

カテキン類によるビタミン E 再生作用の速度論的研究

(愛媛大院 理工) ○新田晃子, 長岡伸一, 小原敬士, 向井和男

【序論】

活性酸素・フリーラジカルに対するフラボノイド類 (ポリフェノール) の抗酸化作用については、これまで様々な研究が行われている。植物の葉に存在する茶カテキン類は、日本人になじみの深い緑茶に高濃度 (緑茶の水溶性抽出物の 10%以上) で含まれており、発癌抑制作用・血漿酸化抑制作用・LDL 酸化抑制作用などの効果が期待できるとの報告がなされている。¹ これらの効果は茶カテキン類の抗酸化作用によるものと考えられる。以前われわれは、ビタミン E モデル化合物を用いて茶カテキン類のビタミン E 再生反応について研究を行った。² 今回は、茶カテキン類 (EC, ECG, EGC, EGCG, Fig. 1) 及びその各環のモデル化合物 (A 環: MR, G 環: MG, B 環: MC, Fig. 1) の天然ビタミン E (α -Tocopherol, α -TocH) 再生反応速度定数 (k_r) を測定し、反応の構造活性相関に関する検討を行った。

【実験】

Double-Mixing Stopped-Flow 分光光度計を用いて、エタノール: 水 (5:1, v/v) 溶液中における茶カテキン類 (EC, ECG, EGC, EGCG) 及びその各環のモデル化合物 (MR, MG, MC) の α -Tocopherol 再生反応速度定数 (k_r) を、温度を変えて (15.0–37.0°C) 測定した。溶媒はすべて 15 分間の窒素バブリングを行った。まず、Aroxyl radical ($\text{ArO}\cdot$) ($\lambda_{\text{max}} = 376 \text{ nm}, 580 \text{ nm}$) と α -Tocopherol を混合し (反応式(1))、その 3 秒後に、生成した α -Tocopheroxyl radical (α -Toc \cdot) と茶カテキン類との反応を行い (2)、 α -Tocopheroxyl radical の可視吸収 ($\lambda_{\text{max}} = 428 \text{ nm}$) の減衰曲線を解析し、 k_r の値を求めた。

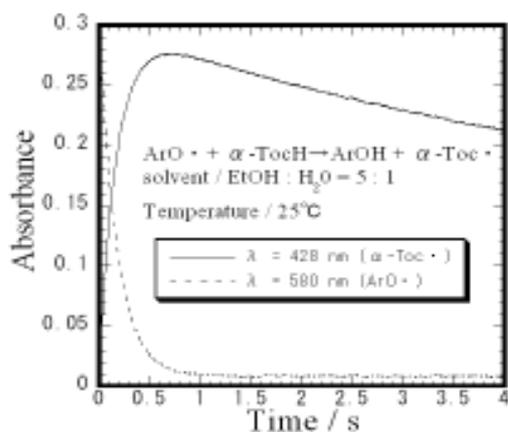
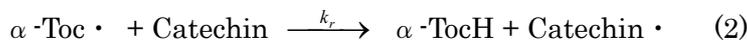
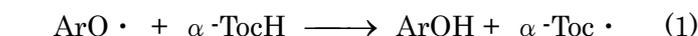
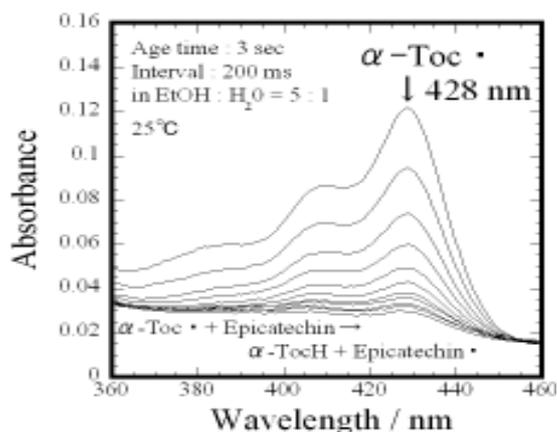
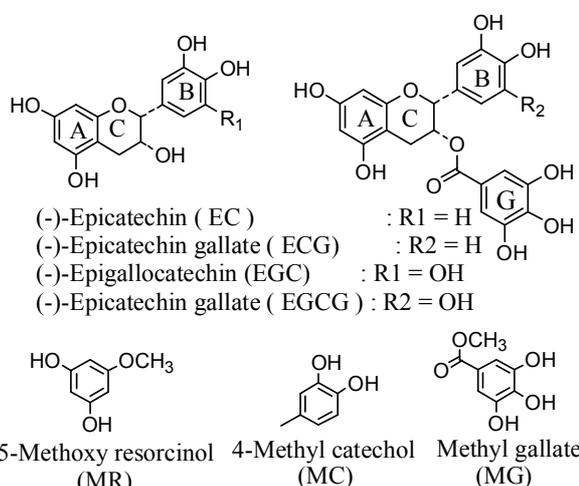
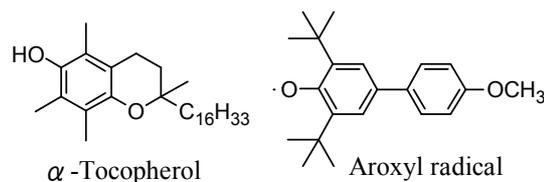
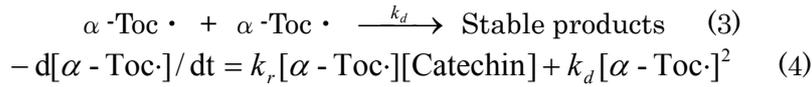
Fig. 3 $\text{ArO}\cdot$ の減衰と $\alpha\text{-Toc}\cdot$ の生成曲線Fig. 4 Epicatechin と $\alpha\text{-Toc}\cdot$ の反応

