

天然を超える抗酸化&抗菌活性の発現をめざした ポリフェノール模倣高分子の精密重合

東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻

江 島 広 貴

Polyphenols are plant-derived chemicals with more than or equal to two phenolic hydroxy groups by the Quideau definition. These molecules usually have both catechol and gallol groups in their chemical structures, that play key roles in their antioxidant and antibacterial activities. Inspired by this, I synthesized gallol-functionalized polymers via controlled radical polymerization for the first time. The reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of 3,4,5-trimethoxystyrene was carried out using cyanomethyl dodecyl trithiocarbonate as the chain transfer agent. This method produces well-defined polymers with a wide range of molecular weight (from 5.4 to 53.4 kg mol⁻¹) and low polydispersity index ($M_w/M_n < 1.3$). Subsequent demethylation of poly(3,4,5-trimethoxystyrene) yields poly(3,4,5-trihydroxystyrene) (polyvinylgallol, PVGal). These newly synthesized polymers exhibit greater antioxidant activities than widely used catechol-functionalized polymers based on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) methods. Given this high antioxidant property, the effective use of gallol-functionalized polymers in biomaterials is expected.

1. 緒 言

持続型社会への転換要請から、バイオマス由来の素材を用いた機能性材料開発が求められている。ポリフェノールは植物の葉、茎、樹皮、果皮、種子などに多く含まれているバイオマス由来の化合物である。Quideauの定義¹⁾では、ポリフェノールとは分子内に2つ以上のフェノール性ヒドロキシ基を持つ植物成分の総称である。抗酸化作用、抗炎症性、抗菌作用といった優れた生理活性を持つものが多く、人類はその長い歴史の上で、伝統的にポリフェノールを活用してきた。例えば、薬や食品添加物としての例は数多く、革なめし工程におけるタンニン、ワインにおけるタンパク質系澱下剤、漆(ポリフェノールの一種)塗りやお歯黒における利用など、枚挙にいとまがない。ポリフェノールの抗菌作用は抗生物質と比べると弱いものの、環境と生体に優しい抗菌物質として近年再び注目を集めている。また、没食子酸プロピル(ポリフェノールの一種)は化粧品に抗酸化物質として既に配合されている。ところで、有機化学で用いられる‘ポリ’は2コ以上をさすため、フェノール性水酸基を2コ以上分子内に持てば‘ポリ’フェノールである。一方、高分子科学で用いられる‘ポリ’は通常10コ以上をさし、‘ポリ’フェノールはいわゆる‘ポリ’マーではない。

本研究ではポリフェノールの化学構造 (Fig. 1a) から着想を得て、そのシンプルかつ普遍的なビルディングブロッ

クであるフェノール性官能基(ガロール基)に着目し、これを側鎖に持つ新規ポリマー、ポリビニルガロール (PVGal) をリビングラジカル重合によって合成した (Fig. 1b)。これまで、有機低分子化合物として用いられてきた‘ポリ’フェノールをポリマー化することによって、優れた加工性、多価効果、隣接効果、分子量効果などが期待でき、天然のポリフェノールより優れた抗酸化or抗菌素材開発が可能になるものと期待される。

2. 方 法

2. 1. Wittig反応による3,4,5-トリメトキシスチレン (TMS)の合成

窒素雰囲気下でメチルトリフェニルホスホニウムブロミド (26.2g, 74.9mmol) を無水THF (180mL) に懸濁し、-78℃に冷却して*n*-ブチルリチウム (1.6Mヘキサン溶液を47mL, 75.2mmol) を加えた。反応混合物を室温まで昇温させた後、3,4,5-トリメトキシベンズアルデヒド (TMB, 11.0g, 55.3mmol) を加え、一晩攪拌した。反応溶液を100mLの蒸留水に注ぎ、ジエチルエーテルで抽出した。硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカ、ヘキサン/酢酸エチル=4/1) で精製し、目的物を得た (収率64%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : (δ, ppm) 6.7 (2H, s, Ar-H), 6.7-6.6 (1H, m, CH=CH₂), 5.7-5.1 (2H, m, CH₂=CH), 3.9 (6H, s, OCH₃), 3.8 (3H, s, OCH₃)。 ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃) : (δ, ppm) 152.7, 135.5, 104.4, 60.7, 55.8, 31.9。

