

博士学位論文

テトラヒドロクルクミンの水溶液中における  
物性評価とその応用可能性の検討

提出者 東北大学大学院 環境科学研究科

環境化学・生態学コース

学籍番号 A3GD5003

氏名 佐藤 きよ子

# 目 次

## 第 1 章 序論

1.1 本研究の目的とその背景	1
1.2 クルクミノイド, クルクミノイド系鉄キレート剤, 水酸アパタイト複合体の研究状況	10
1.3 本研究の概要	12
参考文献 ( 第 1 章 )	14

## 第 2 章 水溶液中におけるテトラヒドロクルクミンの安定性と 酸解離特性の評価

2.1 緒言	16
2.2 実験	
2.2.1 装置	16
2.2.2 試薬	16
2.2.3 クルクミンの精製	16
2.2.4 テトラヒドロクルクミンの合成	17
2.2.5 分光光度滴定	17
2.2.6 $pK_a$ の算出	19
2.3 結果及び考察	
2.3.1 クルクミン	21
2.3.2 テトラヒドロクルクミン	26
2.4 結言	31
参考文献 ( 第 2 章 )	32

## 第 3 章 テトラヒドロクルクミン-鉄錯体の水系における 安定度定数の決定

3.1 緒言	33
3.2 実験	
3.2.1 装置	33
3.3.2 試薬	34

3.2.3	分光光度測定	
3.2.3.1	クルクミン・Fe(II) 及び テトラヒドロクルクミン・Fe(II) 系	34
3.2.3.2	クルクミン・Fe(III) 及び テトラヒドロクルクミン・Fe(III) 系	35
3.2.4	サイクリックボルタンメトリー	35
3.3	結果及び考察	
3.3.1	クルクミン・Fe(II) 錯体の生成定数	35
3.3.2	テトラヒドロクルクミン・Fe(II) 錯体の生成定数	43
3.3.3	クルクミン・Fe(III) 錯体生成定数	50
3.3.4	テトラヒドロクルクミン Fe・(III) 錯体生成定数	54
3.3.5	酸化還元挙動	59
3.4	結言	68
	参考文献 (第 3 章)	69
第 4 章 テトラヒドロクルクミンの鉄 (III) 還元効果		
4.1	緒言	70
4.2	実験	
4.2.1	装置	70
4.2.2	試薬	70
4.2.3	クルクミンの精製, テトラヒドロクルクミンの合成	71
4.2.4	吸光度測定	71
4.2.5	$k_{obs}$ の算出	
4.2.5.1	テトラヒドロクルクミン	75
4.2.5.2	クルクミン	75
4.3	結果と考察	78
4.4	結言	79
	参考文献 (第 4 章)	81
第 5 章 テトラヒドロクルクミン/水酸アパタイト複合体の創製と 応用可能性の検討		
5.1	緒言	82

5.2	実験	
5.2.1	テトラヒドロクルクミンの細胞増殖に与える影響の検討	83
5.2.1.1	テトラヒドロクルクミンの合成	83
5.2.1.2.	骨芽細胞様細胞に与える影響	83
5.2.1.3	骨肉腫由来細胞に与える影響	84
5.2.2	HA球状顆粒の作製とテトラヒドロクルクミン吸着特性 の評価	85
5.2.2.1	HA球状顆粒の作製	85
5.2.2.2	テトラヒドロクルクミンの吸着特性の評価	88
5.3	結果及び考察	
5.3.1	テトラヒドロクルクミンが細胞に与える影響の検討	89
5.3.2	HA球状顆粒の作製とテトラヒドロクルクミン 吸着特性の評価	92
5.4	結言	94
	参考文献 (第5章)	95
第6章	総合考察および総括	
6.1	総合考察	96
6.2	総括	100
	参考文献 (第6章)	102
	謝辞	103
	投稿論文, 学会発表	104



## 第1章 序 論

### 1.1 本研究の目的とその背景

人類は燃料、木材として森林破壊をつづけ、結果として表面の肥沃な土壌が流れ出し、食料不足に陥り、人口も減少し、文明衰退の一因を作ってきた。シュメール文明、ミケーネ文明など例をあげればきりが無い。人類の歴史は地球に対して環境負荷をかけてきた歴史でもある。

われわれは、そろそろ地球にどのように存在し、今後どのように地球環境と向かい合い、どこまで豊かさ、快適さを求めて行くのか考え、方向を決める時期に来ていると考える。そのことをすべての人類が認識し、対策を考え、ささやかであっても各自、様々な観点からできることを実行してゆかないと地球環境の破壊をはやめ、人類を含めた生物全体の消滅を招きかねない。

人類が環境を変えてきた理由のひとつに物の豊かさに対する要求が大きく関わっていると考えられる。特に産業革命以後は大量のエネルギーを使うようになり、時間、豊かさ、快適さを地球の持つエネルギーに置き換え消費してきた。人類は太陽エネルギーの利用から化石燃料という地下資源エネルギーにシフトすることにより大量のエネルギーを獲得できるようになった。しかし、この資源は有限で、いずれはなくなるものであり、大切に使うなくてはならない。

21世紀の現在、昭和20年代あたりとくらべると物に対する満足度はかなり高まっていると思われる。我々人類はこれからは際限なくものの豊かさを求めるのではなく心の豊かさを求めて生きる方向にきていると考える。

最近、クオリティ・オブ・ライフ（Quality of Life = QOL 生命の質、生活の質）という言葉をあちこちで目にする。QOL は人それぞれによってとらえ方、感じ方は異なるものの、基本的には人間としてより充実した生活を送るためその生活の質や人生の質を重視し、肉体的、精神的、社会的に良好な状態を保ち、またそれらの向上を目指す考え方を示すものと思われ、高齢者の福祉、精神医療、終末医療などの分野でその重要性が取り上げられている。その中でも医療面における QOL が一番関心の高いものと考えられる。人は心身ともに自分の意思で自らをコントロールできる状態で長生きしたいと願うものである。また、元気

であれば人は望む限りいつまでも様々な形で社会に貢献することが可能となる。

日本の平均寿命は数百年前に比べると医薬品の開発や栄養状態、衛生状態の改善により確実にのびてきた。しかし、必ずしも寿命がのびたからといって健康状態もよくなり満足度が高くなったとは思えない。平均寿命が延びると高齢者が増え、高齢になると発症しやすいガン、脳血栓疾患などの病気全体に占める割合が必然的に増加してくる。寿命を延ばすために治療にかかる費用、患者や介護する家族、周囲の計り知れない物心両面の苦痛や負担を考えると環境問題を考える上で費用対策を含めたこれら問題はエネルギーの有効利用、環境保護に直結する非常に大切な課題だと思われる。

