

<報 文>

カリックス [4] レゾルシアンレーン及び類似体 の合成と抗酸化活性

Synthesis of the Calix[4]resorcinarene Derivatives and their Analogue and study
on the Antioxidative Activity

職業能力開発総合大学校東京校

前田みづほ

カリックス[4]レゾルシンアレーン及び類似体の合成と抗酸化活性

職業能力開発総合大学校東京校

前田 みづほ

Synthesis of the Calix[4]resorcinarene Derivatives and their Analogue and study on the Antioxidative Activity

Mizuho MAEDA

要約

カリックス[4]レゾルシンアレーンは、レゾルシノールを構成単位とする環状四量体化合物の総称であり、その上部に位置する八つのヒドロキシ基は水素結合による環状ネットワークを形成していることが知られている。そのため、ポリフェノール類のラジカル消去活性と同様な機能を有すると考え、いくつかのカリックス[4]レゾルシンアレーンを合成しそのラジカル消去活性を測定した。また、ピロガロールを構成単位とする類似構造のカリックス[4]ピロガロールアレーンについても合成し、同様にラジカル消去活性を検討した。なお、その強弱の比較に用いたRS50 : nmolは、ラジカルを半減させる能力であり、この値が小さいほどラジカル消去活性が大きいことを示している。

ラジカル消去活性を比較検討した結果、ラジカル消去活性が小さなレゾルシノール（大きなRS50を持つ）であっても、環状四量体として分子内水素結合を有するようになるとRS50が飛躍的に減少し、活性が増大することが分かった。また、高い活性をもつピロガロールを構成単位とするカリックス[4]ピロガロールアレーンも環状四量体とすることにより、カリックス[4]レゾルシンアレーン同様にRS50が飛躍的に減少した。このことから、ラジカル消去活性に分子内水素結合状態が大きく関与していることが明らかとなった。さらに、RS50とケミカルシフトの間に一定の関係を見出すこともできた。

I はじめに

カリックス[4]レゾルシンアレーン（以下CRA）は、レゾルシノールと様々なアルデヒドを酸触媒下で環状縮合反応させることにより合成される環状四量体の総称であり、カリックス[4]レゾルカレン・レゾルカレン・カリックスレゾルシン[4]アレーンなどと呼ばれることもある。また、構成単位をレゾルシノールからピロガロールに変えたカリックス[4]ピロガロールアレーン（以下CPA）も同様に環状四量体である。CRA及びCPAは、四つの芳香環に囲まれた疎水性

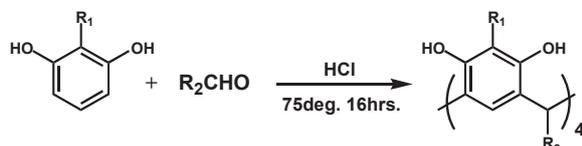
分子空孔を持ち、その空孔内にトルエンのような疎水性有機ゲスト分子を包接することが以前から知られており、著者も芳香族炭化水素に対するCRAの包接能力について報告している⁽¹⁾⁽²⁾。また、CRAおよびCPAはその分子空孔上部に位置する八つ（CPAについては12個）のヒドロキシ基が互いに水素結合を形成し、全体として水素結合による環状ネットワークを形成して分子の安定化を図っている。著者らは、この水素結合ネットワークに着目し、CRAとゲスト分子との水素結合相互作用について詳細に検討し、ヒドロキシ基に対してゲスト分子が相互作用する場合、水素結合ドナー、水素結合アクセプターあるいはその両

方の特性を併せ持つもの大きく三つに分類できることを見出し報告している⁽³⁾⁽⁴⁾。一方、ワインなどに含まれるポリフェノールによる抗酸化活性（ラジカル消去活性）が脚光を浴び始めるとフェノール部を含む様々な有機化合物についてその能力が検討されるようになった⁽⁵⁾。さらに、ハーブ⁽⁶⁾や木酢液⁽⁷⁾など様々な植物等に含まれる成分の抗酸化活性に関する研究も盛んに行なわれるようになった。抗酸化活性とその評価方法を正しく理解することは、職業技術校・職業高校・専門学校等における食品や医療関係を含めた幅広い職業能力開発の分野において、指導員ひいては訓練生等に大いに役立つものとする。そこで、著者もヒドロキシ基を多数持つCRAおよびCPAについて数多くの合成を手掛けてきたので、これら化合物の新しい機能性として抗酸化活性の有無とその強弱に及ぼす分子内水素結合やヒドロキシ基の電子密度との関係について検討したので報告する。