2. 2. RAFT重合によるポリトリメトキシスチレン (PTMS)の合成

シュレンク管にTMS (2g, 10.3mmol)、cyanomethyl dodecyl trithiocarbonate (CDTTC)、重合開始剤



Controlled Radical Polymerization of Polyphenol-Inspired Polymers with High Antioxidant and Antibacterial Properties

Hirotaka Ejima

Department of Materials Engineering,
The University of Tokyo

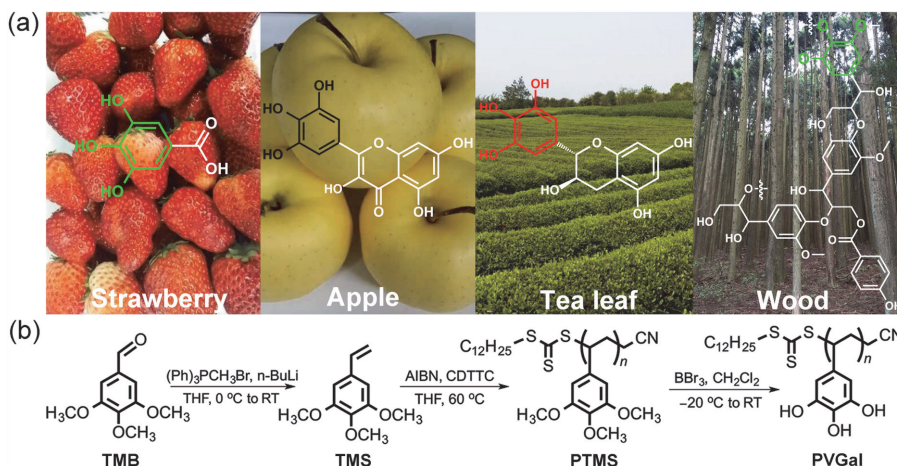


Fig. 1 Polyphenols and polyphenol-inspired polymers.

- (a) Chemical structures of gallic acid found in strawberry, myricetin in apple, epigallocatechin in tea leaf, lignin in wood.
 (b) Synthetic route for the preparation of poly(3,4,5-trihydroxystyrene), PVGal.

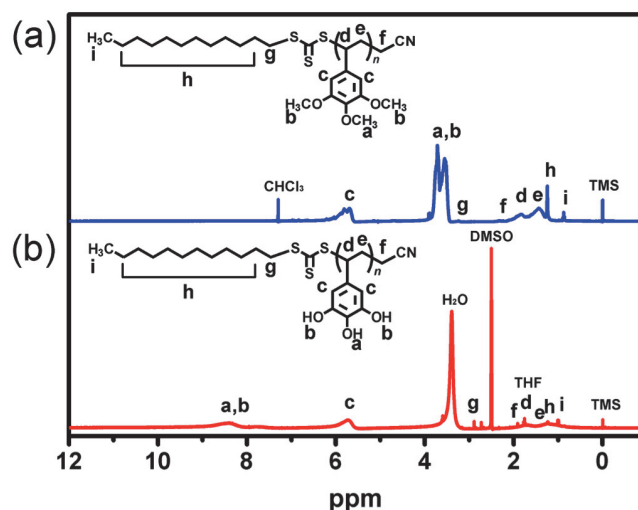
azobisisobutyronitrile (AIBN)、THF (4mL) を入れ、凍結脱気を3回繰り返した後、窒素を充填した。オイルバス中で60℃に加熱することでRAFT重合を開始した。この時のモノマー TMS に対する CDTTC と AIBN のモル比 ($[\text{TMS}] : [\text{CDTTC}] : [\text{AIBN}]$) を変えることで、様々な分子量の PTMS を合成した。重合後、反応溶液を0℃に冷却した。THF (10mL) を添加することでポリマーをよく溶解させ、これをヘキサンで再沈殿することでPTMSを得た (収率90%、Fig. 2)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : (δ , ppm) 6.3–5.5 (Ar-H), 4.0–3.4 (OCH_3), 3.3–3.1 (CH_2S), 2.4–2.2 (CH_2CN), 1.2–0.7 ($\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{-CH}_3$), 2.1–1.0 ($\text{CH}(\text{Ar})\text{-CH}_2$). ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3) : (δ , ppm) 152.7, 135.5, 104.4, 60.7, 55.8, 41.2, 31.7, 29.7, 22.9, 14.4.