自然環境、社会環境、都市環境、など人間の生活を取り巻く環境とその人間、動植物への影響について化学、社会科学、人文科学さまざまな分野からアプローチし、環境問題に対して、将来を予測しつつ総合的な対策を提案する学問が環境科学と考えると、人口、資源、エネルギー問題、人間の寿命と環境問題とは密接に関係しているといわざるを得ない。

日本は世界に類のないほど急速なスピードで高齢化社会を迎えているといわれている。それに伴い、国民の加齢等で肥満、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病や骨の一部が欠損しやすくなり重大な生活機能喪失につながる骨粗鬆症などのリスクを抱える人口が増加してくる現実に直面している。そうすると医療費がかさみ、国全体の医療費の増大につながる。また、いったん不健康になると支出だけでなく収入も減少し、個人の家計を多いに圧迫することが多いに懸念される。現在、日本人の死因の第一位はガン（約 30%）であり、その発原因のひとつに食生活などの生活習慣が挙げられている。このガン及び心疾患、脳血管疾患を合わせるとほぼ 60% の日本人がこれらの病気で死亡しているといわれている。これらの生活習慣病は治療より予防が大切であり、各個人の食生活、ライフスタイルの改善が重要な課題であると考えられる。また、各自が意識して、バランスのとれた食生活を実施するとともに、罹病予防に結びつく食品や機能性食品をとることが大切であり、これが長い目でみれば介護を必要としない健康寿命がのび、我々自身の幸せと国の医療費削減につながるものと思われる。

罹病予防に有効であると考えられている食品類には様々な生理活性機能があ

ると考えられており、その効果が経験的に知られているものが多数存在する。抗炎症作用、ガン抑制作用、肝機能、循環器系の機能向上作用などがその効果に含まれるが、活性機能の多くはその抗酸化力に由来するものといわれている。

そこで鉄に注目した。鉄は必須微量元素中、重金属のなかではもっとも含有量多く、 $Fe^{2+}$  と  $Fe^{3+}$  との2つの酸化状態をとることができ、生体内での種々の酸化還元反応に関与しており、本研究の根底を流れる重要なテーマである抗酸化活性と一番深く関わっている金属だと考えたからである

また我々が長期間健康でいられる為には内臓を支える骨の問題も大切である。その観点から骨の健康、治療、再生及び骨を形成しているカルシウムにも注目した。

カルシウムは生体にとって構造の維持に必須である骨の主要な構成成分であると同時に生体機能維持に不可欠であり、必須常量元素以外ではもっとも含有量の多い元素である（1 Kg / 成人）。その約 99 % が骨と歯に水酸アパタイトの形で存在し、残りの 1 % が細胞内と血液中に存在する。

骨は荷重を支え筋肉と繋がって運動機能を維持することのみならず必要に応じてカルシウムイオンを供給する貯蔵庫としての役割を果たす。骨形成と骨吸収のバランスがくずれると骨の増加や減少が生じる。壮年期以降の減少や骨粗鬆症などを引き起こし、骨折を起こしやすくなる。骨や軟骨は硬組織と呼ばれ、組織の特性は機能と深く関わりあっている。骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返す、カルシウムの平衡代謝が維持されている。骨の生体機能は多様で骨髄における造血機能も有する。骨吸収の過程で水酸アパタイトが溶解するとカルシウムイオン、リン酸が生成する。とくにカルシウムイオンは神経、筋肉の興奮性など細胞機能の維持、調節に必須の成分である。

このように骨は生体内で多くの役割を担っているため、骨の一部が欠損しても重大な生活機能喪失につながる。そこで病気、事故、加齢等で損傷や減少した骨の細胞外骨基質の構築をいかに再生修復するかは健康で質の高い生活を維持するために重大な問題となる。

以上の理由により抗酸化物質とその抗酸化機構の解明、鉄との関わり、骨形成に与える影響、さらに抗酸化物質を使った鉄代謝異常に有効な医薬品及び骨再生、修復、治療用新素材の開発に大きな関心と興味を持った、そこで本研究ができるだけ近い将来、

生活習慣病の予防が可能となるとともに、骨代謝を制御し、骨粗鬆症などの骨疾患の克服、治療に結びつけることができれば人類のクオリティ・オブ・ライフの向上に大いに役立つと考え、実験に着手した。

現在、数多くの健康食品、サプリメントが市販されており、消費者は健康を願って買い求めているものの、その多くは経験的には効果が認められても、反応機構や科学的根拠が不明なものが多いことも事実である。それらの科学的根拠の解明と更なる利用、応用可能性の検討を行うとともに、その情報提供も本研究の目指す目的に含まれる。

近年、植物性のポリフェノールが健康に増進に役立つとして多いに注目を集めている。このポリフェノールには多数の種類が存在し、その多くは程度の違いはあるが、さまざまな生理活性を持つと考えられている。そのため、長年、食され経験的に機能性成分を含むとされている様々なポリフェノールを含有する食品、香辛料、嗜好品類についてその機能の確認、有効性、それらを応用した新素材の開発が様々な角度から盛んに試みられるようになった。カテキンを含む茶は古くから抗菌作用など多くの薬効を持つと考えられており、その代表的なもののひとつである<sup>1)</sup>。

本研究では植物性ポリフェノールの中でも特にクルクミノイドに焦点を絞り、検討を行った。このクルクミノイドを主成分とするウコンは古くから香辛料、天然色素、生薬として幅広く利用されてきた。近年ウコンの主成分であるクルクミノイドの研究が進み、抗酸化活性、抗炎症作用、肝機能や消化器系、循環器系の機能向上作用、ガン抑制作用など、経験的に知られていたクルクミノイドが有する様々な生理機能が実験的にも証明され、その中でも抗酸化活性は特に重要な特性であることが明らかになった<sup>2)</sup>。そのため、活性酸素等に由来する病気の発症抑制、および予防に効果があると期待され、これに伴ってウコンへの関心が高まると同時に、ウコンを利用した機能性食品やサプリメントを数多く見かけるようになった。しかし、クルクミノイド分子のどの部分が様々なモデルシステムで観測された生理機能を促進するのか明確にはされていない。そこで、本研究では生体に対する効果という観点から、水系条件でクルクミノイドの物性と抗酸化特性との関係の検討を行うことを目標とした。また、クルクミノイドの抗酸化機構の解明も視野にいれ実験に着手した。

