、次式を用いて算出した。

$$\text{ラジカル消去活性(SA, \%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

ここで、 A_{sample} および A_{control} は、それぞれ試料溶液または同量の溶媒と混合された DPPH 溶液の吸光度である。全てのサンプルは3回測定した。

4-2-2 過ヨウ素酸樹脂を用いた反応

Harrison[28]の手法にわずかな修正を加えて、過ヨウ素酸担持樹脂を調製した。すなわち200 mLの超純水に20 gの過ヨウ素酸ナトリウム(Wako Chemicals, Japan)を溶解した後、25 gの高多孔性陰イオン交換樹脂(Diaion HPA25, Mitsubishi Chemical, Japan)を投入し、混合した。その溶液を室温で2時間攪拌し、次いで定性濾紙 (No.2, 15 cm ϕ , Advantec, Japan)を用いて樹脂を濾取した。このようにして得られた樹脂を200 mLの超純水で4回洗浄し、次に100 mLのTHFで2回、そして100 mLのエーテル

で2回洗浄した。樹脂を50 mLの試験管に移し、35°Cの真空オーブン中で一晩乾燥させ過ヨウ素酸担持樹脂を得た。

5-CQA溶液はアセトニトリルに溶解させ調製した。過ヨウ素酸樹脂をそれらの溶液に添加し、所定の反応時間攪拌した。反応が平衡に達することを確認した後、樹脂を溶液から濾別し、濾液にNACysを添加した。NACysを添加した溶液と添加しない溶液を、UV-Vis分光計およびLC-MSによってそれぞれ分析に供した。

4-2-3 分取HPLC

生成した主要な5-CQA-NACys付加体を、Waters 2487 Dual Absorbance Detector (Waters, USA), YMC Triart C18カラム(250×20 mm ID, 5 μm粒径, YMC, Japan)を備えたEFヘッド付き1525 バイナリHPLCポンプ(Waters, USA)による逆相分取HPLCを用いて単離した。

4-2-4 UV-Visスペクトル

紫外可視吸収スペクトルは、石英キュベット(光路長, 1 cm)を用いて、2 nmのバンド光路幅を有するUV-2500分光光度計(Shimadzu, Japan)を用いて測定した。全ての測定は、室温で200~700 nmの波長範囲で行った。

4-2-5 LC-MS分析

LC-MSは、飛行時間型質量分析計Synapt HDMS (Waters, USA)に連結された Acquity UPLC (Waters, USA)を用いて行った。分析物を、YMC Triart C18カラム(100×2.1 mm ID, 粒子径1.9 μm, YMC, Japan)を使用して分離した。データは、質量範囲m/z 50~1000においてScan time (0.2 ms) およびInter-scan

delay (0.1 ms)で, centroidモードで収集した. MassLynx 4.1ソフトウェアパッケージ(Waters, Manchester, UK)をデータ取得および処理に使用した.

4-2-6 NMRスペクトル

^1H 及び ^{13}C NMR測定は, CD_3OD 溶液中でJNM-ECA 500分光計(JEOL Ltd., Japan, 500MHz(^1H)及び125MHz(^{13}C))を用い, 化学シフト値は, テトラメチルシラン(TMS)を基準 ($\delta = 0$) とした相対値としてppmスケールで得た. スピン結合定数は J 値(Hz)で得た. 2D-NMR(^1H - ^1H COSY, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence spectroscopy (HMQC)および ^1H - ^{13}C Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy (HMBC))スペクトルは, 同じ装置を使用して測定した.

4-3 結果及び考察

4-3-1 5-CQAのラジカル消去活性に対するチオールの効果

5-CQAのラジカル消去活性におけるチオールの存在による相乗効果は, 以下の様に評価した. 5-CQAおよびチオールのDPPHラジカル消去活性(Scavenging Ability, SA)をそれぞれ個別に測定して計測値SA(5-CQA)およびSA(チオール)を得た. これらと同じ試験条件下で, チオール共存下での5-CQAの消去活性を測定し, 得られた値SA(5-CQA +チオール)をSA(5-CQA)とSA(チオール)の和と比較した. 4種のチオール抗酸化剤*N*-アセチル-L-システイン(NACys), L-システイン(Cys), グルタチオン(還元型:GSH, 酸化型:GSSG)および*S*-カルボキシメチル-L-システイン(CMCys)をチオールとして選択した(Fig. 1). NACys, CysおよびGSHは遊離チオール基を有するが, GSSGはジスルフィド結合が形成されている. また, CMCysでは, チオール基の水素原子はカルボキシメチル基で置換されている. 5-CQAと各抗酸化剤の混合溶液の消去活性の実測値SA(5-CQA+チオール), および理論値(各

抗酸化剤の消去活性の理論和, SA(5-CQA)+SA(チオール)) 消去活性の比較について示した(Fig. 1).

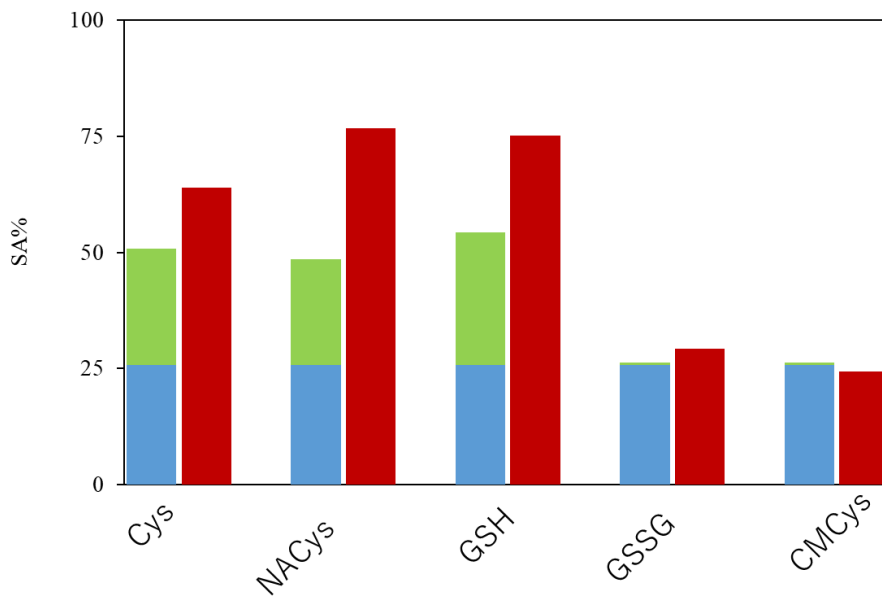
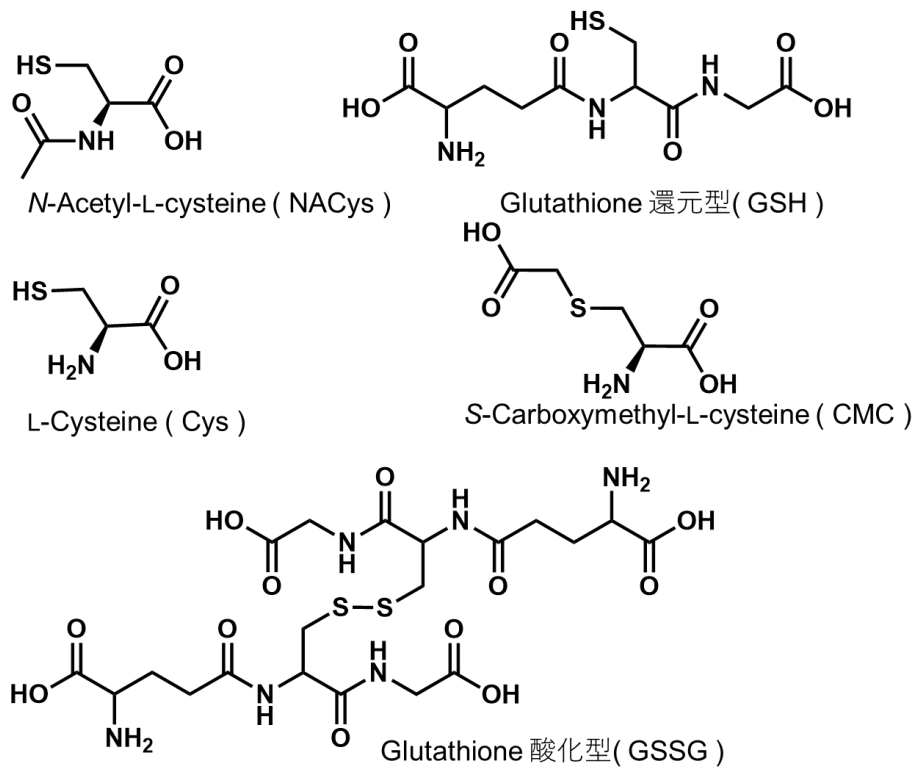


Fig. 1 5-CQAと種々のチオール化合物の混合溶液における理論的および実験的な消去活性の比較

相乗効果は、第2章同様、混合溶液に対する実測SA値と個別のSA値の理論的な和との間の差、すなわち $\Delta SA = SA(5-CQA+チオール) - \{SA(5-CQA) + SA(チオール)\}$ によって評価した。すなわち $\Delta SA > 0$ の場合、抗酸化剤間に相乗効果があり、 $\Delta SA \leq 0$ の場合、抗酸化剤間に相乗効果がないということである[30]。Fig. 1からCys, NACys, またはGSHを含む混合溶液は、それぞれ+13%, +28%および+20%の正の ΔSA 値を示した。すなわち5-CQAのラジカル消去活性が、他のチオール化合物の共存によって高まっていることが示唆された。一方、CSSG, CMCys を用いた混合溶液は、5-CQA単独のSA値と同等であり、それぞれ+2%, -3%の ΔSA 値を示した。これらの結果は、正の相乗効果を得るためには遊離チオール基が不可欠であることを示唆している。

4-3-2 過ヨウ素酸担持樹脂によるCQAの酸化反応

第2章において、筆者らはMCのDPPHラジカル消去反応と過ヨウ素酸酸化反応は、*o*-キノンの形成を経由して進行し、いずれの反応においても同じ生成物を与えることを確認している。そこで、5-CQAの酸化反応過程を段階的に追跡するため、過ヨウ素酸担持樹脂を用いて酸化反応を行い、UV-Visスペクトル変化を測定した(Fig. 2).

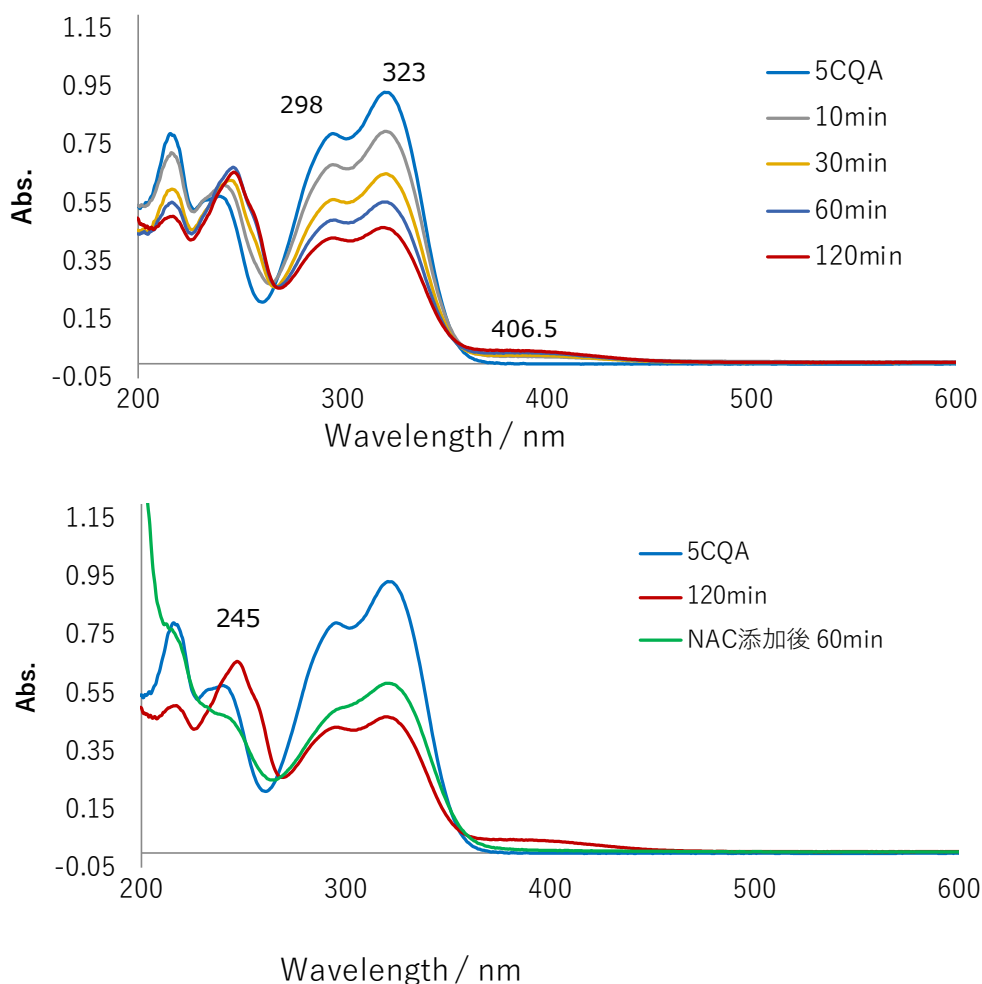


Fig. 2 (a) 5-CQAの過ヨウ素酸酸化反応溶液のUV-Vis吸収スペクトル変化 (CH_3CN 溶液中)
(b) NACys添加による5-CQA 酸化反応液のUV-Vis吸収スペクトル変化

Fig. 2(a)に示すように、CH₃CN溶液中の5-CQAは、298 nmと323 nmにカフェオイル基特有の吸収帯を示す。過ヨウ素酸樹脂を5-CQA溶液に添加すると、無色の5-CQA溶液は黄色に変わり、298 nmと323 nmの吸収強度が経時的に減少するとともに、245 nmと406 nmに特徴的な吸収帯が出現した。反応は120分のインキュベーション後に平衡に達し、さらなるスペクトル変化は観察されなかった。第2章において、MCの酸化反応液にも同様のスペクトル変化が確認されており、406 nmでの吸収は5-CQAキノンに由来するものと推定される。また、このUV-Visスペクトル変化については、明確な等吸収点は観察されず、5-CQAキノン以外の酸化生成物がこの反応に関与していることを示唆している。Fig. 2(b)は、5-CQAキノン溶液にNACysを添加して60分後に得られたUV吸収スペクトルを示す。UV吸収スペクトルは、245 nm, 406 nmの吸収帯が消失し、323 nmの吸収強度の増加が確認された。これはカフェオイル基に特徴的であり、カテコール構造の再生を示唆している。

4-3-3 5-CQAの酸化反応における反応生成物のLC-MS解析

第3章と同様に、本節では5-CQAを過ヨウ素酸により酸化，それに引き続くNACysとの反応について、反応過程をHPLC およびLC-MSにて分析した。Fig.3は、5-CQAに過ヨウ素酸ナトリウムを混合後，4分間隔でHPLCにて反応を追跡したHPLCプロファイルを示している。

反応開始直後からピークB (5-CQA)のピークエリアが減少することを確認した。それに伴って，ピークAおよびピークCが増大することを確認した。よって，ピークA,Cは5-CQAの酸化反応生成物

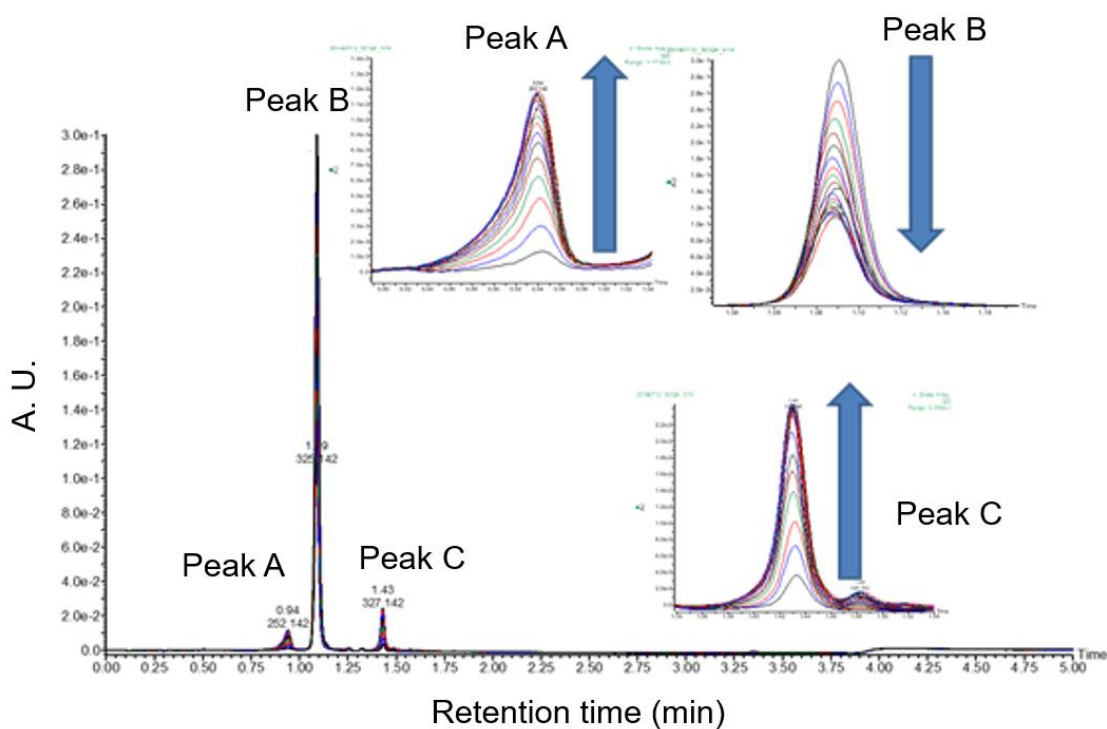


Fig. 3 5-CQAの過ヨウ素酸を用いた酸化反応溶液のHPLCプロファイル経時変化

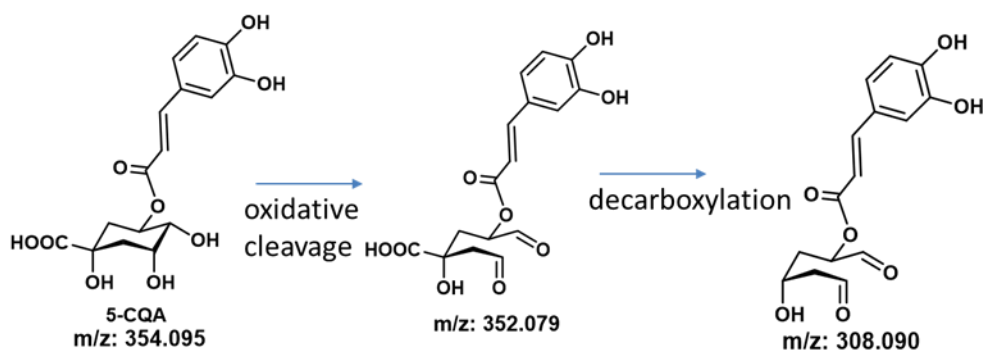
ピーク B: 5-CQA

であることが示唆される。続いて，酸化反応が平衡に達した後，NACys 2等量を溶液に添加した。キノン溶液へのNACysの添加により，溶液の色調は黄色から無色に変化した。以下，これらの反応