II 実験

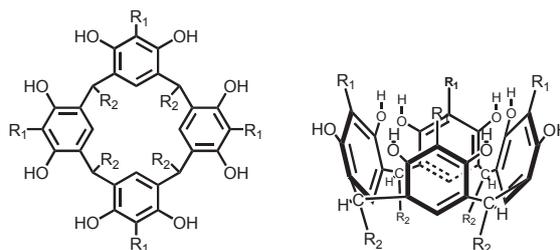
1 CRAの合成

CRAの基本的な合成方法は、スキーム1に示すようにレゾルシノールとアルデヒドを塩酸触媒下75℃で16時間以上縮合反応を行なうものである（この温度・時間以上なら可）。



スキーム1 CRAの一般的な反応式

合成物の解析は、日立製作所製核磁気共鳴分光装置（R-24B）と島津製作所製赤外分光装置（Affinity-1）を用いて行なった。なお、いずれのCRAもコンプレクソメーションをとるため、図1に示したような、お椀構造をしている。図中R2（アルデヒド由来）の



CRA-I:R₁=H, R₂=C₂H₅
 CRA-II:R₁=H, R₂=C₅H₁₁
 CRA-III:R₁=CH₃, R₂=H
 CRA-IV:R₁=CH₃, R₂=C₅H₁₁
 CRA-V:R₁=CH₃, R₂=CH₂CH₂Ph
 CRA-VI:R₁=CH₃, R₂=CH(CH₃)Ph

図1 各CRAの構造

構造によりヒドロキシ基を有する上部の空孔径が変化することが核磁気共鳴分光法によるヒドロキシ基のケミカルシフトから分かっている。

1-1 CRA-Iの合成

(C-tetraethyl-CRA)

100cm³三口フラスコにレゾルシノール4.4g(40mmol)を秤とり、エタノール35cm³に溶解した後、その溶液を攪拌・冷却しながら塩酸11cm³を10分間かけて滴下した。その後、攪拌・冷却を維持しながらプロパナール2.3g(40mmol)を30分間かけて滴下した。溶液を室温に戻した後、75℃に加熱し24時間反応を行なった。反応液は室温まで冷却した後、純水300cm³を十分に攪拌しつつ、その中に非常にゆっくりと滴下して固体を析出させた。ろ別した固体は、洗液が中性となるまで温水で十分に洗浄した後、乾燥した。

1-2 CRA-IIの合成

(C-tetrapentyl-CRA)

100cm³三口フラスコにレゾルシノール5.5g(50mmol)を秤とり、エタノール50cm³に溶解した後、その溶液を攪拌・冷却しながら、ヘキサナール5.0g(50mmol)を30分間かけて滴下した。その後、攪拌・冷却を維持しながら塩酸8.0cm³を10分間かけて滴下した。溶液を室温に戻した後、75℃に加熱し17時間反応を行なった。反応液は室温まで冷却した後、純水300cm³を十分に攪拌しつつ、その中に非常にゆっくりと滴下して固体を析出させた。ろ別した固体は、洗液が中性とな

るまで温水で十分に洗浄した後、乾燥した。

1-3 CRA-ⅢA・ⅢBの合成

(C-tetrahydro-2-methyl-CRA)

200cm³三口フラスコに2-メチルレゾルシノール 8.0g (64mmol) を秤とりエタノール 95 cm³に溶解した後、パラホルムアルデヒド 8.9g を加え溶解した。その溶液に攪拌・冷却しながら塩酸 6.2cm³を 10 分間かけて滴下した。その後、溶液を室温に戻した後、85°C に加熱し 48 時間反応を行なった。生成した固体をろ別し、メタノールと純水で十分に洗浄した後、乾燥した。

次に、ヒドロキシ基をアセチル基で保護するために 200cm³三口フラスコにCRA-ⅢA 3.0g (5.5mmol) を秤とり、無水酢酸 60 cm³に溶解した後濃硫酸を 1 cm³加えた。この溶液を 50°Cで 20 分、90°Cで 20 分それぞれ加熱し、最後に 135°Cに加熱して 2.5 時間反応を行なった。反応液に純水を加え残っている無水酢酸を分解した後、生成した固体をろ別し、メタノールと純水で十分に洗浄・乾燥し、CRA-ⅢB (CRA-ⅢAのアセチル保護体) を合成した。