クルクミンは代表的なクルクミノイドとして一番よく知られており、研究報告も他のクルクミノイドに比べ圧倒的にクルクミンに関するものが多い<sup>3)~13)</sup>。しかし、近年、クルクミンの還元体であるテトラヒドロクルクミンにもクルクミン以上の強力な活性能力があることが明らかにされた<sup>9)</sup>。さらに経口投与後の血液中のクルクミンの量を測定したところクルクミンの代わりにテトラヒドロクルクミンがかなりの量検出されており、実際に生体内で活性を示すのはテトラヒドロクルクミンの方ではないかという報告もある<sup>14), 15)</sup>。さらに、テトラヒドロクルクミンとクルクミンについて、大腸がん、腎臓ガン予防効果、解毒酵素誘導効果を比較したところ、前者の方に強い強い効果が見られたという実験例もみられる<sup>11)</sup>。そこで本研究ではクルクミンより生理活性が高いと言われているわりには報告例の少ないテトラヒドロクルクミンに焦点を当て、クルクミンと比較しながらその物性評価と特性の検討を行った。また、すでに報告されているクルクミンの物性についても、実験条件が不明確なものもあり、本研究ではその観点に特に留意し、再検討も含めて実験を進めた。さらにクルクミノイドと鉄及び生体との関係を検討した。

生体内における酸化還元反応は呼吸、代謝、吸収、解毒などのおよそ考えられる生命体のすべての機能において重要な役割を果たしており、おもに酵素を媒介として進行する。しかし、鉄を介した同様の反応は  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$  というフェントン反応やハーバーバイス反応 ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}\cdot + \text{O}_2$ ) を経て非酵素的にも進行する。この反応の途中で発生する反応性の高い物質が活性酸素、フリーラジカルである。これらの reactive oxygen species (ROS) の中ではヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) が最も毒性が強いといわれている。

従来、ガン、心疾患、脳血管疾患、動脈硬化症、糖尿病等の発症原因のひとつに活性酸素等のラジカルが挙げられており、また、鉄に関しても不足すると貧血や筋肉の障害を引き起こすが逆に過剰は種々の臓器に障害を与えるだけでなく、発癌のリスクとなることがいわれていたが、はっきりしていない部分が多かった。しかし、最近、分析器機や分析方法の進歩に伴い MRI 等の使用により血液中や臓器中の鉄濃度の定量が可能となり、病気を発現した部分の鉄の量が正常な状態より増加していることが分かった。それにより肝細胞等の疾患部分

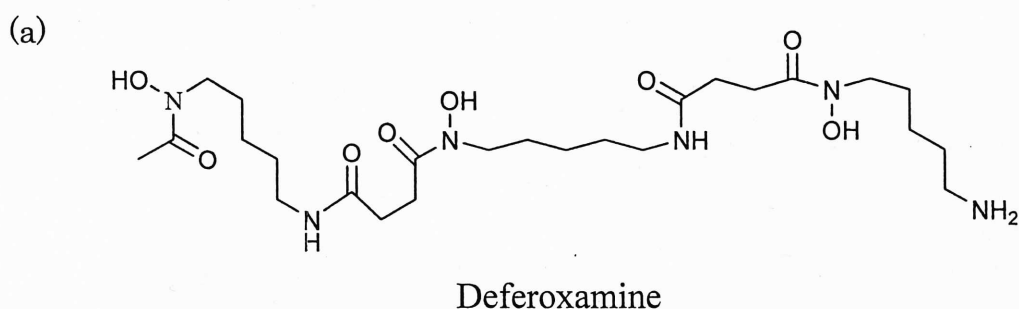
に沈着した鉄がラジカルの産生を亢進し、細胞障害をおこすことが明らかになり<sup>16)</sup> 鉄の病気への関与と影響がはっきりと指摘された。これにより、生体内における鉄のバランス異常、つまり鉄がいわゆる「生活習慣病」の本質部分に関わっていることが明白となった<sup>17)</sup>。

細胞内の酸化還元反応触媒として作用している鉄は成人一人あたりほぼ 4 g 保持している。そのうち、およそ 65 % はヘム鉄としてヘモグロビンとミオグロビン中に存在し酸素の供給に関与している。鉄代謝の機構は不明の部分が多いが、鉄は細胞の呼吸に関連する酵素など活性部位にふくまれ、赤血球のヘモグロビン合成、細胞の増殖、アポトーシスなどに関与する必須の元素と考えられている。加えて、もともと摂取しにくい元素でもあり、余分な鉄を体内に積極滴に排泄する機構は生体内に存在しない。また、存在が過剰であると細胞に有害な活性酸素を発生させるため、細胞内では非ヘム鉄として通常蛋白質に結合して存在し、生体内での鉄のバランスは適切に制御され、毒性を発揮しないようになっている。たとえばすべての細胞に発現しているフェリチン蛋白(鉄貯蔵蛋白)は1分子あたり 2000・5000 の鉄イオンを収容する能力を有しており鉄の毒性から細胞を守っている。しかし何らかの理由で鉄が過剰になると鉄と結合したフェリチンがリソソームで変性をうけヘモジリデンとなる際に過剰な鉄イオンが遊離されやすくなる。すると生じた遊離鉄が ROS を発生させ、脂質膜の過酸化を惹起したり、DNA に傷をつけて細胞を害する。特に肝臓は余分な鉄の貯蔵をおこなったり、生体鉄代謝を調節するホルモンであるヘプシジンを作り出す鉄代謝における大切な臓器であり、肝鉄濃度を測定することが生体貯蔵鉄濃度を知るための最も信頼できる方法と考えられている。肝臓に鉄が過剰に沈着した状態は鉄過剰症候群と呼ばれ、肝細胞壊死やガンの発生を引き起こす。鉄過剰症候群は遺伝性と二次性とに分けられるが、二次性的の場合、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎などの肝疾患でも肝臓に鉄がたまる。

鉄過剰症候群は次のような病気を引き起こす。すなわち、侵される臓器は肝、心肺、内分泌腺、皮膚などであり、生命予後を規定するのは肝硬変、肝癌、心不全、C型肝炎、アルコール性脂肪肝炎、非アルコール性肝障害などである。鉄過剰症の診断は次のようにして行なわれる。血清フェリチンの値で診断