試料のUV-VisおよびLC-MSスペクトルについて論じる。

Fig. 4(a)は、過ヨウ素酸による酸化反応が平衡に達した反応液のHPLCプロファイルを示し、Fig. 4(b)は、NACysをその反応溶液に添加して5分後に得られたHPLCプロファイルを示す。また、検出されたピークA-DについてそれぞれのUVスペクトルおよびMSスペクトルをFig. 5に、およびこれらのデータの要約をTable 1に示す。Fig. 4(a)に示すように、5-CQAの過ヨウ素酸酸化反応溶液のクロマトグラムでは、約0.8 minおよび1.6 minの保持時間で、3つのピークが検出された。ピーク Bは、325 nmにUV吸収を示すとともに、 m/z 354に[M-H]⁻イオンを示した。両方とも5-CQAに特徴的であるため未反応5-CQAと帰属される。ピーク Aのピークエリアは、酸化反応中において5-CQAのピークエリア(ピーク B)が経時的に減少するにつれて増加する。ピーク AのUV-Visスペクトルには251 nmおよび409 nmに特徴的なUV吸収帯があり、5-CQAキノンと推定することができる。しかし、ピーク Aの[M-H]⁻イオンは、 m/z 345に検出され、これは5-CQAキノンより質量数が2少ない5-CQAと同じであった。Albarranら [33]は1,2-ベンゾキノンの質量分析において、イオン化過程で水素化物付加体が生成することを報告しており、今回の結果はこれと一致して、5-CQAキノンがイオン化中に水素付加を受けたため5-CQAの質量数を示したと考えられる。一方、5-CQAキノンは、5-CQA(6.58 min)よりもはるかに短い保持時間(4.15 min)を有することは興味深いデータである。これは、第2章においてMCキノンがMCよりも短い保持時間を示したことと一致している。すなわち、*o*-ベンゾキノンは、カテコールと比較して、ベンゼン中で非常に強い双極子モーメント(5.1D)を有することが報告されており[34,35]、*o*-ベンゾキノンの大きな双極子モーメント値は、*o*-キノンがより短い保持時間をとっている1つの理由であると考えられる。ピーク Cは、酸化反応中において5-CQA(ピーク B)が経時的に減少するにつれて増加するピークが、UV-Visスペクトルにおいて325 nmに吸収帯が観察され、5-CQAと類似したスペクトルであった。一方で、 m/z 307に[M-H]⁻イオンを示しており、カフェオイル基以外の部分構造が変化したことが推定された。過ヨウ素酸ナトリウムは、1,2-ジオールの部分構造を持つ化合物に作用させると間のC-C結合が切断され、対応するアルデヒドまたはケトンを与えることがよく知られている[8]。5-CQAのキナ酸部分は*cis*-ジオール部を有しており、過

ヨウ素酸による酸化的開裂反応をうける可能性が推定される。ピーク CのMSスペクトル解析から、 $[M-H]$ が m/z 307を示すことが明らかとなっており、これは5-CQAのキナ酸部分が開裂し、脱炭酸した化合物の質量数と一致する。よってピークCは、5-CQAキナ酸開裂体と帰属した。推定した反応機構をScheme 1に示す。



Scheme 1 5-CQAの酸化的開裂反応

5-CQAの酸化反応溶液にNACysを加えると、5-CQA キノン（ピークA）はNACys添加後に速やかに消失し、0.8 minおよび1.6 minの保持時間に、5-CQA(ピークB)、5-CQAキナ酸開裂体(ピークC) および1.27 minにピークDの計3つのピークが検出された。ピークDのUV吸収スペクトルは、324 nmに幅広の吸収帯を示し、MSスペクトルにおいて m/z 514 $[M-H]$ を検出したことに基づいて、5-CQAにNACysが一分子付加したmono-NACys付加体であると帰属した。

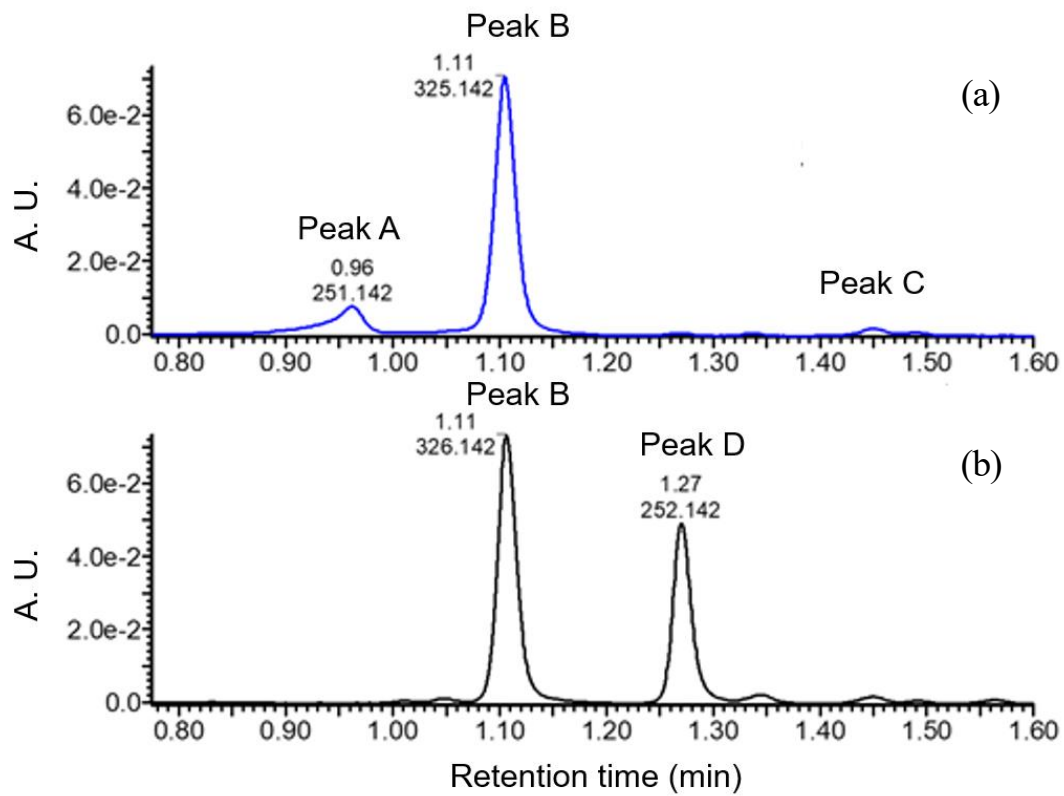


Fig. 4 HPLCクロマトグラム(a) 過ヨウ素酸による酸化後, (b) NACys添加後
 ピークB: 5-CQA. ピークA, ピークC, ピークD: Unknown,

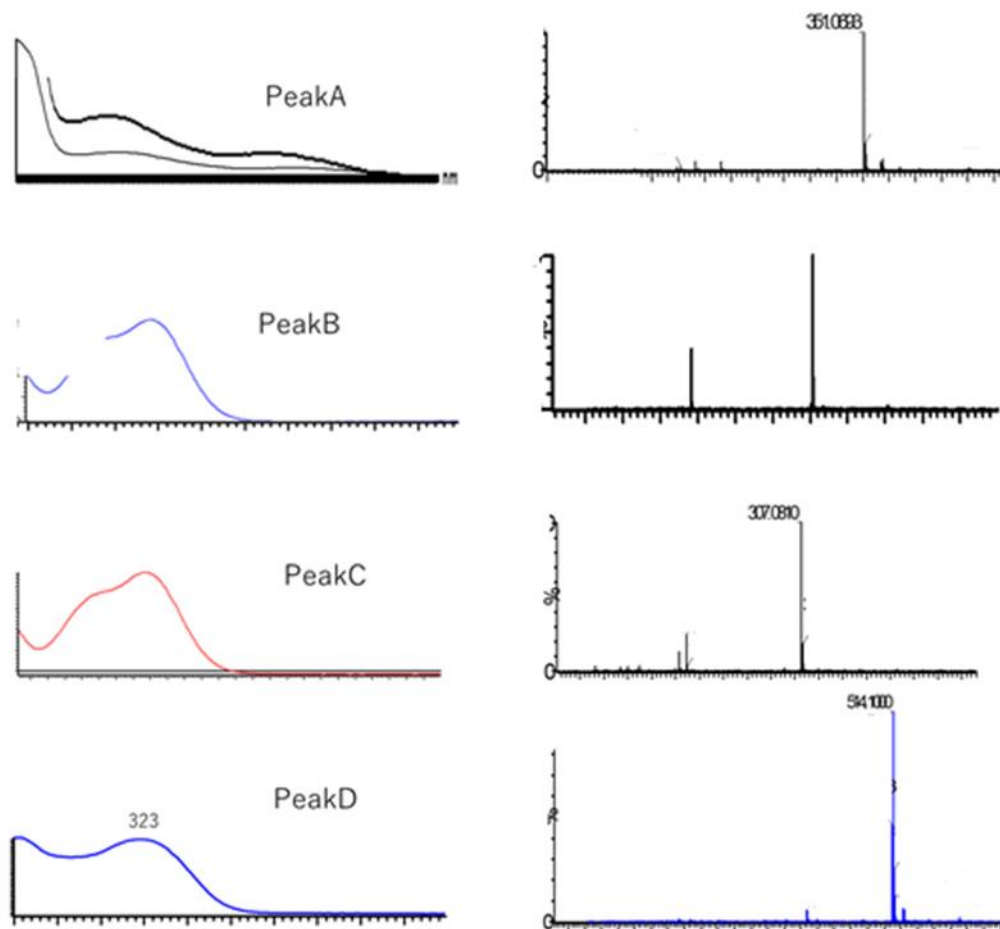


Fig. 5 ピークA-D (Fig. 4)のUV-VisおよびMSスペクトル

Table 1 HPLCピーク (Fig. 4) のMSおよびUVデータと帰属

ピークNo.	t_R (min)	λ_{max} (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	帰属
A	0.96		351	5-CQAキノン
B	0.11	325	353	5-CQA
C	1.45	326	307	5-CQAキナ酸開裂体
D	1.27	323	514	mono-NACys付加体

4-3-4 NACys付加5-CQAの分取HPLCによる単離およびNMRキャラクタリゼーション

NACys付加5-CQAの付加位置を決定するため、分取HPLCを用いてピークDの単離精製を行った。分取LCクロマトグラムを Fig. 6 に示した。生成物に該当するピークを分取し、凍結乾燥した後、白色粉末を得た。

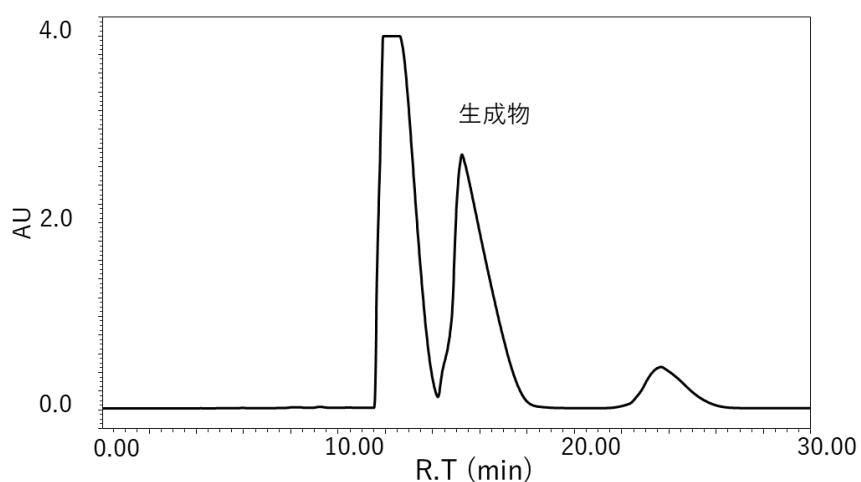


Fig. 6 NACys付加5-CQAの分取LCクロマトグラム

まず、出発物質である5-CQA のNMR 解析を行った。その結果、既知の文献データとほぼ一致した[22]。 ^1H NMRの測定データをFig. 8に、 ^{13}C NMRデータと合わせて帰属した要約をTable 2に示した。従前の文献に記載された同定との比較を容易にするために、カテコール環の位置番号はFig. 7に示したとおりとする。

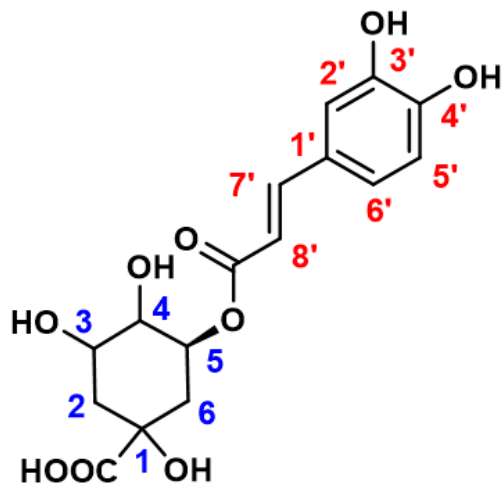


Fig. 7 5-CQAにおける原子の番号付け

続いて、単離したNACys-5-CQAのNMR測定を行った。得られた¹H NMRスペクトルをFig. 9示した。チオール化合物が5-CQAに付加可能な位置としてはカフェオイル基の2', 5', 6', 7', 8'位の可能性が考えられる。¹H NMRスペクトルにおいて7'位と8'位のプロトンとともにダブルットのピークを示した。よって7'位と8'位はオレフィン部の二重結合であり、ここにNACysは付加していないことがわかる。また、5'位と6'位とともにダブルットピークが検出されたことから、5'位と6'位の炭素には水素が1つずつ結合しており、NACysが付加していないことを確認した。また、5-CQAのスペクトル (Fig. 8) と比較すると、2'位のプロトンのピークの消失が確認できた。これらのことより、NACys-5-CQAは5-CQAの2'位にNACysが付加した構造であると帰属できる。

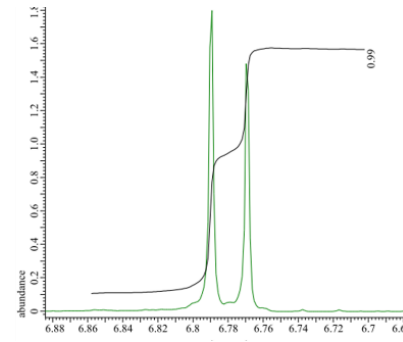
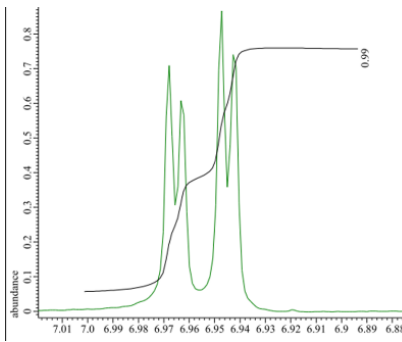
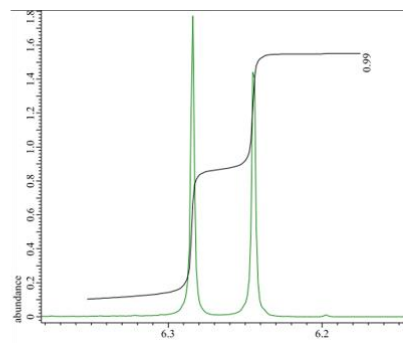
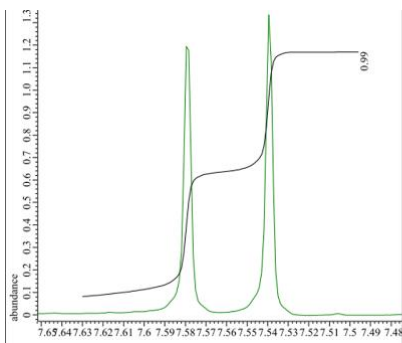
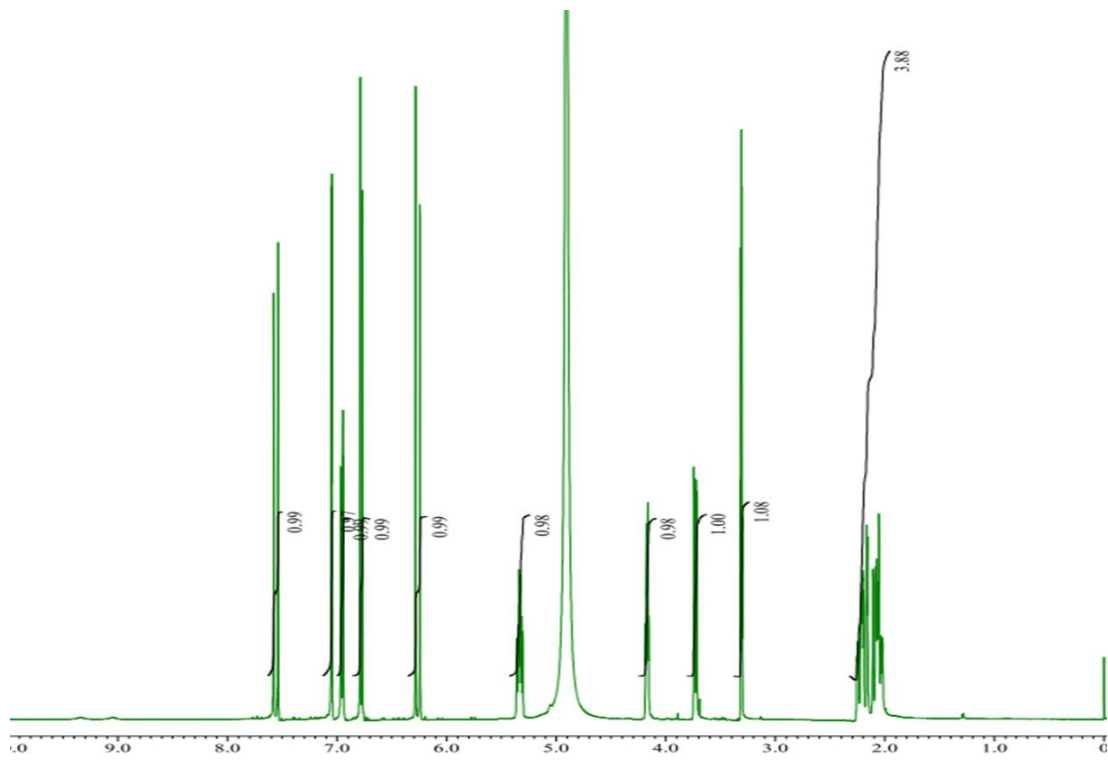


