

2001 年度 修士学位論文

ポリフェノールによる分子状酸素の活性化

Activation of Molecular Oxygen Induced by Polyphenols

高知工科大学大学院工学研究科基盤工学専攻

博士課程前期 環境システムコース

1045003 荅口 由貴

ポリフェノールによる分子状酸素の活性化
Activation of Molecular Oxygen Induced by Polyphenols

目 次

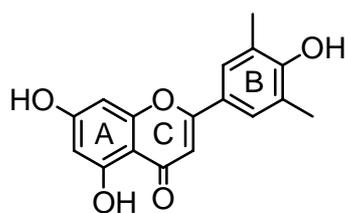
1 章. 緒言	1-7
2 章. ポリフェノールによるアルコールの酸素酸化反応	
2-1 緒言.....	8
2-2 シンナミルアルコールの酸素酸化.....	9-17
2-3 過酸化水素とシンナミルアルコールの反応.....	17-18
2-4 その他のアルコールの酸素酸化.....	18-22
3 章. 分子状酸素の活性化により生成する活性種の検証	
3-1 緒言.....	23
3-2 分子状酸素とカテコールと塩化第一銅との反応.....	24-27
3-3 ESR による反応解析.....	28-32
3-4 反応に関与する銅錯体の単離の試み.....	33-38
4 章. ポリフェノールによる分子状酸素活性化の機構 ～計算化学的手法による反応解析～	
4-1 緒言.....	39-40
4-2 計算化学ソフト“LUMMOX TM ”について.....	41
4-3 LUMMOX TM を用いたカテコール 銅(I)錯体と分子状酸素との相互作用.....	42-49
4-4 分子状酸素活性化機構の検証.....	50-52
総括	53
謝辞	54

1 章. 緒言

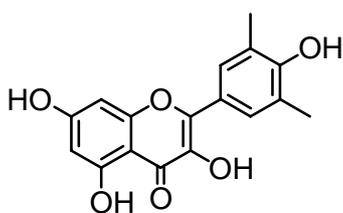
本論文は、著者が高知工科大学大学院工学研究科博士前期課程において行った、「ポリフェノールによる分子状酸素の活性化」に関する研究成果についてまとめたものである。

ポリフェノールは、植物代謝物において最も多く、かつ普遍的に存在する一連の化合物であり、ヒトや動物の食事に必然的に含まれる成分である。近年、食品ポリフェノール類に多くの関心が払われるのは、ポリフェノール類の抗酸化による癌、心血管疾患、他の病気の治療や予防などの、ヒトの健康に有益であるためである^{1,2}。また、ポリフェノールは、塗料、化粧品に加え、革なめし剤や添加物（天然着色料や防腐剤）としても利用されている。

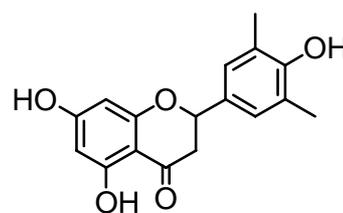
ポリフェノール性化合物のうちフラボノイド (flavonoids) は、植物界に広く存在し、ヒトの一日当たりの摂取量は、1 g と見積もられており、主に野菜源の食事から摂取されている^{3,4}。フラボノイドは抗生物質、抗腫瘍薬、抗炎症薬のみならず、高血圧、アレルギー、抗コレステロール血症などの疾患やその他の治療に応用されている^{5,6}。代表的なフラボノイドを下に示す。



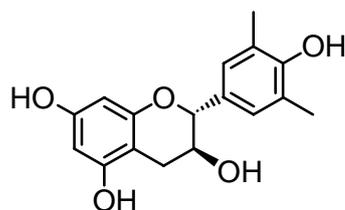
flavones



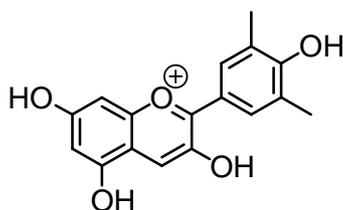
flavonols



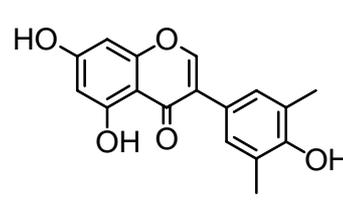
flavanones



catechins

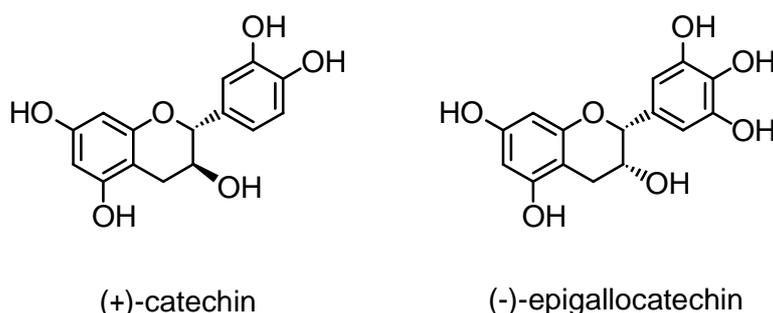


anthocyanidins



isoflavones

フラボノイド骨格を有する茶カテキンも，抗腫瘍，抗発癌，抗突然変異，そして抗アレルギー活性を持つとされている⁷．これらの効果は，ポリフェノール類が本来持つとされている抗酸化力，すなわち，酸素分子から発生するフリーラジカルを捕獲することによっているとされている．ポリフェノールの抗酸化剤としての役割は，多くの論文ですでに報告されているが⁸⁻¹⁰，いくつかの植物ポリフェノールは，酸化を促進する効果，すなわち酸化促進剤（prooxidant）としての作用を持つことが，最近示されている¹¹．

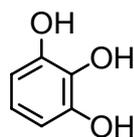
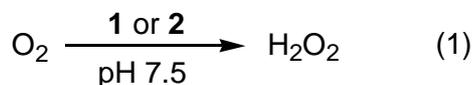


このように，ポリフェノール類は抗酸化剤，あるいは酸化促進剤として作用する際に，酸素分子と密接に関わっている．酸素は，生体にとっては呼吸に必要不可欠の要素であるが，素材，材料の作製工程では不必要である場合が多い．いずれにしても，酸素がどのような機構で生体や素材に取り込まれていくか，今なおその詳細は重要な研究課題の一つである．

酸素分子は，基底状態で不対電子を2個有し，しかもスピンは互いに平行な三重項状態を形成している珍しい分子である．水よりも高いエネルギー状態にあるが，化学的には比較的安定に存在する．しかし，熱や光エネルギーにより容易に励起され，さらに電子を容易に受け入れて還元剤としての作用をも持つ．これら酸素の活性化，およびそれに引き続く化学反応が，素材の作成時に，また素材の天然曝露において進行する可能性をたえず秘めている．これらの反応を的確に把握し，いかに制御するかが，よい素材を開発する必要条件でもある．

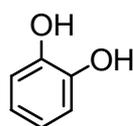
ポリフェノールの生化学的な役割については多くの知見が得られているが，上記の性質を持つ酸素分子とポリフェノールとの関わり合いを，分子論的に研究した例はほとんど無い．そこで，この点についての基本的理解を計ることを目的とし，本研究を開始した．その研究の中で，最も簡単なポリフェノール構造単位であるピロガロール（1）あるいはカテコール（2）が，水溶媒中で分子状酸素を活性化させ，過酸化水素を生成させることを，サントリー（株）の研究グループと共同して見出した¹²．その概要は以下の通りである．

ピロガロール (1) あるいはカテコール (2) を、水溶液中で分子状酸素と反応させると、過酸化水素が生成することがまず始めに分かった (式 1)。



1

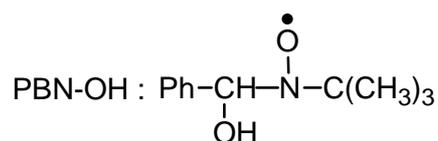
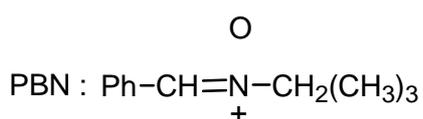
pyrogallol



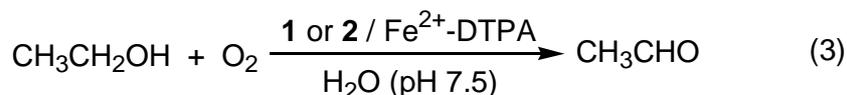
2

catechol

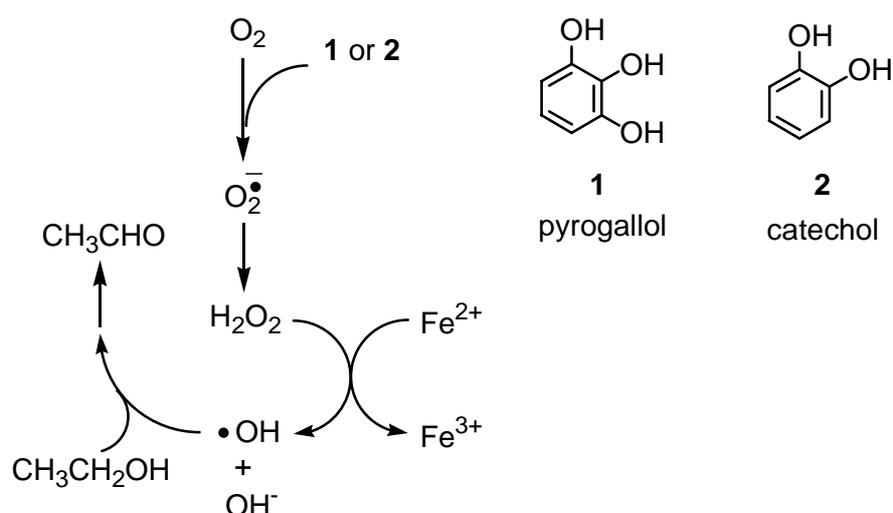
この系に、 Fe^{2+} を共存させて反応を行うと、酸素分子からヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$) が生成することが確認できた (式 2)。すなわち、先に述べた過程を経て系中で形成された過酸化水素は、 Fe^{2+} との Fenton 反応により、ヒドロキシルラジカルを生成したと言える。なお、このヒドロキシルラジカルは、以下に示したような *N*-tert-butyl- α -phenylnitron (PBN) 付加体として、ESR により検出した。



この系を用い、エタノールを分子状酸素と反応させたところ、エタノールがアセトアルデヒドに酸化されることを見出した (式 3)。このことは、式 2 で生成したヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$) がエタノールと反応し、アセトアルデヒドが生成したものと考えられる。

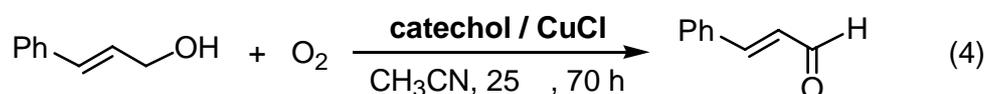


これらのことを総合すると、次の反応経路（スキーム 1）が考えられる。すなわち、ピロガロール、あるいはカテコールにより、分子状酸素は一電子還元を受け、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) になる。この O_2^- は、水溶液中で容易に過酸化水素に変化し、金属塩の存在下で、ヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$) を発生させる。エタノールは、このヒドロキシルラジカルによりアセトアルデヒドへ酸化される。これらのことから、ピロガロールあるいはカテコールは、明らかに分子状酸素を活性化させ、酸化反応を促進させる作用を持つことを示している。

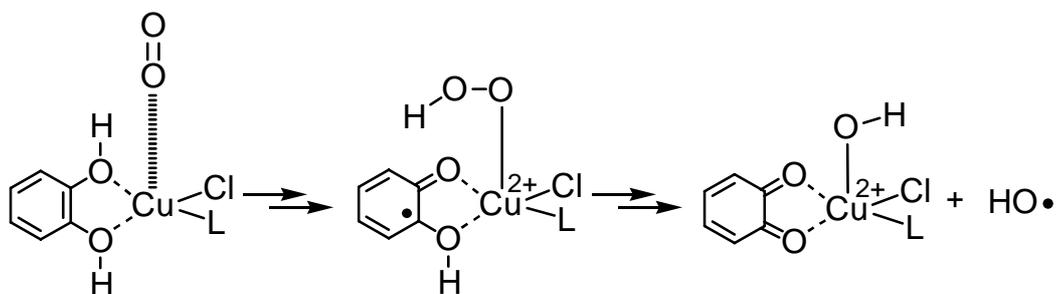


Scheme 1

こうした研究成果を背景として、ピロガロールあるいはカテコールによる分子状酸素の活性化が、非水溶媒中でも起こるのかどうかを詳細に検討した。その際、最も簡単なポリフェノール構造単位であるピロガロールあるいはカテコールを用い、シナミルアルコールの酸素酸化反応を通じて、分子状酸素の活性化を検討した。その結果、カテコール 塩化第一銅の組み合わせを用いたとき、最も効果的に分子状酸素が活性化され、シナミルアルコールがアルデヒド体へ酸化されることを見出した（式 4）。また、この酸化反応は先に述べた水溶媒中での酸化反応と異なり、カテコールと銅塩の錯体形成により進行することも分かった。これらの結果の詳細を 2 章で述べる。



3章では、カテコール 塩化第一銅の組み合わせにのみ着目し、カテコール 塩化第一銅による分子状酸素の活性化から生成する活性種について調査した。その結果、下記に示すように、銅ヒドロペルオキシド (Cu-OOH) を経て生じるヒドロキシルラジカル (HO•) により、シンナミルアルコールの酸素酸化反応が進行する機構を提唱した。



4章では、住友化学工業(株)により開発された反応軌道間相互作用解析プログラムである“LUMMOX™”を用いた計算化学的手法により、ここで提唱した分子状酸素活性化の機構を検証した。

本論文の内容を要約する。水溶液中では、ピロガロールあるいはカテコールは酸素分子に一電子移動を起こし、スーパーオキシドアニオンを生成させ、過酸化水素の形成を与える。金属塩が存在すると、ヒドロキシルラジカル (HO•) が生成する。一方、非水溶媒中では、カテコールは金属塩との錯化により分子状酸素を活性化させ、銅ヒドロペルオキシド (Cu-OOH) を経てヒドロキシルラジカル (HO•) を与える。これらのことから、従来、抗酸化剤とされていたポリフェノール類が、酸化促進剤としても作用することが分かった。また、ピロガロールあるいはカテコールによる分子状酸素の活性化は、それらの環境 (水溶媒・非水溶媒) に依存することなく、最終的にはヒドロキシルラジカルを与えると言える。

参考文献

- (1) Bravo, L.; *Nutr. Rev.*, **1998**, *56*, 317-333.
- (2) Briviba, K.; Sites, H. In *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*; Frei, B., Ed.; Academic Press: New York, 1994, p107.
- (3) Kuhnau, J. *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, **1976**, *24*, 117-191.
- (4) Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S., *Free Radic. Biol. Med.*, **1994**, *16*, 845-850
- (5) Brown, J. P. *Muta. Res.*, **1980**, *75*, 243-277.
- (6) Torel, J.; Cillard, J.; Cillard, P., *Phytochemistry*, **1986**, *25*, 383-385.
- (7) (a) Sano, M.; Suzuki, M., et al., *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 1906-1910, and references cited therein. (b) Yang, G.-Y.; Liao, J.; Kim, K.; Yurkow, E. J.; Yang, C., *Carcinogenesis*, **1998**, *19*, 611-616. (c) Miller, N. J.; Castelluccio, C.; Tijburg, L.; Rice-Evans, C., *FEBS Letters*, **1996**, *392*, 40-44. (d) Hara, Y., *In Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*, Ho, C.-T.; Osawa, T.; Huang, M.-T.; Rosen, R. T. Eds.; ACS Symposium Series, **1994**, *547*, p. 34-50. (e) Shi, S. T.; Wang, Z.-T.; Smith, J. T.; Hong, J.-Y.; Yang, C. S., *Cancer Res.*, **1994**, *54*, 4641-4647. (f) Sigler, K.; Ruch, R. J., *Cancer Lett.*, 1993, *69*, 15-19. (g) Wang, Z.-Y.; Huang, M.-T.; Ferrao, T.; Wong, C.-Q.; Lou, Y.-R.; Reuhl, K.; Iatropoulos, M.; Yang, C. S.; Conney, A. H., *Cancer Res.*, **1992**, *52*, 1162-1170.
- (8) (a) Kondo, K.; Kurihara, M.; Miyata, N.; Suzuki, T.; Toyoda, M., *Free Radical Biol. Med.*, **1999**, *27*, 855- 863. (b) Kondo, K.; Kurihara, M.; Miyata, N.; Suzuki, T.; Toyoda, M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, *362*, 79-86 and see also Kondo, K.; Kurihara, M.; Fukuhara, K.; Tanaka, T.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Toyoda, M. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 485-488.
- (9) Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S., *Free Radical Biol. Med.*, **1994**, *16*, 845-850.
- (10) Inui, T.; Nakahara, K.; Uchida, M.; Komura, H.; Unoura, K.; Miki, W.; Koikeguchi, Y.; Hosokawa, T. A criterion for prooxidant property of polyphenols in activation of molecular oxygen. in press.