2. 3. ポリビニルガロール(PVGal)の合成

100mLナス型フラスコ中でPTMS (0.96 g, 5mmol) をジクロロメタン 20mL に溶かし、15 分間窒素でパージした。溶液を0℃まで冷却し、10 分間攪拌した後、三臭化ホウ素 (1M, 15mL, 15mmol) を10 分間かけて滴下した。30 分後に反応溶液を室温まで昇温し、一晩攪拌した。1%塩酸水溶液を加え、生じた沈殿を濾過によって回収した。これをメタノールに溶かして濾過した。濾液をエバポレーターによって濃縮し、THF に再び溶解した。これをヘキサンで再沈殿し、濾過で回収することで目的物を得た (収率60%)。 ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) : (δ , ppm) 9.1–8.0 (OH), 6.2–5.4 (Ar-H), 2.2–0.8 ($\text{CH}(\text{Ar})\text{-CH}_2$). ^{13}C NMR (400MHz, CD_3OD) : 144.8, 131.1, 106.7, 67.9, 40.3, 31.7, 25.2, 22.3, 13.3.

2. 4. 抗酸化能の測定

抗酸化能は2,2-diphenyl-1-picrylhydrazylラジカル消去活性


 Fig. 2 ^1H NMR spectra of (a) PTMS and (b) PVGal.

法(DPPH アッセイ)、2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) カチオンラジカル消去活性法 (ABTS アッセイ)、oxygen radical absorbance capacity法 (ORAC アッセイ) の3 種の方法を併用して評価した。

2. 4. 1. DPPHアッセイ

36mg のDPPH を100mL のメタノールに溶かしてストック溶液とした。このストック溶液と抗酸化物質のメタノール溶液を適切な量希釈し混ぜることで、DPPH の終濃度が91 μM 、抗酸化物の終濃度が250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25mM となるように溶液を調製した。その後すぐに、515nm における吸光度を0.2 秒ごとに12 分にわたって測定した。抗酸化能は以下の式より計算した。

Radical scavenging effect (%) =

$$[(\text{Control Abs.}) - \text{Sample Abs.} / \text{Control Abs.}] \times 100$$

2. 4. 2. ABTSアッセイ

ABTS と硫酸カリウムの混合水溶液 (終濃度はそれぞ

れ 7.0, 2.5 mM) を 20 時間暗所で静置した。これを $\lambda=734$ nm における吸光度が約 1.0 になるように希釈し、所定の濃度の抗酸化物質と混ぜ、吸光度の退色を追跡した。抗酸化能は以下の式により標準物質 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) 換算値 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) として計算した。ただし、 A_{12} は 12 分後の $\lambda=734$ nm における吸光度を表す。

$$\text{TEAC} = [A_{12} - A_0]_{\text{antioxidant}} / [A_{12} - A_0]_{\text{trolox}}$$

2. 4. 3. ORAC アッセイ

フルオレセインのリン酸緩衝溶液 (70nM, pH7.4) と抗酸化ポリマー (モノマー単位の濃度で 10 μ M) のメタノール溶液 (0.3mL) を石英セル中で混合した。次に、2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) のリン酸緩衝溶液 (18mM, pH7.4) を添加し、蛍光強度 (Ex : 468nm, Em : 520nm) を 60 分にわたって 2 秒ごとに測定した。蛍光強度を時間に対してプロットし、その曲線の下部の面積 (Area Under the Curve, AUC) を計算した。対照実験として、メタノールのみを加えた (サンプル濃度 0 μ M) ものと Trolox のメタノール溶液 (濃度 : 1, 3, 5, 7 μ M) を加えたものでも測定して AUC を求め、検量線を作成した。この検量線を用いることで、抗酸化能は TEAC 値として算出した。

2. 5. 測定機器

^1H -, ^{13}C -NMR 測定は、日本電子社製の NMR 分光測定装置 (JNM-AL400) を用いた。紫外可視分光光度計は日立社製の U-3010 を使用した。フーリエ変換赤外分光装置は Thermo Scientific 社製の Nicolet iS10 FT-IR に Smart iTR attenuated total reflectance apparatus を装着したものをを用いた。数平均分子量 (M_n)、重量平均分子量 (M_w) は絶対分子量測定マルチ検出器システム (示唆屈折計検出器、粘度検出器、光散乱検出器) を備えた東ソー社製の GPC (HLC-8320) に TSKgel GMHHR-M カラムを装着したものをを用いて求めた。クロロホルムの流速は 1mL min $^{-1}$ 、相対