Fig. 8 5-CQAの ^1H NMRスペクトル

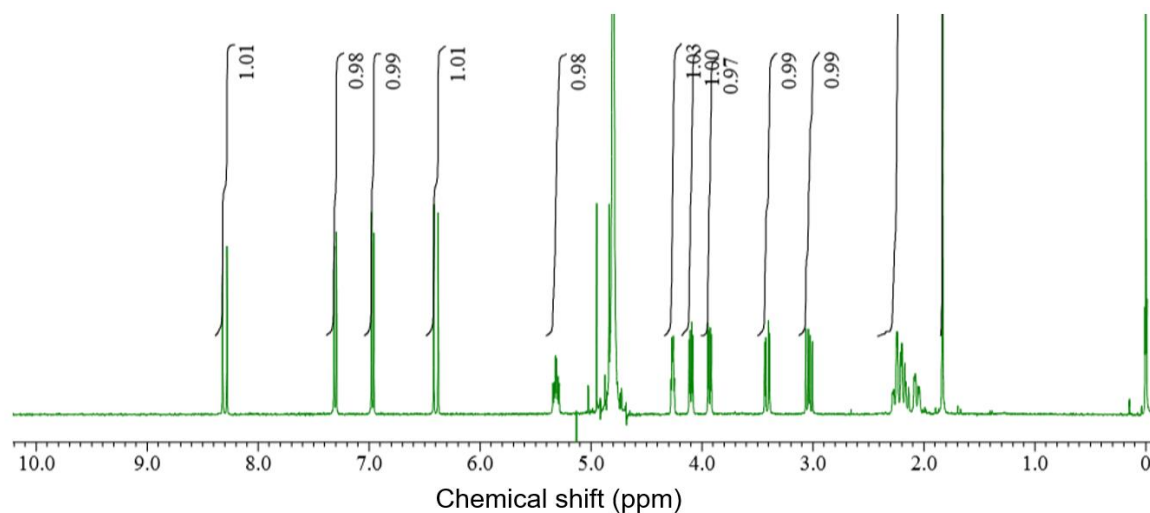


Fig. 9 NACys-5-CQAの¹H NMRスペクトル

Table 2 5-CQAの¹H および¹³C NMR データ

¹H NMR (Methanol-d₄): δ 2.05 (1H, m, H-6'), 2.23 (1H, m, H-2'), 3.73 (1H, dd, *J* = 3.2, 8.8 Hz, H-4'), 4.17 (1H, m, H-3'), 5.33 (1H, m, H-5'), 6.26 (1H, d, *J* = 16 Hz, H-8), 6.78 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 6.96 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz, H-6), 7.05 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2),

7.56 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-7)

¹³C NMR (Methanol-d₄): δ 36.9 (C-2'), 37.4 (C-6'), 69.9 (C-3'), 70.6 (C-5'), 72.1 (C-4'), 74.8 (C-1'), 113.8 (C-2), 113.9 (C-8), 115.1 (C-5), 121.7 (C-6), 126.4 (C-1), 145.5 (C-7), 145.8 (C-3), 148.2 (C-4), 167.3 (C-9), 175.7 (C-7')

NACys一分子付加5-CQAのNMR 解析の結果は、以下のとおりである。

Table 3 NACys-5-CQAの¹H および¹³C NMR データ

¹H NMR (D₂O): δ 1.83(3H, s, H-5''), 2.20(1H, m, H-6'), 2.2(1H, m, H-2'), 3.03(1H, m, H-1''), 3.42(1H, dd, J= 3.6, 14.0 Hz, H-1''), 3.93(1H, dd, J= 3.2, 8.8 Hz, H-4'), 4.10(1H, dd, J=3.6, 9.2 Hz, H-2''), 4.27(1H, dd, J=3.2, 8.0 Hz, H-3'), 5.21(1H, m, H-5'), 6.40(1H, d, J=16.0 Hz, H-8), 6.96 (1H, d, J=8.4 Hz, H-5), 7.30 (1H, d, J=8.0 Hz, H-6), 8.32 (1H, d, J=16.0 Hz, H-7)

¹³C NMR (Methanol-d₄): δ 24.6 (C-5''), 37.6 (C-2'), 39.5 (C-6'), 56.0 (C-4''), 72.2(C-3'), 73.8 (C-5'), 74.4(C-4'), 78.0(C-1'), 116.3(C-8), 119.8(C-4), 122.9 (C-6), 123.1 (C-1), 147.3 (C-7), 149.1 (C-3), 149.4 (C-4), 171.5 (C-7')

4-3-5 コーヒー豆抽出液中のCQAsの酸化およびそれに続くNACys付加体形成

これまでの検証によって、MCやCQAsのようにカテコール構造を有する化合物は酸化反応によりキノン体へと変換されることを確認した。それに引き続いてキノン体にNACysのようなチオール化合物を共存させると直ちにチオール付加体が生成し、カテコール構造を再生することがラジカル消去活性増強の要因であることも明らかにした。

このような、酸化反応に関する検証は、モデル化合物を用いた研究がほとんどである。本研究で用いたMCやCQAsはいずれもコーヒー抽出物に含有されている物質であるものの、実際の食品試料において検証される例は殆ど知られていない。コーヒー飲料は、製造時に混入した極微量の酸素によって酸化し、その香味が保存期間と共に変化し、香味劣化が起こることが知られている。複雑な

マトリクス成分中において、コーヒーポリフェノールの抗酸化性の発現に関する知見を得ることは、酸化反応の香味の安定性への影響を知り、香味安定性の良い飲料を理論的に製造する技術の開発に有用であるといえる。本節では、CQAsを含む生コーヒー豆抽出物を用いて、CQAsの過ヨウ素酸担持樹脂による酸化反応とそれに引き続く、チオール付加体の生成に関して検証した。Fig. 9に生コーヒー豆抽出物に含有される主要なクロゲン酸類の分子構造を示す。

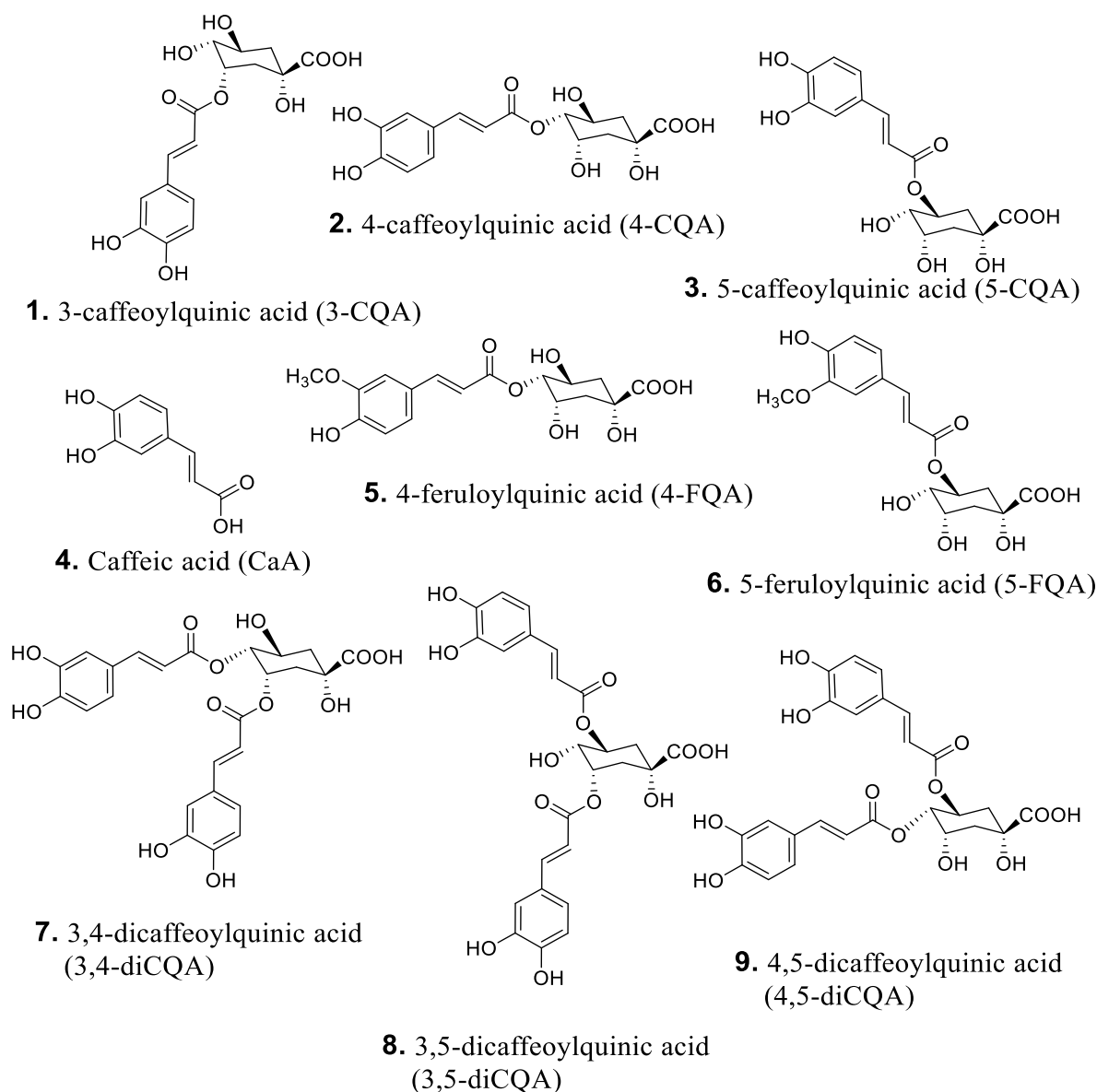


Fig. 9 キナ酸エステル類 (CQAs, FQAs and diCQAs) の分子構造

Fig. 10に、生コーヒー豆抽出物のHPLCクロマトグラムを示した。酸化反応前のクロマトグラムAでは保持時間 1.0 minから14.0 minの間に9本のピークを認めた。各ピークは、そのMSスペクトルと文献値との比較により、それぞれTable 4にまとめたように帰属した。ピーク1-3は、mono-CQAの三つの位置異性体(3-CQA, 4-CQA, 5-CQA)、ピーク4はカフェ酸(CaA)、ピーク5, 6はフェルロイルキナ酸(mono-FQA)の位置異性体(5-FQA, 4-FQA)、そしてピーク7-9はジカフェオイルキナ酸(di-CQA)の三つの位置異性体(3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA, 4,5-di-CQA)である。生コーヒー豆抽出物を過ヨウ素酸酸化し、これにNACysを加え5分後にHPLC測定すると複雑なクロマトグラムBが得られた。

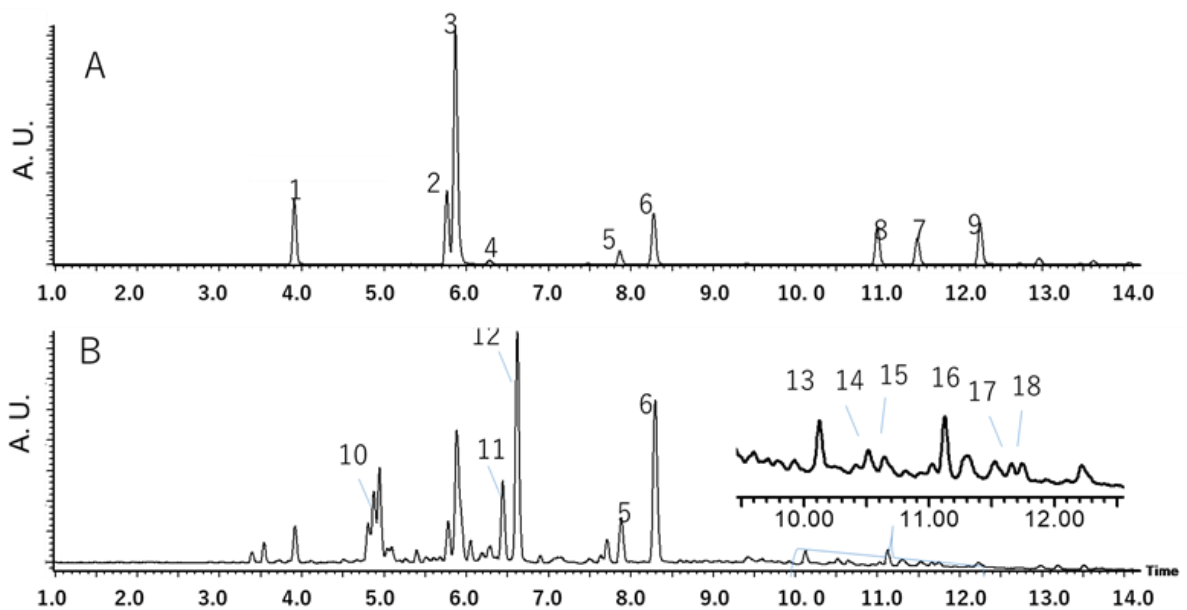


Fig. 10 生コーヒー豆抽出物のHPLCクロマトグラム

Table 4 酸化反応前後における生コーヒー豆抽出物のLC-MS分析結果

chart	Peak NO.	R _t [min]	λ _{max} [nm]	[M-H] ⁻ [m/z]	帰属
A	1	3.91	325	353.086	3-CQA
	2	5.76	326	353.082	4-CQA
	3	5.87	326	353.086	5-CQA
	4	6.28	323	179.033	CaA
	5	8.28	325	367.103	5-FQA
	6	7.87	325	367.103	4-FQA
	7	11.48	325	515.116	3,4-diCQA
	8	11.00	328	515.119	3,5-diCQA
	9	12.25	327	515.120	4,5-diCQA
B	10	4.88	323	514.100	3-CQA+NAC
	11	6.44	321	514.100	4-CQA+NAC
	12	6.62	324	514.101	5-CQA+NAC
	13	10.12	317	837.147	3,5-diCQA+2NAC
	14	10.51	-	676.131	3,5-diCQA+NAC
	15	10.64	-	676.133	3,5-diCQA+NAC
	16	11.12	323	837.145	4,5-diCQA+2NAC
	17	11.66	-	676.134	4,5-diCQA+NAC
	18	11.74	-	676.130	4,5-diCQA+NAC

各ピークのMSスペクトルから、出発物質（キナ酸エステル類）のNACys付加体と帰属できたものをピーク10-18として示した。ピーク10-12は、mono-CQAの三つの位置異性体にそれぞれNACysが一分子付加したものの、ピーク14, 15は、3,5-di-CQAにNACysが一分子付加したものの、ピーク16, 17は、4,5-di-CQAにNACysが一分子付加したものの、ピーク13, 16は、di-CQAにNACysが二分子付加したものであった。また、カテコール部の3'位にメトキシ基、4'位に水酸基をもつFQAsにおいては、NACys付加体の生成が確認できなかった。これは、構造的にo-キノンの生成が不可能であるため、NACysの付加反応が起こらなかったものと考えられる。

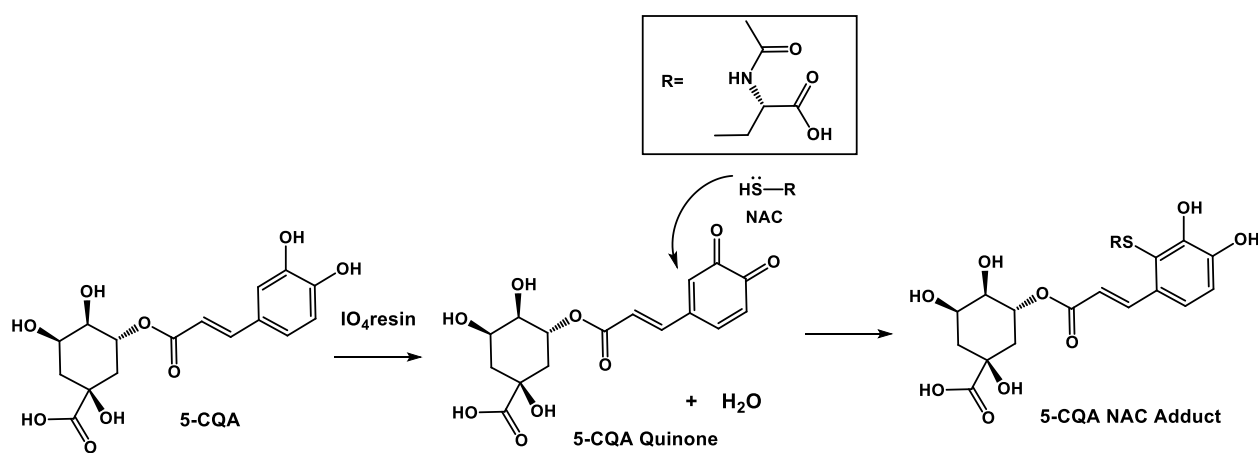
以上の結果より，生コーヒー豆抽出物をサンプルとして用いた場合にも，これに含まれるCQAsは，共存する他の化合物影響を受けることなく，酸化反応と引き続くチオール化合物の求核反応を受け，対応する化合物を与えることが明らかとなった．すなわち，生コーヒー豆抽出物においても抗酸化活性の増強効果があることを示唆している．