1800ng/ml を超えると鉄過剰症と診断され、肝細胞の鉄含量の測定を行なったのち、治療が開始される。

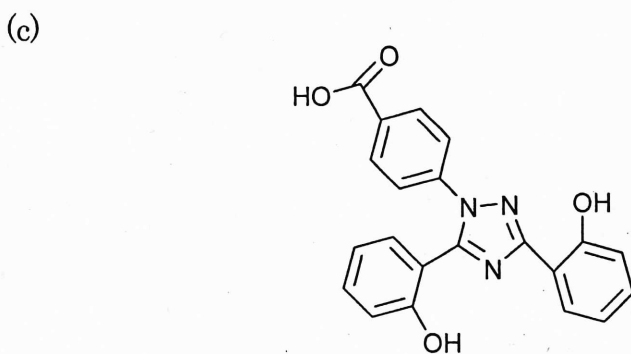
最近、その鉄過剰症や鉄代謝異常疾患に関する分野の研究が進み、その治療法及び治療薬の開発も進歩してきた。その代表的な治療方法は余分な鉄を鉄キレートとして除鉄する鉄キレート療法である。現在、わが国では鉄キレート薬としてデフェロキサミン (DFO, Fig. 1・1(a)) のみ許可されている。DFO は高い鉄除去能を持つが効果の持続時間が極めて短いためポンプを用いた長時間にわたる皮下注入を5~7日/週行なわなければならない患者への負担が大きい。そこで効果持続時間が長く副作用の少ない経口薬の開発が盛んに試みられるようになった<sup>22)</sup>。しかし十分な量の鉄を除去するために鉄キレート剤が体内に安定してとどまっていながらも必要な鉄依存性の代謝を妨げず、かつ副作用の少ない薬剤の開発は困難であった。1999年に European Regulatory Authority で認可されたデフェリプロン (Fig. 1・1(b)) は効果持続時間が短い分子量が小さいため吸収しやすい経口キレート剤として使用されてきたが長期使用にあたっては肝繊維症等の進行等の副作用がみられた。しかし2005年に画期的な経口鉄キレート剤として米国食品医薬品局により承認されたデフェラシロクス (Fig. 1・1(c))<sup>18), 19)</sup> はデフェリプロンより生体内滞留時間が長く、ほぼ24時間持続するので1日1回の服用で効果が期待できる。しかし、この治療薬にも軽度の腹部症状やクレアチニンの上昇などの副作用が確認されている。







Defriprone



Deferasirox

Fig. 1 - 1 Chemical structure of Deferoxamine, Defriprone and Deferasirox.

そこで、現在、副作用の無いキレート剤の開発が早急に望まれている状況である。また、最近、パーキンソン病、アルツハイマー病等の脳疾患の病理学的特長のひとつにニューロン先端及び周囲のミクログリアにおける鉄の異常な蓄積がみられ、このアルツハイマー病等の治療に抗酸化剤、金属キレート剤が有効であるとの報告や<sup>20)</sup>、茶カテキンがヒト脳における神経死を阻害、または遅延させる効果があるとの報告もあった<sup>17)</sup>。このことはこれらの脳疾患にも鉄が関与していることが推測され、ポリフェノールが天然鉄キレート化剤、抗酸化剤として機能している可能性を示唆するものである。

その観点からも、クルクミノイドは天然由来なので生体に対する負担、副作用が少ないと推定され、鉄キレート剤としての開発可能性が有望であると考えられる。この鉄キレート剤は高齢者とは限らずあらゆる年齢層に適用可能と考えられる。

カルシウムに関しては現在骨再生分野で骨伝導性人工材料として有望なリン酸カルシウムを主成分とする多孔質セラミックスの開発が進み、細胞移植と組み合わせた骨再生技術などに発展してきており、生体組織の損傷を補うため、



多くの生体親和性にすぐれた生体材料が合成され、すでに臨床応用されている。骨芽細胞は骨組織表面に存在し盛んにコラーゲンなどの骨基質蛋白質を分泌している。この基質蛋白質にリン酸カルシウム、水酸アパタイトの結晶が沈着し硬い骨組織ができあがる。このリン酸カルシウムの結晶の沈着を石灰化と呼んでいる。骨表面の骨芽細胞は石灰化のはじまった直後の骨基質の中に埋め込まれて、やがて骨細胞となる。

骨形成は骨芽細胞の出現により引き起こされるが、単なる細胞の移植では、そのほとんどの細胞は周囲に吸収され、移植場所にとどまることができない。そのため、細胞の担体（carrier）を必要とする。この担体として人工的に合成した多孔性の水酸アパタイトが適しており、また、水酸アパタイト自体が骨再生を促進することが知られている<sup>21)</sup>。

一方、生体成分を抽出、精製し、生物由来の生体材料として用いられることもある。これらの生体材料には有機高分子や無機化合物もある。しかし、これらの生体材料そのものでは生物活性をもたないものが多く、その応用範囲は限定される。もし、これらの物質が生理活性を持つことになれば、水酸アパタイトの生体親和性に付加価値が加わり、その応用範囲は非常に広がることが期待できる。例えば、骨欠損部の治療に用いられる水酸アパタイトは欠損部が小さい場合には単独移植で治癒されるが、その欠損部が大きい場合には組織修復が十分に行われないう可能性がある。しかし、もし水酸アパタイトそのものが持つ骨再生促進能力に加え、新生骨を形成する生理活性が付加されれば、周囲の骨組織からの修復と水酸アパタイトの骨再生機能が更に増幅され、非常におおきな骨欠損部でも修復可能となる。

また、水酸アパタイトに抗生物質等の医薬品と担持させれば、骨再生のみならず治療を目的とし、歯や骨の病気の部分に望む濃度で連続的、スポット的に必要な期間、医薬品投与が可能になる。ドラッグデリバリーシステム（DDS）である。この DDS に適用できれば医薬品の全身投与に比べ患者への負担や副作用もかなり軽減できると思われる。

そこで水酸アパタイトのさらなる応用可能性を探るため、未知の生理活性を持つ新しい複合材料の開発を目的としてテトラヒドロルクミン/水酸アパタイト複合体を創生し、この複合体の生理活性評価を行い、生体内ドラッグデリバ