分子量を求める際はポリスチレンを標準物質として作成した検量線を使用した。絶対分子量を求める際に必要な屈折率濃度増分 (dn/dc) は 0.104mL g $^{-1}$ であった。

3. 結果と考察

RAFT 重合 (可逆的付加開裂連鎖移動重合) の際に使用する連鎖移動剤 (CTA) は、分子量の制御に重要である。CTA は成長ポリマー鎖からラジカルを受け取り、ポリマーの伸長を止めるが、ラジカルを受け取った CTA はモノマーを攻撃して再び重合を開始させる。この平衡反応の存在によりラジカル活性種の濃度が反応溶液中で低く抑えられるため停止反応などの副反応が起こりにくい。そのため RAFT 重合では通常のラジカル重合と比べて分子量分布の狭いポリマーを合成することができる。しかしながら、用いるモノマー種によって適する CTA と適さない CTA が存在するため、最適な CTA を探索する必要がある。

本研究では、まず 4 種類の CTA、2-(dodecylthiocarbonylthio)-2-methylpropionic acid (DDMAT)、cyanomethyl dodecyl trithiocarbonate (CDTTC)、2-cyano-2-propyl dodecyl trithiocarbonate (CPDTTC)、4-cyano-4-[(dodecylsulfanyl-thiocarbonyl) sulfanyl] pentanoic acid (CDSPA) を用いて、RAFT 重合条件の最適化を行った。[TMS] : [CTA] = 30 : 1 の条件で (標的重合度 30) 重合したところ、得られたポリマーの重合度は DDMAT, CDTTC, CPDTTC, CDSPA の場合、それぞれ 16, 29, 18, 18 であった。また多分散度 (M_w/M_n) は 1.4, 1.2, 1.2, 1.6 であった。CTA を用いないフリーラジカル重合では、得られたポリマーの重合度は 80 で M_w/M_n は 2.3 であった。最も標的重合度に近く、分子量分布も狭いポリマーが得られた CDTTC を CTA として用いることに決定した。

次に CTA と重合開始剤の比を [CDTTC] : [AIBN] = 1 : 1 に固定し、モノマーと CTA の比を [TMS] : [CDTTC] = 20 : 1, 30 : 1, 50 : 1, 100 : 1, 200 : 1, 300 : 1 で重合したところ、26, 35, 53, 115, 185, 276 量体の PTMS が得られた (Fig. 3)。すなわち M_n にすると 5-50kg mol $^{-1}$

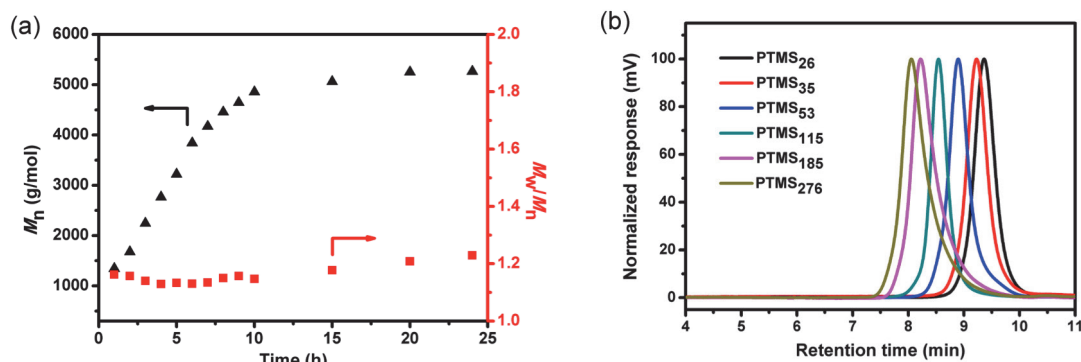


Fig. 3 (a) Plots of molecular weight (M_n) and polydispersity (M_w/M_n) against RAFT polymerization time. (b) GPC traces of PTMS with various molecular weight.