4-4 結論

本章では、コーヒー抽出物に最も多く含有されているCGAである5-CQAを対象物質として用い、そのDPPHラジカル消去活性に対して、チオールがおよぼす増強効果を検証した。

NACysの非存在下および存在下における5-CQAの酸化反応生成物をLC-MSにより分析したところ、第2章のMCを用いた場合と同様に、カテコール部にNACysが付加した化合物の生成を確認した。そのうち主要な反応生成物である5-CQA-NACys付加体を分取HPLCにより単離した。それらの1Dおよび2D NMRスペクトル解析の結果から、5-CQAの2'位にNACysが付加した構造であると帰属した。

得られた結果より、5-CQAの酸化およびその後のNACysとの反応についてScheme 2に示した反応メカニズムを提案する。



Scheme 2. NACysの存在下での5-CQAの抗酸化反応機構

すなわち、第2章のMCを用いた反応と同様に5-CQAは酸化を受けて対応する o -キノン(5-CQAキノン)を形成し、引き続きNACysの求核付加では、主なmono-NACys付加体として2'-NACys-5-CQAを生じる。

これまでの結果を踏まえ、CGAsを含有する生豆抽出物を試料に用いて酸化反応と引き続くNACysとの反応を行い、食品サンプル中におけるCGAsの抗酸化反応について検証した。反応前後をLC-MSを用いて解析し比較検討した結果、カテコール構造を分子内に有するCGAsは、CQA-NACys付加体へ変換されることがわかった。

つまり、コーヒー豆抽出物のような原材料に近い状態でも、含有されるCQAsの酸化反応では、NACysの共存下において、前章で述べたカテコール部の再生を伴う反応が進行していることが明らかとなった。コーヒーの抽出成分には、NACysのようにチオール部を有する化合物を含んでおり、これらもNACysと同様にCQAsの抗酸化活性の増大に寄与しているものと推察できる。以上のように本章の結果は、コーヒー飲料が有する高い抗酸化作用の機構を明らかにするものである。

4-5 参考文献

- [1] Weidman, S. W.; Kaiser, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5820-5827.
- [2] Fulcrand, H.; Cheminat, A.; Brouillard, R.; Cheynier, V. *Phytochem.* **1994**, *35*, 499-505.
- [3] Bassil, D.; Makris, D. P.; Kefalas, P. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 395-402.
- [4] Jongberg, S.; Gislason, N. E.; Lund, M. N.; Skibsted, L. H.; Waterhouse, A. L. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6900-6905.
- [5] Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitao, G. G.; Reis, A. S.; dos Santos, T. C.; Coube, C. S.; Leitao, S. G. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 127-130.
- [6] Harrison, C. R.; Hodge, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1982**, *1*, 509-511.
- [7] Liu, D.; Shi, J.; Ibarra, A. C.; Kakuda, Y.; Xue, S. J. *LWT-Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 1344-1349.
- [8] Malaprade, L. *Bulletin de la Societe Chimique de France.* **1928**, *43*, 683-96

第5章

CQAsのシクロデキストリン包接挙動

第5章 CQAsのシクロデキストリン包接挙動

5-1 緒論

植物食品に含まれるポリフェノール類は、その抗酸化作用や抗炎症作用などの生理活性に着目した機能性食品の素材として利用されている[1]。しかし、これらの生理活性の有効性は、物質自体の化学的安定性のみならず、生物活性および生体吸収性などの生物学的利用性（バイオアベイラビリティ）などに大きく依存する[2]。そのため、食品に利用可能な高分子化合物によるナノカプセル化や環状オリゴ糖シクロデキストリン(CyD)を用いた包接などの技術がフェノール類の化学的安定性の向上と生物学的利用を促進する有効な手段として検討されている[3]。

とくにCyD包接複合体は、上記の化学的性質の改善に加え、溶解性改善、ゲル化防止、減臭など物理的性質の向上を目的に製薬産業、食品、および農業などに広く用いられている。CyDは、6、7および8個のD-グルコース単位からなる環状オリゴ糖であり、それぞれ α -、 β -および γ -CyDとして一般的に知られている。CyDはFig.1 に示すような中空のバケツ型の構造をとっており、空孔（キャビティ）の外側が親水性、内部が疎水性の性質を有する両親媒性化合物である。この性質から、様々なゲスト分子と包接複合体を形成することができる[4]。Table 1にCyDの物性値を示す。

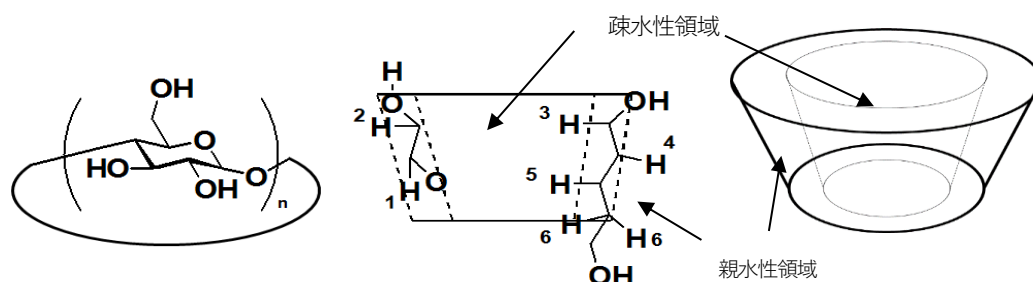


Fig. 1 CyDの分子構造

CyDのうち β -CyDは、1998年に米国食品医薬品局（FDA）によってGRAS（グラス、Generally

Recognized As Safe²⁾) リストに食品添加物として承認されて以来, その用途および使用量が拡大している [5]. 食品への具体的な使用例として, コーヒー, 茶, ダイズ, カンキツ果実およびニンジンなどに含有される呈味成分がCyDと複合体化すると, 味蕾の味覚細胞との相互作用が抑制され, 苦味

Table 1 CyDの物性

CyDs	グルコース数	分子量(g/mol)	空孔径(Å)	空孔容積(Å ³)	水への溶解性(g/100 mL @ 25°C)
α-CyD	6	972	4.7~5.3	~174	14.5
β-CyD	7	1135	6.0~6.5	~262	1.85
γ-CyD	8	1297	7.5~8.3	~472	23.2

や渋味を低減することが報告されている[6]. また, ポリフェノールの酸化安定性がCyD複合体化により改善されることも報告されている[7-12].



Fig. 2 Caffeoyl quinic acids (CQAs)の分子構造

コーヒー成分や飲料に対するCyDの添加効果も検討されている. コーヒー由来ポリフェノールがコーヒーの苦味の主要な要因物質であることが知られているが[13], β-CyDはその苦みを抑制するといわれている [6]. また, CyDの添加によりコーヒーポリフェノールのDPPHラジカル消去活性が増加するという報告がある[14].

当研究室では, CyD存在下におけるCQA類の熱異性化反応について検討し, β-CyD共存下において酸化により増加する副生成物の生成が抑制されることを確認している. これらの現象について, 包接複合体の形成が示唆されているが, 分子レベルでの包接挙動については依然として議論の余地がある.

そこで本章では、コーヒー由来ポリフェノールとCyDとの包接複合体形成の分子機構を明らかにする。コーヒー由来ポリフェノールとしてCQAsをとあげ、CyD類ととの包接複合体の化学量論比および安定度定数を種々の分光学的手法によって検討した。また、二次元NMRを用いて、CyDによるCQAs包接現象の詳細を考察した。

5-2 実験

5-2-1 試薬

5-CQAは関東化学(株)より、4-CQA, 3-CQA, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA, 4,5-di-CQAはChengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.より購入した。α-Cyclodextrin, β-Cyclodextrin, γ-Cyclodextrinは東京化成工業(株)より購入した。リン酸二水素カリウムは和光純薬(株)より、水酸化カリウムはナカライテスク(株)より購入した。緩衝液の調整には超純水(アリウム 611UV, ザルトリウス・メカトロニクス・ジャパン社製)を使用した。D₂Oは関東化学(株)より購入した。

5-2-2 装置

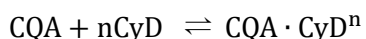
UV-Visスペクトルは、第2章と同様の装置を用いて測定した。

蛍光スペクトルは、石英キュベット(光路長, 1 cm)を用いて、10 nmのバンド光路幅を有するFP-8200型分光蛍光(日本分光, 日本)を用いて測定した。

¹H及び¹³C NMR測定は、第2章と同様の装置を用い、化学シフト値は、D₂Oを基準(δ = 4.79 ppm)とした相対値としてppmスケールで得た。スピン結合定数はJ値(Hz)で得た。2D-NMR(ROESY (Rotating Overhauser enhancement and Exchange Spectroscopy)スペクトルも上記の装置を使用して測定した。

5-2-3 包接化合物の会合定数

包接複合体の平衡について



とおくと、安定度定数 K は

$$K = \frac{[\text{CQA} \cdot \text{CyD}^n]}{[\text{CQA}][\text{CyD}]^n}$$

と表される。

一般に包接複合体の安定度定数 K は、Benesi-Hildebrandの式[19]を用いて見積もることができる。

とくに、1:1包接に対するBenesi-Hildebrand式は以下のように与えられる。

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{K\Delta F_{\max}} \cdot \frac{1}{[\text{CyD}]_0} + \frac{1}{\Delta F_{\max}}$$

ここで $\Delta F = F - F_0$ 、 $\Delta F_{\max} = F_{\infty} - F_0$ であり、 F および F_0 は、 CyD の存在下および非存在下でのCQAsの蛍光強度、 F_{∞} はすべてのCQAsが包接複合体を形成するときの理論的な蛍光強度である。1/ ΔF を1/ $[\text{CyD}]_0$ に対してプロットすると直線を与え、切片1/ ΔF_{\max} と傾き1/ $K\Delta F_{\max}$ から安定度定数が算出できる。

上記の式は、ホスト分子である CyD がゲスト分子CQAに対して過剰濃度で存在するとき成立するので[15-17]、本研究では、CQA濃度に対して CyD 濃度を10-200当量添加することとした。

5-2-4 連続変化法(Jobプロット)

試薬

UV-vis測定

溶媒：0.05 M リン酸緩衝液

CQA水溶液： 1×10^{-5} M

CyD水溶液： 1×10^{-5} M

NMR測定

溶媒：D₂O

CQA水溶液： 1×10^{-2} M

CyD水溶液： 1×10^{-2} M

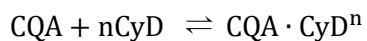
Table 2 測定試料のモル分率

sample	[CQA]/([CyD]+[CQA])
1	1
2	0.9
3	0.7
4	0.5
5	0.3
6	0.1
7	0

溶液の組成 r に対して吸光度差 ΔA ，または化学シフト差 $\Delta\delta$ に含まれている濃度との積の値をプロットした。 r は下式に従って算出した。

$$r = \frac{[\text{CQA or CyD}]}{[\text{CQA}] + [\text{CyD}]}$$

このプロットにおいて、 $\Delta A \cdot [\text{CQA}]$ または $\Delta\delta \cdot [\text{CyD}]$ が極大であるときの r の値から反応を求められる。すなわち、反応が以下の平衡式で表されるとき



$\Delta A \cdot [\text{CQA}]$ または $\Delta\delta \cdot [\text{CyD}]$ が極大であるときの r の値から

$$n = \frac{r}{(1-r)}$$

が得られる[17,18].

5-3 結果と考察

包接現象などで生じる分子間相互作用は、吸収および蛍光強度、吸収および蛍光スペクトルにおけるピークの位置などの変化をもたらすことが知られている。蛍光スペクトルを用いたシクロデキストリン包接複合体の研究例は、多くの系で報告されている[14–19]。

5-3-1 蛍光光度計を用いた安定度定数と化学量論の決定

CQA水溶液に320 nm励起波長を照射するとFig. 3に示した蛍光スペクトルが得られた。続いて徐々にCyD溶液を添加していくことによって蛍光強度が増大した。蛍光強度の差が最大となる波長が420 nm付近であり、その波長の蛍光強度を前述のBenesi-Hildebrand式（化学量論値 $n = 1$ として）に当てはめてプロットしたグラフをFig. 3に示した。このグラフが直線関係を示したことから化学量論的に1:1で包接していることが示唆された。また、この直線からそれぞれの包接複合体の安定度定数を算出し、Table 3に要約して示した。この結果から、 α -CyD、 β -CyDとの包接複合体は5-CQA > 4-CQA > 3-CQAの順に安定であることが示唆された。 γ -CyDはキャビティサイズが大きく（ゲスト側の分子サイズに対してキャビティサイズが大きすぎるため）、いずれのCQA異性体との安定度定数も小さい値になったと推定した。次に、二つのカフェ酸部位を分子内に有するdi-CQAと各CyDの包接複合体について検討した。mono-CQAと同様の条件で測定し、mono-CQAに類似した形状の蛍光スペクトルが得られた。そこでCQAと同様に蛍光強度をBenesi-Hildebrand式（化学量論値 $n = 1$ として）に代入してプロットした（Fig. 4）。この結果、直線関係が得られ、di-CQAとCyDの包接複合体も化学量論的に1:1で包接していることが示唆された。また、この直線から求めた安定度定数から、 β -CyDとの複合体は4,5-di-CQA > 3,5-di-CQA > 3,4-di-CQAの順に安定であることを確認した(Table 3)。この順はmono-CQAで求めた安定度定数の高い位置にカフェオイル基が結合した順になっており、カフェオイル基同士が離れた構造をとる分子ほど包接しやすいことを示している。また、3,4-di-CQA、4,5-di-CQAと γ -CyDとの混合液は、いずれも蛍光強度の増加が確認されなかった。筆者らは3,4-di-

CQA, 4,5-di-CQAは 2つの隣接するカフェオイル基同士がスタッキングした構造をとることを確認している。従って、芳香環同士の嵩高いスタッキング構造のため γ -CyDのキャビティに包接できなかったと考察した。

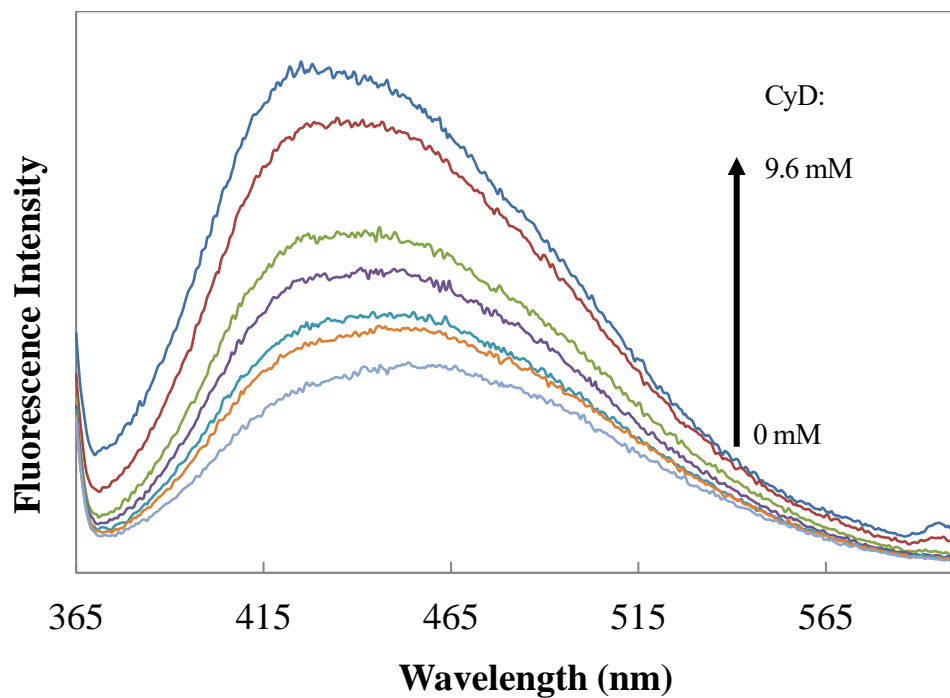


Fig. 3 β -CyD存在下における5-CQAの蛍光スペクトル.

