博士（農　学）　齊　藤　静　夏

学 位 論 文 題 名

Studies on radical scavenging mechanism of protocatechuic acid and its related compounds

（プロトカテキュ酸および関連化合物の
ラジカル消去反応機構に関する研究）

学位論文内容の要旨

ポリフェノールは抗酸化作用があることがよく知られており、中でもカテコール構造を有する化合物は酸化されるとo-キノン体に変換されるためラジカル消去活性が高いことがわかっている。しかしながら、カテコール化合物のキノン体生成以降の反応についての詳細は明らかになっていない。そこで本研究では天然に幅広く存在するプロトカテキュ酸（**1**）とそのエステルのキノン体生成以降のラジカル消去反応機構の解明を目的とした。

プロトカテキュ酸およびそのエステルのラジカル消去活性を安定なフリーラジカルであるDPPH（2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl）ラジカルを用いて吸光度法で測定したところ、アセトンやアセトニトリルなどの非アルコール性溶媒中ではプロトカテキュ酸やそのエステルはいずれも2当量のラジカルを消去した。アルコール性溶媒中では、プロトカテキュ酸はやはり約2当量消去したのに対し、プロトカテキュ酸エステルでは急速に5当量のラジカルを消去した。

プロトカテキュ酸（**1**）やそのメチルエステル（**2**）と、DPPHラジカルの反応液を直接NMRによって分析したところ、非アルコール性溶媒中ではo-キノン体（**1a**、**2a**）のみが生成することがわかった。それに対しアルコール性溶媒中では、キノン体の他にもキノン様化合物のシグナルが観測された。二次元NMR等によって詳細に構造解析したところ、プロトカテキュキノンの3位ヘミアセタール体（**1b**、**2b**）であることが明らかとなった。

プロトカテキュ酸メチル（**2**）をメタノール中、DPPHラジカルで酸化させ、反応液をNMRで分析したところ、キノン体（**2a**）やそのアセタール体（**2b**）のシグナルの他にも二つの未知酸化生成物のシグナルが観測された。これらを2位に溶媒のメタノール分子が付加した酸化生成物のシグナルと推定し、これを確かめるために**2**の2位メタノール付加体（**2c**）を調製してその酸化生成物の化学シフトと比較した。二次元NMR等により解析した結果、未知生成物はプロトカテキュ酸メチルの2位メタノール付加体（**2c**）のキノン体（**2d**）とその3位ヘミアセタール体（**2e**）であることが明らかとなった。また、反応液中より**2c**を単離同定することができたことからも2位メタノール付加体の生成を確認した。

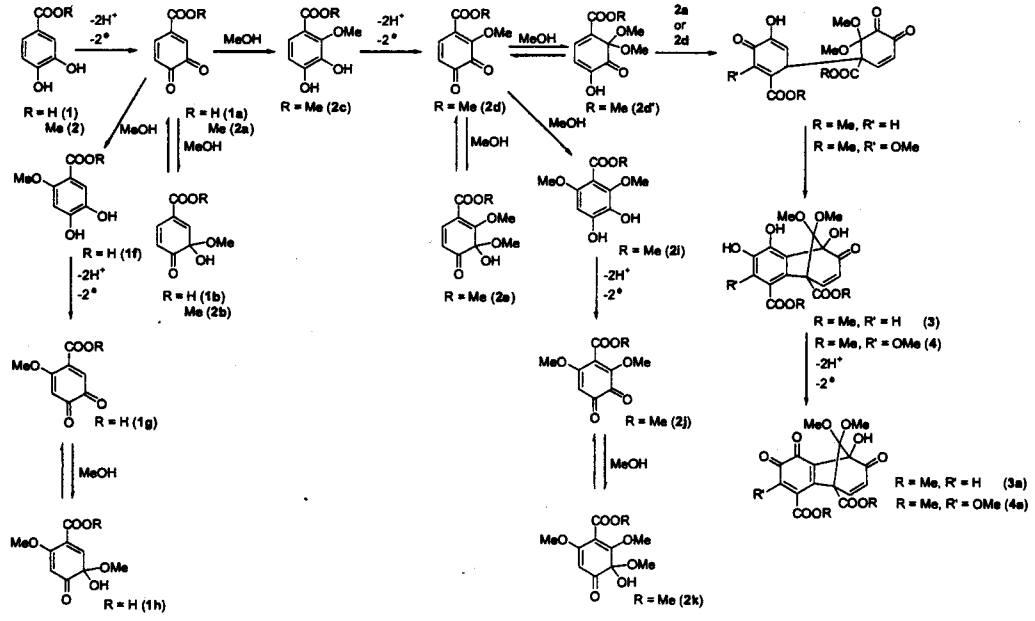
アルコール中でプロトカテキュ酸がそのエステルと比較して低いラジカル消去活性しか示さないのは、中間体キノンにおいてカルボキシ基の解離が促進され、電子求引性が大幅に低下したためであると予想された。そこでC-1置換基の電気的性質がラジカル消去反応に与える影響について検討した。C-1に電子求引および