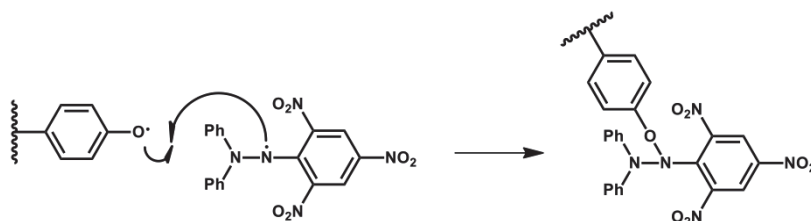


Fig. 4 Reaction of the DPPH radical and a phenolic molecule.

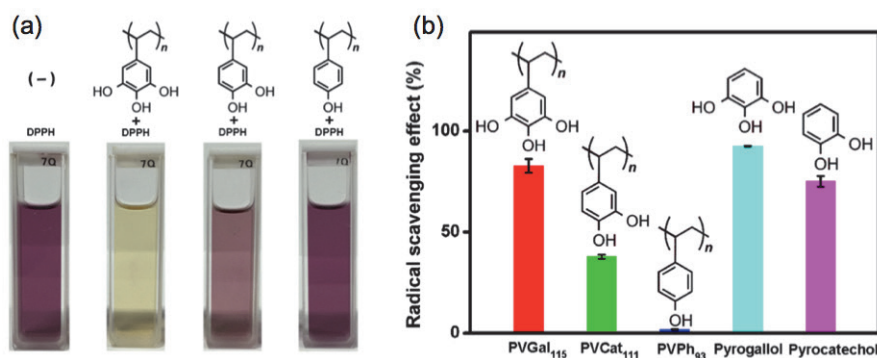


Fig. 5 (a) Decoloration of the DPPH radicals in methanol reacting with polyphenol-inspired polymers. (b) The antioxidant activity of polyphenol-inspired polymers and the corresponding monomers after 2 min with the tested antioxidant in the presence of DPPH.

の範囲で分子量を良好に調節できた。どの分子量のPTMSも M_w/M_n は < 1.3 であり、分子量が揃ったポリマーが得られた。最後に、PTMSのメトキシ基を三臭化ホウ素によって脱保護することでPVGalを得た。脱保護反応の進行は ^1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR によって、メトキシ基ピークの消失およびヒドロキシ基ピークの出現から確認した。

DPPHは安定なラジカルを持ち、紫色を呈色する。DPPHラジカルがFig. 4のような反応を経て抗酸化物質によって消去されると、色が黄色に変化するため、比色分析によって抗酸化活性を評価することができる²⁾。フェノール性水酸基をそれぞれ1つ、2つ、3つ持つ、PVPh、PVCat、PVGalの抗酸化活性をFig. 5に示した。フェノール性水酸基の数が増えるほど高い抗酸化活性を示した。PVGalはPVPhと比べると60倍以上、PVCatと比べても2倍程度の高い抗酸化活性を示した。この際、用いたフェノール性ポリマーの重合度は約100に揃えてある。低分子のピロガロールとピロカテコールは、ポリマーであるPVGalとPVCatよりも同じ重量濃度で比べると高い抗酸化活性を示したが、モル濃度で比べるとポリマーの方が高い抗酸化活性を示した。

Fig. 6にDPPHの紫色 (Abs. = 515 nm) の退色過程を時間に対してプロットしたものを示す。DPPHラジカルの消去速度はPVGal>PVCat>PVPhという順番であり、Fig. 5bの抗酸化活性と同様の順番であった。PVGalは約2分でDPPHをほぼ全て退色させたが、PVCatは10分以上を要した。また測定した12分という時間内においてPVPh

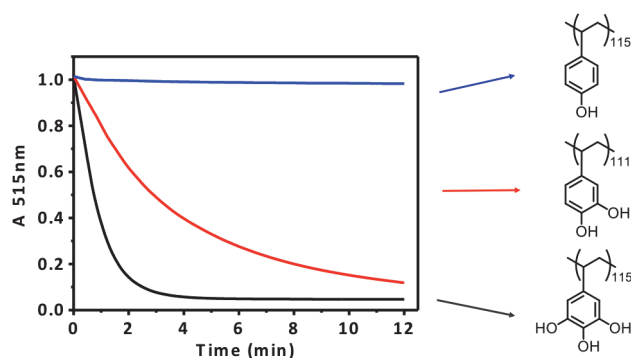


Fig. 6 DPPH decoloration kinetics for the tested antioxidant polymers.