1-4 CRA-Ⅳ・Ⅴ・Ⅵの合成

CRA-Ⅳ (C-tetrapentyl-2-methyl-CRA)、CRA-Ⅴ (C-tetrakis(2-phenylethyl)-2-methyl-CRA) 及びCRA-Ⅵ (C-tetrakis(1-phenylethyl)-2-methyl-CRA) の合成は、CRA I ~ⅢAの合成方法に準拠して行なった。

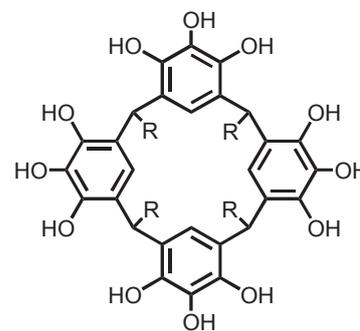
2 CPAの合成

CPA-I : C-tetraethyl-CPA、

CPA-II : C-tetrakis(2-phenylethyl)-CPA、

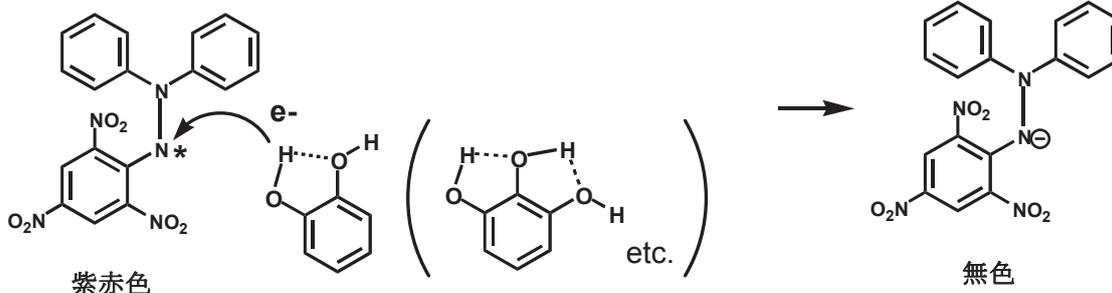
CPA-Ⅲ : C-tetrakis(4-bromophenyl)-CPA、

50 cm³三口フラスコにピロガロール 2.5g (20mmol) を秤とり、エタノール 15 cm³に溶解した後、溶液を攪拌・冷却しながら、塩酸 3 cm³を 10 分間かけて滴下した。その後、各アルデヒド (CPA-I : プロパナール 1.2g (20mmol)、CPA-II : 3-フェニルプロパナール 2.7g (20mmol)、CPA-Ⅲ : 4-ブロモベンズアルデヒド 3.7g (20mmol)) を 30 分間かけて滴下した。溶液を室温に戻した後、75°Cに加熱し 21 時間反応を行なった。反応液は室温まで冷却した後、純水 300 cm³を十分に攪拌しつつ、その中に非常にゆっくりと滴下して固体を析出させた。ろ別した固体は、洗液が中性となるまで温水で十分に洗浄した後、乾燥した。なお、合成物の解析は、CRAと同様に行なった。また、それぞれの構造を図2に示した。



CPA-I : R=C₂H₅
CPA-II : R=CH₂CH₂Ph
CRA-Ⅲ: R=Ph(4-bromo)

図2 各 CPA の構造



スキーム2 DPPHのラジカル消去機構

3 抗酸化活性の評価方法

抗酸化活性を評価する代表的な方法には、ロダン鉄法、リノール酸-β-カロテン溶液を用いる抗酸化試験法及び常温常圧で比較的長時間ラジカル状態を維持する1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル(DPPH)を用いたDPPH法(ラジカル消去活性測定)などがある⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾。今回検討したCRA及びCPAは、精製された単一物であり、測定妨害を起こす不純物を含まないことなどから、操作が簡便なDPPH法によるラジカル消去活性により機能性の評価を行った。試験方法及びラジカル消去活性の評価方法は以下のとおりである。