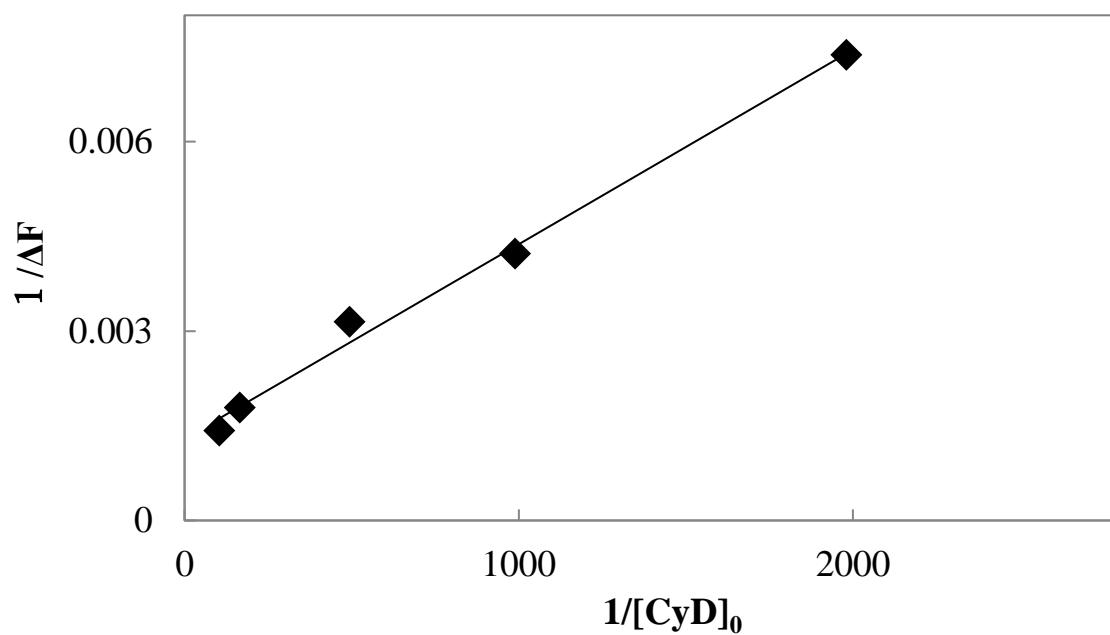


Fig. 4 5-CQAの蛍光強度に対する β -CyD濃度の影響

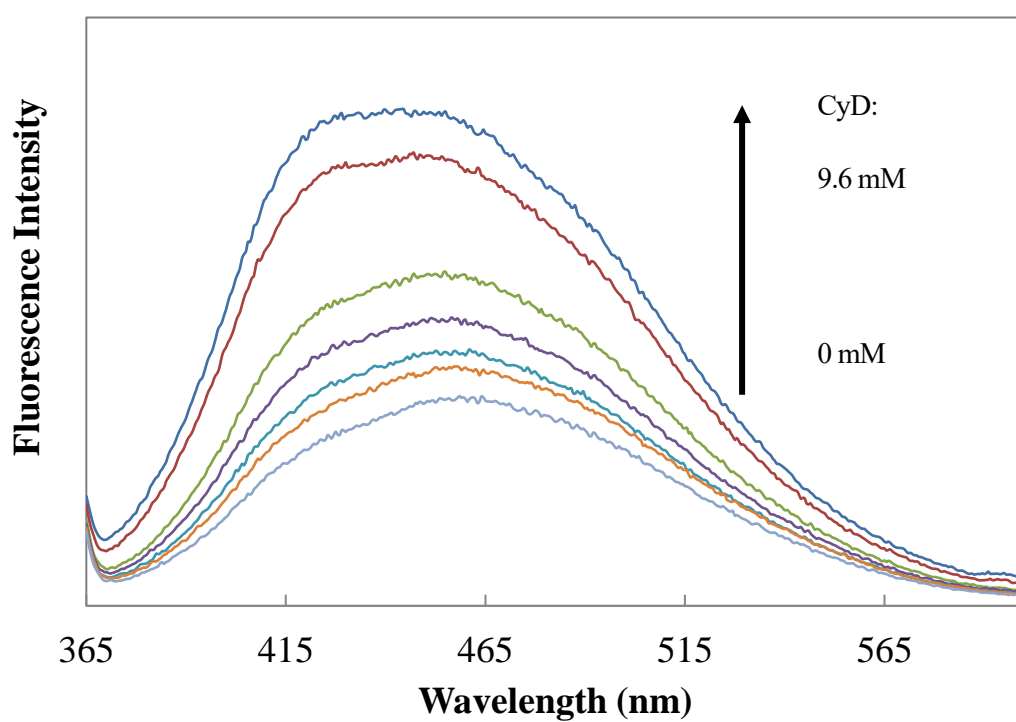


Fig. 5 β -CyD存在下における3,5-CQAの蛍光スペクトル

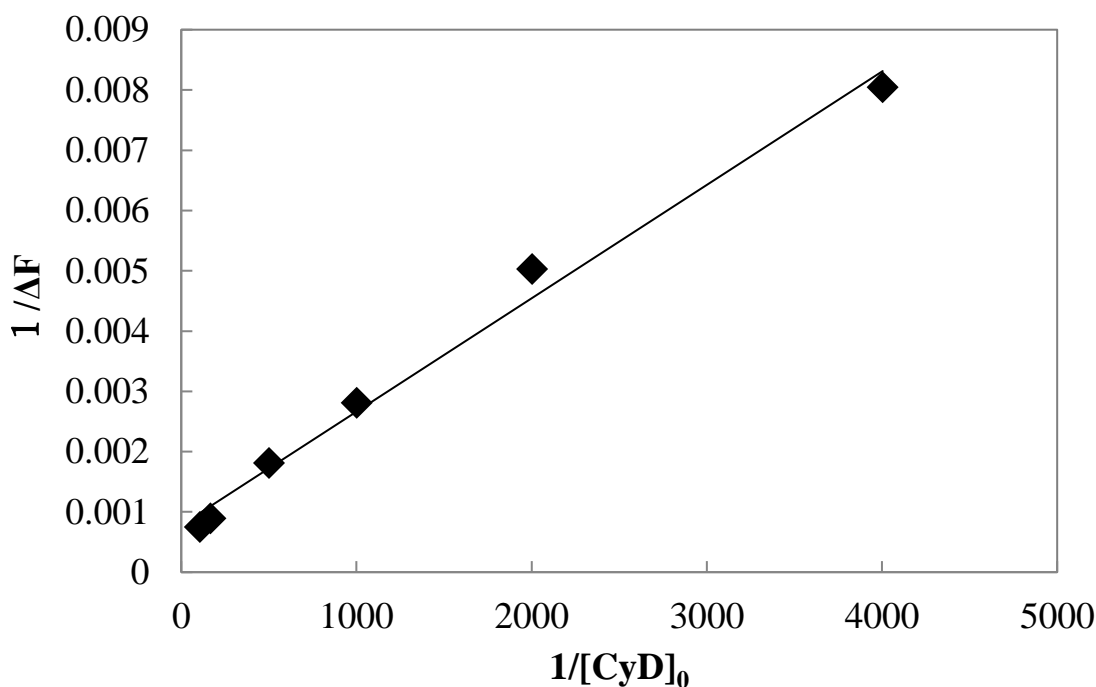


Fig. 6 3,5-di-CQAの蛍光強度に対する β -CyD濃度の影響

Table 3 包接複合体の安定度定数 (M^{-1})

Host	Guest					
	3-CQA	4-CQA	5-CQA	3,4-di-CQA	4,5-di-CQA	3,5-di-CQA
α -CyD	55 \pm 15	76 \pm 20	312 \pm 25	60 \pm 11	46 \pm 11	406 \pm 52
β -CyD	56 \pm 14	180 \pm 3.5	481 \pm 36	115 \pm 14	588 \pm 48	431 \pm 23
γ -CyD	14 \pm 10	26 \pm 22	9.7 \pm 4.6	-	-	52 \pm 21

5-3-2 UV-visを用いた連続変化法

前節においてCQAとCyDの包接複合体の安定度定数を明らかにした。さらに、その複合体の化学量論比について明確にするため、CQA溶液にCyDを添加した際の吸収スペクトルの変化を測定し、連続変化法 (Jobプロット) から化学量論比を見積もった。連続変化法 (Jobプロット) は、金属と配位子の複合体量論比を求めるのに用いられる手法である[32,33]。この手法では、金属の濃度と配

位子の濃度の和を一定にした状態で金属と配位子のモル比を変化させ、形成した複合体の吸収スペクトルを測定する。形成した複合体の特定波長における吸光度をモル分率に対してプロットし、極大値をとるモル分率から複合体形成比を見積もることが出来る。UV-Vis分光光度計による測定から得られた吸光度差をプロットし、Jobプロットを作成した。5-CQA/ β -CyDのモル分率を連続的に変化させたときの溶液の吸収スペクトル変化をFig. 7に示す。吸収スペクトルの330 nmの吸収吸光度に対するJobプロットをFig. 8に示す。モル分率が0.5、すなわちホストであるCyDとゲストであるCQAのモル比が1:1のとき極大値をとることから、1:1の包接化合物の形成が示された。他のmono-CQAとCyDの組み合わせにおいても、同様に1:1の包接化合物の形成が示唆された。

次にdi-CQAとCyDとの包接複合体についても同様に検討した。mono-CQAとCyDの包接複合体と同様に1:1の包接化合物を形成していることが示唆された(Fig. 9, Fig. 10)。

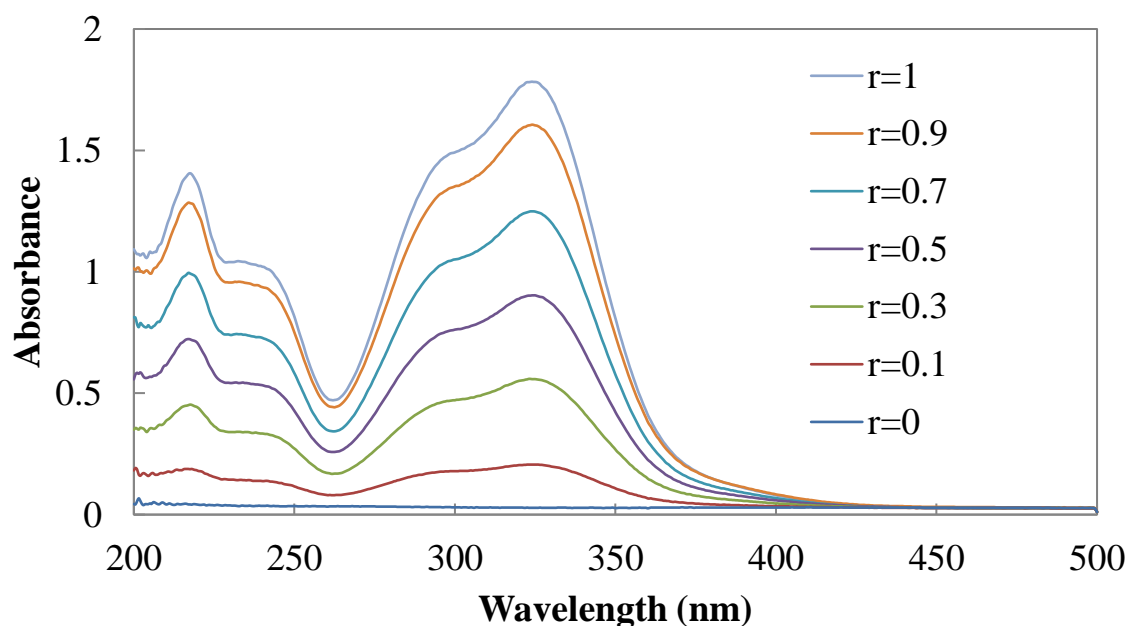


Fig. 7 5-CQA/ β -CyDモル分率(r)変化に伴うUV吸収スペクトル変化

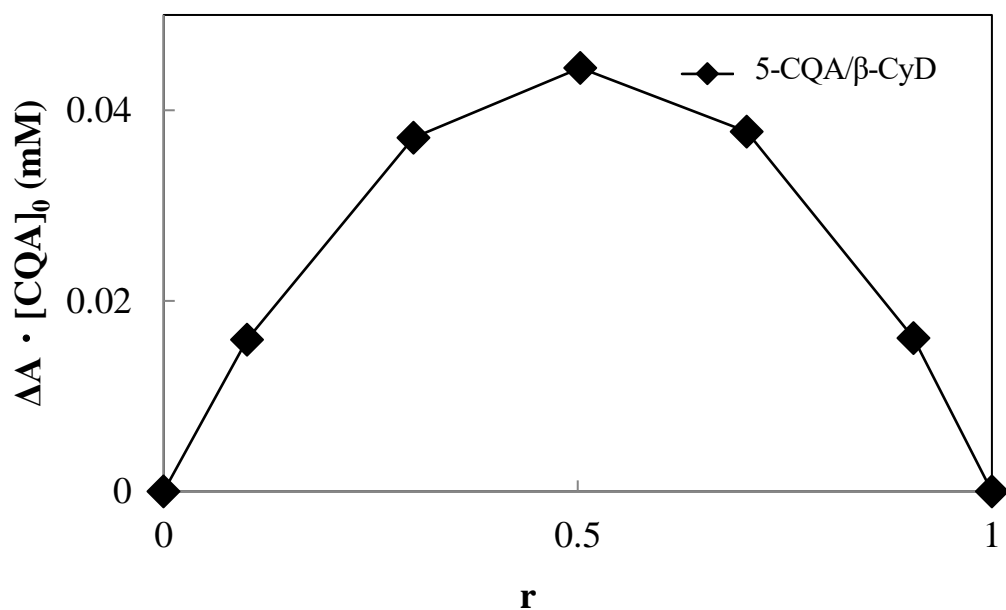


Fig. 8 UV吸収を用いた5-CQA/β-CyD系のJobプロット

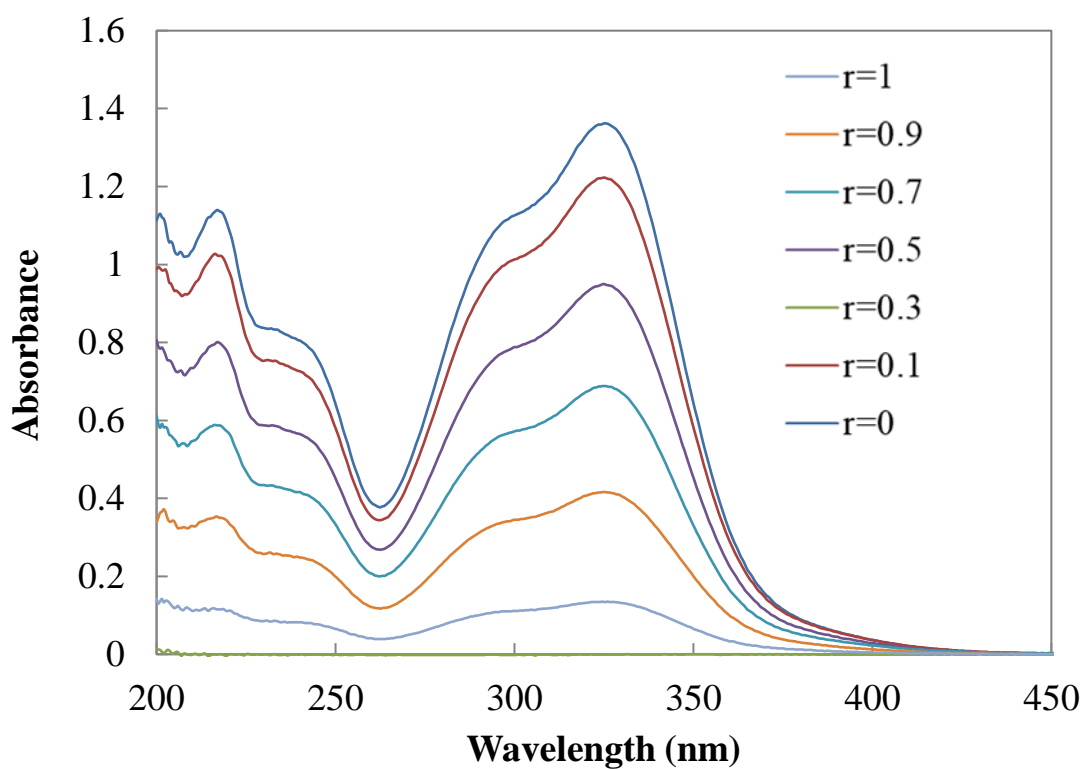


Fig. 9 4,5-di-CQA/β-CyDモル分率(r)変化に伴うUV吸収スペクトル変化

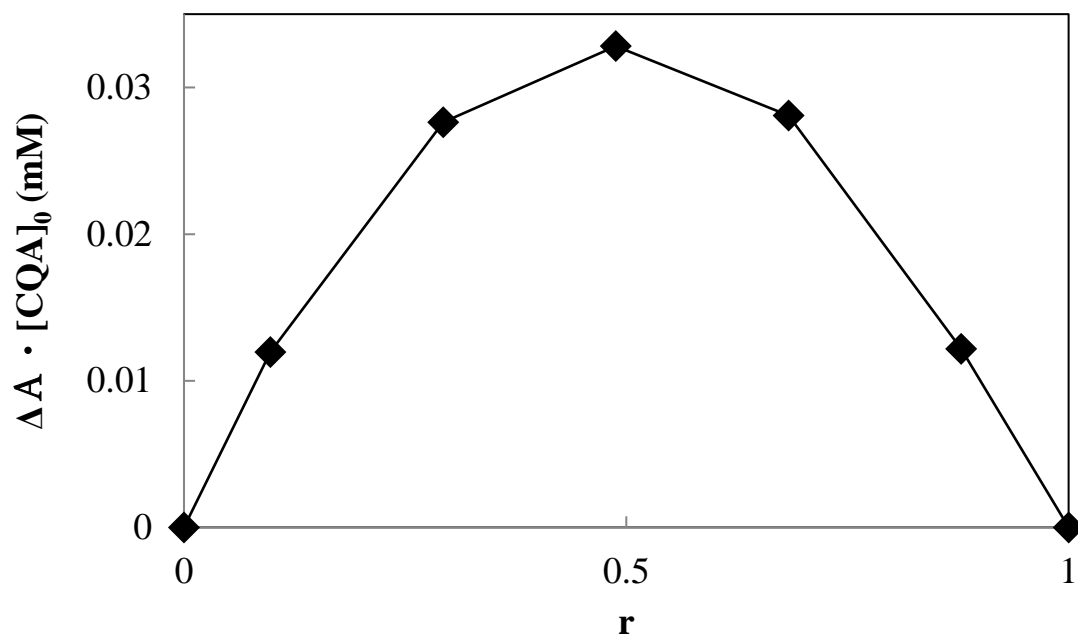


Fig. 10 UV吸収を用いた4,5-di-CQA/ β -CyD系のJobプロット

5-3-3 ^1H NMRを用いた連続変化法

前節と同様に、 ^1H NMRスペクトル変化を利用してJobプロットを行った。NMR測定は、UV-Vis測定より濃い濃度で測定できることから、濃度による包接挙動の違いを検討できる。Fig. 11ではそれぞれの比で測定した ^1H NMRスペクトルを示す。このスペクトル範囲ではシクロデキストリンのピークが現れており、モル比を変えることによりピークがシフトしていくことが観察された。このシフトからFig. 12に示したJobプロットを作成した。Fig. 12より $r=0.5$ のときに極大であるので、CQAとCyDの包接複合体は1:1で安定であることが示唆された。しかし、 γ -CyDとCQAの包接複合体を測定したところFig. 13に示したように、 $r = 0.4$ 付近で極大でありCQAと γ -CyDの包接複合体は2:1で形成している可能性が示された。2.3.2においてCQAと γ -CyDの包接複合体は1:1であることから、キャビティサイズの大きい γ -CyDでは濃度が濃くなるにつれてCQAが二つ包接されると考察できる。

次にdi-CQAとCyDとの包接複合体について検討を行ったところ、Fig. 14とFig. 15で示す通りdi-CQAとCyDの包接複合体は1:1で形成していることが示唆された。