リーシステムへの応用等, 生体系における医療材料としての機能性を検討することとした。

本研究が実用化できれば人間が心身ともに健康で生活できる寿命を延ばすことにつながり, それは広い意味での医療, 介護等に費やす費用, エネルギー使用の大幅な削減および環境保全に貢献できるものと考ええる。

## 1.2 クルクミノイド, クルクミノイド系鉄キレート剤, 水酸アパタイト複合体の研究状況

現在, クルクミンの抗酸化機構についてはペルオキシラジカルの捕捉<sup>3~5)</sup>, 一重項酸素のクエンチング<sup>6)</sup>, 鉄(III)の還元<sup>7)</sup>, 鉄(II, III)イオンとの錯体形成<sup>7)</sup>など, 様々な観点からその解明が試みられている。しかしこれらの機能は複合して起こり, 生体への影響を一様に議論することは難しい。例えば Kunchandyらは過酸化水素存在下, クルクミンと Fe(III)-EDTA 錯体との反応を調べている<sup>6)</sup>。クルクミンは Fe(III) 錯体を還元し Fe(II)-EDTA 錯体を生ずる。一方生成した Fe(II) 錯体は Fenton 反応によりヒドロキシラジカルを発生させ, クルクミンは還元作用とヒドロキシラジカル発生の双方に関与していると報告している。しかし, 実験条件で水に対する溶解度の低いクルクミンを溶解するため 0.1 % の水酸化ナトリウムを使用しており生体内に近い実験条件とはいえない。Tonnesen らは生体膜のモデルとしてリポソームの脂質二分子膜にクルクミンを取り込ませ, その過酸化反応に与える影響を調べている<sup>8)</sup>。その結果クルクミンは酸素ラジカル発生に対して光増感剤として機能する一方, 他の増感剤由来のラジカルを捕捉するという相反する機能を示した。このようにクルクミンは関与する反応系により多様な機能を示す。

最近 Osawa らはクルクミンの還元体であるテトラヒドロクルクミンに注目し, その抗酸化活性について調べている<sup>9~11)</sup>。リノール酸の自動酸化および赤血球膜や肝臓マイクロソームの *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (t-BuOOH) による過酸化に対する作用を調べたところ, テトラヒドロクルクミンはクルクミンよりも高い抗酸化作用を示すことを見いだした<sup>9)</sup>。さらにクルクミンを経口摂取させたとき, 腸管の上皮細胞で吸収される際, テトラヒドロクルクミンに還

元されることを見いだしている<sup>11)</sup>。この事実はテトラヒドロクルクミンが生体内での抗酸化過程において重要な役割を担っていることを示すものである。しかし、その安定性や  $pK_a$  に関してはまだ報告されていない。また、現在、クルクミノイドを含むポリフェノール類を利用した生体に無害な鉄キレート剤として承認されている医薬品はない。

水酸アパタイトはリン酸カルシウム的一种で骨や歯の主要成分であり、現在様々な分野への応用が期待されている素材である。優れた生体適合性、骨親和性を持つため、人工歯根、人工骨などにも使われており、そのナノ粉末は水溶液中でフェノールに対する良好な吸着剤<sup>22)</sup>として機能し、環境保全にも役立つ可能性を示唆している。更に、その吸着特性を生かし、より扱いやすく、適用範囲を拡大するため、多孔性の様々なサイズ、形状の水酸アパタイト結晶が作製されており、蛋白質、医薬品等を吸着させて実際に医療に応用する取り組みがなされている<sup>23)</sup>。例えば 歯周病による骨欠損では患部へのスポット的に連続した高濃度の抗生物質投与が必要となるが水酸アパタイト結晶に抗生物質を吸着させた複合体を欠損部分へ充填すれば骨の再生と同時に長期間の抗生物質投与が可能となり、従来より治療効果を上げることが期待される。そのような骨再生に有用な蛋白質や薬物制御放出担体<sup>23)</sup>としての利用が可能となる投薬システム (DDS) の開発を目指して現在多くの研究<sup>24)</sup>が進んでいる。

ただし、これまでに抗酸化活性の高いテトラヒドロクルクミンのような物質を水酸アパタイトに担持させた例は見あたらず、本研究が初めての試みである。また、最近クルクミンが骨の代謝システム (造骨と破骨) を制御する能力を有するという興味深い報告が出された<sup>25)</sup>。テトラヒドロクルクミンもクルクミンと同様の能力を有すると推測される。この特性を医療に応用すれば加齢によって避けがたい骨粗鬆症の進行やガンの骨溶解性転移等を抑制する効果が期待される。このようにテトラヒドロクルクミン単独使用、及び水酸アパタイト複合体としての利用を考え合わせるとその応用範囲は多方面に広がると思われる。

### 1.3 本研究の概要

本研究はクルクミンより抗酸化活性が高いといわれているテトヒドロクル

ミンに注目し、クルクミンと比較しながら、その抗酸化システムの解明を行うとともに天然物由来の生理活性物質を使用した医薬品（鉄キレート剤）の開発や新しい医療素材の開発（水酸アパタイト複合体）を目的とし、その応用と可能性を検討するものである。

本研究は 6 章より構成されており、各章は次のようになっている。

## 第 1 章

この章ではクルクミン、テトラヒドロクルクミンの各種生理活性機能解明のため従来の研究を概観するとともに本研究の意義と目的及び概要を述べた。

## 第 2 章

この章ではまだ明らかになっていないにテトラヒドロクルクミンの酸化安定性をクルクミンとともに明確な測定条件下で評価、ついで基本的物性のひとつである  $pK_a$  を求め両者の結果を比較した。その結果、クルクミンは pH により安定性が大きく異なるが、テトラヒドロクルクミンは pH に依存せず、長時間安定であることを明らかにした。

## 第 3 章

この章では生体内で起こる酸化還元反応に深く関わっていると考えられる鉄に注目し、鉄の捕捉という観点から 2 章で決定した  $pK_a$  をもとに鉄(II)、(III) 錯体の水系における安定度定数求めた。また、サイクリックボルタンメトリーにより電気化学的に酸化還元挙動を調べ、鉄(III)還元能力を評価した。その結果、錯体の安定度定数はテトラクルクミンの方がいずれもやや大きい値を与えた。また、サイクリックボルタンメトリーでは比較のために測定したクルクミンが鉄(III)を鉄(II)に還元することが確認されたが、テトラクルクミンの場合は明確に実証できなかった。