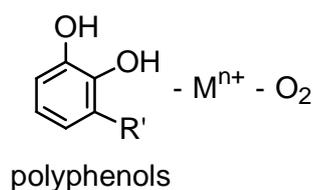
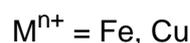
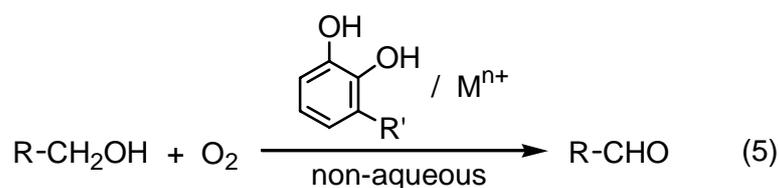
参考図書

- (1) “活性酸素” 高柳 輝夫，大坂 武男（丸善）1999 年
- (2) “抗酸化物質” 二木 鋭雄，島崎 弘幸，美濃 真（学会出版センター）1996 年
- (3) “活性酸素に克つ緑茶成分カテキンの驚異” 平松 緑（かんき出版）1997 年
- (4) “活性酸素・フリーラジカルのすべて” 吉川 敏一，河野 雅弘，野原 一子（丸善）2000 年

2 章. ポリフェノールによるアルコールの 酸素酸化反応

2-1 緒言

1 章で述べたように，水溶媒中では，ピロガロールあるいはカテコールと金属塩の組み合わせにより分子状酸素が活性化され，エタノールがアセトアルデヒドへ酸化された（サントリー㈱との共同研究）．また，カテコールよりもピロガロールの方が分子状酸素をより活性化させ，アルコールをアルデヒドへより効率良く変換させることも分かった．このような現象が，非水溶媒中でも起こるのか検討した．その際，アルコールの酸化反応を一つの指標として，以下に示すような金属塩とポリフェノールとの組み合わせによる分子状酸素の活性化を検証することにした(式5)．



なお，アルコール基質としては，官能基として芳香環・二重結合・水酸基を持つシンナミルアルコールを基質として選び，種々の条件下での酸素酸化反応を行った．

2-2 シンナミルアルコールの酸素酸化

(1) ポリフェノール-金属塩によるシンナミルアルコールの酸素酸化

アルゴン置換した枝付フラスコに，ピロガロール(1)(0.5 mmol)，塩化第一鉄水和物(0.5 mmol)を加えた後，溶媒としてアセトニトリル(1.0 mL)を加えた．25℃で30分攪拌した後，フラスコ内を酸素置換し，シンナミルアルコール(3)(0.5 mmol)のアセトニトリル溶液(0.5 mL)を滴下した．70時間後，反応をジエチルエーテル(1 mL)で停止させた．¹H NMR, GC-MSにより生成物を同定し，¹H NMRにより収率を決定した(式6)．また，ピロガロールの代わりにカテコールを，また種々の金属塩との組み合わせについても同様の実験を行った．それらの結果を表1に示す．

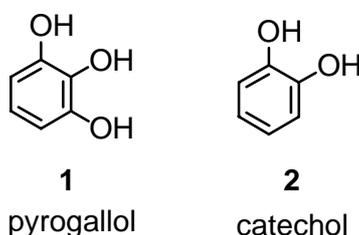
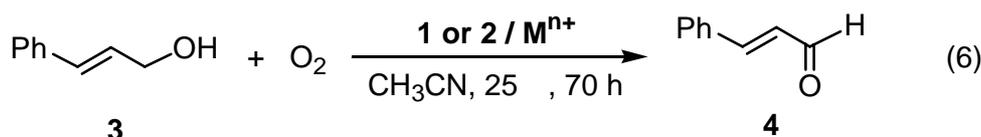


表1に示すように，ピロガロールを用いた系ではシンナムアルデヒド(4)は5～19%程度しか生成しない(エントリー1～4)．また，水溶媒中では，ポリフェノールと鉄塩の組み合わせが，アルコールをアルデヒドに酸化させたのに対し，非水溶媒中では，鉄塩よりも銅塩のほうが効果的であることが分かった．カテコールと塩化第一銅を用いると，表1に示すように，その収率は64%に向上する(エントリー7)．以上の結果から，非水溶媒中では，ピロガロールよりもカテコールの方が分子状酸素分子をより活性化し，より効果的なアルコールのアルデヒドへの酸化を進行させることが分かった．

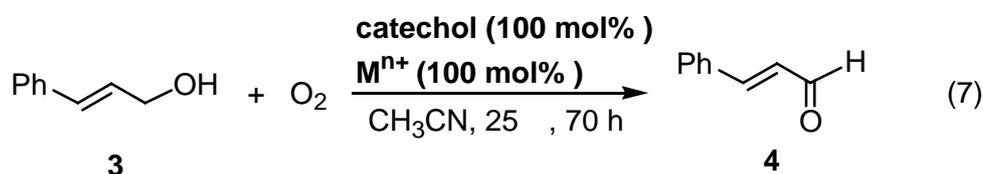
Table 1. Oxidation of cinnamyl alcohol by **1** or **2** / M^{n+} system.

Entry	1 or 2 100 mol%	M^{n+} 100 mol%	Yield of 4 ¹⁾ (%)
1	1	$FeCl_2 \cdot 6H_2O$	7
2	1	$FeCl_3 \cdot 4H_2O$	5
3	1	$CuCl$	19
4	1	$CuCl_2$	5
5	2	$FeCl_2 \cdot 6H_2O$	5
6	2	$FeCl_3 \cdot 4H_2O$	1
7	2	$CuCl$	64
8	2	$CuCl_2$	19

¹⁾ NMR yield

(2) カテコール-金属塩によるシナミルアルコールの酸素酸化

先に述べたように，非水溶媒中でのシナミルアルコールの酸化反応は，ピロガロールよりもカテコールがより効果的に分子状酸素を活性化させる．そこで，カテコールを用いたシナミルアルコールの酸化反応のみに焦点を当て，種々の条件下で，この反応の検討を行った(式7)．先ず始めに，用いる金属塩の原子価の違いが，この酸化反応にどのような影響を与えるのか検証した．その結果を表2に示す．カ



テコールと塩化第一銅の組み合わせのとき，シナムアルデヒドが 64 %の収率で生成した(エントリー 4)．塩化第二銅を用いたときは，反応はわずかしか進行しない(エントリー 5)．鉄塩を用いた場合は，効果的な酸化反応は起こらなかった(エントリー 1~3)．従って，カテコール-塩化第一銅の組み合わせが，分子状酸素を最も活性化させ，シナミルアルコールをシナムアルデヒドへ酸化させることが分かった．

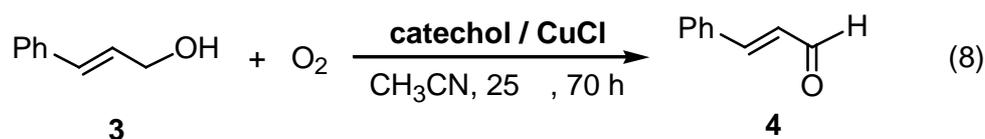
Table 2. Oxidation of cinnamyl alcohol by catechol - Mⁿ⁺ system.

Entry	M ⁿ⁺ (100 mol%)	Yield of 4 ¹⁾ (%)
1	FeCl ₂ ·6H ₂ O	5
2	FeCl ₃ ·4H ₂ O	1
3	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1
4	CuCl	64
5	CuCl ₂	19
6	CuI	1
7	Cu(OAc) ₂	4
8	Cu(OH) ₂	3

¹⁾ NMR yield

(3) カテコール-塩化第一銅によるシナミルアルコールの酸素酸化

この酸化反応では，カテコール 塩化第一銅の組み合わせが，最も効果的にシナミルアルコールをシナムアルデヒドへ変換させる．次に，用いるカテコールと塩化第一銅の量的関係を検討した（式 8）．その結果を表 3 に示す．



カテコールと塩化第一銅の両者が共存しない時は，当然のことながらシナミルアルコールの酸化反応は進行しない（エントリー 1）．また，カテコール，あるいは塩化第一銅のみでも，反応は進行しない（エントリー 2,3）．これらが両者共存するときに反応は良好に進行し（エントリー 4），塩化第一銅とカテコールの量を半分に減らすと，アルデヒドは 46 % しか生成せず（エントリー 5），この反応は触媒的に進行しないことが分かった．また，カテコールの量に対し塩化第一銅の量を減少させると，その収率は用いた塩化第一銅の量に対応してシナムアルデヒドを生成させることも分かった（エントリー 7,8）．

Table 3. Oxidation of cinnamyl alcohol by catechol-CuCl system.

Entry	catechol (mol%)	CuCl (mol%)	Yield of 4 ¹⁾ (%)
1	—	—	0
2	—	100	0
3	100	—	1
4	100	100	64
5	50	50	46
6	30	30	19
7	100	50	43
8	100	30	19

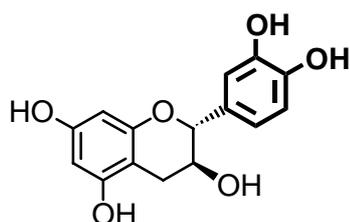
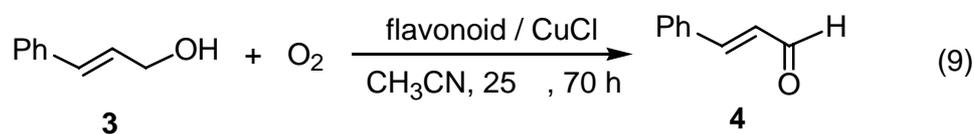
¹⁾ NMR yield

以上の結果から，非水溶媒中において，ポリフェノールの最も簡単な構造単位であるカテコールと銅塩の組み合わせが，最も効果的に分子状酸素を活性化し，シンナミルアルコールをシンナムアルデヒドへ酸化させる．また，カテコールと塩化第一銅が当量存在するとき，最も効率良く酸化反応が進行し，カテコールと銅塩は等量必要なことも分かった．1章で述べたように，水溶媒中ではカテコールよりもピロガロールの方が分子状酸素をより活性化させているのに対し，非水溶媒中ではカテコールの方が分子状酸素をより活性化させている．それでは，これらの化合物の酸化促進性は何に由来するのか．

一般に，抗酸化性化合物としてのポリフェノールの効果は，それらの化学構造に大きく依存している．フェノール自身は，抗酸化剤として不活性であるが，*ortho*-および *para*-ジフェノールは抗酸化能を持ち，エチルあるいは *n*-ブチル基でベンゼン環水素原子を置換することで抗酸化力は増加する¹．フラボノイドは，抗ラジカル活性に關与する要因を1個以上有するため，最も効果的な植物性抗酸化剤である．また，フラボノイドの抗酸化力は直接，水酸化の程度と相関し，糖分子の存在により減少する（配糖体は抗酸化剤でないが，相当するアグリコンは抗酸化剤である．）²．また，ポリフェノールは金属のキレート剤であり，活性酸素ラジカル源として重要な Fenton, Harber-Weiss 反応を阻害する³．さらに，フラボノイドは金属イオンと複合体を形成した後でも，フリーラジカル消去能を持つ⁴．

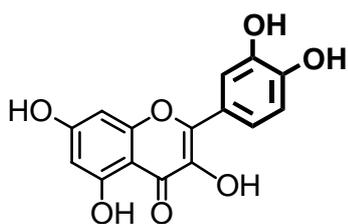
こうした考え方を考慮し，代表的な抗酸化剤であるカテキン，ケルセチン，ルチ

ンを用いて、式7に示した反応と同様の反応を行った(式9)。なお、カテキンはお茶やワインに、ケルセチンは玉葱・ブロッコリーなどの野菜に、ルチンはそばに含まれる成分である。

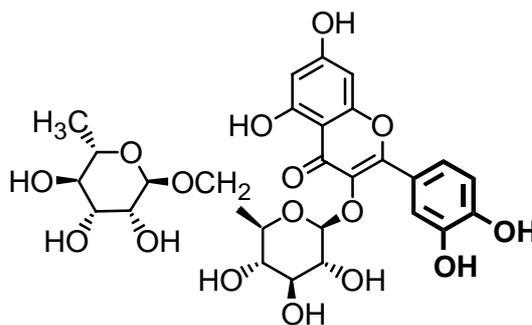


catechin

catechin	48 %
quercetin	24 %
rutin	10 %



quercetin



rutin

その結果、カテキン、ケルセチン、ルチンを用いた場合は、シナミルアルコールからそれぞれ48%、24%、10%の収率でシナムアルデヒドが得られた。この結果は、抗酸化剤といわれるポリフェノール類(フラボノイド)が、酸化促進剤としての作用をも持つことを示している。

先に述べたように、フラボノイドの抗酸化度は、糖分子の存在により減少するとされている。ところが、ルチン(糖分子が存在)を用いた場合、カテキンやケルセチンと比べ、抗酸化度は増加するという逆の結果が得られた。このことは、カテキンやケルセチンなどの抗酸化剤といわれるポリフェノール類が、酸化促進剤としても作用していることと関連性があると思われる。

(4) 様々な置換基を有するカテコールを用いた反応

様々な置換基を有するカテコールを用い、式 8 に示した反応と同様の反応を行った (式 10)。ここでは、カテコールに含まれる置換基の特性 (電子供与性・電子求引性) が、シンナムアルデヒド (4) の生成と関連性があるのか検証した。その結果を表 4 に示す。

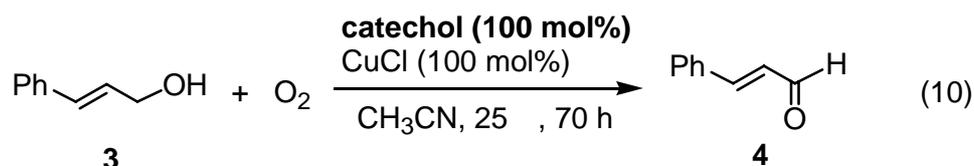
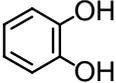
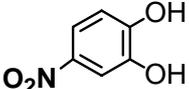
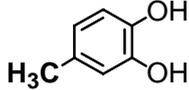


Table 4. Oxidation of cinnamyl alcohol induced by various catechols.

Entry	catechol (100 mol%)	Yield of 4 ¹⁾ (%)
1		64
2		7
3		10

¹⁾ NMR yield

この結果から、カテコールを用いたとき最も高い収率 (64%) で、シンナミルアルコール (3) からシンナムアルデヒド (4) が得られた。4-ニトロカテコールを用いたときの収率は 7%、4-メチルカテコールを用いたときのそれは 10% であった。そこで、様々なカテコール類とフラボノイドの酸化電位を検証した。図 1 に示すように、カテコールの酸化電位は、4-ニトロカテコールのそれより高く、4-メチルカテコールのそれより低い。また、ケルセチンの酸化電位は、ルチンやカテキンの酸化電位より高い。従って、今回用いたカテコール類やフラボノイドの酸化電位とアルデヒドの生成量の間には相関関係が見られないことが分かった。このことは、ポリフェノールの酸化促進力がそれらの酸化電位のみでは評価できないことを明らかに示している。

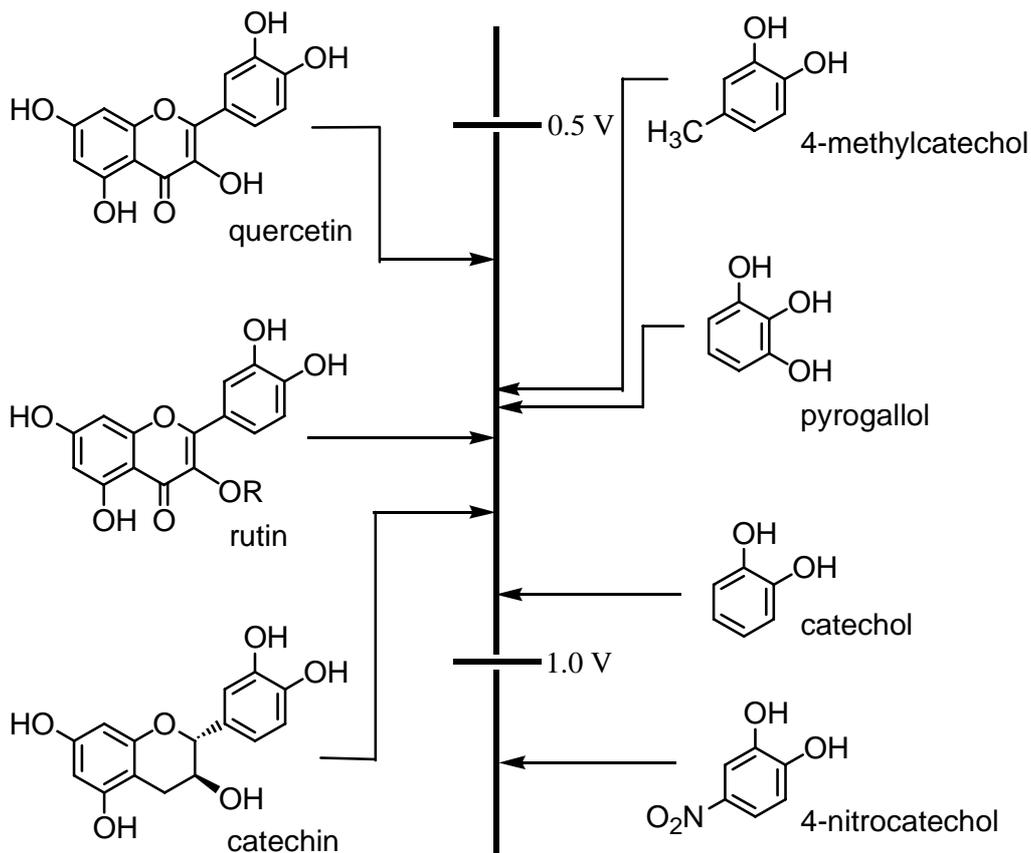
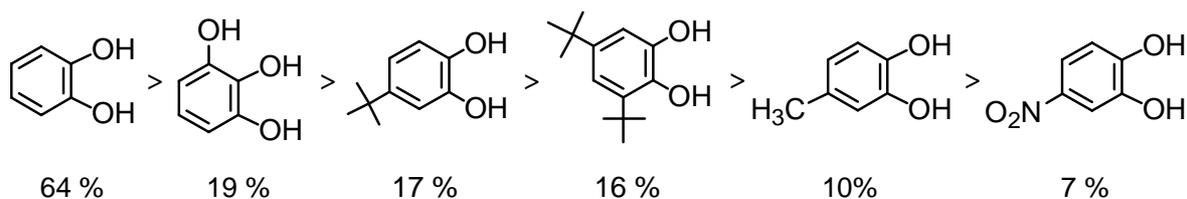


Figure 1. Oxidation potential of various polyphenols.