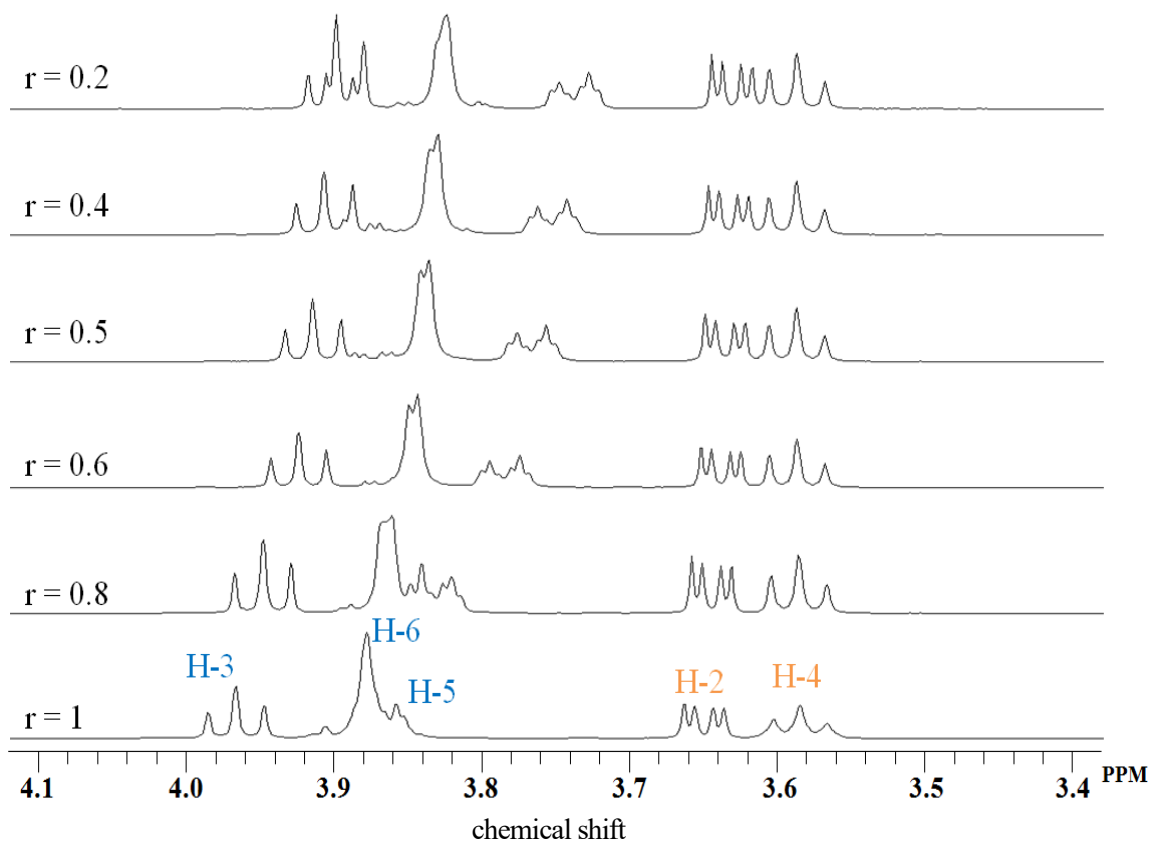


Fig. 11 5-CQA/β-CyDモル分率(r)の変化に伴う¹H NMRスペクトル変化

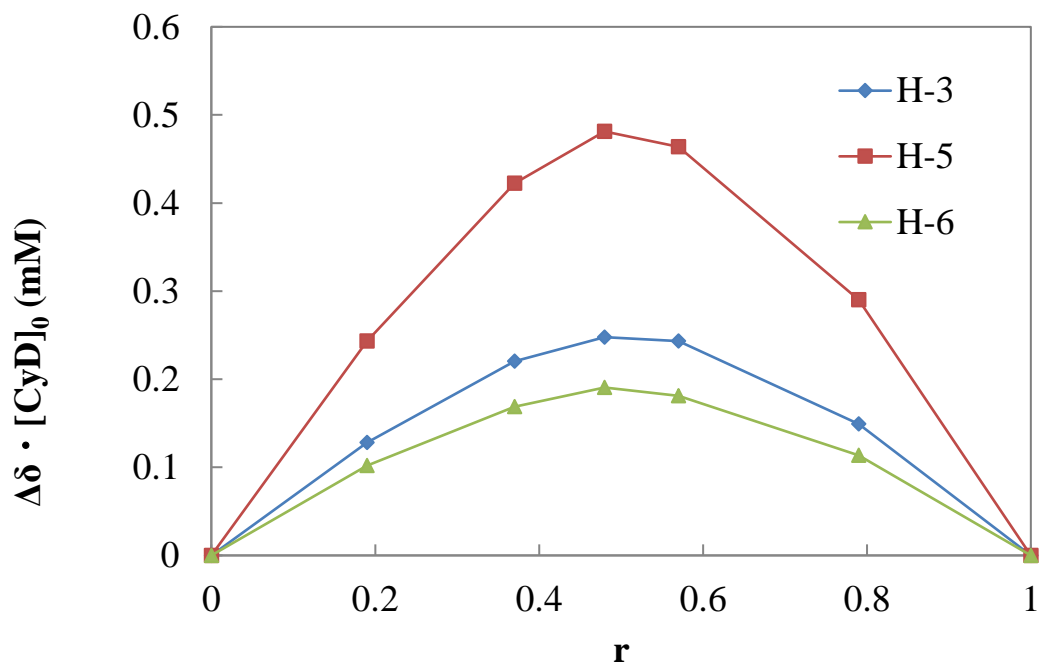


Fig. 12 ¹H NMRを用いた5-CQA/β-CyD系のJobプロット

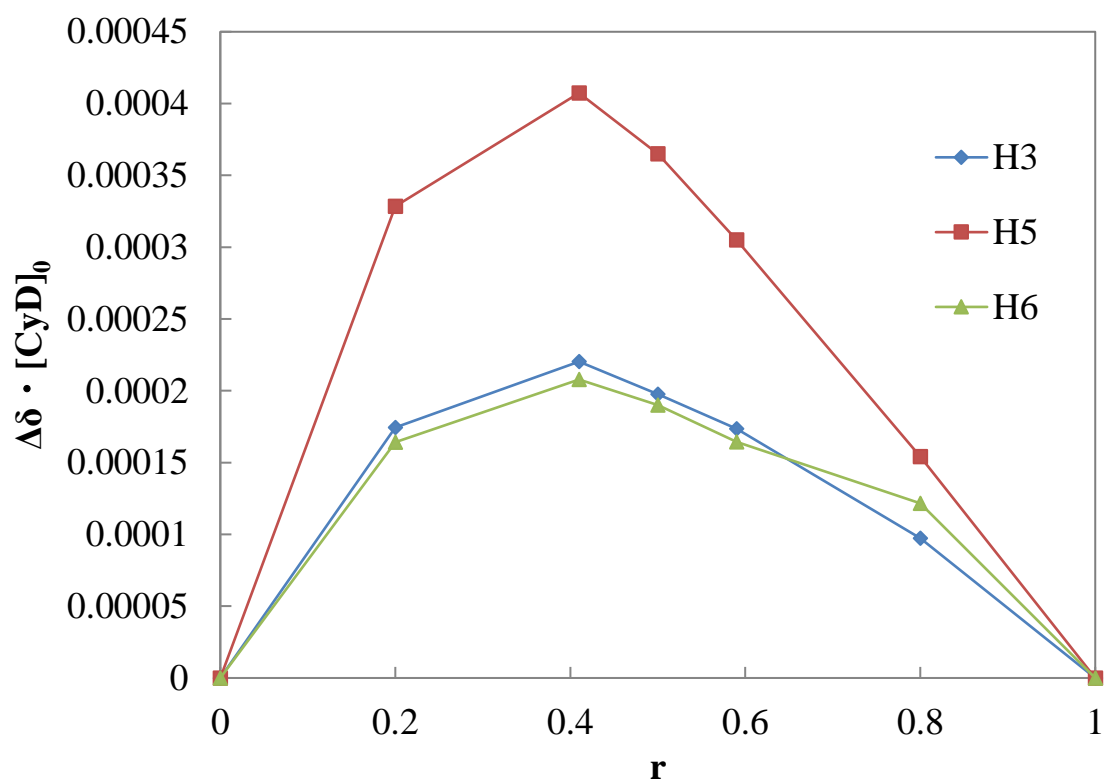


Fig. 13 ^1H NMRを用いた5-CQA/ γ -CyD系のJobプロット

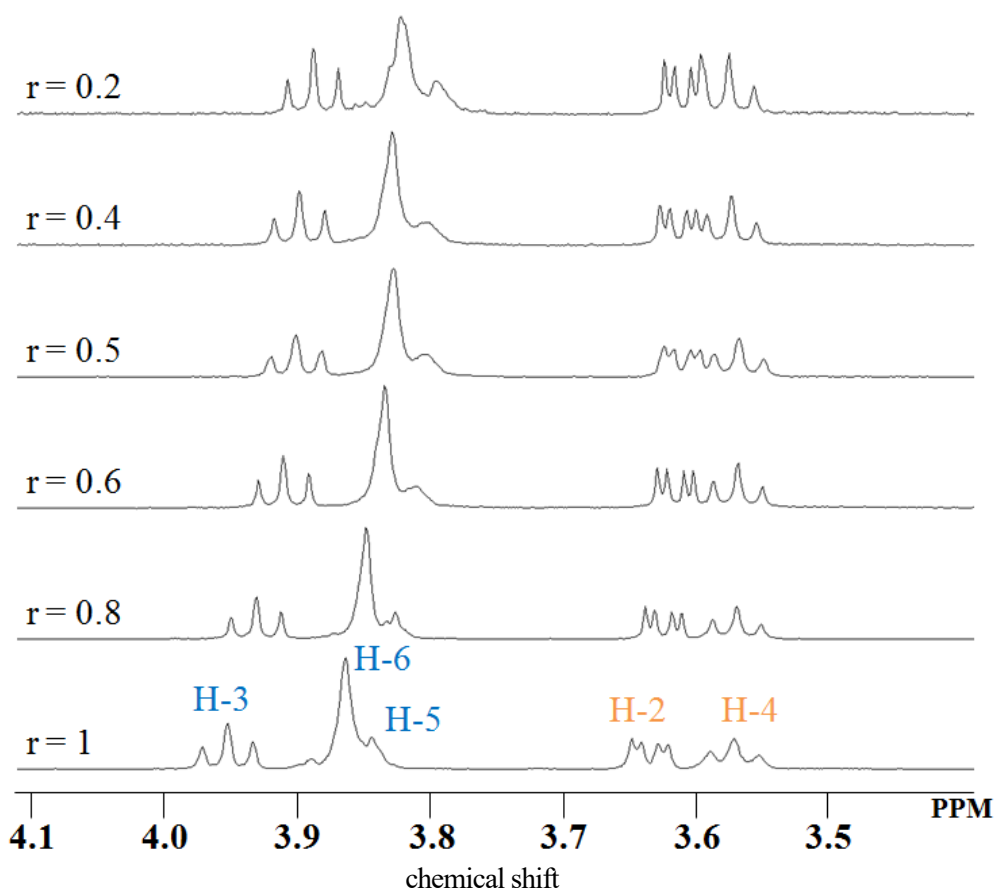


Fig. 14 4,5-di-CQA/β-CyDモル分率(r)の変化に伴う¹H NMRスペクトル変化

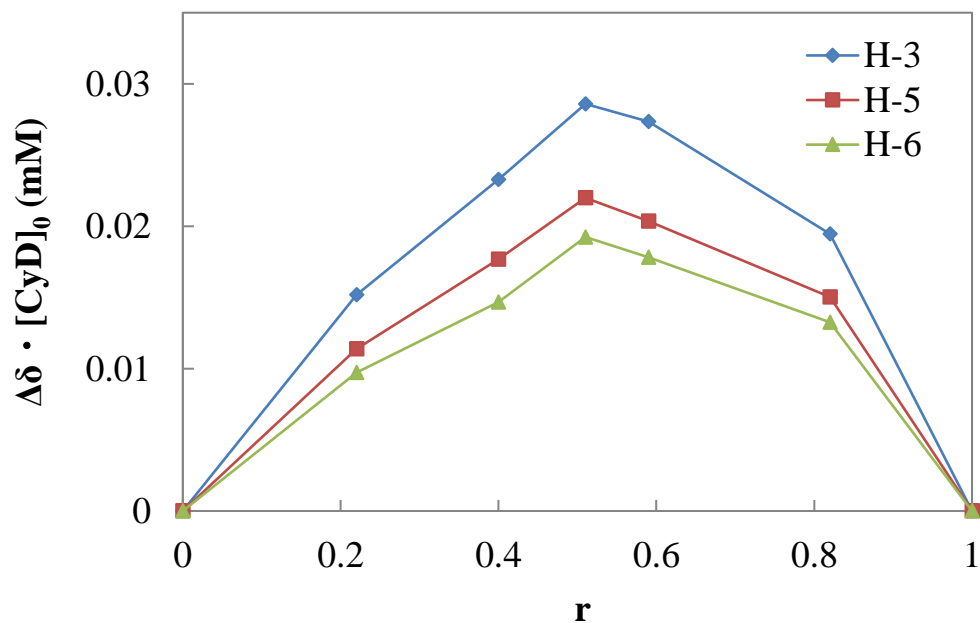


Fig. 15 ¹H NMRを用いた4,5-di-CQA/γ-CyD系のJobプロット

ここまで述べてきたことをまとめると以下のようなになる。CQAとCyDまたはdi-CQAとCyDの包接複合体はBenesi-hildebrand式の理論より1:1で形成していることが本章の実験より示された。また包接複合体の安定性についてはmono-CQAと β -CyDにおいて、5-CQA > 4-CQA > 3-CQAの順で安定であり、di-CQAと β -CyDにおいてもCQAと β -CyDの包接複合体の影響が観察された。

連続変化法においてもCQAとCyDの包接複合体は濃度に関係なく基本的に1:1で形成していることが示されたが、5-CQAと γ -CyDの包接複合体においては濃度が高くなると2:1で形成される可能性が示唆された。

5-3-4 包接複合体の構造決定

前節では、CQA異性体とCyDは1:1で包接複合体を形成していることを明らかにした。しかしながら、CyDがCQAのどの部位に包接しているかは明らかになっていない。そこで本章では包接複合体におけるCQAとCyDの相互作用を検討するために、それぞれの濃度を等濃度にし、 ^1H NMRスペクトル及び2D NMR ROESYスペクトル測定により検討した。

5-3-4-1 ^1H NMRによる測定実験

包接複合体を形成すると包接されたゲスト分子の周辺環境が変わるため、NMR測定の結果にも変化が生じる[15]。本実験では ^1H NMRを用いて包接複合体の形成に伴うプロトンピークのシフトを観測することで、どの部位が包接されているかを検討した。

サンプル管にCQAを D_2O で溶解させた後、得られた溶液をNMRチューブに入れて測定を行った。測定後、サンプル管に等モル量のCyDをとり、測定した D_2O 溶液で溶解させた後、再びNMRチューブに入れて測定を行った。CQAが 2.8×10^{-2} M、di-CQAが 3.5×10^{-3} Mに濃度を調整し、積算回数を32回として測定した。

5-3-4-2 2D NMR ROESYによる測定実験

ROESY (Rotating Overhauser enhancement and Exchange Spectroscopy)は慣性系での nOe が小さい中程度の分子量を持つ化合物の nOe 測定に利用する。この測定法では分子間で近接するプロトンの相関を測定できるので、包接複合体において二分子間のプロトンの相関を観測することができる[16]。本実験ではCQAとCyDの包接複合体の形成についてROESYを用いて各分子間の相互作用に関する検討を行った。

溶液の調整は前節と同様に行い測定を行った。積算回数を32回、mixing timeを0.5 sとして測定した。

5-3-5 測定結果と考察

β -CyD-CQA複合体および β -CyD-カフェ酸(CA)複合体について分子モデリングを用いた先行研究がある。その報告によると、包接複合体は β -CyDキャビティ内にカテコール環部分が配置された構造をとり、O(2)H/O(3)H側からカルボキシル基が突き出した包接体を形成する[20]。対照的に、NMRデータでは、様々な包接構造が示唆されている。例えば β -CyD-CA複合体は、カテコール部分がO(2)H/O(3)H側から突き出した包接体を形成し、分子モデリング研究とは反対の構造が観察された[12]。さらに、いずれの包接体もエネルギー的に妥当性があるとする報告もある[10,21]。一方で、 β -CyD-CQA複合体については、キナ酸(QNA)部分が包接されているという報告もある[22]。さらに、蛍光および比色法をもちいた研究では、 β -CyDキャビティ内にCAおよびQNA部分が競合的に包接した構造を有する二種の β -CyD-CQA包接複合体の存在が報告されている[23]。B-CyD-QNA包接複合体についての報告はないが、 β -CyD とCQAのQNA部分との複合体形成が報告されている[20,23]。

5-CQAとCyDの包接複合体と5-CQAのみの ^1H NMRスペクトルをFig. 16, それぞれのプロトンの

化学シフト値はTable 4に示した。Fig. 16において α -CyDと β -CyDの包接複合体ではオレフィン部のH-7', H-8'が低磁場シフト, 芳香環のH-2', H-5', H-6'が高磁場シフトしていることより, クロロゲン酸類のカフェ酸部位でシクロデキストリンと包接していると推定した。また5-CQAと γ -CyDの包接複合体においてはカフェ酸部位のプロトンが全体的に高磁場シフトしているが, 前節では連続変化法を用いて5-CQAと γ -CyDが2:1で包接することを明らかにしている。これは, シクロデキストリン内の二つの5-CQAのカフェ酸部位の芳香環同士が相互作用することによる環電流効果に起因するものと考えられる。