Fig. 1 茶カテキン類とモデル化合物の構造式

Fig. 2 α -Tocopherol と Aroxyl ラジカルの構造式



$$[\alpha\text{-Toc}\cdot] = \frac{k_r[\text{Catechin}][\alpha\text{-Toc}\cdot]_0 \exp(-k_r[\text{Catechin}]t)}{k_d[\alpha\text{-Toc}\cdot]_0 + k_r[\text{Catechin}]} \quad (5)$$

$$1 - \frac{k_d[\alpha\text{-Toc}\cdot]_0}{k_d[\alpha\text{-Toc}\cdot]_0 + k_r[\text{Catechin}]} \exp(-k_r[\text{Catechin}]t)$$

【解析】

茶カテキン類の α -Tocopherol 再生反応 (2) は、同時におこる α -Tocopheroxyl radical の二分子反応 (3) と競争する。二分子反応の反応速度定数 (k_d) は $1.15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (25°C) である。そのため α -Tocopherol 再生反応速度は(4)で表される。解析は(4)を積分して得た(5)³を用いてシミュレーションを行い、実験で得た α -Tocopheroxyl radical 減衰曲線にフィッティングして k_r を得た。

【結果と考察】

25°Cにおける k_r と、その温度依存性から Arrhenius の式 ($k_r = A \exp(-E_a/RT)$) を用いて得られる活性化エネルギー (E_a)、頻度因子 (A) を Table 1 に示した。 k_r の値は EC < ECG < EGC < EGCG の順に増加し、EGCG が最も高い活性を示した。カテコール構造とピロガロール構造の違いは水酸基の数であるが、 k_r の値は EC < EGC、ECG < EGCG となったことから水酸基を多く持つピロガロール構造の方が、活性が高いことがいえる。また各環のモデル化合物の k_r は MR << MG < MC となったことから、カテキン類の抗酸化作用は G 環と B 環による寄与が大きいことがわかった。水酸基を多くもつ MG よりも MC の方が高い活性を示す理由として、MG は電子吸引性の置換基を持つことが考えられる。 E_a の値は EGCG ~ EGC < ECG ~ EC となり、おおむね k_r が大きい物質ほど E_a が低くなった。

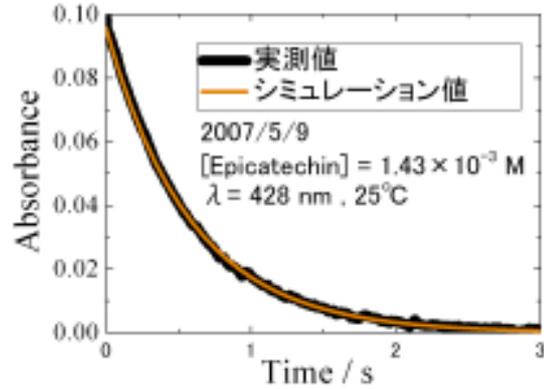


Fig. 5 実測値とシミュレーション値

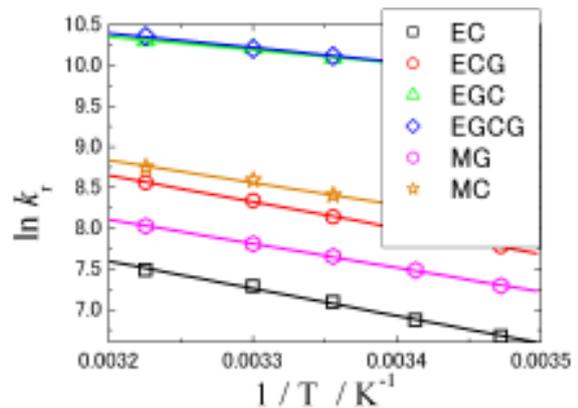


Fig. 6 茶カテキン類の Arrhenius 曲線

Table.1 茶カテキン類の 25°Cにおける反応速度定数と活性化エネルギーと頻度因子

Antioxidant	反応速度定数 k_r / $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (25°C)	活性化エネルギー E_a / Jmol^{-1}	頻度因子 A / $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Epicatechin (EC)	1.20×10^3	$2.79(\pm 0.11) \times 10^4$	$1.43(\pm 0.06) \times 10^8$
Epicatechin gallate (ECG)	3.43×10^3	$2.68(\pm 0.05) \times 10^4$	$1.75(\pm 0.37) \times 10^8$
Epigallocatechin (EGC)	2.41×10^4	$1.35(\pm 0.06) \times 10^4$	$5.74(\pm 1.63) \times 10^6$
Epigallocatechin gallate (EGCG)	2.47×10^4	$1.46(\pm 0.05) \times 10^4$	$9.12(\pm 2.11) \times 10^6$
5-Methoxy resorcinol (MR)	$\sim 10^{-1}$		
Methyl gallate (MG)	2.11×10^3	$2.46(\pm 0.37) \times 10^4$	$4.26(\pm 0.63) \times 10^7$
4-Methyl catechol (MC)	4.48×10^3	$2.20(\pm 0.09) \times 10^4$	$4.30(\pm 0.34) \times 10^7$

^{*1} Z. Wang et al., *Cancer Res.*, 54, 3428 (1994)

^{*2} K. Mukai et al., *Free Radical Biol. Med.*, 38, 1243 (2005)

^{*3} A. Watanabe et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 5438 (2000)