## 第 4 章

この章では 0-フェナントロリン法を使用し、pH 7.4 におけるテトラヒドロクルクミンの  $Fe^{3+}$  の還元動向をクルクミンと比較しながら検討した。その結果、テトラヒドロクルクミンが  $Fe^{3+}$  を  $Fe^{2+}$  に還元していることがわかり、還元能力を有することが明らかになった。

## 第 5 章

この章ではクルクミノイドの新しい応用例としてテトラヒドロクルクミン/水酸アパタイト複合体を創製し、その特性評価を行い、骨再生、ドラッグデリバリーシステム等へ応用を検討した。

## 第 6 章

この章は結論であり、総合的に考察を行い、各章の内容を要約して総括とした。

参 考 文 献 (第 1 章)

- 1) M. Slvia, A. Tamar, R. Lydia, W. Orly, Y. Moussa B. H. : *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 5, 229 (2006)
- 2) J. - K. Lin, M. - H. Pan, S. - Y. Lin - Shiau: *BioFactors*, 13, 153 (2000) .
- 3) T. Masuda, K. Hidaka, A. Shinohara, T. Maekawa, Y. Takeda, H. Yamaguchi: *J. Agric. Food Chem.* , 47, 71 (1999) .
- 4) T. Masuda, T. Maekawa, K. Hidaka, H. Bando, Y. Takeda, H. Yamaguchi: *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2539 (2001) .
- 5) K. Ohara, W. Mizukami, A. Tokunaga, S. Nagaoka, H. Ueno, K. Mukai: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 78, 615 (2005).
- 6) K. C. Das, C. K. Das: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295, 62 (2002) .
- 7) E. kunchandy, M. N. A. Rao: *Int. J. Pharm.*, 57, 173 (1989) .
- 8) H. H. Tønnesen, G. Smistad, T. Ågren, J. Karlsen: *Int. J. Pharm.*, 90, 221 (1993).
- 9) T. Osawa, Y. Sugiyama, M. Inayoshi, S. Kawakishi: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1609 (1995).
- 10) 大澤俊彦: *食品と開発*, 33, 5 (1998).
- 11) T. Osawa, Y. Sugiyama, M. Inayoshi, S. Kawakishi: *Food Phytochemicals II: Teas, Spices, and Herbs*, Chapter 19, 183 (1994).
- 12) Y. - J. Wang, M. - H. Pan, A. - L. Cheng, L. - I. Lin, Y. - S. Ho, C. - Y. Hsieh, J. - K. Lin : *J. Pham. Biomed. Anal.*, 15, 1867 (1997) .
- 13) M. Bernabé, M. Teresa, M. Romero, E. Gonzales, A. Rojas: *Spectrochim. Acta PartA*, 60, 1091 (2004).
- 14) G. M. Holder, J. L. Pulummer, A. J. Ryan: *Xenobiotica*, 8, 761 (1978)
- 15) シーエムシー出版編集発行 : *植物ポリフェノール含有素材の開発ーその機能性と安全性ー* p.216
- 16) N. P. Ferras, A. Y. Mateus, F. C. Monteiro: *Journal of Biomedical Research Part A DOI 10. 1002/jbm. a.* 31151, 994 ( 2007)
- 17) G. Nicolas, M. Bennoun, I. Devaux, C. Beaumont, B. Grandchamp, A. Kahn, S. Vaulont.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 15, 8780 (2001)

- 18) 血液フロンティア : Vol. 16, No8, 95 (2006)
- 19) P. V. Bernhardt : [www.rsc.org/dalton](http://www.rsc.org/dalton), 5 (2007)
- 20) D. Amichand, F. Ronen, D. Santy, L. Janice L. : *J. Agric Food Chem.* **56**, 9, 3350 (2008)
- 21) T. Okuda, K. Ioku, I. Yonezawa, H. Migagi, Y. Gonda, G. Kawachi, M. Kamitakahara, Y. Shibata, H. Murayama, H. Kurosawa, T. Ikeda : *Biomaterials*, **29**, 2719-2728 (2008)
- 22) L. Kalli, P. Jiayong, C. Yiwei, C. Rongming, X. Xuecheng : *J. Hazard Mater.*, **161**, 231-240 (2009)
- 23) T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, S. Yamaguchi, T. Kusunose, T. Toyonaga, Y. Hamada, J. Takahashi : *Biomaterials*, **25**, 3807-3812 (2004)
- 24) T. Takahashi, M. Kamitakahara, G. Kawachi, K. Ioku : *Key Engineering Materials*, 361-363, 83-86 (2008)
- 25) M. Notoya, H. Nishimura, J. T. Woo, K. Nagai, Y. Ishihara, H. Hagiwara : *European Journal of Pharmacology*, **534**, 55 (2006)

## 第 2 章 クルクミノイドの酸化安定性と酸解離特性の評価

### 2.1 緒 言

テトラヒドロクルクミンの機能解明を視野に, Fe (II, III) イオンに対する錯形成挙動を解析する前段階として, 水溶液中における安定性を大気下及びアルゴン雰囲気下で比較検討し, 酸解離反応特性を調べ, クルクミンの安定性や酸解離特性と比較した. クルクミンに関する安定性<sup>1)</sup>,  $pK_a$  に関する報告<sup>2)</sup> は既になされているものの, 前者は溶存酸素存在下での検討であり, 後者はイオン強度が不明であるため, 本研究では実験条件を明確化し再検討することとした.

### 2.2 実 験

#### 2.2.1 装置

吸収スペクトルは島津製のフोटダイオードアレイ分光光度計 Shimadzu MultiSpec - 1500 に 1 cm 石英セルを用いて測定した. pH は Horiba F - 21 pH メーターに複合電極を装着して測定した. pH メーターは 25°C で pH 6.86, 9.18 の標準溶液を用いて校正した. 試料及びセル室は, ヤマト製恒温槽 Low Constant Water Bath BQ 100 を用いて 25°C とした. <sup>1</sup>H-NMR 測定はパリアン製核磁気共鳴装置 Gemini 2000 ( 400 MHz ) を用い重クロロホルム中で行った. 質量分析は島津製質量分析計 QP - 5000 を用いて行った.

#### 2.2.2 試薬

クルクミンは和光純薬製 ( 試薬特級 ) を用いた. HCl ( 関東化学, 特級 ), NaOH ( 関東化学, 特級 ), NaCl ( 関東化学, 特級 ), アダムス触媒 ( PtO<sub>2</sub>, 安田薬品 ), 水素ガス ( 東北酸素 ) はそのまま使用した. アセトン, MeOH, CHCl<sub>3</sub>, はともに和光1級を蒸留して利用した. 純水はオルガノ製純水製造器 Organo G-10 C で精製したものをを用いた.