供与性基をもつ種々のカテコール化合物のDPPHラジカル消去活性を測定したところ、非アルコール性のアセトニトリル中ではすべての化合物で2当量のラジカルを消去した。メタノール中ではアセトニトリル中と比較していずれの化合物もラジカル消去活性が増大し、C-1置換基の電子求引性が強いほどラジカル消去当量が大きくなることを見出した。キノン体のLUMOのエネルギーはC-1の電子求引性が強いほど低いことから、強い電子求引性基をもつ化合物ではキノン体へのアルコール分子の求核付加が起こりやすく、カテコール構造の再生が促進されて結果的にラジカル消去当量が増大すると考えられた。また、プロトカテキュ酸がそのエステルよりもアルコール中でラジカル消去活性が低い原因は、キノン体においてカルボキシ基の解離が促進されることにより、電子求引性が低下し、キノン体への溶媒分子の求核付加が起こりにくくなるためであることが明らかとなった。さらに、反応液のNMR分析によりC-1置換基の電気的性質の違いによって溶媒分子の付加位置が異なることがわかった。半経験的分子軌道法によってキノン体のLUMOの電子密度を計算したところ、キノン体への付加の位置選択性が確かめられた。加えて、プロトカテキュ酸エステルのC-2アルコール付加体のC-6へさらにアルコール分子が求核付加することにより、C-2, 6アルコール付加体が生成することも明らかとなった。

アルコール中でのプロトカテキュ酸エステルとDPPHラジカルの反応液から新規二量体（**3**、**4**）を単離同定することに成功した。化合物**3**、**4**はカテコール構造をもつことから、アルコール分子付加後の二量化反応もラジカル消去活性の増大に寄与していると考えられた。

これらの結果より、プロトカテキュ酸とそのエステルのメタノール中でのラジカル消去反応は次のように進行していることが示唆された（Scheme 1）。まず、プロトカテキュ酸およびそのエステルはラジカル2当量と反応して*o*-キノン体とその3位ヘミアセタール体へ変換される。プロトカテキュ酸メチル（**2**）の場合には、キノン体（**2a**）の2位へ溶媒のメタノール分子が直ちに求核付加し、環のカテコール構造（**2c**）が再生される。**2c**はさらに2当量のラジカル消去により、キノン体（**2d**）とその3位ヘミアセタール体（**2e**）へ変換される。生成したC-2付加体のキノン体（**2d**）のC-2へさらにメタノール分子が付加するとジメチルアセタール体（**2d'**）が生成する。そして、立ち上がったC-4キノンカルボニルがケト型へ戻る際に、二分子目のキノン体（**2a**）へのマイケル付加が起こり、引き続く分子内アルドール縮合と芳香族化によって酸化二量体（**3**）が生成する。**3**はさらに2当量のラジカルと反応するとキノン体（**3a**）になる。また、**2d**は一部、C-6へもメタノール分子の求核攻撃を受け、C-2, 6付加体（**2i**）になり、さらに2当量のラジカルを消去してキノン体（**2j**）とその3位ヘミアセタール体（**2k**）へ変換される。一方、プロトカテキュキノン（**1a**）の場合はゆっくりとC-6へメタノール分子の求核付加が起こり、カテコール構造（**1f**）が再生され、さらに2当量のラジカルと反応するとキノン体（**1g**）とその3位ヘミアセタール体（**1h**）が生成する。

以上の結果から、アルコール性溶媒中ではアルコール分子のキノン体への付加とそれに続く二量化反応がプロトカテキュ酸エステルのラジカル消去活性の増大において鍵反応となっており、プロトカテキュ酸がそのエステルと比較して低いラジカル消去活性しか示さないのは、キノン体においてカルボキシ基の解離が促進され、電子求引性が低下したためであることが明らかとなった。



Scheme 1. Proposed whole radical scavenging mechanism of protocatechuic acid and its esters in methanol.