以下に、シナムアルデヒドの生成量（収率）により評価した単純なポリフェノール類の酸化促進力の順序を示している。この結果から、ポリフェノール類の酸化促進剤としての作用は、酸素分子の取り込み能、およびそれらの金属塩錯体の安定性によるものと思われる。電子供与基、あるいは電子求引基を有するカテコールが、無置換のカテコールを用いた場合と比べ、アルデヒド生成に大きな違いが見られるのは、これらの要素が関わっているものと思われる。



(5) 酸素分子の吸収量測定

カテコール 塩化第一銅によるシンナミルアルコールの酸化反応では、どのようにして分子状酸素は活性化されるのか。その点を調査するために、この反応で使用する酸素分子の吸収量を測定した。

25 mL 枝付きナスフラスコに、カテコール(0.5 mmol)、塩化第一銅(0.5 mmol)、アセトニトリル(0.5 mL)を加え、25℃、アルゴン雰囲気下で30分撹拌した。その後、シンナミルアルコール(0.5 mmol)のアセトニトリル溶液(0.5 mL)を加えた。酸素を充填したガスビュレットを先のナスフラスコに取り付け、系内を酸素置換し、酸素吸収量を測定した(25℃、70 h)(式 11)。その結果を図 2 に示す。

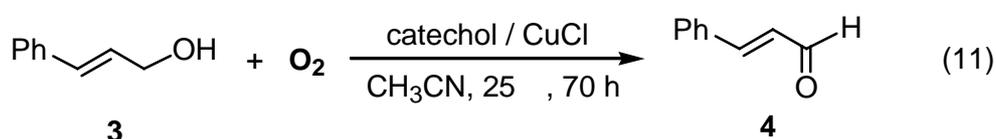


図 2 に示すように、反応開始 10 時間以内に、急速に酸素が吸収され、その後、酸素吸収速度が徐々に遅くなる。最終的に、式 11 に示す酸化反応条件下では、1.03 mmol の酸素が吸収された。この反応で用いたカテコール、および塩化第一銅の量は、それぞれ 0.50 mmol である。従って、酸素分子の 4 個の酸素原子がこの反応で消費されていることとなる。この点に関しては、3 章で詳しく述べる。

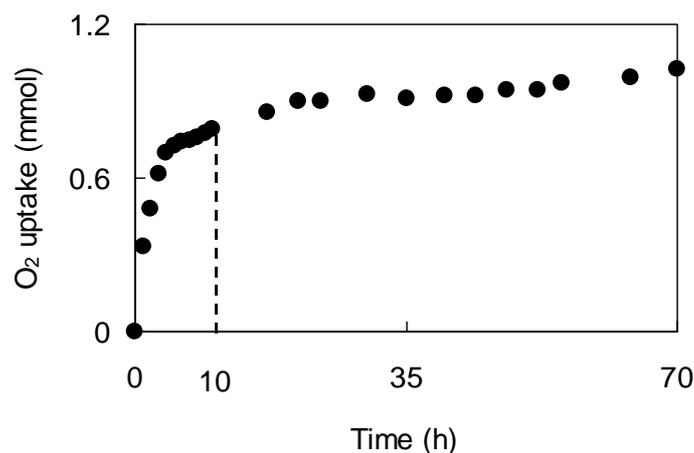


Figure 2. O₂ uptake measurement in the oxidation of cinnamyl alcohol by using catechol-CuCl.

酸素吸収量の測定結果を踏まえ、先の反応における酸素吸収量とシナムアルデヒド生成量に相関性があるか検証した。シナムアルデヒド生成量の経時変化を図3に示す。図3に示すように、シナムアルデヒドの生成量とその酸素吸収量との間には、相関係数はほとんど見られない。シナミルアルコールからシナムアルデヒドの生成は徐々に進行しており、酸素吸収量のように、反応開始10時間の間に、急激な増加は見られない。従って、シナミルアルコールからシナムアルデヒドへの酸素酸化過程と、カテコールと塩化第一銅と酸素との反応過程は、独立して進行しているものと考えられる。

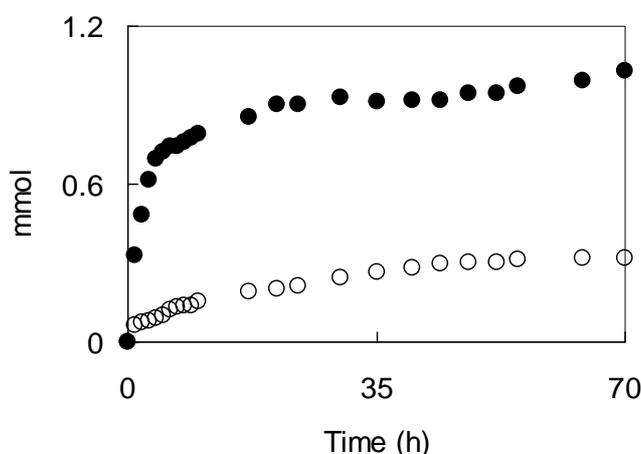


Figure 3. Time-profile for the formation of cinnamaldehyde (○) and O₂ (●) uptake in the oxidation of cinnamyl alcohol by using

2-3 過酸化水素とシナミルアルコールの反応

1章では、水溶液中でのアルコールの酸化反応は、系中で発生した過酸化水素により進行することを述べた。非水溶媒中でのシナミルアルコールの酸化反応においても、系中で過酸化水素が発生し、その結果シナムアルデヒドへ酸化される可能性がある。そのことを検討するために、以下の実験を行った。非水溶媒中で発生させた過酸化水素を、銅塩の共存下でシナミルアルコールと反応させ、シナムアルデヒドが生成するか確かめた。

非水溶媒中で過酸化水素を発生させるために、下式に示す関西大学の石井康敬の方法を用いた(式12)⁵。

パラ位に異なる置換基の持つシナミルアルコールを基質として用い、その酸化反応を検討した(式14)。結果を表5に示す結果から、4-ニトロシナミルアルコールを用いたとき、対応するアルデヒドは71%の収率で得られた。

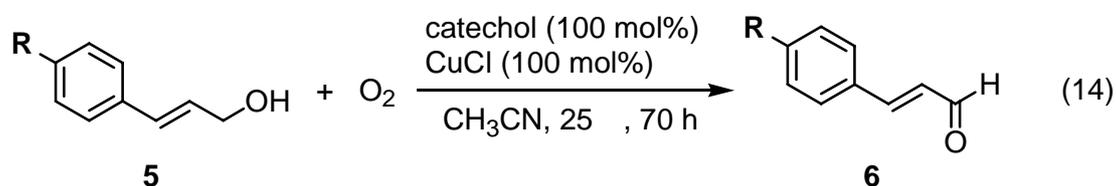


Table 5. Oxidation of *para*-substituted cinnamyl alcohol by catechol-CuCl system.

Entry	R	Yield of 6 ¹⁾ (%)
1	NO ₂	71
2	H	64

¹⁾ NMR yield

また、基質を変え(ベンジルアルコール、アリルアルコール、クロチルアルコール)、式11に示した条件下で反応を行ったが、アルコールのアルデヒドへの酸化反応の収率は、いずれも1%前後であった。以上の結果から、カテコール塩化第一銅をもちいたアルコール類の酸化反応は、強い基質特異性を有することが分かった。この要因の検証は、今後の研究課題として残された。

以上の結果をまとめると、非水溶媒中では、ピロガロールよりもカテコールの方が分子状酸素をより活性化させ、シナミルアルコールをシナムアルデヒドへ酸化させる。カテコールの代わりに抗酸化剤とされているカテキン等を用いた場合においても、シナミルアルコールのシナムアルデヒドへの酸化は促進された。この結果は、抗酸化剤と言われているポリフェノール類が、酸化促進剤としても作用していることを、明らかに示している。また、ポリフェノール類が、抗酸化剤あるいは酸化促進剤として働く要因は、それらに含まれているポリフェノールの最も簡単な構造単位であるピロガロール、あるいはカテコールによることが示唆され、それらポリフェノール類の酸化促進剤としての作用は、酸素分子の取り込み能、およびそれらの金属塩錯体の安定性によるものと考えられる。

実験の部

General. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were measured on a $^{\text{UNITY}}$ INOVA VARIAN (400 MHz) with anisole as an internal standard in CDCl_3 , and chemical shifts are reported in parts per million (ppm) downfield from $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Analytical GLC evaluations of product mixtures were performed on a Shimadzu GC-17A flame ionization chromatography by using a $30\text{ m} \times 0.53\text{ mm}$ chemical bonded glass capillary column DB-1 (1.5 μm , dimethyl polysiloxane, J&W Scientific) under the conditions of injection temperature (200 $^\circ\text{C}$), N_2 gas pressure (0.5 kg/cm^2), and column temperature 60-250 $^\circ\text{C}$ (10 $^\circ\text{C}/\text{min}$). Mass spectra were obtained on a Shimadzu GCMS-QP5050 by using a $30\text{ m} \times 0.53\text{ mm}$ chemical bonded glass capillary column DB-1 (J&W Scientific).

Materials. Cinnamyl alcohol was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Catechol and pyrogallol were purchased from Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan). $\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ was obtained from Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan). $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was obtained from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). Copper (I) chloride was commercially available and purified ⁶ prior to use. Copper (II) chloride was commercially available and used as received. 4-nitrocinnamyl alcohol was purchased from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). Anisole was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). CH_3CN was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Benzhydrol and *N*-hydroxy phthalimide (NHPI) was purchased from Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan). Hydrogen peroxide (30 %, w/v) was obtained from Santoku Chemical Industries Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Aerobic Oxidation of Cinnamyl Alcohol by Using Pyrogallol- FeCl_2 Complexes.

A mixture of $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.50 mmol, 99.41 mg) and pyrogallol (0.50 mmol, 63.06 mg) in CH_3CN (0.75 mL) was stirred in a 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirrer bar and a balloon filled with Ar at 25 $^\circ\text{C}$ for 30 min. A solution of cinnamyl alcohol (0.50 mmol, 67.09 mg) in CH_3CN (0.50 mL) was added to the flask under O_2 , and the reaction was monitored by GLC. After the mixture was stirred under O_2 atmosphere (balloon) at 25 $^\circ\text{C}$ for 70 h, the solution was decanted using

ether / n-hexane (1 / 1). Filtration, washing with ether, and evaporation of the solvent gave cinnamaldehyde. The yield of cinnamaldehyde was determined by NMR analysis with anisole as an internal standard.

O₂-Uptake in the Oxidation of Cinnamyl Alcohol by Using Catechol-CuCl Complex.

A mixture of CuCl (0.50 mmol, 49.50 mg) and catechol (0.50 mmol, 55.06 mg) in CH₃CN (0.50 mL) was stirred in a 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirr bar and a balloon filled with Ar at 25 °C for 30 min. Then, a solution of cinnamyl alcohol (0.50 mmol, 67.09 mg) in CH₃CN (0.5 mL) was added to the flask. O₂-uptake was measured by using gas bullet. The time-profile for the O₂-uptake is given in Figure 2.

Oxidation of Cinnamyl Alcohol by Hydrogen Peroxide in the Presence of CuCl.

In a 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirr bar and a balloon filled with Ar was placed CuCl (0.5 mmol, 49.5 mg) and CH₃CN (0.25 mL). The mixture was stirred at 25 °C for 10 min. After gas in the flask was substituted Ar for O₂, a mixture of hydrogen peroxide and benzophenone (1.3 mL), which is prepared by *N*-hydroxyphthalimide (NHPI)-catalyzed oxidation of benzhydrol⁸ and a solution of cinnamyl alcohol (0.5 mmol, 67.09 mg) in CH₃CN (0.5 mL). The reaction was monitored by GLC. The yield of cinnamaldehyde was determined by NMR analysis using anisole as an internal standard.

Oxidation of Cinnamyl Alcohol by Hydrogen Peroxide (30 %, w/v) in the Presence of CuCl.

In a 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirr bar and a balloon filled with Ar was placed CuCl (0.5 mmol, 49.5 mg) and CH₃CN (0.25 mL). The mixture was stirred at 25 °C for 10 min. Then, argon in the flask was substituted by O₂. To this was added 30 % hydrogen peroxide (0.5 mL) and a solution of cinnamyl alcohol (0.5 mmol, 67.09 mg) in CH₃CN (0.5 mL). The reaction was monitored by GLC. The yield of cinnamaldehyde was determined by NMR analysis using anisole as an internal standard.

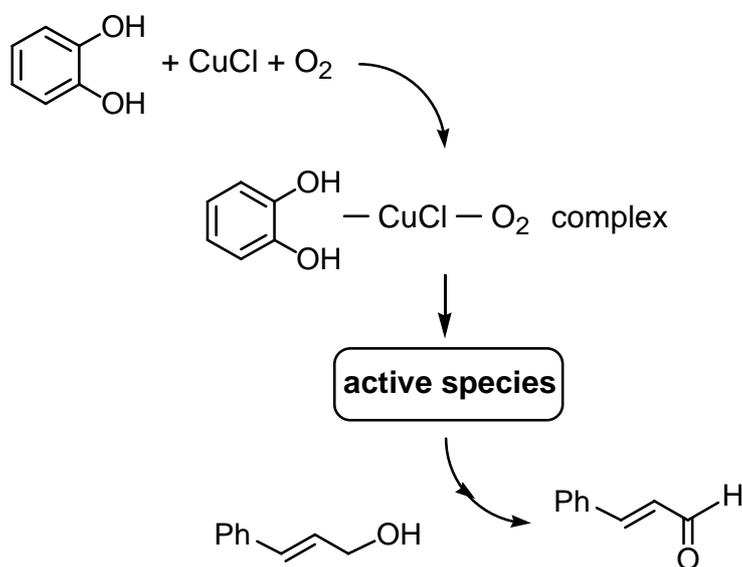
参考文献

- (1) Shahidi, F.; Wanasundara, PKJPD., *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **1992**, 32, 67-103
- (2) Ratty, AK.; Das, NP., *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **1988**, 39, 69-79
- (3) Fuhrman, B.; Lavy, A.; Aviram, M., *Am. J. Clin. Nutr.*, **1995**, 61, 549-554
- (4) Afanas'ev, IB.; Dorozhko, AL.; Brodskii, AV., et al., *Biochem. Pharmacol.*, **1989**, 38, 1763-1769
- (5) Iwahama, T.; Sakaguchi, S. and Ishii, Y., *Org. Process Res. Dev.*, **2000**, 4, 94
- (6) *Inorganic syntheses*, Vol.1 Chapter 1

3 章. 分子状酸素の活性化により生成する活性種の検証

3-1 緒言

2 章で述べたように，カテコールと塩化第一銅によるシンナミルアルコールの酸化反応は，過酸化水素を共存させても進行しない．また，カテコールと塩化第一銅が当量存在するときに，シンナミルアルコールのシナムアルデヒドへの酸化反応は良好に進行し，カテコールに対して使用する塩化第一銅の量を減らすと，シナムアルデヒドの生成量は減少する．そうした点を考えると，この酸化反応は，以下に示すように，カテコールと銅塩が錯化することにより分子状酸素が活性化され，その結果生成する活性種により進行するものと思われる．そこでこの章では，この酸化反応の引き金と考えられる活性種について検討した結果を述べる．



3-2 分子状酸素とカテコールと塩化第一銅との反応

(1) 酸素分子の吸収量の測定

カテコールと塩化第一銅と分子状酸素との反応で生成する化合物を検証するために、この反応で使用される酸素分子の吸収量を測定した。

25 mL 枝付きナスフラスコに、カテコール(0.5 mmol)、塩化第一銅(0.5 mmol)、アセトニトリル(0.5 mL)を加え、25℃、アルゴン雰囲気下で30分撹拌した。その後、酸素を充填したガスビュレットをナスフラスコに取り付け、系内を酸素置換し、酸素吸収量を測定した(25℃、70 h)(式15)。その結果を図4に示す。

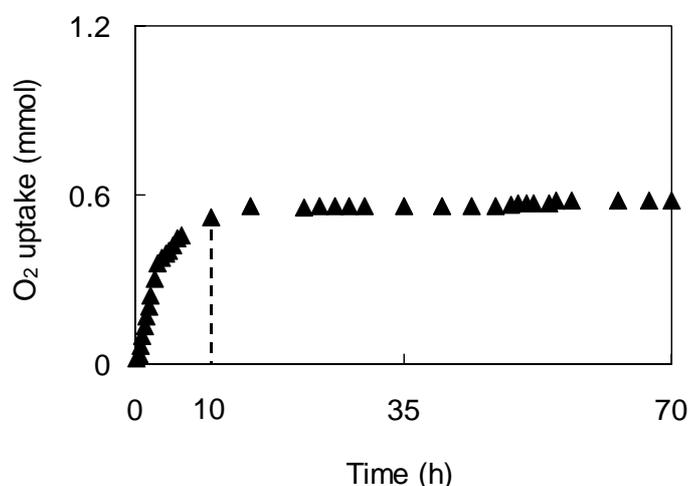
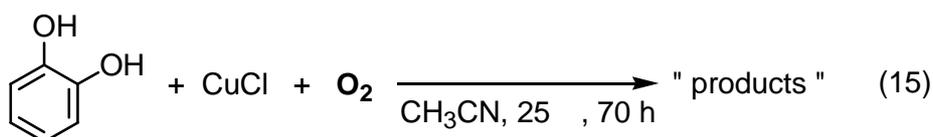


Figure 4. O₂ uptake measurement in the reaction of catechol with CuCl.