#### 2.2.3 クルクミンの精製



市販のクルクミンにはデメトキシクルクミン、ビスデメトキシクルクミンが不純物として含まれているため、薄層クロマトグラフィー (TLC) により精製した。クルクミン 60 mg をアセトン 3 ml に溶解し、Merck 製シリカゲル薄層プレート (PLC plate 20 × 20 cm, Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 厚さ 0.5 mm) 4 枚に、先端を二段に細く引き伸ばしたピペットで塗布した後、5% MeOH/CHCl<sub>3</sub> で展開した。R<sub>f</sub> = 0.55 の部分を掻き取り、クロロホルム、メタノールにて溶離し、溶媒を留去し、クルクミンの粉末を収量 48 mg (収率: 80%) で得た。m/z 368 (M<sup>+</sup>), <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 400 MHz: δ3.94 (6H, s, OCH<sub>3</sub> × 2), δ5.79 (H, s, 4), δ5.84 (H, s, OH), δ6.47 (2 H, d, J = 15 Hz, 2, 6), δ6.92 (2 H, d, J = 7 Hz, 5, 5'), δ7.05 (2 H, d, 2', 2''), δ7.11 (2 H, dd, J = 2 Hz, 7 Hz, 6', 6''), δ7.58 (2 H, d, J = 15 Hz, 1, 6)。

#### 2.2.4 テトラヒドロクルクミンの合成

Osaw<sup>3)</sup>, Uehara<sup>4)</sup> 及び Roughley<sup>5)</sup> の方法を改変し合成、精製した (Fig. 2-1)。クルクミン 45 mg をメタノール 6 ml に溶解し、アダムス触媒 (PtO<sub>2</sub>) 30 mg を加え、8 分間水素を通じた。このとき、溶液は黄色から無色に変化した。シリンジフィルター Minisart RC 25 で反応混合物をろ過し、触媒を除いた。ロータリーエバポレーターで溶媒を留去後、TLC 分離 (5% MeOH / CHCl<sub>3</sub>, 一回展開) により UV 吸収を示す R<sub>f</sub> = 0.65 の部分を掻き取り、クロロホルム、メタノールでシリカゲルから溶離し、テトラヒドロクルクミン 13 mg (収率: 28.9%) で得た。m/z 372 (M<sup>+</sup>), <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>: 400 MHz): δ2.54 (4H, t, J = 8.1, 1.7), δ2.78~2.85 (4H, m, 2, 6), δ3.49 (2 H (keto), s, 4), δ3.84 (6 H, s, 2 × OCH<sub>3</sub>), δ5.42 (1 H (enol), s, 4), δ5.53 (H, s, OH), δ6.65 (2 H, d, J = 8.4 Hz, 6', 6''), δ6.67 (2 H, s, 2', 2''), δ6.81 (2 H, d, J = 7.6 Hz, 5', 5'')。

#### 2.2.5 分光光度滴定

クルクミンは DMSO に溶解し、遮光下で貯蔵した。クルクミン溶液 0.20 ml (5.92 × 10<sup>-3</sup>M) に 0.1 M NaCl を含有する 0.01 M NaOH 水溶液を加えて 100 ml とし、被滴定溶液とした。一方、テトラヒドロクルクミンはメタノ

ールに溶解し冷蔵した。メスフラスコにテトラヒドロルクミン溶液 0.16 ml ( $1.80 \times 10^{-3}$  M) をとり, 0.1 M NaCl を含有する  $1.0 \times 10^{-4}$  M HCl を加えて 100 ml とし, 被滴定溶液とした。25°C に保った恒温槽に被滴定溶液を含むビーカーを入れ, 水で飽和したアルゴンを通気し, マグネチックスターラーで攪拌した。pH 5.5 ~ 11.5 の範囲で塩酸又は水酸化ナトリウム水溶液を滴下し, pH メーターの数値が安定した後, 攪拌とアルゴンガス通気を停止し pH を記録した。試料溶液は石英セルに分取し吸光度ないしスペクトルを測定後, セル内の溶液をビーカーに戻した。再び塩酸, もしくは水酸化ナトリウム水溶液の滴下と測定を繰り返した。1 回の滴定におよそ 1 時間を要し, 各実験は 3 回行った。

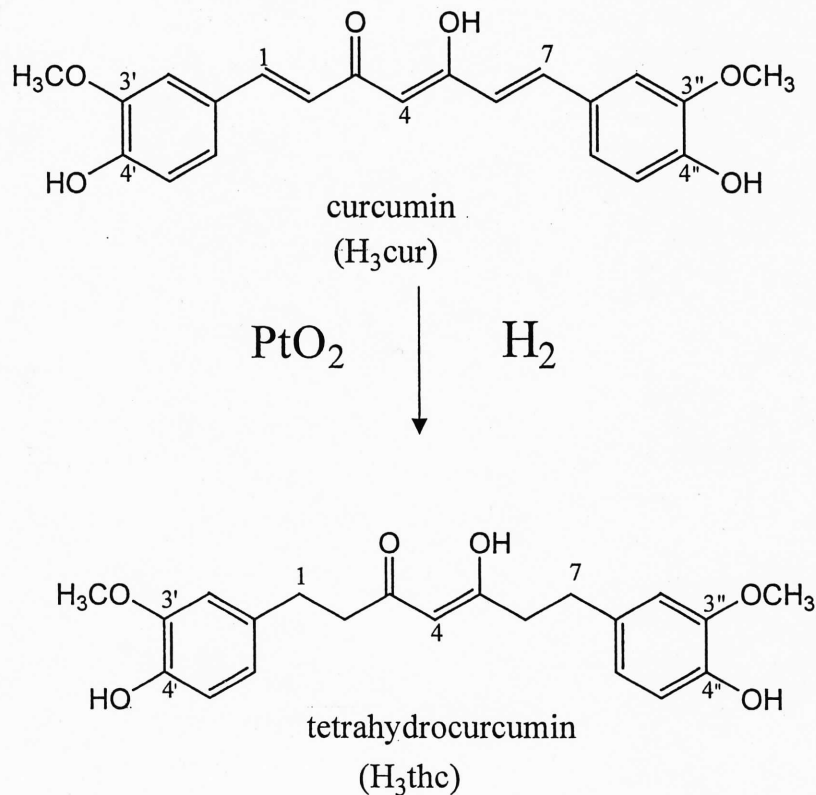


Fig. 2 - 1 Tetrahydrocurcumin from Curcumin by hydrogenation with using PtO<sub>2</sub> catalyst.