3-1 DPPH法

50nmol/cm³のDPPHメタノール溶液 6.0 cm³を共栓試験管にとり、そこに試験物質の物質質量を変えて加え、それぞれよく混合する。スキーム2に示すように、紫赤色のDPPHのうちラジカル消去されたDPPHアニオンは無色となるので吸光度減少が起こる。そこで、30分静置した後、図3に示すように750~250nmにおけるスペクトルを日立製作所製分光光度計U-1800で測定した。ラジカル消去活性の評価には大きな吸光度変化見られた515nmにおける吸光度を利用した。なお、DPPH溶液は、時間とともに吸光度減少がみられるので、試験物質を加えないものをブランク溶液として吸光度補正を行なった。

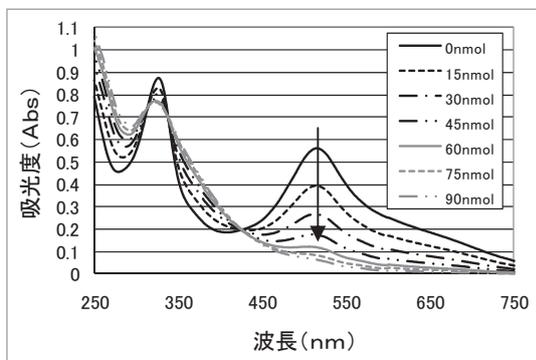


図3 CRA類添加によるDPPH溶液のスペクトル変化

3-2 ラジカル消去活性の指標(RS50)

図4に示すように、3.1で得られた30分後の515nmにおける各吸光度とブランク溶液の吸光度の比と、試験物質の物質質量との関係を測定した。これより、DPPHラジカル(試験物質未添加)の50%を消去するのに要する試験物質の物質質量、すなわちRS50を求め、CRAおよびCPAのラジカル消去活性を比較検討した。なお、このRS50の値が小さいほどラジカル消去活性が大きいことを表している。

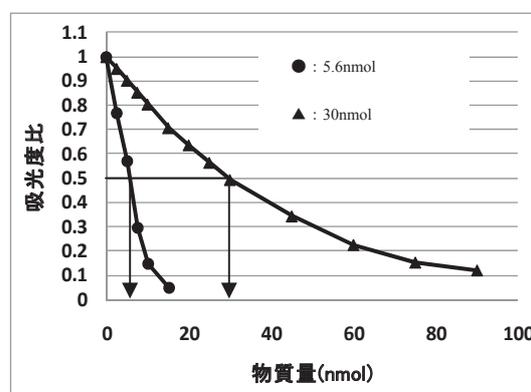


図4 ラジカル消去活性(RS₅₀)の求め方

III 結果と考察

1 CRA及びCPAの収率

CRAおよびCPAの収率を表1に示す。表1に示すように、CRAの収率はおおむね70%以上の高収率であり、副生成物の生成はほとんど見られなかった。これに対してCPAは極端に低い収率であり、副生成物の生成が見られ、カラムクロマトグラフィーあるいは再結晶など精製操作を必要とした。収率における両者の大きな違いは芳香環におけるヒドロキシ基の配向性(オルトパラ配向)によるものと考えられる。

表 1 CRAおよびCPAの収率

化合物名	収率 (%)
CRA-I	80
CRA-II	98
CRA-III A	87
CRA-IV	68
CRA-V	98
CRA-VI	71
CPA-I	14
CPA-II	5
CPA-III	39

CRA合成は、次のような反応機構により合成される。まず、アルデヒドを酸触媒によりイオン化し求電子試薬とすると、このカルボニウムイオンはレゾルシノールの電子密度の高い部位に求電子攻撃を行ない、その反応を繰り返すことにより鎖状構造をとり、加熱条件下におくと最終的に環状四量体構造となる⁽⁹⁾。ここで、レゾルシノールの2位、4位及び6位は、ヒドロキシ基の配向性により電子密度が増加し、その結果求電子攻撃の反応点となっているが、CRAの合成では、この反応点のうち、4位と6位に選択的に反応させる必要がある。都合がよいことに同様に電子密度が増大している2位については、図5に示した理由により反応が阻害されている。つまり、2位への求電子