図4に示したように、反応開始後10時間以内に急速に酸素は吸収された。その後、酸素は穏やかに吸収され、最終的に0.58 mmolの酸素が吸収された。先のシンナミルアルコールのアルデヒドへの酸化反応の際に吸収された酸素の量と比較すると、その吸収量は約1/2である(図5)。この結果は、シンナミルアルコールの酸化には、カテコール-塩化第一銅錯体により吸収された酸素分子に加え、もう一

分子の酸素を必要とすることを示唆している。

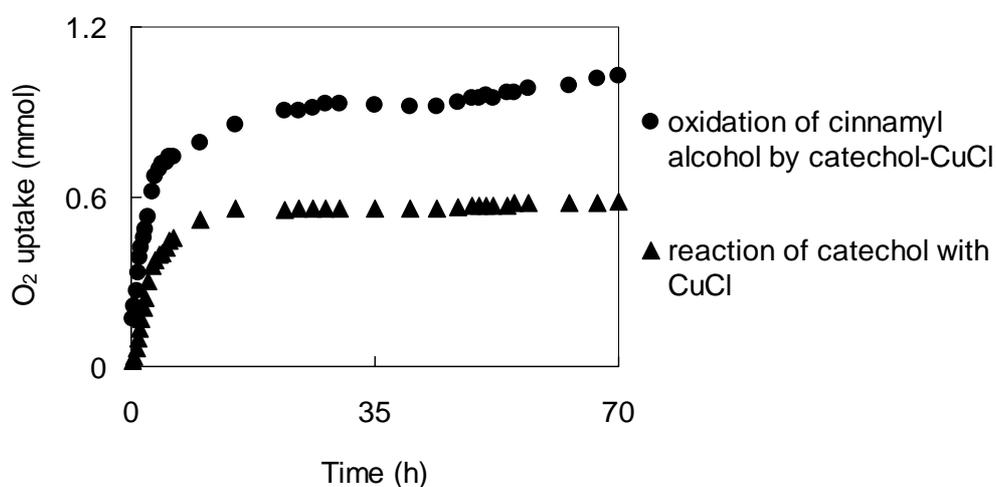
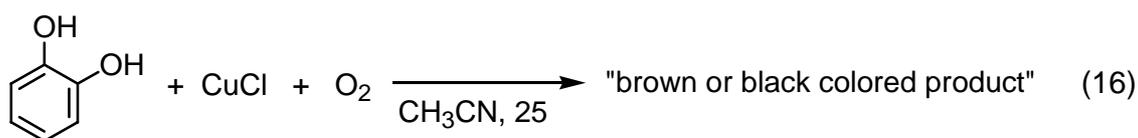


Figure 5. O₂ uptake in the system of catechol-CuCl in the presence or absence of cinnamyl alcohol.

(2) 反応生成物の検証

アルゴン雰囲気下で、カテコール (2 mmol) と塩化第一銅 (2 mmol) をアセトニトリル (2 mL) 中で 30 分攪拌した後、フラスコ内を酸素置換し、その後、酸素雰囲気下で攪拌した (式 16)。



反応時間を、1 時間、2 時間、3 時間、6 時間と変化させた実験を行った。1, 2, 3 時間攪拌した後の反応溶液の色は、全てやや赤身を帯びた茶色であった。それぞれの反応時間で攪拌させた反応溶液をデカンテーションし、沈殿物と上澄み溶液に分け、その上澄み溶液を濃縮し溶媒を除去したところ、茶色を帯びた黒色の生成物が得られた。生成物の色は、攪拌時間の増加に伴い、黒色へ近づき、粘性が増してくる。特に、反応開始後 6 時間の反応溶液は、かなりの粘性を持っており、溶液は真っ黒である。それぞれの沈殿物を IR により解析したところ、図 6 に示すように 3400 cm⁻¹ に O-H 伸縮振動が見られた。従って、分子状酸素とカテコールと塩化第

一銅と酸素分子との反応において得られた黒色の粉末は、ヒドロキシル基を有する化合物であると思われる。

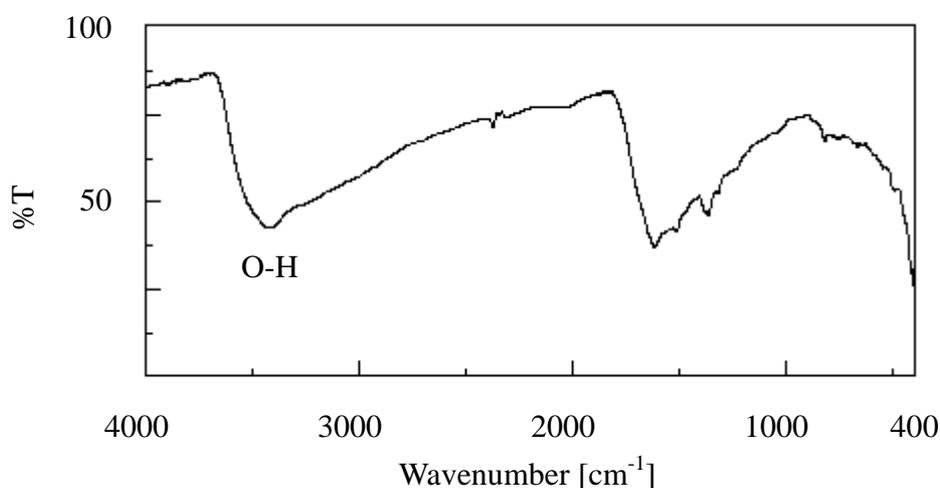
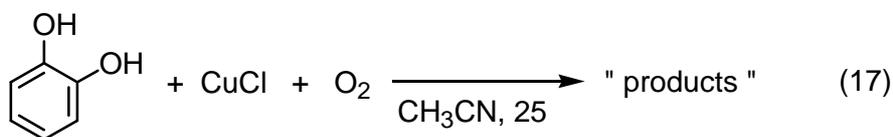


Figure 6. IR spectrum of the precipitated black solid in the reaction of catechol-CuCl with O₂.

それでは、カテコールと塩化第一銅と分子状酸素との反応における、カテコールの変化に着目した。

アルゴン雰囲気下で、カテコール (2 mmol) と塩化第一銅 (2 mmol) をアセトニトリル (2 mL) 中で 30 分攪拌した後、フラスコ内を酸素置換し、その後、酸素雰囲気下で攪拌した (式 17)。反応時間は、1 時間、2 時間、3 時間、6 時間で各々行った。反応終了後、ろ過により沈殿物を除去した。

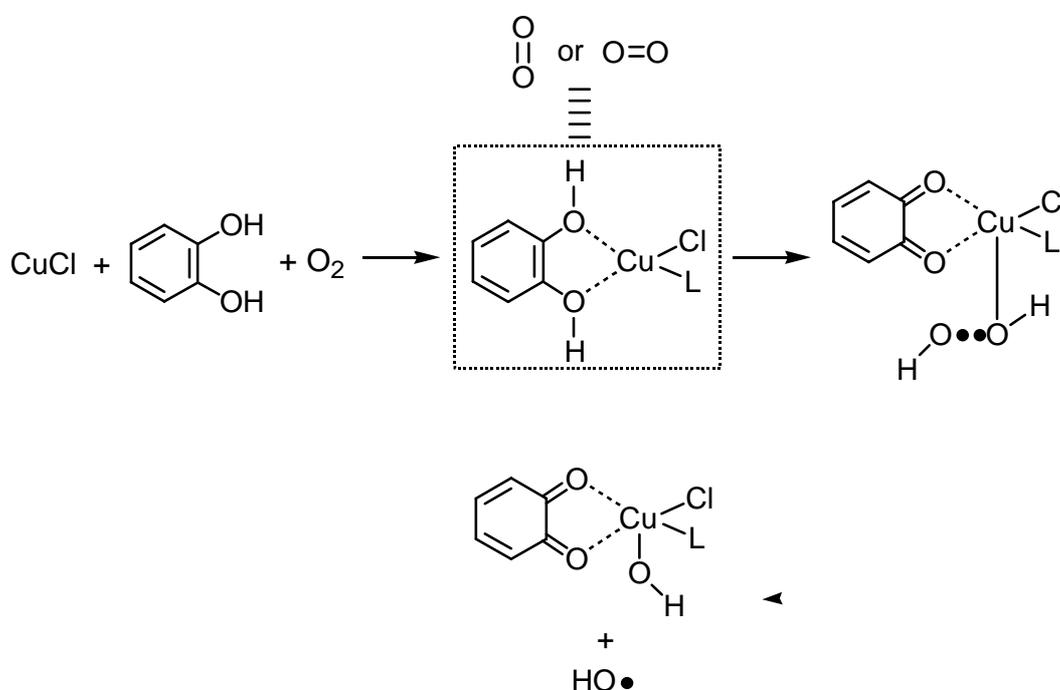


GC による分析から、カテコールは、反応開始 1 時間後に、全て無くなった。このことから、カテコールは何らかの化合物に変化したと考えられる。NMR により反応生成物の構造を解析したところ、反応開始 1 時間後の生成物では、カテコールのみのピークが見られたが、反応開始 2, 3, 6 時間後には、特徴的なピークが何も観測されなかった。従って、NMR からの生成物の解析は不可能であった。

(3) HPLC による分析

25 mL 枝付きナスフラスコに, カテコール(0.5 mmol), 塩化第一銅(0.5 mmol), アセトニトリル(0.5 mL)を加え, 25℃, アルゴン雰囲気下で30分撹拌した. その後, フラスコ内を酸素置換し酸素雰囲気下で撹拌した(式15と同様). アルゴン雰囲気下直後, 30分後, および酸素置換30分, 1時間, 1.5時間, 2時間, 2.5時間, 3時間後にそれぞれサンプルを採取し, HPLCにより反応生成物を分析した. その結果, アルゴン雰囲気下直後, および30分後には, カテコールとカテコールが酸化されたと思われる化合物の計2本のピークが見られた. 酸素置換後には, カテコールの酸化体と思われる化合物のピークは増加し, 酸素置換1.5時間後には, キノンと思われる化合物と何らかの化合物の, 2本の吸収が新たに増え, 計4本のピークが観測された. 従って, カテコールと塩化第一銅と分子状酸素との反応により, カテコールはキノンに変化することが, HPLCにより確認された. その他に生成した化合物については, 特定できておらず, 今後の研究課題として残された.

以上の結果から, カテコールはスキーム2に示すように銅塩と錯化し^{1,2}, 生成した錯体が分子状酸素を取り込み, 最終的には銅ヒドロキサイド(Cu-OH)とヒドロキシルラジカル(HO•)が生成すると考えられる.



3-3 ESR による反応解析

これまでの実験結果から、カテコール 塩化第一銅によるシナミルアルコールの酸素酸化反応は、カテコールと銅塩が錯化した後、ヒドロキシルラジカルが放出され、アルコールがアルデヒドへ酸化されるという反応経路が示唆される。そこで、ESR (Electron Spin Resonance : 電子スピン共鳴) により、カテコール 銅錯体形成過程における銅の原子価の変化の追跡、およびシナミルアルコールのアルデヒド体への酸化反応の引き金と考えられるヒドロキシルラジカルの検出を試みた。

(1) 銅の原子価の変化

先ず始めに、シナミルアルコール酸化反応の活性種と考えられるカテコール 塩化第一銅錯体の反応過程における銅の原子価の変化に着目し、一価銅が二価銅に変化するのか、あるいは一価のまま保持されるのかを ESR により追跡した。

25 mL の枝付きナスフラスコに、カテコール(0.5 mmol)と塩化第一銅(0.5 mmol)を加え、アセトニトリル(0.5 mL)中、アルゴン雰囲気下で 30 分撹拌した(式 18)。その後、フラスコ内を酸素置換し、酸素雰囲気下で撹拌し続けた(式 19)。

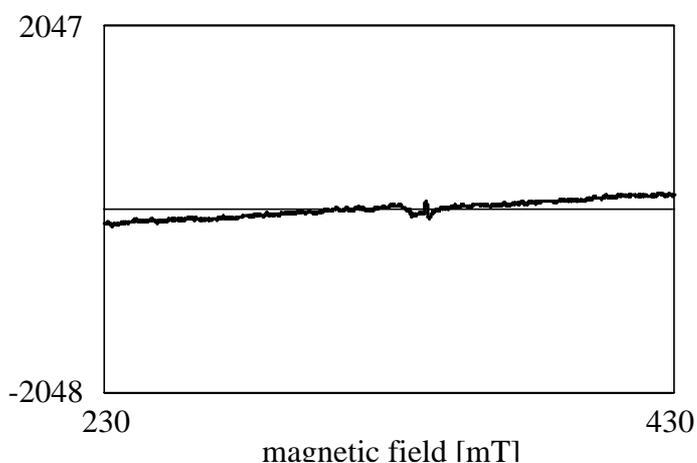


Figure 7. ESR spectrum of Cu^+ Cu^{2+} under Ar atmosphere.