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　川　端　　潤
副　査　教　授　田　原　哲　士
副　査　教　授　生　方　　信
副　査　助教授　松　浦　英　幸

学位論文題名

Studies on radical scavenging mechanism of protocatechuic acid and its related compounds

(プロトカテキュ酸および関連化合物のラジカル消去反応機構に関する研究)

ポリフェノールは抗酸化作用があることがよく知られており、中でもカテコール構造を有する化合物は酸化されると *o*-キノン体に変換されるためラジカル消去活性が高いことがわかっている。しかしながら、カテコール化合物のキノン体生成以降の反応についての詳細は明らかになっていない。本研究は天然に幅広く存在するプロトカテキュ酸とそのエステルのキノン体生成以降のラジカル消去反応機構の全容解明を目的としたものである。

プロトカテキュ酸およびそのエステルのラジカル消去活性を DPPH ラジカルを用いて吸光度法で測定したところ、非アルコール性溶媒中ではプロトカテキュ酸やそのエステルはいずれも 2 当量のラジカルを消去した。アルコール性溶媒中では、プロトカテキュ酸はやはり約 2 当量消去したのに対し、プロトカテキュ酸エステルでは急速に 5 当量のラジカルを消去した。

プロトカテキュ酸やそのメチルエステルと、DPPH ラジカルの反応液を直接 NMR によって分析したところ、非アルコール性溶媒中では *o*-キノン体のみが生成することがわかった。それに対しアルコール性溶媒中では、キノン体の他にもキノン様化合物のシグナルが観測された。二次元 NMR 等によって詳細に構造解析したところ、プロトカテキュキノンの 3 位ヘミアセタール体であることが明らかとなった。

プロトカテキュ酸メチルをメタノール中、DPPH ラジカルで酸化させ、反応液を NMR で分析したところ、キノン体やそのアセタール体のシグナルの他にも二つの未知酸化生成物のシグナルが観測された。これらを 2 位に溶媒のメタノール分子が付加した酸化生成物のシグナルと推定し、合成品との比較および反応液中よりの直接単離によって確認した。

次に置換基の電気的性質がカテコールのラジカル消去反応に与える影響について検討した。C-1 に電子求引および供与性基をもつ種々の 3,4-カテコール類は、非アルコール性溶媒中ではすべて約 2 当量のラジカルを消去した。メタノール中ではいずれの化合物もラジカル消去活性が増大し、C-1 置換基の電子求引性が強いほど消去当量が大きくなることを見出した。キノン体の LUMO のエネルギーは C-1 の電子求引性が強いほど低いことから、強い電子求引性基をもつ化合物ではキノン体へのアルコール分子の求核付加が起こりやすく、カテコール構造の再生が促進されて結果的にラジカル消去当量が増大するものと考えられた。プロトカテキュ酸がエステルよりもアルコール中でラジカル消去活性が低いのは、キノン体においてカルボキシ基の解離が促進されることにより電子求引性が低下し、キノン体への溶媒分子の求核付加が起こりにくくなるためであることが明らかとなった。

また、プロトカテキュ酸エステルの C-2 アルコール付加体の C-6 へさらにアルコール分子が求核付加することにより、C-2, 6 アルコール付加体が生成することも明らかとなった。

さらに、アルコール中でのプロトカテキュ酸エステルと DPPH ラジカルの反応液から新規二量体を単離同定した。これらはカテコール構造をもつことから、アルコール分子付加後の二量化反応もラジカル消去活性の増大に寄与していると考えられた。

これらの結果より、プロトカテキュ酸とそのエステルのメタノール中でのラジカル消去反応は次のように進行していることが示唆された。プロトカテキュ酸およびそのエステルはラジカル 2 当量と反応して *o*-キノン体とその 3 位ヘミアセタール体へ変換される。プロトカテキュ酸メチルの場合には、キノン体の 2 位へ溶媒のメタノール分子が直ちに求核付加し、環のカテコール構造が再生される。C-2 付加体はさらに 2 当量のラジカル消去により、キノン体へ変換される。生成した C-2 付加体キノンの C-2 へさらにメタノール分子が付加するとジメチルアセタール体が生成する。立ち上がった C-4 キノンカルボニルがケト型へ戻る際に、二分子目のキノン体へのマイケル付加が起こり、引き続く分子内アルドール縮合と芳香族化によって新規酸化二量体が生成する。また、C-2 付加体キノンは一部、C-6 へもメタノール分子の求核攻撃を受け、C-2, 6 付加体になり、さらに 2 当量のラジカルを消去してキノン体へ変換される。一方、プロトカテキュキノンの場合はゆっくりと C-6 へメタノール分子の求核付加が起こり、カテコール構造が再生され、さらに 2 当量のラジカルと反応すると C-6 付加体キノン体が生成する。

以上の知見は、代表的なフェノールカルボン酸であるプロトカテキュ酸のラジカル酸化機構の詳細を初めて明らかにしたものであり、ポリフェノール分子の抗酸化活性発現機構解明の基礎をなす重要なものであると認められた。

よって審査員一同は、齊藤静夏が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。