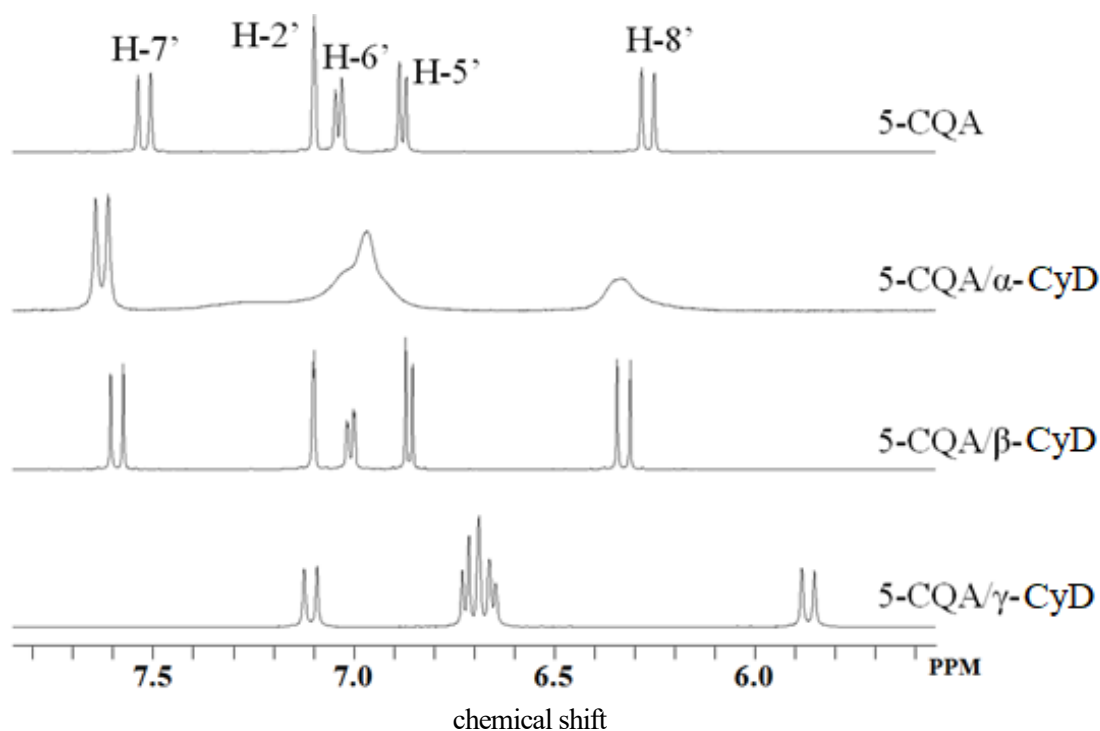


Fig. 16 CyDs添加に伴う5-CQAの¹H NMRスペクトル変化

Table 4 CyDs添加に伴う5-CQAの¹H NMRケミカルシフト変化 $\Delta\delta$ (ppm)

Proton	α -CyD	β -CyD	γ -CyD
H-7'	0.074	0.032	-0.447
H-2'	-	-0.002	-0.444
H-6'	-	-0.030	-0.35
H-5'	-	-0.015	-0.256
H-8'	0.035	0.038	-0.431

次にdi-CQAと β -CyDの包接複合体について検討した。Fig. 17では4-CQA, 5-CQA, 4,5-di-CQA, 4,5-di-CQAと β -CyDの包接複合体の¹H NMRスペクトルを比較した。またTable 5では β -CyDの添加に伴うdi-CQAのカフェ酸部位の化学シフト値の変化を示した。Fig. 17より4,5-di-CQAの各種プロトンのピークは4-CQA, 5-CQAに比べて全体的に高磁場側にシフトしていることが分かる。これは二つのカフェ酸部位のスタッキング相互作用に起因すると考えられる。また、4,5-di-CQAと β -CyDの包接複合体のピークは4,5-di-CQAに比べて低磁場側にシフトしていることが分かる。これはシクロデキストリン包接により二つのカフェ酸部の相互作用が弱まったためではないかと考えられる。また、3,5-di-CQAは他のdi-CQAとは異なった挙動をしているが (Table 5), これは3,5-di-CQAの2つのカフェ酸は互いの距離が構造的に離れており相互作用をしていないためだと考えられる。

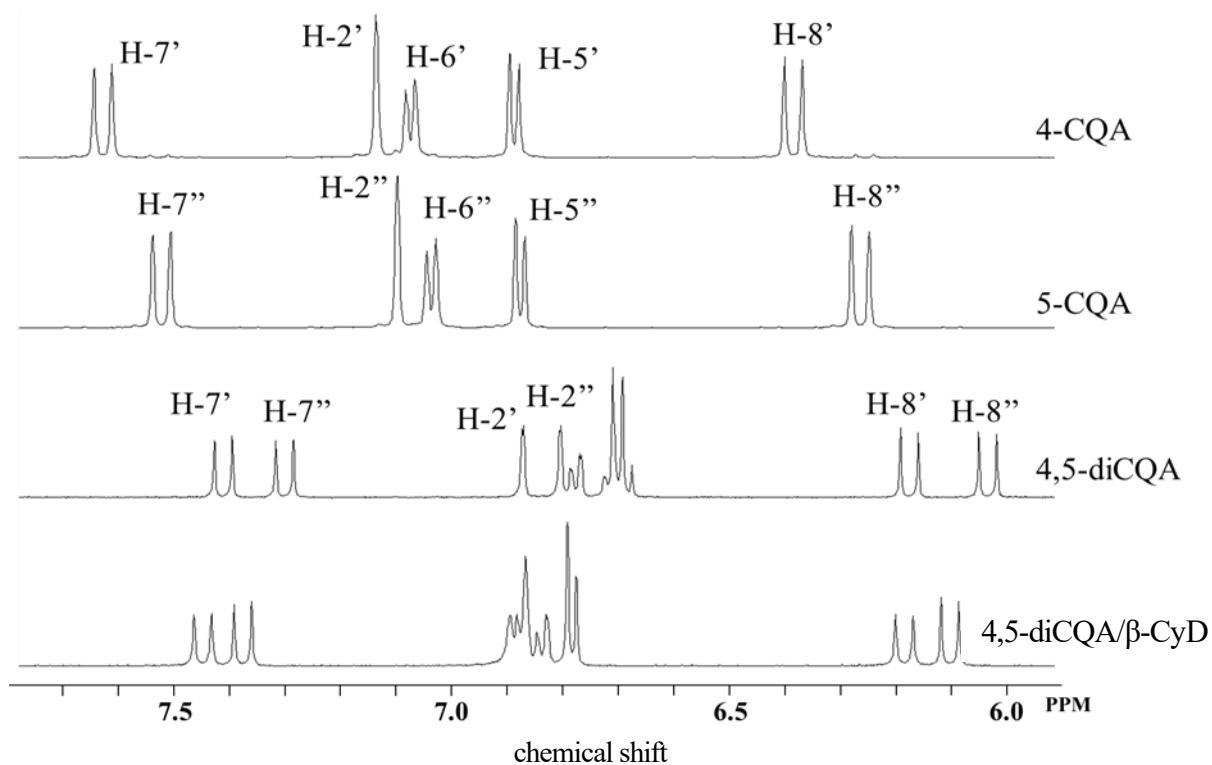


Fig. 17 β -CyD添加に伴う4,5-di-CQAの ^1H NMRスペクトル変化

Table 5 β -CyD添加に伴うdi-CQAの ^1H NMRケミカルシフト変化 $\Delta\delta$ (ppm)

	3,4-di-CQA	4,5-di-CQA	3,5-di-CQA
H-7'	0.054	0.036	0.009
H-2'	0.059	-	0.005
H-6'	0.083	-	0.003
H-5'	0.083	-	0.004
H-8'	-0.016	0.009	0.011
H-7''	0.044	0.075	0.009
H-2''	0.038	-	-0.008
H-6''	0.043	-	-0.023
H-5''	0.021	-	-0.010
H-8''	0.041	0.068	0.010

5-CQAとCyDの包接複合体のROESYスペクトルをFig. 18-20に示した。包接複合体の安定性が高い5-CQAと β -CyDの包接複合体 (Fig. 19) では5-CQAの芳香環のプロトン (H-2', H-5', H-6') と β -CyDのプロトン (H-3, H-5, H-6), 5-CQAのオレフィン部 (H-7', H-8') と β -CyDの環の広い側のプロトン (H-3) に相関ピークが観察された。この結果より5-CQAのカフェ酸部分に β -CyDの環の広い側から包接挙動を示している事が考察できる。5-CQAと α -CyDの包接複合体 (Fig. 18) では5-CQAのカフェ酸部位のプロトンと α -CyDのプロトン (H-5, H-6) に相関ピークが観察された。 α -CyDによる包接は他のCyDと違い、運動性が束縛されていてピークがブロードニングを起こしている。5-CQAと γ -CyDの包接複合体 (Fig. 20) では5-CQAの芳香環のプロトン (H-2', H-5', H-6') と γ -CyDのプロトン (H-3, H-5, H-6) に相関ピークが観察された。5-3-3で前述したように5-CQAと γ -CyDの包接複合体は2:1で形成している状態があることから、5-CQAの芳香族が一つのシクロデキストリンの環の中に二つ重なって入っていると考えられる。

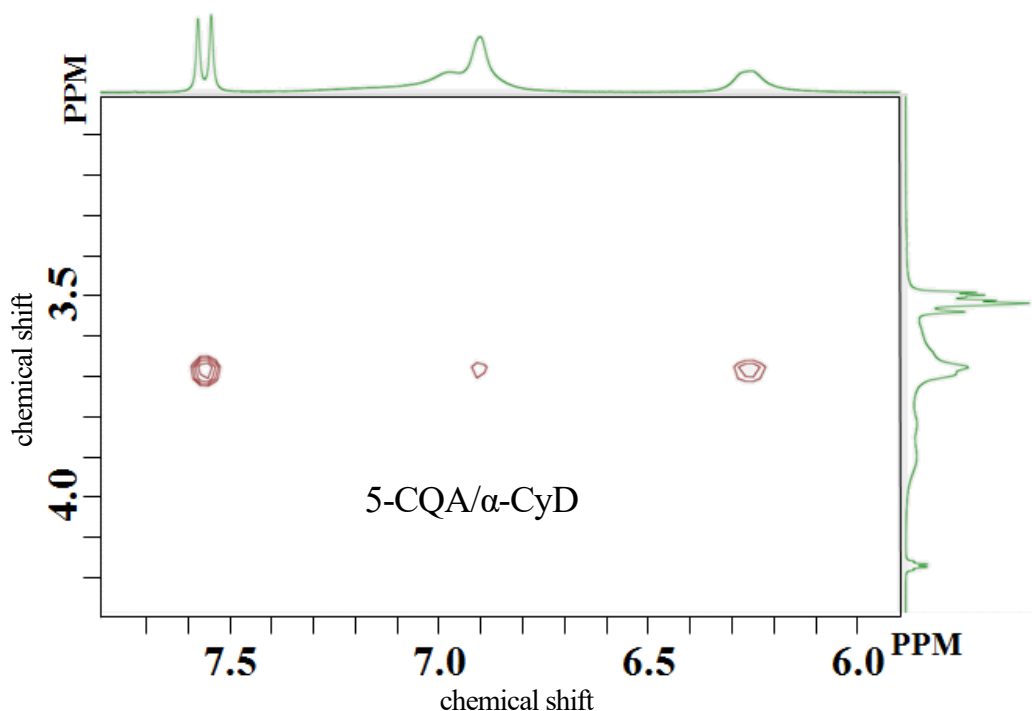


Fig. 18 5-CQA/ α -CyD系のD₂O混合溶液 (1:1) の二次元ROESYスペクトル

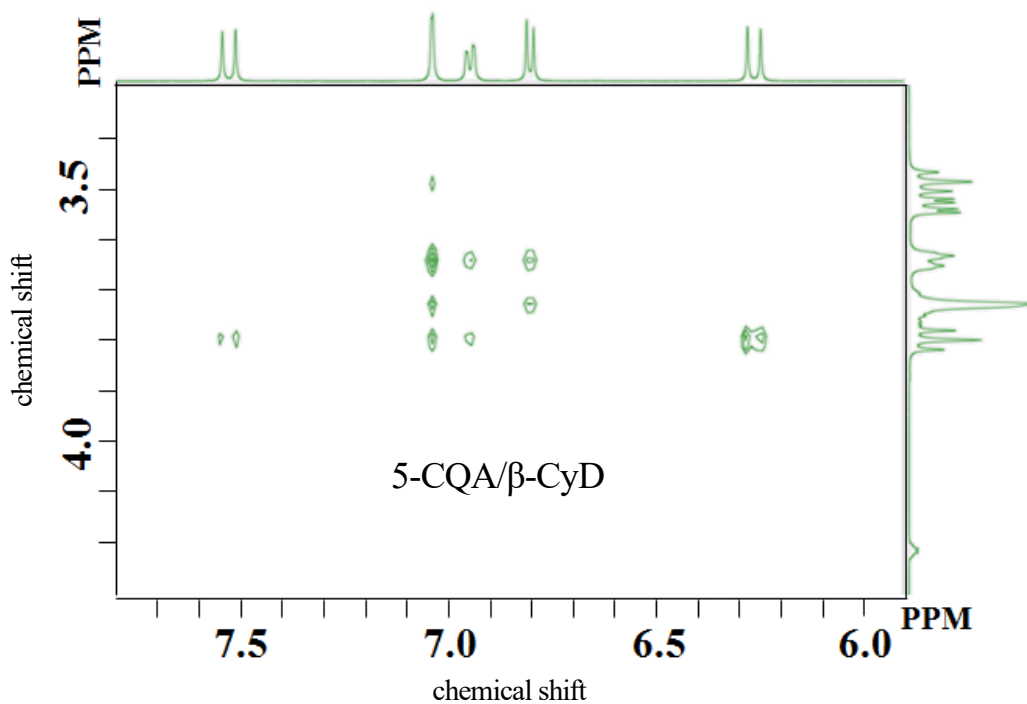


Fig. 19 5-CQA/ β -CyD系のD₂O混合溶液 (1:1) の二次元ROESYスペクトル

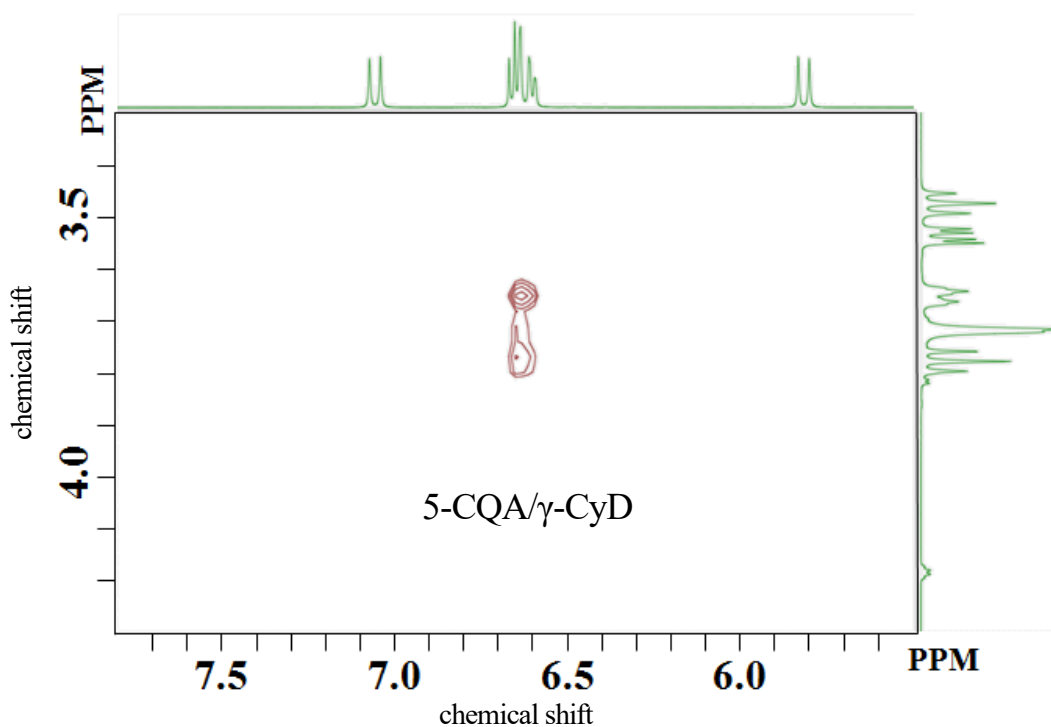


Fig. 20 5-CQA/ γ -CyD系のD₂O混合溶液 (1:1) の二次元ROESYスペクトル

前節ではdi-CQAと β -CyDの包接複合体が1:1で形成していることを示したが、di-CQA がもつ二つのカフェ酸のどちらが優先的に β -CyD包接しているかをROESYスペクトルFig. 21-23から考察した。三種のdi-CQA包接複合体で注目すべき点は、di-CQAのオレフィン部位である。いずれのdi-CQAにおいてもCQAのオレフィン部と β -CyDの環の広い側のプロトン（H-3）に相関ピークが観察された。3,5-diCQAと β -CyDの包接複合体のスペクトルでは(Fig. 22)、二つのカフェ酸のうち5位でエステル結合した方のカフェ酸の二重結合部とCyDのプロトンと相関ピークが観察された。4,5-di-CQAと β -CyDの包接複合体も同様の傾向が示し、di-CQAと β -CyDは1:1で包接複合体を形成することが確認された。