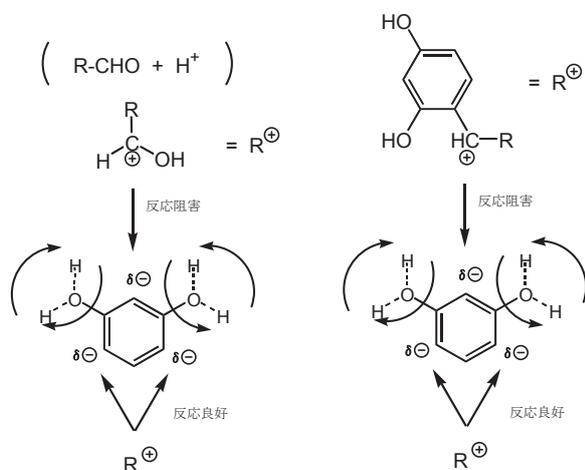


図 5 レゾルシノールの反応性

攻撃は両サイドのヒドロキシプロトンの回転運動により阻害をうけるため、副生成物の生成がほとんど見られないものと考えられる。この反応阻害の度合いは、図5右の第二段階以降の反応ではより顕著な立体障害により増大していく。したがって、図5左の第一段階における2位への反応性が副生成物量に影響することになる。

一方、CPA合成ではピロガロールの4位、5位及び6位の電子密度が増加し反応性が増大している。そこにアルデヒドが求電子攻撃を仕掛けるが、CRAとは異なり、5位への反応を阻害するヒドロキシプロトンの回転運動はない。したがって、5位にもアルデヒドが反応した副生成物が生成されたものと考えられる。それぞれのケミカルシフトを調べると、4位・6位プロトンのケミカルシフトが δ 6.60ppm であるのに対して、5位プロトンのケミカルシフトは δ 6.75ppm であり、いずれもベンゼンよりも電子密度は高まっているものの、5位の電子密度が4位・6位に比べ低いことから、アルデヒドの添加方法など反応条件の検討を加えることにより収率の向上が期待できる。

2. ラジカル消去活性評価

2-1 フェノール類のラジカル消去活性

芳香環にヒドロキシ基を有する有機化合物をフェノール類というが、本研究においては大きく二つに分類した。一つ目は、ヒドロキシ基が分子内水素結合をせずに単独で存在する化合物群（以下化合物I群）であり、フェノールやレゾルシノールがこれに該当する。二つ目は、ヒドロキシ基が分子内水素結合をしている化合物群（以下化合物II群）であり、カテコールやピロガロールがこれに該当する。まず、化合物I群についてRS50を求めると表2の通りであった。いずれもDPPH300nmol に対して3倍モル以上存在してもラジカル消去活性をほとんど示さなかった。

表 2 化合物 I 群のRS50

化合物名	RS50 (nmol)
フェノール	> 1000
レゾルシノール	> 1000
2-メチルレゾルシノール	> 1000

次に、化合物 II 群についてRS50を求めると表3の通りであった。表3に示した化合物 II 群は非常に興味深い結果となった。つまり、ヒドロキシ基同士で分子内水素結合をするカテコールやピロガロールは高いラジカル消去活性を示すが、ヒドロキシ基とカルボキシ

表 3 化合物 II 群のRS50

化合物名	RS50 (nmol)
カテコール	51
ピロガロール	36
2,4-ジヒドロキシ安息香酸	> 1000
サリチル酸	> 1000

基の分子内水素結合ではラジカル消去活性をほとんど持たないということである。これは、ヒドロキシ基の酸解離定数とカルボキシ基の酸解離定数の違いによるものと思われる。カテコールのpK1は9.125、サリチル酸のpK1は2.754であり、カルボキシ基のプロトンが非常に解離しやすい状態であることが分かる。このことから、ラジカル消去活性の強弱には分子内水素結合の度合いが鍵を握っているが、プロトン放出による分子のイオン化が起こりやすい化合物はラジカル消去活性を示さないことが分かった。したがって、ラジカル消去には酸素原子ではなくヒドロキシプロトン上から電子が供与されていると推測される。なお、図6に示すようにCRA-III Aのヒドロキシ基をアセチル保護したCRA-III Bはラジカル消去活性を失うことから、この点からもヒドロキシ基プロトンがラジカル消去活性に重要であることは明らかである。