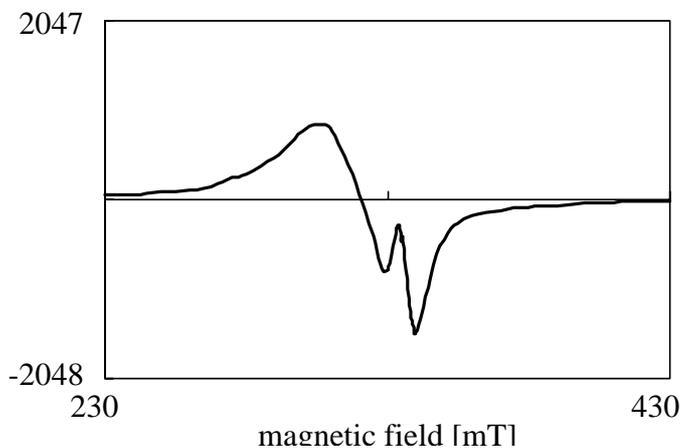
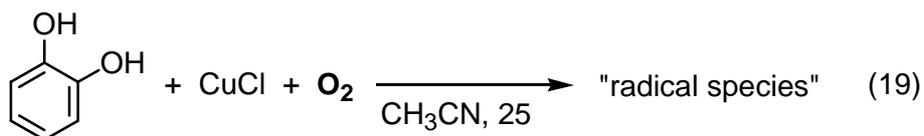


Figure 8-a. ESR spectrum of Cu^+ Cu^{2+} under O_2 atmosphere. (1 h after initiation)

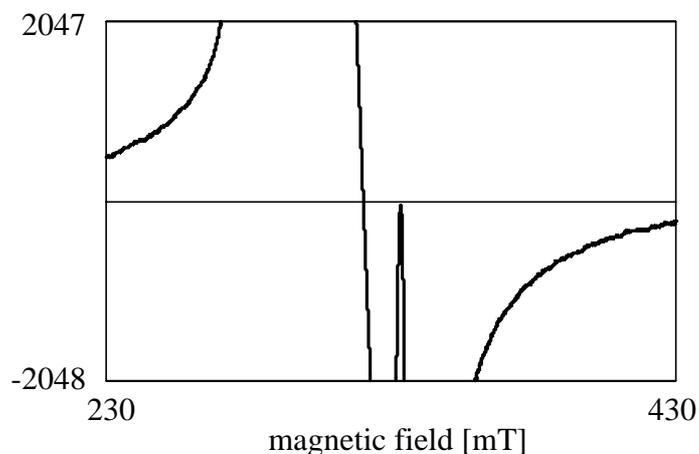


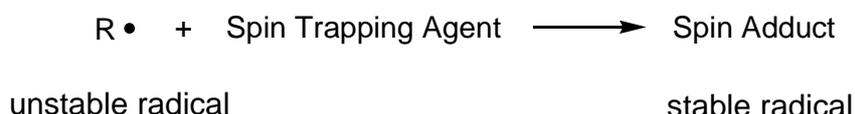
Figure 8-b. ESR spectrum of Cu^+ Cu^{2+} under O_2 atmosphere. (2 h after initiation)

図7は、式18に示した反応における、反応開始直後のサンプルをESRにより解析した結果を示している。その結果、図7に示されているように、アルゴン雰囲気下では、ESRにサイレントであることから、銅の酸化数は一価のまま保持されていることがわかる。ところが、酸素雰囲気下1時間後には、二価に酸化された銅の吸収スペクトルが観測された(図8-a)。さらに2時間後には、かなりの量の二価銅が一価銅に酸化されていることが分かる(図8-b)。すなわち、カテコールと塩化第一

銅と分子状酸素との反応において、銅は一価銅から二価銅に酸化されていることが分かった。

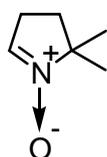
(2) スピントラップ剤を用いた反応解析

不安定なラジカル種を検出する方法として、高速流通法、凍結法、マトリック
ス分離法等があるが、いずれも不安定ラジカル種のまま高速で観測するか、その反
応性を抑えた条件下で観測するかの方法である。スピントラップ法は、これらの不
安定ラジカル種を比較的安定なラジカル種に変換して ESR を測定し、不安定なラジ
カル種を同定しようとする方法である。



不対電子を持たないスピントラップ剤が、不安定ラジカル R \cdot をトラップして、
ESR で観測できるスピンを持ったスピニアダクトを生成する。スピニアダクトは多
くの場合、安定中性ラジカルのニトロキッドであるが、R \cdot のラジカル種や実験の目
的によって種々のトラップ剤が使用される。代表的トラップ剤を分類すると、ニト
ロン系とニトロソ系の 2 つに大別される。

ここでは、代表的なスピントラップ剤であるニトロン系の 5,5-dimethyl-1-pyrroli-
ne-N-oxide (DMPO) を用い、アルゴン雰囲気下でのカテコールと塩化第一銅との
反応、およびカテコール 塩化第一銅によるシンナミルアルコールの酸素酸化反応
におけるラジカル種の検出を試みた。



5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide
(DMPO)

まず始めに、DMPO を用い、シンナミルアルコールの酸素酸化反応の引き金と考
えられるヒドロキシルラジカル (HO \cdot) の検出を試みた。しかしながら、DMPO-OH
付加体は検出されなかった。おそらく、生成したヒドロキシルラジカルは、シンナ
ミルアルコールと溶媒との競争反応により、先に溶媒に捕捉されたものと考えられ

る．そこで，ヒドロキシルラジカル消去剤である DMSO を系中に加え³，ヒドロキシルラジカル以外のラジカル種の捕捉を試みた．

25 mL の枝付きナスフラスコに，カテコール(0.5 mmol)と塩化第一銅(0.5 mmol)を DMPO (100 μ L)，DMSO (100 μ L) を含むアセトニトリル(0.5 mL) 中に加え，アルゴン雰囲気下で，30 分攪拌した(式 20)．攪拌直後のサンプルを，ESR により解析した(図 9)．その結果，図 9 に示されているように，同じ強度の 4 本の吸収が検出された．この吸収は，おそらくカテコール由来のラジカル種であると思われる．

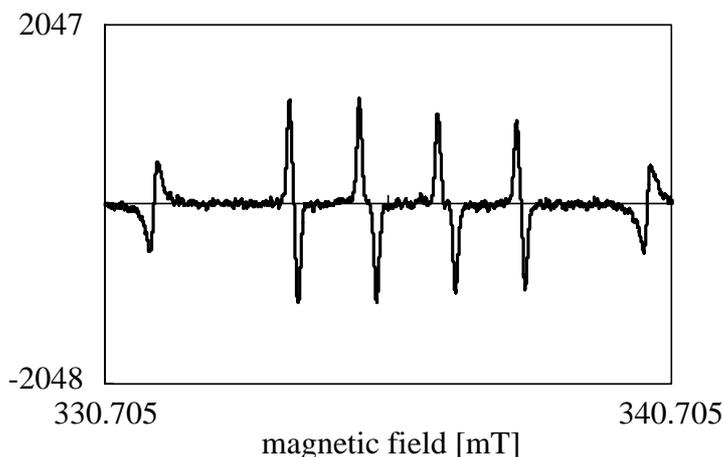
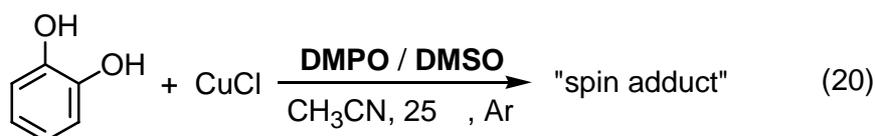
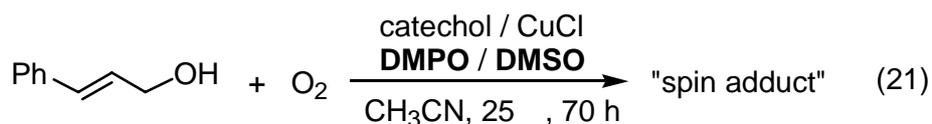


Figure 9. ESR spectrum by using DMPO: Reaction of catechol-CuCl with under Ar atmosphere.

続いて，先のフラスコ内を酸素置換し，シナミルアルコール(0.5 mmol) のアセトニトリル溶液(0.5 mL) を滴下した(式 21)．攪拌開始直後，および 10 分後のサンプルを，先ほどと同様に ESR により解析した(図 10-a,b)．



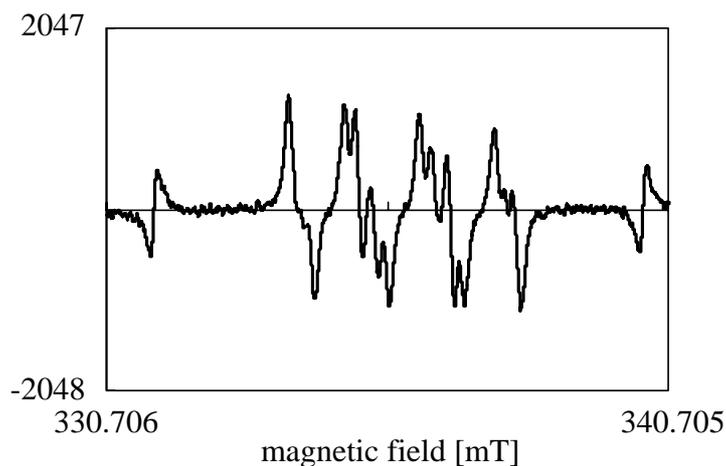


Figure 10-a. ESR spectrum by using DMPO: Oxidation of cinnamyl alcohol induced by catechol-CuCl under O₂ atmosphere at beginning of the reaction.

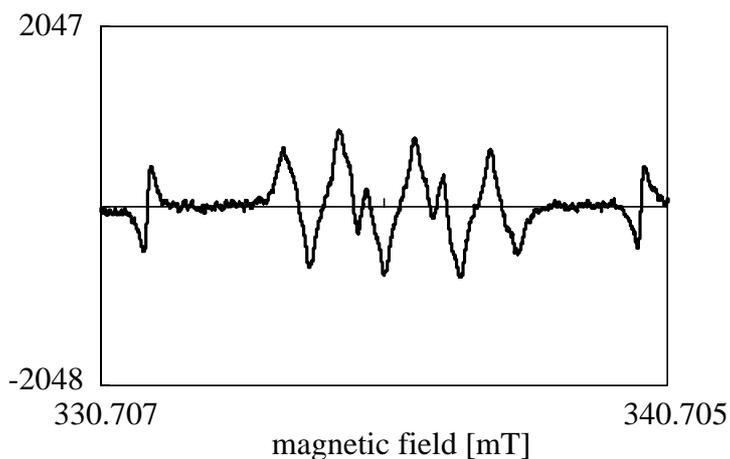


Figure 10-b. ESR spectra by using DMPO: Oxidation of cinnamyl alcohol induced by catechol-CuCl under O₂ atmosphere at 10 min after the initiation.

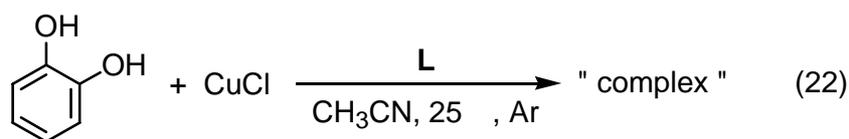
その結果，図 10-a に示すように，カテコール 銅錯体形成過程において検出された吸収に加え，新たに何らかのラジカル種が DMPO の付加体として検出された．反応開始 10 分後には，先のカテコール 銅錯体による吸収は減少し，新たに検出されたピークが増加しているのが分かる（図 10-b）．図 10-a および図 10-b で検出された吸収は，おそらくシナミルアルコール由来のラジカルによるものと思われるが，その詳細は，今後の研究課題として残された．

3-4 反応に関与する銅錯体の単離の試み

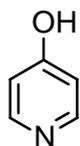
最近, Cu / O₂ の化学は, 銅モノオキシゲナーゼモデルの業績により, 多くの注目を得ている. 銅-ヒドロペルオキシ種 (Cu-OH) は, D-パミン β-ヒドロキシラーゼ (DβH)⁴, ガラクトースオキシダーゼ (GO)⁵ やスーパーオキシドディムスターゼ (SOD)⁶ のような銅酵素により触媒化される生物的酸化反応において, 鍵となる中間体である. しかしながら, これらの酸化において仮説的な反応中間体のモデル化合物として用いられているヒドロペルオキシ錯体の特性評価は, それらの短い寿命のため, かなり困難なものとなっている. 最近, 三脚型ピリジルアミン配位子を用いた単核銅-ヒドロペルオキシ (II) 錯体の単離が成功し, その分光学的, 物理的特性が明らかとなっている⁷.

これらのことを考慮に入れて, 様々なピリジン誘導体を配位子として用い, 反応の引き金と考えられるカテコール-銅錯体の単離を試みた.

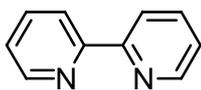
25 mL 枝付きナスフラスコに, カテコール (1.0 mmol), 塩化第一銅 (1.0 mmol), アセトニトリル (1.0 mL) を加え, 25 °C, アルゴン雰囲気下で 30 分撹拌した. その後, 配位子 (L) を加え, アルゴン雰囲気下で撹拌を続けた (22) (25 °C, 3 時間). こうして得られた反応溶液から, 沈殿物を取り出し, その結晶化を試みた.



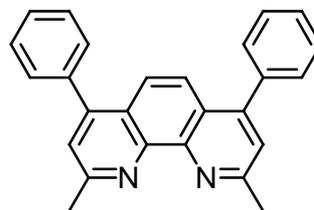
L



4-hydroxy pyridine



[2,2']Bipyridinyl

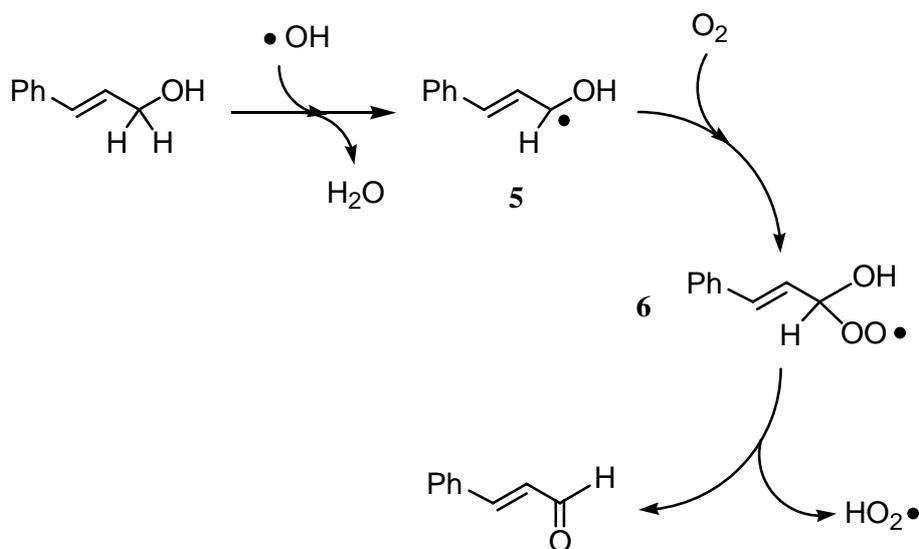


2,9-Dimethyl-4,7-diphenyl
-[1,10]phenanthroline

しかしながら，カテコール 銅 L 錯体の単離は未だ成功しておらず，中間体の単離は今後の研究課題となった．

以上の結果から，カテコール 塩化第一銅によるシンナミルアルコールのシンナムアルデヒドへの酸化反応は，スキーム 3 に示した経路を経ると考えられる．この反応経路は，先に述べたカテコール 塩化第一銅によるシンナミルアルコールの酸化反応において使用したカテコール，塩化第一銅とシンナミルアルコールと比較して，2 当量の酸素が吸収されていたことから支持される．

まず，カテコールと塩化第一銅と分子状酸素との反応で生成したヒドロキシラジカルは，シンナミルアルコールのアリル位の水素を引き抜く．その際生成した α -ヒドロキシラジカル 5 は酸素分子と反応し，ヒドロペルオキシラジカル 6 を与える⁸．その後，ヒドロペルオキシラジカル 6 はシンナムアルデヒドへと変化する．同時に生成した $\text{HO}_2\cdot$ が，どのように反応に関与するのか，その詳細は今後の研究課題として残された．



Scheme 3

実験の部

General. Infrared spectra were measured on a JASCO FT/IR-610 spectrometer using KBr; ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were measured on a $^{\text{UNITY}}$ INOVA VARIAN (400 MHz) in CDCl_3 , and chemical shifts are reported in parts per million (ppm) downfield from $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. HPLC analyses were performed on an Inertsil ODS-3 (5 μm , 4.6 I.D. \times 150 mm) column using HPLC system composed of a LC 6A pump (Shimadzu) and a TOSOH UV 8020 detector. Separate conditions: sample, 300 μL , eluting solution; acetonitrile / water (15 / 7), flow rate; 1.0 mL/min, temperature; 30 . Solvents for HPLC were degassed previously. The products were detected at 254 nm. A 0.1 mL sample was transferred to a flat quartz ESR cuvette and its ESR spectra were measured with JEOL JES-FA100 ESR spectrometer (Tokyo, Japan). The ESR analytical conditions were as follows: magnetic field, 330 ± 100 mT; power, 16 mW; response, 1 sec; modulation, 1 mT; temperature, room temperature; sweep time, 8 min.

Materials. Catechol and pyrogallol were purchased from Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan). Copper (I) chloride was commercially available and purified ⁹ prior to use. CH_3CN and CH_2Cl_2 were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Cinnamyl alcohol was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) was obtained from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). HPLC grade CH_3CN was purchased from Nacalai Tesque Inc. (Kyoto, Japan). Deionized water was used throughout and was prepared with a Milli-Q water purification system (Millipore-Waters).

O_2 -Uptake in the Reaction of Catechol with CuCl .

A mixture of CuCl (0.50 mmol, 49.50 mg) and catechol (0.50 mmol, 55.06 mg) in CH_3CN (0.50 mL) was stirred in a 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirr bar and a balloon filled with Ar at 25 $^\circ\text{C}$ for 30 min. O_2 -uptake was measured by gas bullet method. The time-profile for the O_2 -uptake is given in Figure 4.

Reaction of Catechol with CuCl in the Presence of Molecular Oxygen.

A mixture of CuCl (2.0 mmol, 198.0 mg) and catechol (2.0 mmol, 220.22 mg) in CH₃CN (2 mL) was stirred in a 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirrer bar and a balloon filled with Ar at 25 °C for 30 min. After the mixture was stirred at 25 °C for 1 h under O₂ atmosphere (balloon), filtration, washing with CH₂Cl₂ (100 mL) and evaporation of the solvent gave black or brown products. The products were analyzed by NMR. The black solid on the filter paper was vacuum dried at 65 °C overnight. IR-spectrum of the solid is given in Figure 6.

HPLC Analysis in the Reaction of Catechol with CuCl in the Presence of Molecular Oxygen.

A mixture of catechol (1.0 mmol, 110.11 mg) and CuCl (1.0 mmol, 99.00 mg) in HPLC grade CH₃CN (1.0 mL) was stirred in a 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirrer bar and a balloon filled with Ar at 25 °C for 30 min. Then, the mixture was stirred at 25 °C under O₂ atmosphere (balloon). Aliquot samples were analyzed by HPLC. Preparation of samples: 0.05 mL of the reaction solution was collected, and a HPLC grade of CH₃CN (2 mL) was added to the solution, and the solution was filtrated using membrane filter.