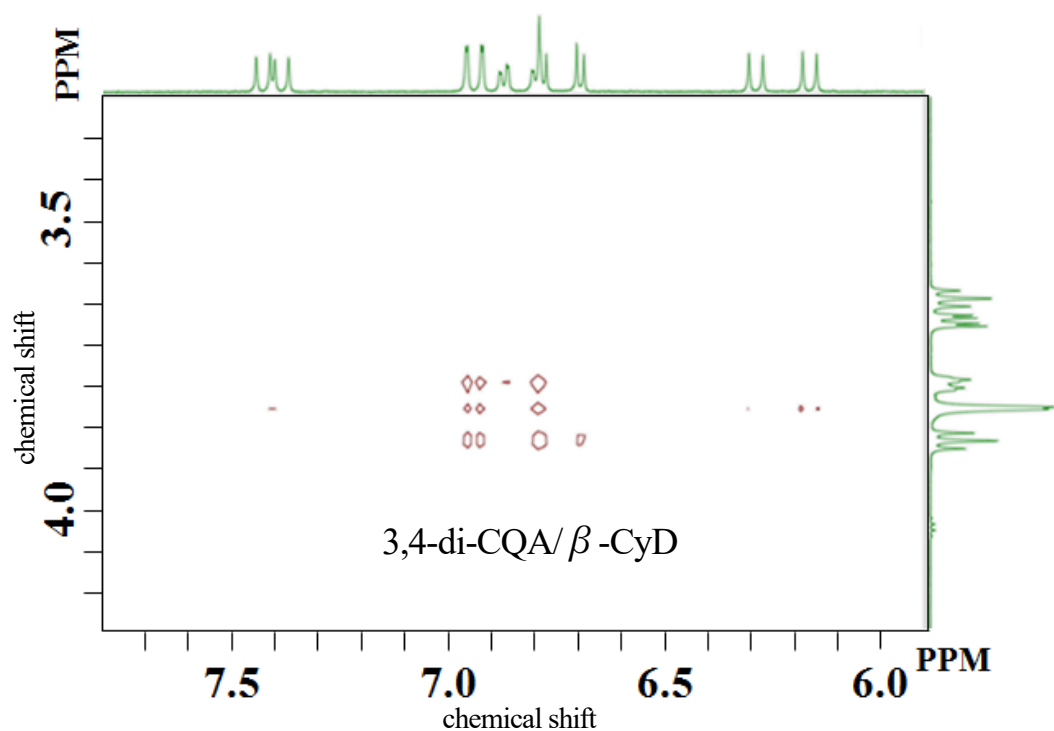


Fig. 21 3,4-di-CQA/ β -CyD系のD₂O混合溶液 (1:1) の二次元ROESYスペクトル

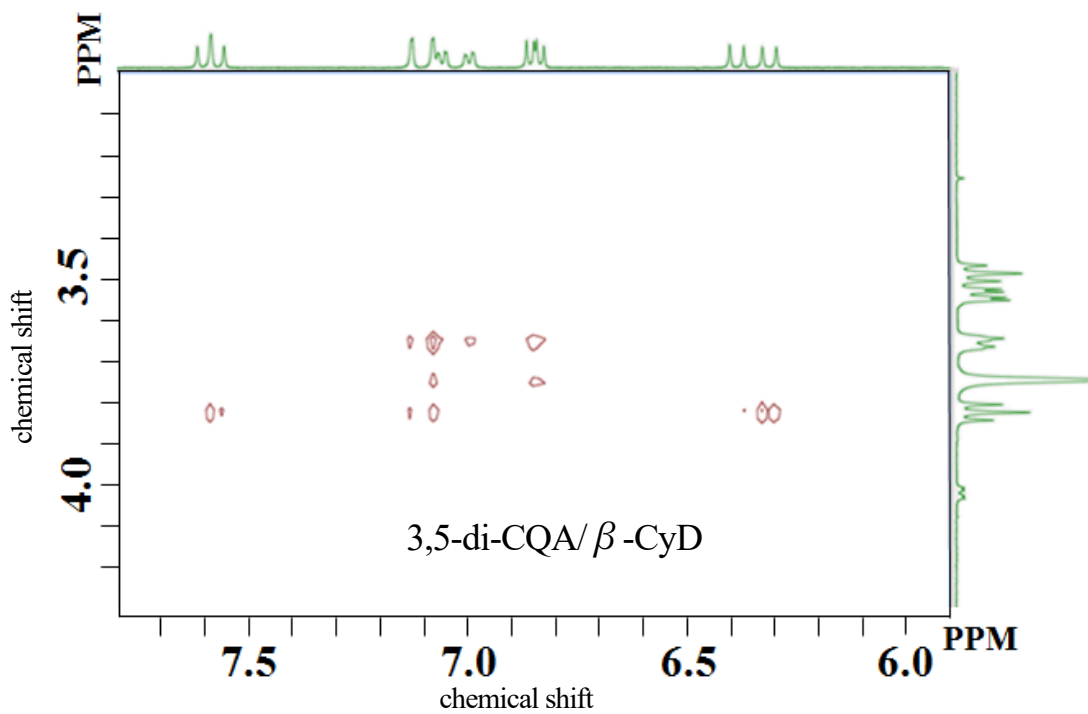


Fig. 22 3,5-di-CQA/β-CyD系のD₂O混合溶液 (1:1) の二次元ROESYスペクトル

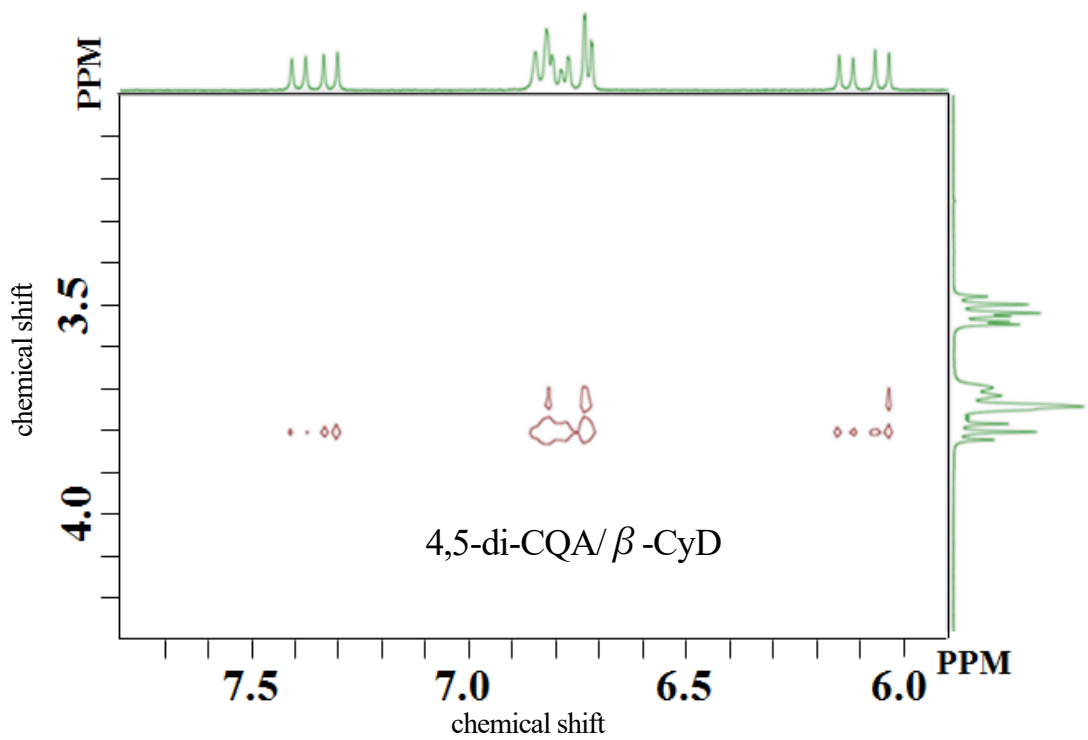


Fig. 23 4,5-di-CQA/β-CyD系のD₂O混合溶液 (1:1) の二次元ROESYスペクトル

5-3-6 結論

蛍光スペクトルより、包接複合体形成におけるCQAの安定度定数の大きさは、 β -CyD $>$ α -CyD $>$ γ -CyDとなり、キャビティサイズの依存性が認められた。一方、 α -CyDおよび β -CyDに対する包接の安定度定数の値は、5-CQA $>$ 4-CQA $>$ 3-CQAとなり、位置異性体を認識することが示された。

Job's Plotの結果より、CQAとCyDの包接複合体は基本的に1:1で形成されることが示された。また、複合体の¹H NMRと2D ROESYスペクトルより、CQAのCA部位がCyDの二級水酸基側から包接され、複合体を形成する事が示唆された。一方、di-CQAと β -CyDの包接複合体では、 β -CyDがdi-CQAの一方のCA部位を優先的に包接することが示唆された。

5-4 参考文献

- [1] Campos-Vega, R.; Loarca-Piña, G. *Food Research International* **2010**, *43* (2), 461–482.
- [2] Fang, Z.; Bhandari, B. *Trends in Food Science and Technology* **2010**, *21* (10), 510–523.
- [3] Munin, A.; Edwards-Lévy, F. *Pharmaceutics* **2011**, *3* (4), 793–829.
- [4] Dodziuk, E. *Cyclodextrins and Their Complexes*; Dodziuk, H., Ed.; Wiley, 2006.
- [5] Szente, L.; Szejtli, J. *Trends in Food Science & Technology* **2004**, *15* (3–4), 137–142.
- [6] Szejtli, J.; Szente, L. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, *61* (3), 115–125.
- [7] Budryn, G.; Nebesny, E.; Pałecz, B.; Rachwał-Rosiak, D.; Hodurek, P.; Miśkiewicz, K.; Oracz, J.; Żyżelewicz, D. *Food Research International* **2014**, *61*, 202–213.
- [8] Chao, J.; Wang, H.; Zhao, W.; Zhang, M.; Zhang, L. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *50* (1), 277–282.
- [9] Inoue, Y.; Suzuki, K.; Ezawa, T.; Murata, I.; Yokota, M.; Tokudome, Y.; Kanamoto, I. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2015**, *83* (3–4), 289–298.

- [10] Kfoury, M.; Geagea, C.; Ruellan, S.; Greige-Gerges, H.; *Food Chemistry* **2019**, 278 (November 2018), 163–169.
- [11] Shao, P.; Zhang, J.; Fang, Z.; Sun, P. *Food Hydrocolloids* **2014**, 41, 132–139.
- [12] Shiozawa, R.; Inoue, Y.; Murata, I.; Kanamoto, I. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, 13 (1), 24–33.
- [13] Bicchi, C. P.; Binello, A. E.; Pellegrino, G. M.; Vanni, A. C. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43 (6), 1549–1555.
- [14] Chao, J.; Wang, H.; Zhao, W.; Zhang, M.; Zhang, L. I. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, 50 (1), 277–282.
- [15] Alvarez-Parrilla, E.; De La Rosa, L. A.; Torres-Rivas, F.; Rodrigo-Garcia, J.; González-Aguilar, G. A. *Journal of Inclusion Phenomena* **2005**, 53 (1–2), 121–129.
- [16] Pescitelli, G.; Bilia, A. R.; Bergonzi, M. C.; Vincieri, F. F.; Di Bari, L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, 52 (4), 479–483.
- [17] Jullian, C.; Cifuentes, C.; Alfaro, M.; Miranda, S.; Barriga, G.; Olea-Azar, C. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2010**, 18 (14), 5025–5031.
- [18] Rodrigues, E.; Vaz, S.; Gil, V. M. S. S.; Madalena Caldeira, M.; Moreira Da Silva, A. M. G. *Journal of Inclusion Phenomena* **2002**, 44 (1–4), 395–397.
- [19] H. A. Benesi; H. J. Hildebrand *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2703–2707

第6章

結 論

第6章 結論

コーヒーは、世界で最も飲用されている嗜好飲料の一つである。一方、最新の疫学的研究にもとづき、コーヒーが単に嗜好飲料としてだけでなく様々な健康作用や生理学的効果を有することが判明している。そのうち、代表的な生理活性の一つである抗酸化作用をコーヒー由来ポリフェノールが担っている。コーヒーポリフェノールの中で最も含有量が多い成分は、桂皮酸類とキナ酸のエステル誘導体であるクロロゲン酸類 (CGAs)とそのサブグループであるカフェオイルキナ酸類(CQAs)である。コーヒー豆に含まれるCQAsは、焙煎や加工のプロセスで酸化反応はじめ種々の化学的変化を受け、さらに共存する成分との間で複雑な反応も進行するが、その詳細は未解明な部分が多い。本研究では、CGAsが有する抗酸化活性が、コーヒーの重要な香気成分であるチオール化合物等の求核物質の共存下では増強される事象を検証し、その反応機構の解明を目指した。また、CGAsが発現する生理活性作用の制御を目的として、食品添加物として利用されるシクロデキストリン(CyD)を用いたCGAsの包接複合体の形成とそれらの相互作用について詳細に検討した。

第2章では、抗酸化活性の評価法として最も一般的に使用されるDPPH(2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル)ラジカル消去法を用いて、チオール化合物存在下でのCGAsの活性増強についての検証と反応機構の解明を検討した。CGAsのモデル化合物として4-メチルカテコール(MC)を用い、DPPHによる酸化反応とそれに引き続く*N*-アセチルシステイン(NACys)との反応を行ったところ、MCの酸化では*o*-キノン(MCキノン)が生成し、生じたキノンへのNACysの求核付加により、主要なmono-NACys付加体として5-NACys MCが生成することを明らかにした。さらに、得られた5-NACys MCが酸化を受けて5-NACys MCキノンに変換され、このキノンはさらなるNACysの求核付加反応により、主生成物である2,5-NACys MCに変換された。2,5-NACys MCがさらに酸化を受けると2,5-NACys MCキノンが生成するが、これがNACysにより直接還元され、主に2,5-NACys MCを生成するとともに、NACysの求核付加反応も並行して進行し、少量の2,5,6-NACys MCが生成する。以上のように、カテコール構造の酸化中間体であるキノンへのNACysの求核付加により、反応系中にカテコール構造が再生されるために、チオール存在下では抗酸化活性が増強されることを明らかにした。本研究では、

DPPHに代えて、過ヨウ素酸を担持した樹脂を調製し、これを酸化剤として用いた系でも反応を実施した。この手法を用いることにより、酸化反応を制御し、各反応を段階的に進行させることに成功した。さらに、種々の分光学的分析法による抗酸化反応の段階的な追跡が可能となり、反応中間体の構造解析が大きく進展した。

第3章においては、アルコール溶液中でのラジカル消去活性の増強機構について検討した。さらに、NACys共存下での反応と比較し、反応過程や生成物の相違を通して、ラジカル消去活性に対するアルコール分子の効果を検証した。DPPHラジカル消去活性を非アルコール溶媒のアセトニトリルおよび4種のアルコール溶媒を用いて比較検討した。つぎに、メタノール溶液中におけるMCの抗酸化反応をHPLC、LC-MSを用いて経時的に追跡した。また、酸化剤として過ヨウ素酸担持樹脂を用いた場合において、反応経過をUV-Visスペクトルにより解析した。さらに反応生成物を分取し、二次元NMR分光法により構造解析を行った。これらの結果からアルコール溶液中におけるMCのラジカル消去機構を明らかにした。

第4章では、コーヒー抽出物に最も多く含有されているCGAの一種である5-CQAを対象物質として、5-CQAのDPPHラジカル消去活性に対して、チオールがおよぼす増強効果を検証した。続いて、酸化反応における5-CQAの酸化生成物を、NACysの非存在下および存在下でLC-MSにより分析した。主要な反応生成物である5-CQA-NACys付加体を分取HPLCにより単離し、それらの分子構造をそれらの1Dおよび2D NMRスペクトルを用いて解析した。最後にCQAsを含有する生豆抽出物を試料に用いて酸化反応と引き続くNACysとの反応を行い、食品サンプル中におけるCQAsの反応挙動について検証した。LC-MSを用いて反応前後を比較解析することにより、カテコール構造を分子内に有するCGAsは、前章までと同様の酸化反応機構を経由し、CQA-NACys付加体へ変換されることを明らかにした。

第5章においては、CQAsとシクロデキストリン(CyD)との包接複合体形成の分子機構について検討した。まず、蛍光スペクトルを用いた連続変化法から複合体の安定度定数を算出した。いずれのCQAにおいても安定度定数は β -CyD > α -CyD > γ -CyDの順となり、複合体形成に対するCyDのキャ

ビティサイズ依存性を示唆した。また、 α -CyDおよび β -CyDに対する安定度定数は5-CQA > 4-CQA > 3-CQAの順となり、CQAの位置異性体の構造を認識することを示唆した。Jobプロット(Job's Plot)の結果は、CQAとCyDの包接複合体が基本的に1:1で形成されることを示した。 ^1H NMRおよび2D ROESYスペクトル解析のデータは、CQAのカフェオイル基部分がCyDの広い側から包接されることを示唆した。また、di-CQAと β -CyDの包接複合体においてはdi-CQAの片方のカフェオイル基部分を優先的に包接することが示唆された。

以上、コーヒー由来ポリフェノールの化学的性質と抗酸化挙動についての研究をまとめた。抗酸化挙動の検証により明らかにした抗酸化活性の増強機構は、食品製造中のコーヒーポリフェノールの成分変化や、飲料摂取後のバイオアベイラビリティ（生物学的利用能）にも関わる基礎的な知見を与えることが期待される。また、アルコール溶媒中における消去活性増強作用に関しては、主にアルコール溶液を使用することが慣例となっているDPPHラジカル消去活性測定手法、特にポリフェノールを含有する食品の活性測定の精度に関して更なる検証の必要性を示唆していると考えられる。また、CyDsとの包接複合体に関する知見は、コーヒー飲料の課題である不快な苦味や渋みを制御した処方設計を行う際の有用な指針を与えるものである。

謝辞

論文は、著者が金沢大学大学院自然科学研究科物質科学専攻において行った研究をまとめたものです。

本研究の遂行並びに本論文の執筆に関し、終始温かいご指導ご鞭撻を賜りました金沢大学院自然科学研究科 本田 光典 准教授に深い感謝の意を表します。また、本論文を精読していただき有用なご助言を賜りました金沢大学 国本 浩喜 名誉教授、金沢大学大学院自然科学研究科 長谷川 浩 教授、前多 肇 教授、太田 明雄 准教授に心より感謝申し上げます。特に、国本 浩喜 名誉教授には、研究の方向性について多くの議論を交わし、各論文の執筆において丁寧なご指導とご助言を賜りました。本研究の遂行は、国本 浩喜 名誉教授のご支援がなければ、到底実現できるものではありませんでした。改めて深い感謝の意を表します。

日常の業務と研究活動の両立にご理解とご協力を頂いた株式会社伊藤園中央研究所の堤坂 裕子 前所長、衣笠 仁 所長、瀧原 孝宣 副所長、沢村 信一 元課長、同僚の皆様に御礼申し上げます。

研究活動全般において大変お世話になりました金沢大学大学院自然科学研究科分子機能解析化学研究室の須田 光広 博士、学生の皆様、長岡高専物質工学科化学計測研究室の奥村 寿子 准教授、学生の皆様に心から感謝致します。特にコーヒーポリフェノールに関する研究に共に携わってくださった、中室 奈緒美さん、金木 祐介君、杵淵 望君、北河 広大君、西井 洸太君、中嶋 佑吾君、千葉 隆平君、関川 留奈さん、石坂 祐子さん、鎌田 大輝君、西木 航君、石澤 昂昌君に厚く御礼申し上げます。

最後に、私の博士課程進学に伴う不便に耐え、いつも支えてくれた妻 絵美と娘 明里、和奏、温かく応援してくれた妻の両親と私の両親に深い感謝の意を表して謝辞と致します。