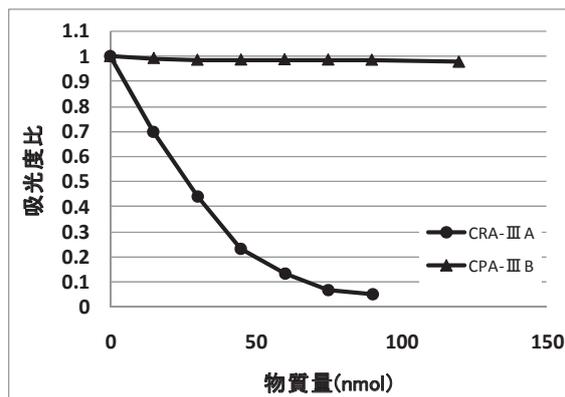


図 6 CRA-III AとIII Bの比較

2-2 CRA のラジカル消去活性

CRAの構成単位であるレゾルシノールは、2.1で述べたようにラジカル消去活性をほとんど示さない。しかしながら、レゾルシノール4分子から構成されるCRAは、図7に示すように8つのヒドロキシ基により水素結合ネットワークを形成し安定化をはかっている。そのため、レゾルシノールでは不可能な分子内水素結合が存在することとなり、ラジカル消去活性を持つことが期待できた。そこで、合成した6種類のCRAにおけるRS50を求めたところ、図8のような結果となった。6種類のCRAはいずれも高いラジカル消去活性が確認され、有効なラジカル消去材料として利用できることが分かった。

また、6種類のRS50は、いずれも試験に用いたDPPH量300nmolに対して10分の1から20分の1程度の量であり、DPPHのラジカル状態の窒素原子にプロトンが付加するのではなく、水素結合状態のプロトンから電子移動が起こることによりラジカルが消

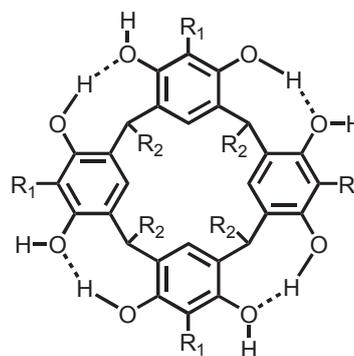


図 7 水素結合ネットワークによるCRAの安定

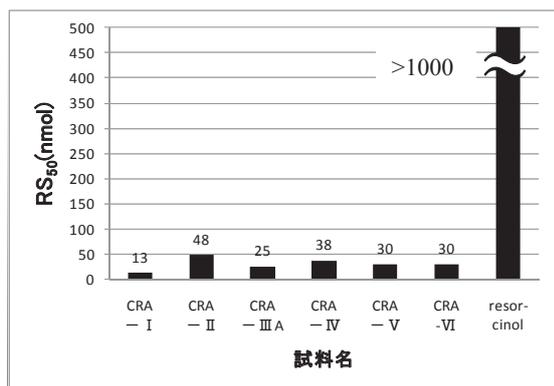


図 8 各CRAのRS₅₀の比較

去していることが分かった。さらに、6種類のCRAを比較するとレゾルシノールユニットをつないでいる架橋部（以下ペンダント部）が短いほどRS₅₀が小さくラジカル消去活性が高い傾向がみられた。この点については、ペンダント部の長さを変えたCRAを合成し検討するとともにX線構造解析による水素結合原子間距離の把握も必要であり、今後の課題である。

しかしながら、核磁気共鳴分光装置によるヒドロキシプロトンのケミカルシフトが分子構造に伴う水素結合状態の指標として使えると考えられることから、RS₅₀とケミカルシフトの関係を調べた。図9に示すように、ケミカルシフトが小さいほど言い換えると電

子密度が増加するほど高いラジカル消去活性を持つことが分かった。したがって、CRAのヒドロキシプロトンのケミカルシフトを測定することにより、その分子のもつラジカル消去活性をある程度推定できることが分かった。

2-3 CPAのラジカル消去活性

CPAの構成単位であるピロガロールは、2. 1で述べたようにそれ自身が高いラジカル消去活性を持っている。しかしながら、さらに高いラジカル消去活性を追求し、環状四量体構造としたところ、図10に示すように、CRAと同様に大幅なラジカル消去活性の向上が見られた。CPAの場合は、ピロガロール単体でRS₅₀が36nmolであり、水素結合効果を考えずに単に四量体化したことによる効果だけであれば、RS₅₀は4分の1の9nmolとなるところであるが、実際には3.9~5.6nmolとさらに2倍程度の向上がみられている。このことから、図11に示すように、CPAの12個のヒドロキシ基が水素結合ネットワークを形成し、ヒドロキシプロトン上の電子密度がラジカル消去活性に好ましい状態を形成していると考えられる。