ESR Analysis of Copper Valency Variation in the Reaction of Catechol with CuCl under Argon Atmosphere.

A mixture of CuCl (0.50 mmol, 49.50 mg) and catechol (0.50 mmol, 55.06 mg) in CH₃CN (0.50 mL) was stirred in 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirrer bar and a balloon filled with argon at 25 °C for 30 min. Aliquot samples were analyzed by ESR. The ESR spectra for the reaction of catechol-CuCl under argon or oxygen atmosphere are given in Figure 7, 8-a, and 8-b.

ESR Analysis by Using DMPO as a Spin Trapping Reagent: Reaction of Catechol with CuCl under Argon Atmosphere.

A mixture of CuCl (0.50 mmol, 49.50 mg) and catechol (0.50 mmol, 55.06 mg) in CH₃CN (0.50 mL) in the presence of DMPO (100 µL) and DMSO (100 µL) was stirred in 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirrer bar and a balloon filled with argon at 25 °C for 30 min. Aliquot samples were analyzed by ESR. The ESR spectra are given in Figure 9.

ESR Analysis by Using DMPO as a Spin Trapping Reagent: Oxidation of Cinnamyl Alcohol Induced by Catechol and CuCl under Oxygen Atmosphere.

A mixture of CuCl (0.50 mmol, 49.50 mg) and catechol (0.50 mmol, 55.06 mg) in CH₃CN (0.50 mL) was stirred in 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirrer bar and a balloon filled with argon at 25 °C for 30 min. Then, gas in the flask was substituted Ar for O₂. A solution of cinnamyl alcohol (0.50 mmol, 67.09 mg) in CH₃CN (0.50 mL) was added to the flask at 25 °C under O₂. Aliquot samples were analyzed by ESR. The ESR spectra are given in Figure 10-a and 10-b.

Attempt of Formation of Catechol-L-CuCl complex.

A mixture of CuCl (2.0 mmol, 198.0 mg) and catechol (2.0 mmol, 220.22 mg) in CH₃CN (2 mL) was stirred in a 25 mL side-necked round bottom flask equipped with magnetic stirrer bar and a balloon filled with Ar at 25 °C for 30 min. After that, ligand (1.0 mmol or 2.0 mmol) was added to the flask and stirred for more 1 h. The precipitated products were taken out from the flask, and then the products were recrystallized by using the combination of CH₂Cl₂ and n-hexane.

参考文献

- (1) Rogic, M. M; Demmin, T. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 5472-5487
- (2) Demmin, T. R.; Swerdloff, M. D.; Rogic, M. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*,
(3) 5795-5804
Babbs, C. F.; Gale, M. J., *Anal. Biol.*, **1987**, *163*, 67-73
- (4) Brenner M. C.; Klinman, J. P., *Biochemistry*, **1989**, *209*, 249
- (5) Whittaker, M. M.; Whittaker, J. W., *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 9610
- (6) Condorelli, G.; Cosranzo, L. L.; De Guidi, G.; Giuffrida, S.; Rizzarelli, E.;
Vecchio, G., *J. Inorg. Biochem.*, **1994**, *54*, 257
- (7) Wada, A.; Harata, M.; Hasegawa, K.; Jitsukawa, K.; Masuda, H.; Mukai, M.;
Kitagawa, T.; Einaga, H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 798-799
- (8) Miyoshi, A; Matsui, H., *J. Phys. Chem.*, **1990**, *94*, 3016-3019
- (9) *Inorganic syntheses*, Vol.1 Chapter 1

参考図書

- (1) “電子スピン共鳴” 大矢 博昭，山内 淳（講談社サイエンティフィック）1989年

4 章. ポリフェノールによる分子状酸素活性化の機構～計算化学的手法による反応解析～

4-1 緒言

フロンティア軌道理論 (Frontier Orbitals Theory) が発表され, およそ半世紀が経過した。軌道相互作用の考え方が, 現代化学に普遍性の高い理論基盤を与えている。1960年代には, 大きな理論の展開があった。それは Woodward-Hoffmann 則の発見と相前後して, フロンティア軌道間の相互作用において, 軌道の位相関係の重要性が見出された。このことは, 分子軌道計算上の近似に依存しない基本的な原理が働いていることを示すものである。その後も, 理論の妥当性を検証するための様々な試みが行われた。その中で, フロンティア軌道間の相互作用に代表される “電子の非局在化” が, 化学反応の進行を表す結合の生成, 開裂の原動力であることが明らかとなった。

軌道理論の観点から化学反応を見つめると, ある2種の化合物がお互いに近づくと, 両者の分子軌道の相互作用が始まる。化合物を構成している結合はゆるみ, 結合に局在化していた電子は, 結合から開放され反応領域へと非局在化を始める。この非局在化電子量は, 遷移状態において最大となる。遷移状態を超えると, 電子は再び新しい結合生成部位へと局在化し, 反応は終結する。従って, 反応の推進力は反応領域への電子の非局在化電子量であり, この非局在電子量が多いほど, 反応は進行し易いと考える。言い換えると, 二つの分子の軌道相互作用 (Orbital Interaction) による電子の非局在化が, 反応を支配すると言える。

フロンティア軌道理論によれば, 分子と分子の相互作用でもっとも重要な働きをするのは, 最高被占軌道 (Highest occupied MO: HOMO) と最低空軌道 (Lowest unoccupied MO: LUMO) である (図 11)。

もし, 相互作用に関与する二つの分子がともにあまり大きくなければ, 一方の分子の最高被占軌道とその次の準位の被占軌道との間にはある程度の大きさのエネルギー差がみられる。また, 相手分子の最低空軌道とそれより一つ準位の高い空軌道との間にもある程度の大きさのエネルギー差がみられる。そのような条件が成り立てば, 一方の分子のすべての被占軌道ともう一方の分子のすべての空軌道の組み合わせの中で, 最高被

占軌道と最低空軌道との組み合わせだけに注目し,他をすべて無視するという簡略化を行っても間違った結論に到達することは無いと思われる.これがフロンティア軌道理論の考え方の前提である.

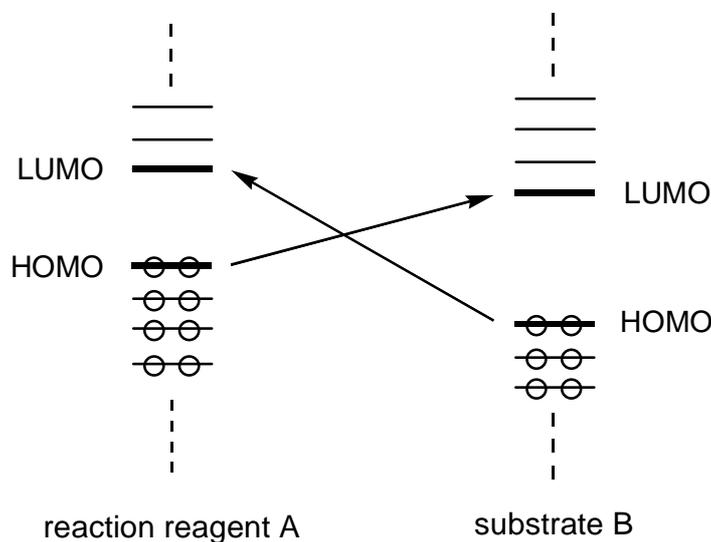


Figure 11. Interaction of Frontier orbitals.

分子のサイズが大きく HOMO と LUMO の相互作用だけでは不十分となる。藤本らは分子が反応に際して電子の授受を行う反応軌道を相互に生み出すことを分子の全分子軌道間の相互作用を考慮して明らかにし,『Paired Interacting Orbitals (PIO)』を用いる反応の解析法¹として,また,一連の分子が,特定の相手分子との間でこの反応軌道を通じて電子の授受を行う際の定量的な難易度を比較する方法『Localized Frontier Orbital Calculation (LFO 計算)』を提唱した². この考えに基づき開発されたのが,反応軌道間相互作用解析プログラム LUMMOXTM (住友化学工業(株))である.

この章では,シンナミルアルコールの酸化反応の活性種と考えられるカテコール銅錯体に対し,酸素分子がどの位置(location)に,そしてどのような形,様式(type)で配位するのか,またカテコール 塩化第一銅によりどのようにして分子状酸素は活性化されるのかを,LUMMOXTMを用いた計算化学的手法により考察する.

4-2 計算化学ソフト“LUMMOXTM”について¹

(1) LUMMOXTMの構成

LUMMOXTM³は、以下の5つのモジュールで構成されている。

-) 入力：Z-matrix 法による3次元構造データの発生
-) 分子軌道法：拡張ヒュッケル法
-) 相互作用解析評価：藤本らによるPIO法¹
-) 反応性指数：藤本らによるLFO法²
-) 出力：計算結果リストおよび相互作用軌道の等高線図

(2) 簡便な反応性の尺度：非局在化電子量 (ΣOP)

先に述べたように、化学反応の推進力は、反応領域への電子の非局在化電子量である。そして、この非局在化電子量が多いほど、反応は進行し易い。LUMMOXTMでは、この非局在化電子量を反応性の尺度としている。非局在化電子量、つまり overlap population の総和 (OP) とは、2つの化合物 A と B が配位構造を形成した際にそれら二者間に存在する電子の総量を示すものである。LUMMOXTMでは、これを配位結合力と考えている。さらに、個々のPIOごとに分けて解析することにより、相互作用を軌道レベルで的確に理解することができる。よって、配位力すなわち反応性の尺度は、 OP により評価する。

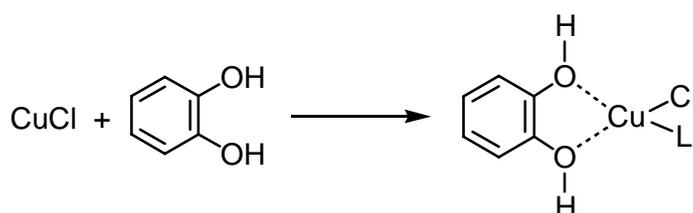
非局在化電子量の算出手順を以下に示した。

- 1) 遷移状態のモデリング：同種類の反応は、同じ反応機構、基本的に同じ遷移状態を経て進行する。この考えに基づいて、活性中心部分の構造だけは ab initio 計算を利用し、それ以外の部分は既知の分子構造データを用いて仮想的な遷移状態をモデリングする。
- 2) PIO 解析：藤本らの方法に基づき、LUMMOXTMで計算する。
- 3) 非局在化電子量：全PIOの overlap population の総和 (OP) をもって非局在化電子量とする。

4-3 LUMMOX™を用いたカテコール-銅(I)錯体と分子状酸素との相互作用

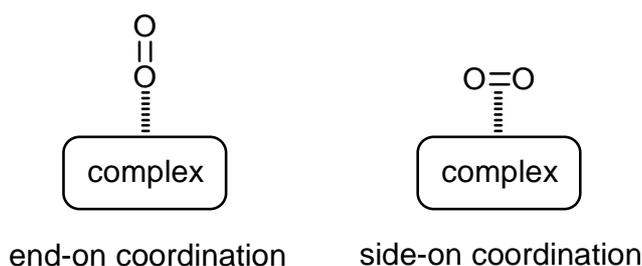
(1) 分子状酸素とカテコール-銅(I)錯体との相互作用

カテコール 塩化第一銅錯体と分子状酸素の、初期の配位様式について検討した。カテコール 塩化第一銅錯体は、以下のように配位すると考えられる^{5, 6}。その後、



酸素分子がどのようにしてこの錯体に配位するのか検証した。カテコール 塩化第一銅錯体に対する酸素分子の配位形式は無数にあるため、可能性のある数種類の配位形式についてのみ検証した。

下図に示すように、酸素分子の配位様式は2種類ある。そのうちの1つは酸素分子が錯体の真上から垂直に配位する end-on 配位、そしてもう1つは酸素分子が錯体に平行に配位する side-on 配位である。



今回は、錯体との距離が 2.5 Å のところに酸素分子が配位したモデルを用いて計算した。Eigenvalue の値により、酸素分子とカテコール 銅錯体の主たる相互作用は PIO-1 に、副次的なそれは PIO-2 に示されていることが分かった。酸素分子の位置は、銅原子上から徐々にベンゼン環へ移動し、以下の PIO 等高線図に示すようなモデルについて考察した (図 12~15)。

Figure 12. Contour map of PIO-1 of catechol-CuCl-O₂ complex.
(O₂ end-on-top coordination)

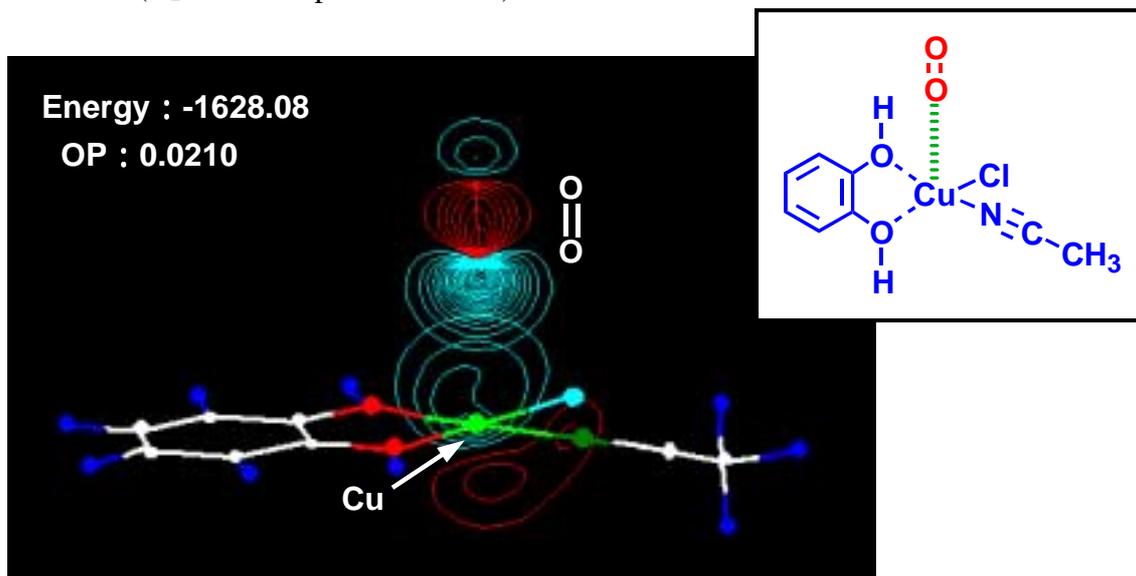


Figure 13. Contour map of PIO-1 of catechol-CuCl-O₂ complex.
(O₂ side-on coordination)

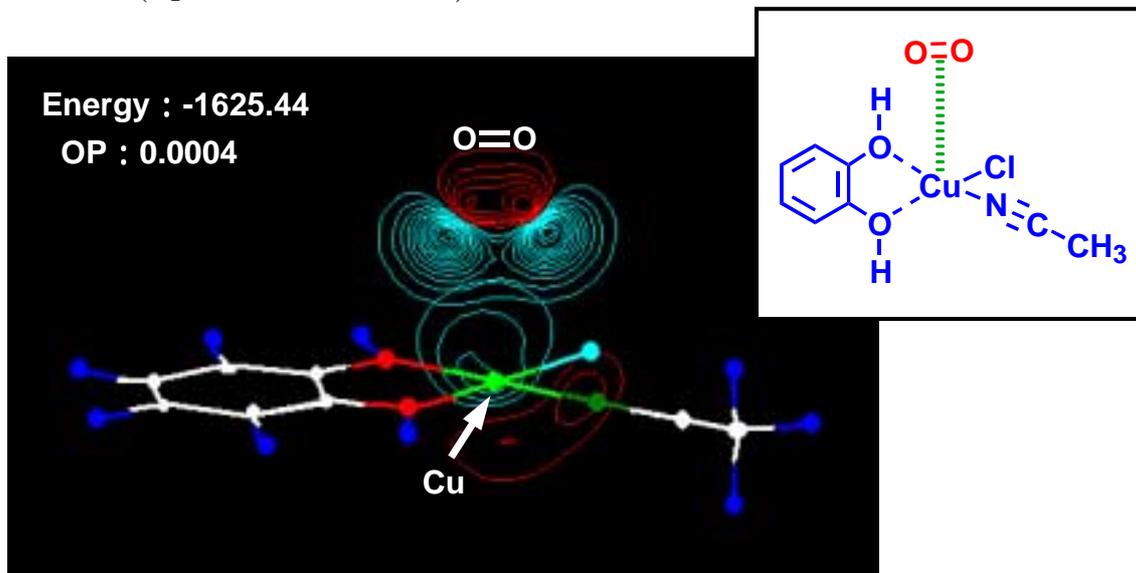


図 12 に示したように、銅原子上に end-on-top 配位した酸素分子は、カテコール銅錯体と同じ位相で相互作用しており、反応性の尺度を示す OP の値が正の値を示している。すなわち、このモデルでは、カテコール銅錯体は酸素分子と引力的相互作用をする。このことを軌道論的視点から見る。酸素分子の HOMO と LUMO は縮重しており、スピンは 3 重項状態にある。酸素分子が銅原子に配位すると、酸素分子の充填軌道から銅錯体の空軌道に電子が非局在化する(図 12, PIO-1)。同時にわずかではあるが、PIO-2, PIO-3 に錯体の HOMO から酸素分子の HOMO (EH 法ゆえに HOMO となっているが実質は LUMO として働く)への電子の非局在化が混じっているのが認められた。この酸素分子の HOMO への電子の非局在化が O=O 結合を弱める。図 13 には、カテコール銅錯体に酸素分子が side-on 配位した際の PIO-1 を示している。図 12 に示した結果と同様に、図 13 に示した結果からも銅原子と酸素分子間の引力的相互作用が見られるが、エネルギー値を見ると、side-on 配位よりも end-on-top 配位の方が安定である。