では退色はほとんどみられなかった。使用したポリマーの重合度は約110量体で揃えてあるため、溶液中での拡散速度に大きな差はない。そのためPVGalの高いDPPHラジカル消去活性はその化学構造に由来すると考えられる。

ガロール基の3つのヒドロキシ基の酸化還元電位は1.16, 1.40, 1.92V (vs. Ag/AgCl) である。一方で、カテコール基の2つのヒドロキシ基の還元電位は1.18, 1.35V (vs. Ag/AgCl) である³⁾。1つ目の酸化還元電位はガロールの方が若干低いため、酸化されやすい。すなわち抗酸化活性は高い。それに加えて、ガロール基はFig. 7に示すように、発生したラジカルは隣接する2つのヒドロキシ基と水素結合して、カテコール基の場合よりもさらに安定化される。この効果は密度汎関数理論 (DFT) による計算から、ガロール基では 50 kJ mol^{-1} 、カテコール基では 33 kJ mol^{-1} と

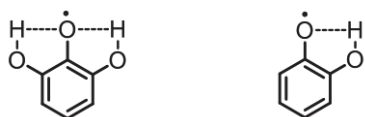


Fig. 7 Stabilization of phenoxy radicals via hydrogen bondings in gallol and catechol groups.

Table 1 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values of the antioxidants calculated from the ABTS and ORAC assays.

Antioxidant	ABTS	ORAC
Trolox	1.0	1.0
PVPh ₁₁₅	0.4	0.1
PVCat ₁₁₁	0.9	0.8
PVGal ₁₁₅	1.4	1.5

見積もられる。これにより、ガロール基を側鎖に多くもつ PVGal は高い抗酸化活性を示したと考えられる。

続いて、ABTS アッセイと ORAC アッセイから求めた TEAC 値を Table 1 に示す。TEAC 値とは、抗酸化物質の標準である Trolox の抗酸化能を 1 として、それに対して相対的に抗酸化能がどのくらいかを表した換算値であり、値が大きい方が、抗酸化能が高い。ABTS/ORAC アッセイともほぼ同様の結果を与えた。PVGal の TEAC 値は約 1.5 となり、Trolox よりも大きな値となった。一方で天然のポリフェノールであるエピガロカテキンガレート (EGCG) の TEAC 値を ABTS アッセイで求めたところ 4.2 であり、PVGal はその値に及ばなかった。しかしながら、分子量の違いを考慮にいった IC₅₀ 値では EGCG の 3.5 μM⁴⁾ に対し、PVGal は 0.3 μM と一桁低い値を示した。IC₅₀ 値は酸化を 50% 阻害する濃度であるから、その値は小さい方が少ない濃度で酸化を阻害できることを示しており、抗酸化活性が高い。

4. 総括

市販の化合物である TMB からポリフェノール模倣高分子 PVGal を合成する 4 ステップの合成ルートを確認した。さらにリビングラジカル重合の一種である RAFT 重合の条件を最適化し、分子量を制御した PVGal を得ることができた。今回合成した新規ポリマーである PVGal は他のフェノール性高分子と比べて特に高い抗酸化活性を示した。

謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団によりご援助いただきましたことに深謝いたします。

(総括引用文献)

- 1) Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L : Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 586–621, 2011.
- 2) Piras A M, Dessy A, Dinucci D, Chiellini F : 2-Methoxy aniline grafted poly(maleic anhydride-*alt*-butyl vinyl ether) hemiester: A new biocompatible polymeric free radical scavenger, *Macromolecules*, 44, 848–856, 2011.
- 3) Carter M K: Correlation of electronic transitions and redox potentials measured for pyrocatechol, resorcinol, hydroquinone, pyrogallol, and gallic acid with results of semi-empirical molecular orbital computations—A useful interpretation tool, *J. Mol. Str.*, 831, 26–36, 2007.
- 4) Snijman P W, Joubert E, Ferreira D, Li X C, Ding Y, Green IR, Gelderblom W C : Antioxidant activity of the dihydrochalcones aspalathin and nothofagin and their corresponding flavones in relation to other rooibos (*aspalathus linearis*) flavonoids, epigallocatechin gallate, and trolox, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 6678–6684, 2009.