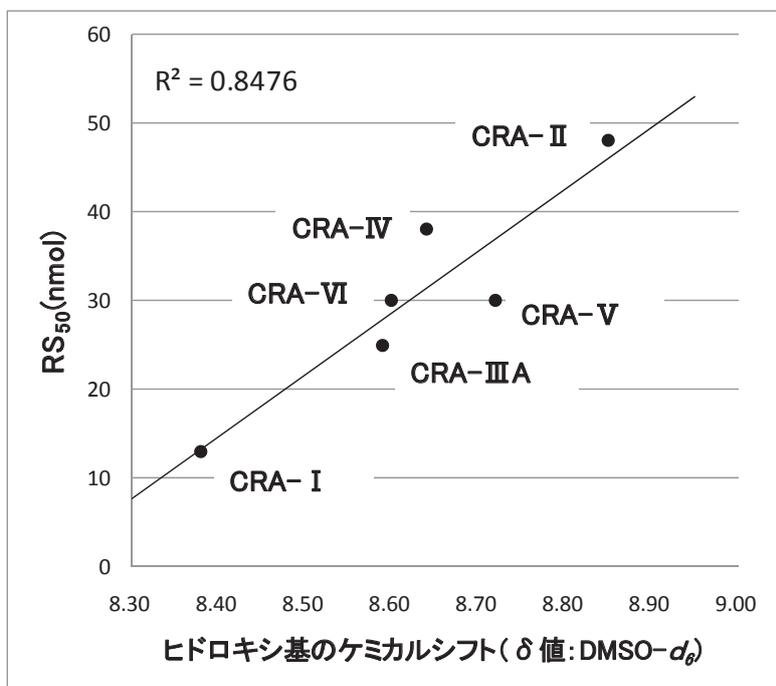


図 9 RS₅₀とケミカルシフトの関係

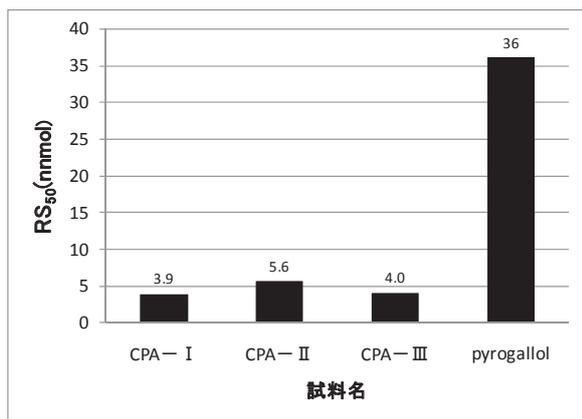


図 10 各CPAのRS₅₀の比較

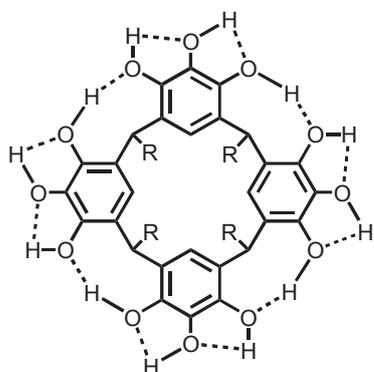


図 11 水素結合ネットワークによるCPAの安定化

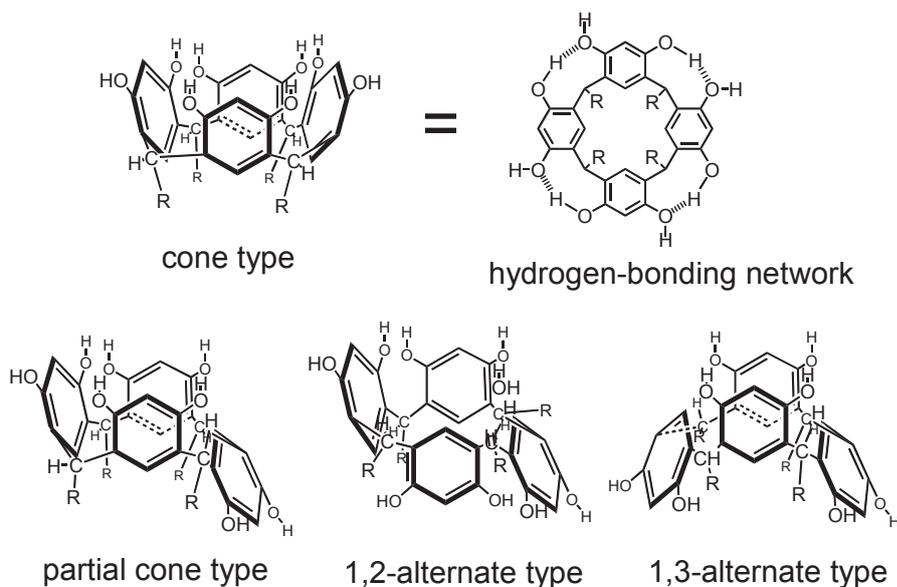


図 12 CRA類のコンフォメーション

IV 今後の課題

今回新たにラジカル消去活性を見出したCRAおよびCPAであるが、今後の検討課題もあげられる。

①水素結合状態を分子構造で表現するため、各化合物の単結晶を調製してX線構造解析を行なう。それにより、水素結合原子の原子間距離や空孔径を求め、RS50との関係を導き出す。

②CRAおよびCPAの四量体構造は図 12 のようなコーン型以外をとる可能性があり、X線構造解析によりCRAおよびCPAのコンフォメーションを明らかにするとともにコンフォメーションとRS50の関係についても検討する予定である。

V おわりに

糖類や芳香族炭化水素の空孔内への包接、金属配位子の導入による金属捕捉能などの機能性を有するCRAおよびCPAについて、新しい機能性を見出すことに成功した。

CRAについて検討した結果、ラジカル消去活性が小さなレゾルシノール（大きなRS50を持つ）であっても、環状四量体とすることにより水素結合ネットワークが形成され、RS50が飛躍的に減少し、ラジカル消去活性を示すことが分かった。

また、もともと高いラジカル消去活性をもつピロガロールを構成単位とするCPAもCRA同様に水素結合ネットワークを形成しRS50が飛躍的に減少した。

これらのことから、ラジカル消去活性に分子内水素結合状態が大きく関与していることが明らかとなった。さらに、ペンダント部のアルキル基によりその水素結合状態が変化することがNMRのケミカルシフトで確認できた。

本報告において示したラジカル消去活性や従来から知られている有機化合物の包接能を応用して、空気浄化材料としての利用を検討して行きたいと考えている。

【参考文献】

- (1) 前田みづほ他2名、カリックスレゾルシン[4]アレーン誘導体の合成とその機能、触媒談話会2001国際シンポジウム講演要旨集、2001年、P36-39