図 14 は銅原子とベンゼン環の中間に、図 15 はベンゼン環の中心に酸素分子を end-on 配位した際の PIO 等高線図を示している。これら 2 つの結果は共に、負の OP 値を示しており、図 12 に示したエネルギー値と比較すると不安定である。従って、酸素分子はカテコール銅錯体の銅原子上に end-on-top 配位することが支持される。すなわち、酸素分子がカテコール銅錯体の銅原子上に end-on-top 配位した状態が、カテコール銅錯体による分子状酸素活性化の初期過程の状態である。

Figure 14. Contour map of PIO-1 of catechol-CuCl-O₂ complex.
(O₂ end-on-top coordination)

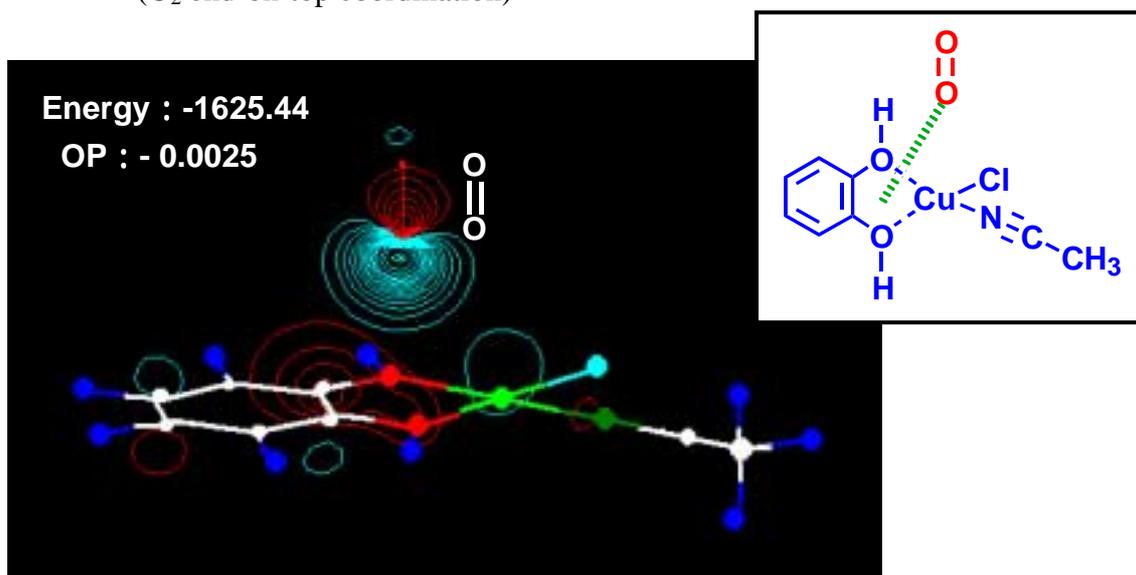


Figure 15. Contour map of PIO-1 of catechol-CuCl-O₂ complex.
(O₂ end-on-top coordination)

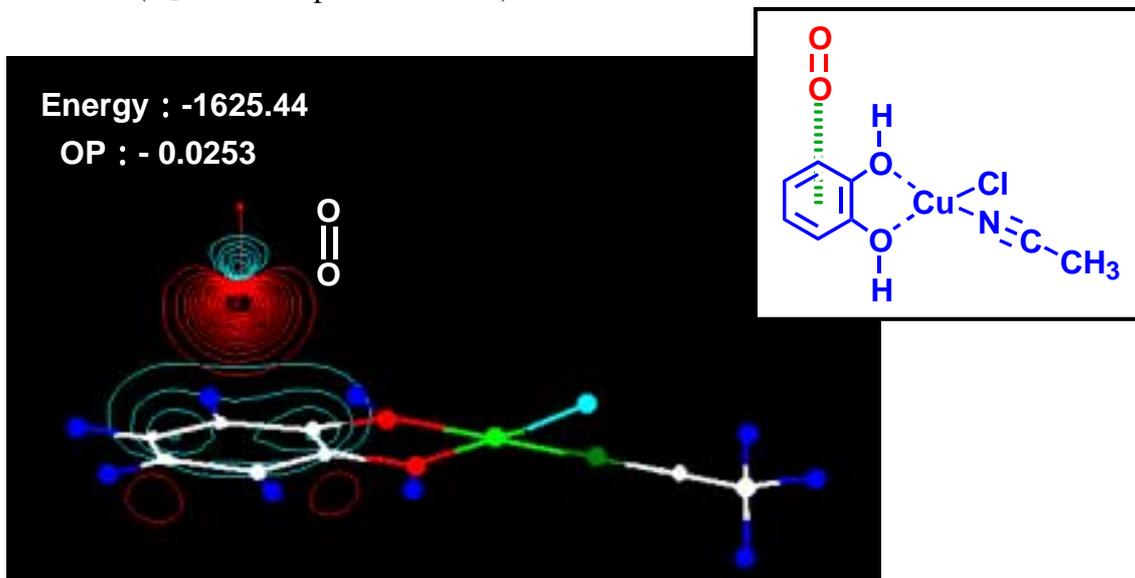


表 6 には、カテコール 銅錯体の様々な位置・様式で酸素分子を配位させた際の結果をまとめている。これらの結果は、カテコール 銅錯体の銅原子上に end-on-top 配位させたモデルが、カテコール 銅 酸素複合体形成の初期構造であることを強く示唆している。

Table 6. Extended Hückel energy and OP in the interaction between catechol- CuCl complex and molecular oxygen.

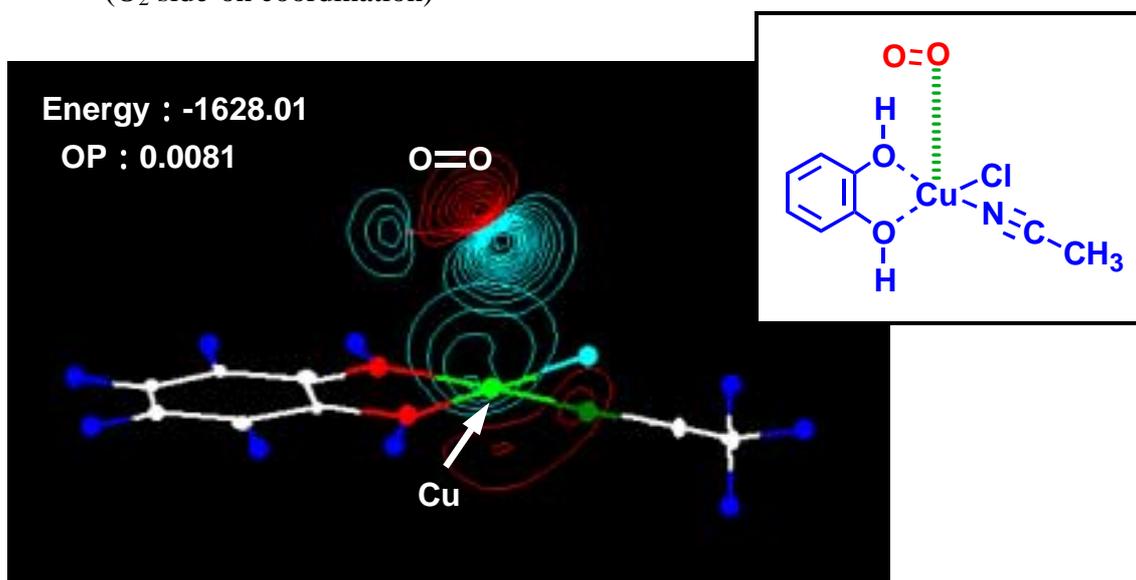
Coordination type	Energy (eV)	OP	Coordination type	Energy (eV)	OP
	-1628.08	0.0210		-1625.44	-0.0024
	-1625.44	0.0004		1625.44	-0.0253
	-1625.44	-0.0025		-1625.44	-0.0494

(2) カテコール-銅(I)錯体形成過程の検討

先に述べたように、酸素分子がカテコール 銅錯体の銅原子上に end-on-top 配位し、カテコール 銅 酸素複合体が形成されることが示唆された。続いてその後の過程を考察した結果、図 16 に示すように、酸素分子がカテコールの方へ倒れた side-on 配位状態になることが支持された。

Figure 16 Contour map of PIO-1 of catechol-CuCl-O₂ complex.

(O₂ side-on coordination)



side-on 配位状態となった後、銅原子と酸素原子間の距離を縮小 (2.0)しながら、カテコール水酸基の一方の水素原子が酸素分子に向かって垂直に立ち始める (図 17)。その後、その水素原子を引き抜き、銅ヒドロペルオキシド (Cu-OOH) に変化する (図 18)。続いて、カテコール水酸基のもう一方の水素原子も同様に Cu-OOH に向かって垂直に立ち上がる (図 19)。

Figure 17. Contour map of PIO-1 of catechol-CuCl-O₂ complex.

(Cu-OOH interaction (Cu-OOH: 2.0))

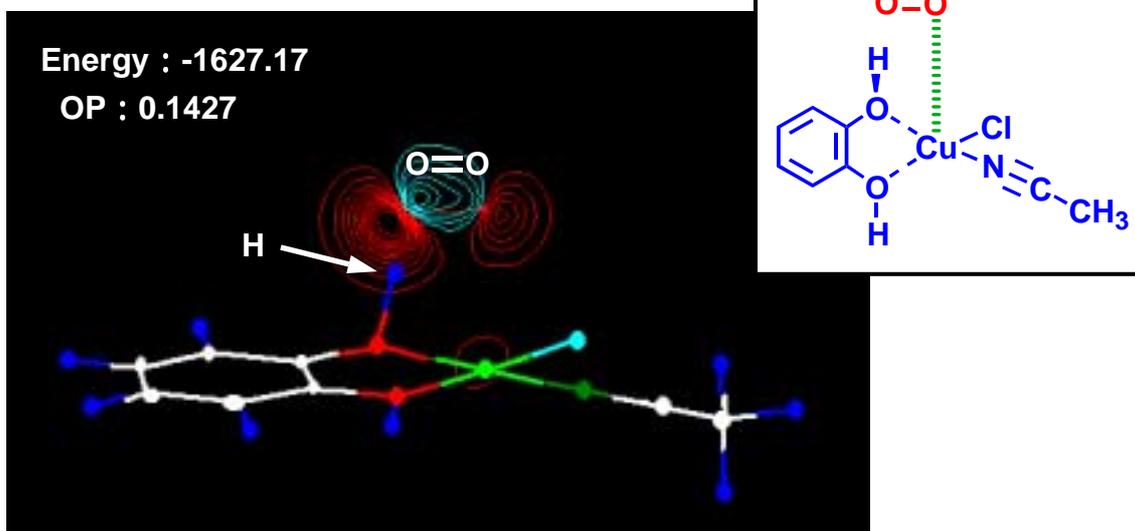


Figure 18. Contour map of PIO-1 of catechol-CuCl-O₂ complex.

(Cu-OOH interaction (Cu-OOH: 2.0))

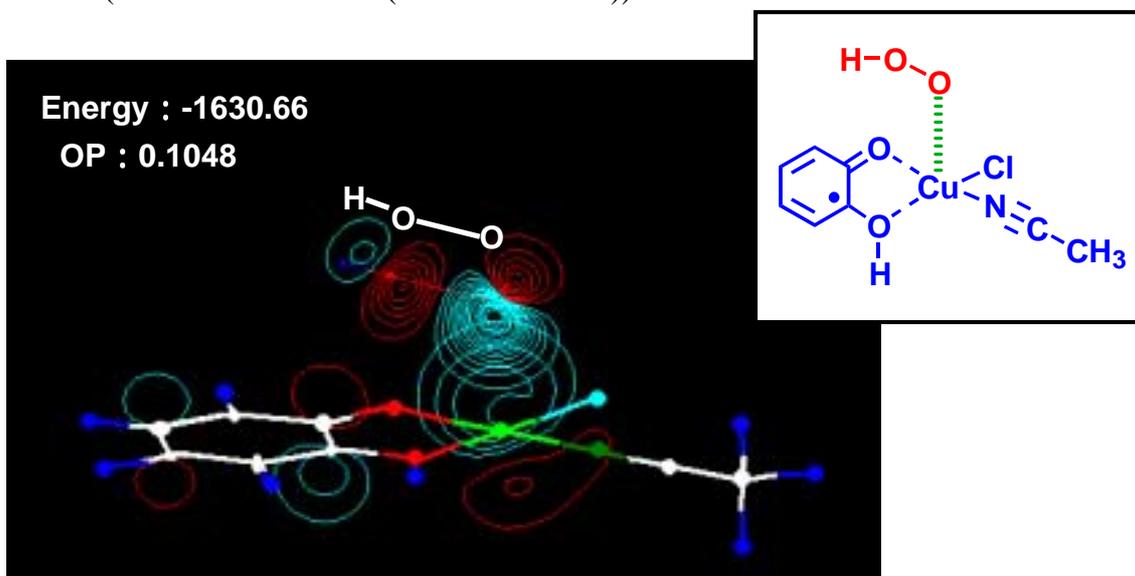
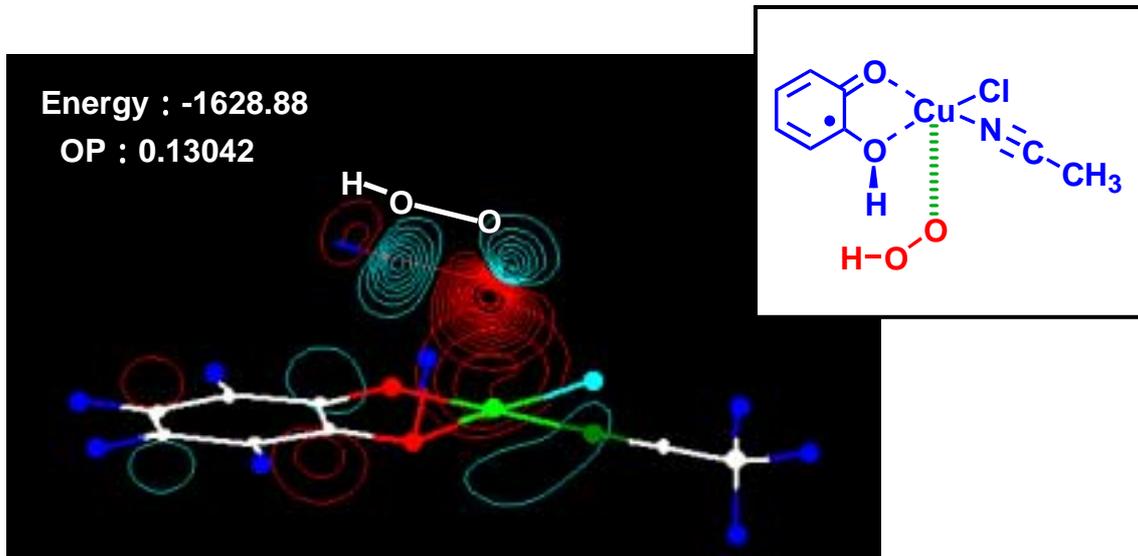
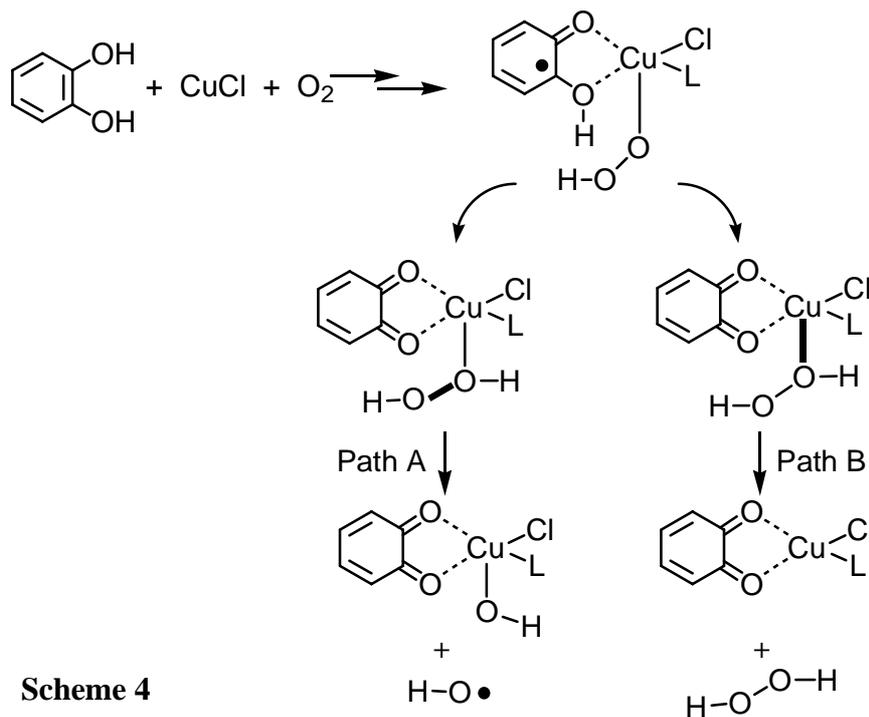


Figure 19. Contour map of PIO-1 of catechol-CuCl-O₂ complex.

(Cu-OOH interaction (Cu-OOH: 2.0))



その後，カテコール水酸基のもう一方の水素原子も引き抜きかれ，最終的には Cu-OHOH が形成されることが示唆された (Scheme 4)．そこで，形成された Cu-OHOH から，続いてどのような経路をとり得るのか考察したところ，以下に示すような 2 種類の経路が考えられる．経路 A では，銅ヒドロペルオキシドから銅ヒドロキサイド (Cu-OH) とヒドロキシルラジカル (HO•) が，経路 B では塩化銅と過酸化水素が形成される．これら 2 種類の経路のうち，どちらが適当な経路であるのか検証した．



経路 A (ヒドロキシルラジカルの脱離) を検討した結果は図 20 に、経路 B (過酸化水素の脱離) のそれは図 21 に示す。図 20, 21 に示されているように、CuOH-OH 間の OP 値は -0.1954、Cu-HOOH 間のそれは 0.0578 であった。この結果は、過酸化水素よりもヒドロキシルラジカルの方が、カテコール銅酸素複合体から離脱し易いことを表している。従って、カテコールと塩化第一銅と分子状酸素との反応からは、銅ヒドロキไซด์(Cu-OH)とヒドロキシルラジカルが生成することが、LUMMOX™ による計算化学的に、より合理的な経路であることが示された。

Figure 20. Contour map of PIO-1 of catechol-CuCl-O₂ complex.
(HO• elimination)

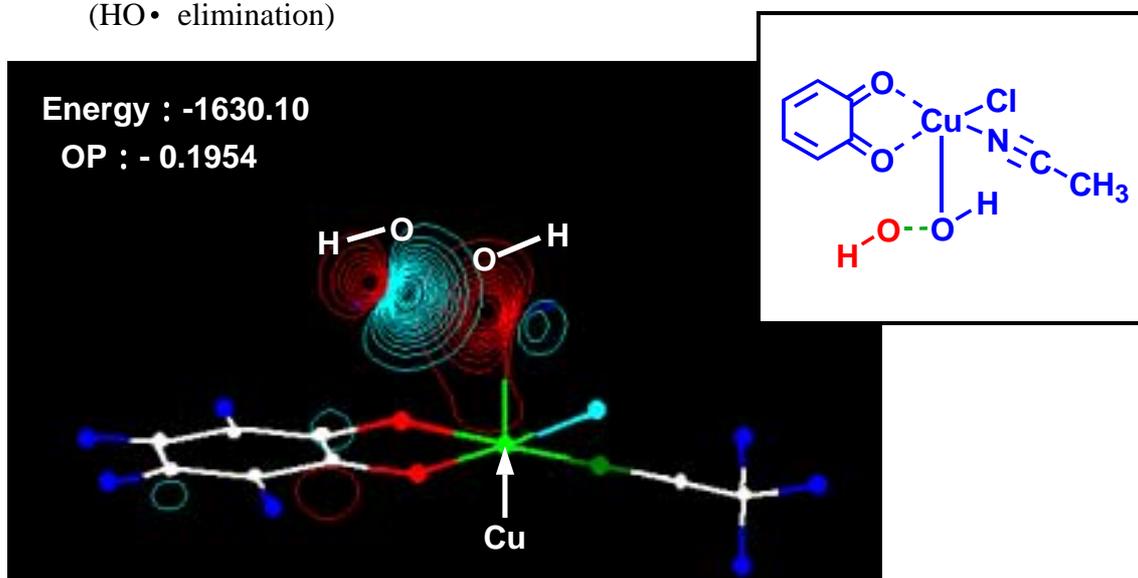
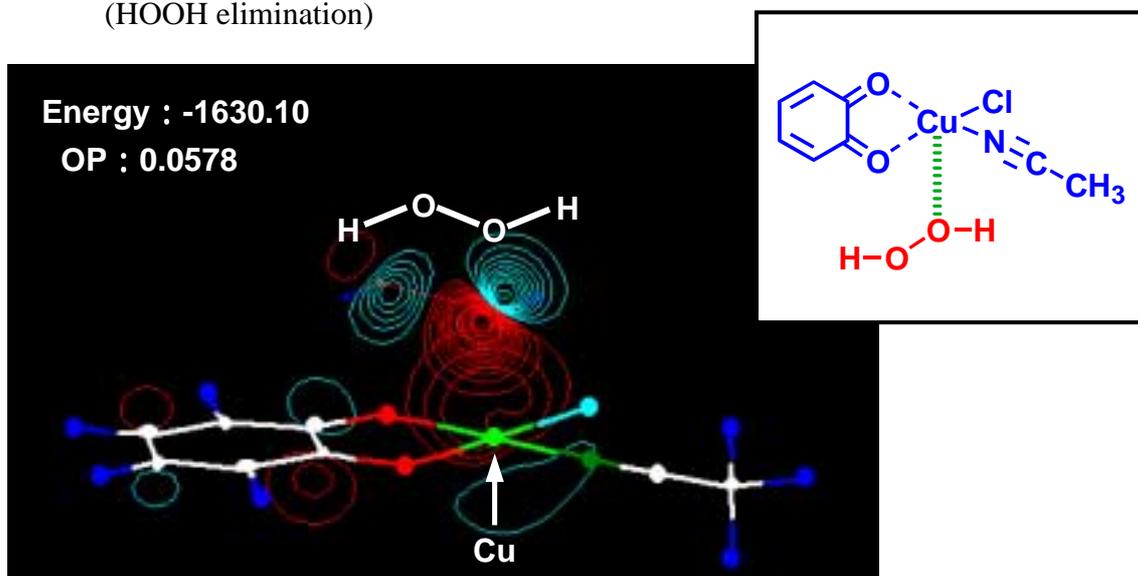


Figure 21. Contour map of PIO-1 of catechol-CuCl-O₂ complex.
(HOOH elimination)



4-4 分子状酸素活性化機構の検証

以上の結果をもとに、カテコール 塩化第一銅による分子状酸素の活性化機構を、先に述べた各々の状態での複合体について、エネルギー的視点から評価した(図 22)。錯体 8, 11 に関しては、前段階の錯体よりエネルギー的に不安定となるが、それほど大きなエネルギーギャップではないため、妥当な経路であると思われる。

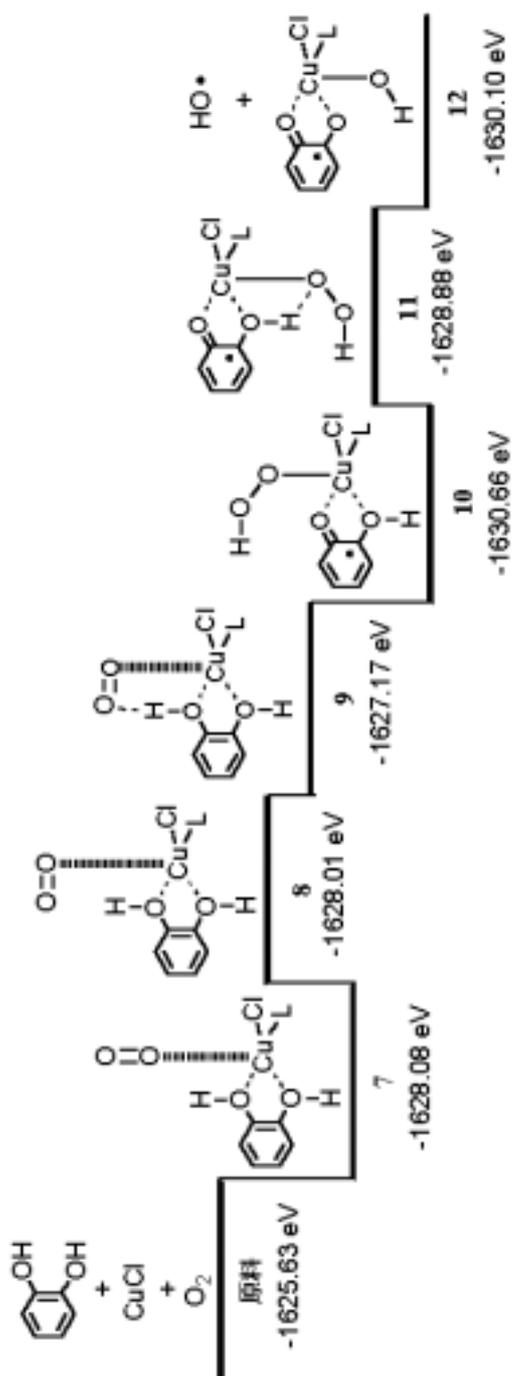
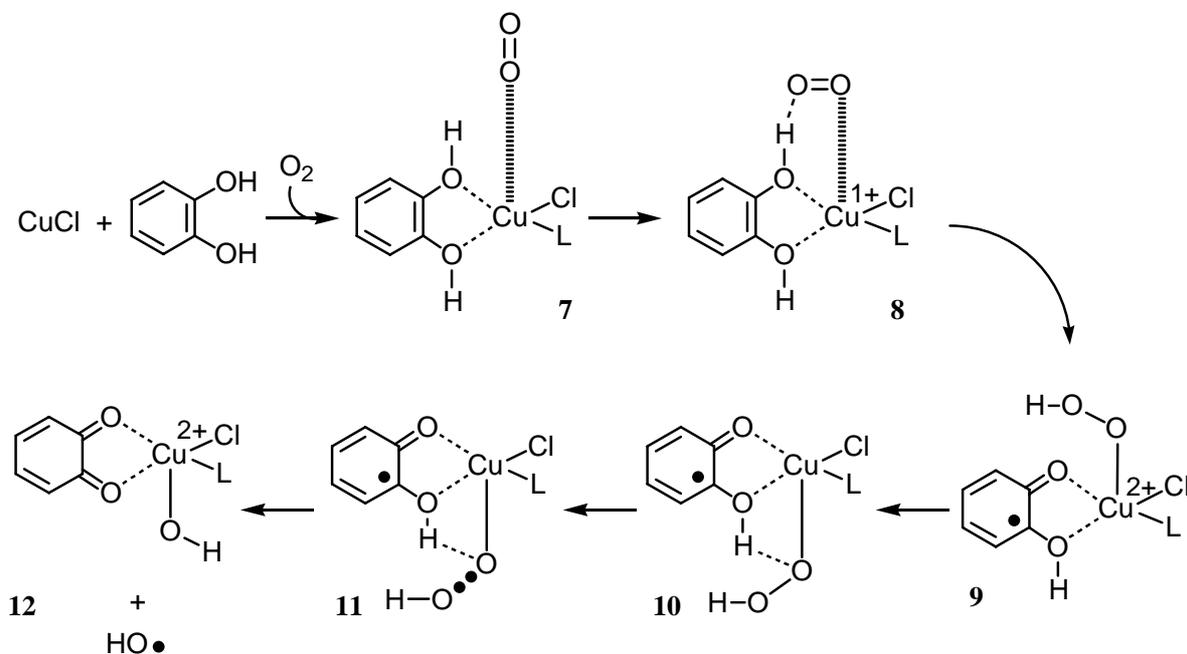


Fig. 22 Energy diagram in terms of reaction pathways for activation of molecular oxygen induced by catechol-CuCl complex.

以上の結果から，カテコール 塩化第一銅による分子状酸素の活性化機構についてまとめる（スキーム 5）。

カテコール 銅錯体に end-on-top 配位した酸素分子 7 が，カテコールの方へ倒れながら，side-on 配位した錯体 8 となる。カテコール水酸基の一方の水素を引き抜き，銅ヒドロペルオキサイド 9 となる。その後，もう一方のカテコール水酸基との相互作用を持ち，O-O 結合の均一開裂を経て（10 → 11），最終的に銅ヒドロキサイド（Cu-OH）12 とヒドロキシルラジカル（HO•）に変化する。その結果，生成した HO•により，アルコールがアルデヒドに酸化されると思われる。また，以下に示した機構は，2 章・3 章で述べた実験結果と対応したものとなっている。



Scheme 5

参考文献

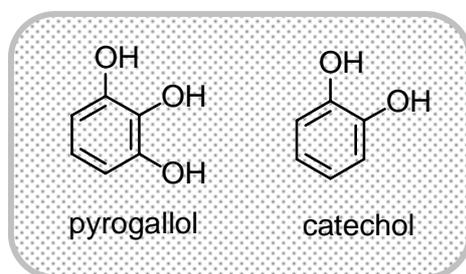
- (1) Shiga, A., *JCPE J.*, 13, **2001**, 85-96
- (2) Fujimoto, H., *Acc. Chem. Res.*, 20, **1987**, 448
- (3) Fujimoto, H.; Hatakeyama, K.; Kawasaki, S.; Sasaki, T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2, **1991**, 989
- (4) LUMMOXTM, Sumitomo Chemical Co., Ltd. **1999**
- (5) Rogic, M. M; Demmin, T. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 5472-5487
- (6) Demmin, T. R.; Swerdloff, M. D.; Rogic, M. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 5795-5804

参考図書

- (1) “有機反応軌道入門” 藤本 博 (講談社サイエンティフィック) 1998 年
- (2) “有機反応と軌道概念” 藤本 博, 山辺 信一, 稲垣都士 (化学同人) 1986 年

総括

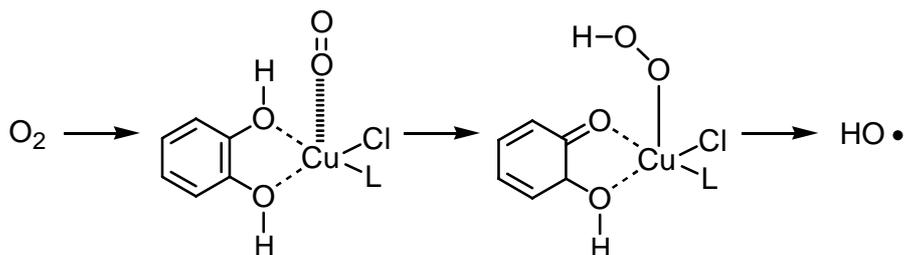
ポリフェノール類の酸化促進剤としての作用は、それらに含まれるピロガロール、あるいはカテコールユニットが関与する。水溶媒中では、ピロガロールあるいはカテコールは、酸素分子に一電子移動を起こし、以下に示すように生成するスーパーオキシドアニオン (O_2^-) から過酸化水素が生成する。その結果、ヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$) が形成される。一方、非水溶媒中では、カテコールは金属塩と錯化することにより分子状酸素が活性化され、ヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$) が生成する。いずれの場合も、ピロガロールあるいはカテコールによる分子状酸素の活性化から生成する酸化反応活性種は、ヒドロキシルラジカル ($HO\cdot$) であると言える。これらの結果は、従来抗酸化剤と言われていたポリフェノール類が、金属塩との組み合わせにより、酸化促進剤としても作用することが明らかとなった。また、このことは、ポリフェノール類が酸素分子と関わる化学、すなわちポリフェノール類の抗酸化剤あるいは酸化促進剤としての作用を、分子論的に理解する際の基本的な情報になると思われる。



In Aqueous Solution



In Non-Aqueous Solution



謝辞

本研究の遂行ならび本論文の作成にあたり，終始暖かく御指導，御鞭撻を賜りました高知工科大学大学院工学研究科教授 細川 隆弘 先生に，心より深く感謝申し上げます．

本研究を進めるにあたり，研究の指針の御指導を賜りましたサントリー株式会社基礎研究所 永見 憲三 氏，中原 光一 氏，乾 隆子 氏，商品開発研究所 幹 渉 氏に深く感謝申し上げます．

計算化学ソフト LUMMOXTMの原理ならびに，本研究に関する数々の御討論を賜りました住友化学工業株式会社筑波研究所 志賀 昭信 氏，LUMMOXTMの使用方法に関する詳細について御指導を賜りました同研究所 本木 隆夫 氏に深く感謝致します．

ESR の測定に関して，高知工科大学生命環境工学講座教授 河野 雅弘 先生に御指導，御討論を賜りましたことに深くお礼申し上げます．また同講座助手 西沢 真裕 先生，ほか同講座の皆様には日々ご親切にして頂き，感謝の気持ちでいっぱいです．

本研究を遂行するにあたり，御助言下さいました高知工科大学大学院工学研究科助教授 小廣 和哉 先生に深く感謝致します．

実験に御協力をいただきました今井 拓郎 様に深くお礼申し上げます．また，日頃の研究活動において大変お世話になりました細川研究室の同輩，後輩の方々に深く感謝致します．

平成 14 年 3 月 20 日

荅口 由貴