- (2) 前田みづほ、カリックスレゾルシン[4]アレーン誘導体の合成とその包接能、職業能力開発総合大学校東京校紀要、第18号、2003年、P27-30
- (3) M.Maeda, et al., Hydrogen-bonding Interactions of C-Tetraundecenylresorc[4]arene with Some Guest Molecules, J.Oleo.Sci., Vol.55, No.12, 2006年、P637-646
- (4) 前田みづほ、レゾルカレンとゲスト分子との水素結合相互作用、職業能力開発総合大学校東京校紀要、第22号、2007年、P69-72
- (5) 寺沢なお子他2名、ハーブ水抽出成分の抗酸化性、日本食品科学工学会誌、Vol.48, No.2, 2001年、P99-104
- (6) 宮川雄太他4名、流木木酢液ベンゼン抽出物の燻臭成分とその抗酸化性、日本食品科学工学会誌、Vol.50, No.11, 2003年、P530-536
- (7) Jun-ichi Ueda et al., Relationship Between Effects of Phenolic Compounds on the Generation of Free Radicals from Lactoperoxidase-Catalyzed Oxidation of NAD(P)H or GSH and their DPPH Scavenging Ability, Chem.Pharm.Bull., Vol.49, No.3, 2001年、P299-304
- (8) 竹内若子他4名、ナスポリフェノール量がラジカル捕捉活性及び抗酸化活性に及ぼす影響、名古屋女子大学紀要、Vol.50, 2004年、P53-58
- (9) Hitoshi Konishi et al., The Acid-Catalyzed Condensation of 2-Propylresorcinol with Formaldehyde Diethyl Acetal. The Formation and Isomerization of Calix[4]resorcinarene, Calix[5]resorcinarene, Calix[6]resorcin-arene, tetrahedron Letters, Vol.37, No.41, 1996年、P7383-7386