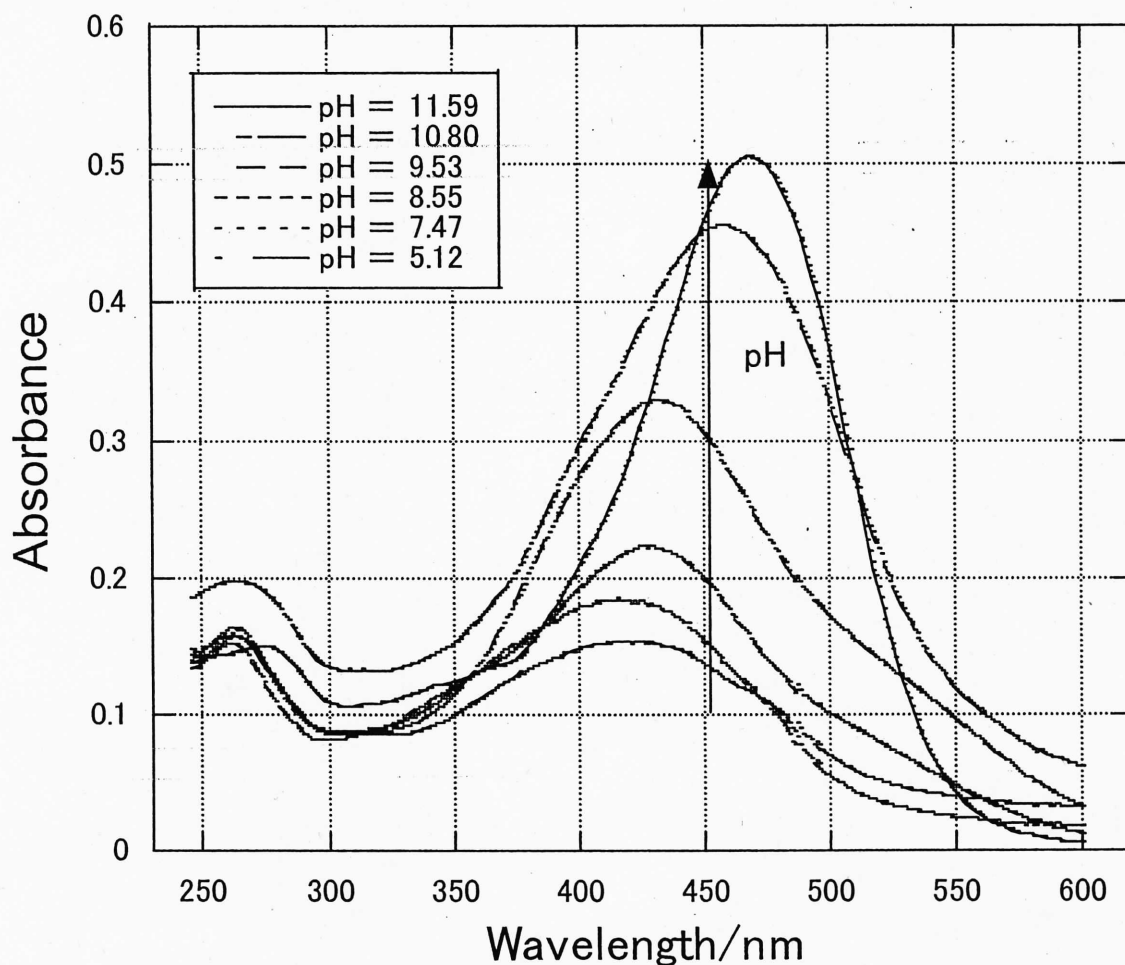


Fig. 2 - 2

Typical UV-vis absorption spectra for curcumin as a function of pH .

$C_{\text{cur}} = 1.18 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $25^{\circ}\text{C}$  ; pH 5.12 ~ 11.59

### 2.2.6 $pK_a$ の算出

クルクミン ( $\text{H}_3\text{cur}$ ) , 及びテトラヒドロクルクミン ( $\text{H}_3\text{thc}$ ) は共に各フェノール部位に 1 つ, アセチルアセトン部位に 1 つの解離可能なプロトンを有する三プロトン酸 ( $\text{H}_3\text{A}$ ) である. したがって三段階の酸解離反応 (式 (1) ~ (3) ) を仮定し, 解析した.



ここで  $K'_{a1\sim3}$  は混成平衡定数で、プロトンの活量  $a_{\text{H}^+}$  は pH 測定により式 (4) で与えられる。

$$a_{\text{H}^+} = 10^{-\text{pH}} \quad (4)$$

三プロトン酸の全濃度  $A_T$  は式 (5) で、又、 $\text{H}_3\text{A}$ ,  $\text{H}_2\text{A}^-$ ,  $\text{HA}^{2-}$ ,  $\text{A}^{3-}$  の測定波長におけるモル吸光係数  $\varepsilon_{\text{H}_3\text{A}}$ ,  $\varepsilon_{\text{H}_2\text{A}^-}$ ,  $\varepsilon_{\text{HA}^{2-}}$ ,  $\varepsilon_{\text{A}^{3-}}$  を用いて、吸光度 Abs は式 (6) で与えられる。

$$A_T = [\text{H}_3\text{A}] + [\text{H}_2\text{A}^-] + [\text{HA}^{2-}] + [\text{A}^{3-}] \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \text{Abs} = & \varepsilon_{\text{H}_3\text{A}} [\text{H}_3\text{A}] + \varepsilon_{\text{H}_2\text{A}^-} [\text{H}_2\text{A}^-] \\ & + \varepsilon_{\text{HA}^{2-}} [\text{HA}^{2-}] + \varepsilon_{\text{A}^{3-}} [\text{A}^{3-}] \quad (6) \end{aligned}$$

水溶液中 (25°C, イオン強度 0.1) のアセチルアセトン, 及びフェノールの  $\text{p}K_a$  はそれぞれ 8.82, 9.87 であり<sup>6)</sup>,  $K'_{a1}\sim K'_{a3}$  の近接が予測された。よって上の式 (1)~(3) の酸解離を独立に解析することは不可能と判断した。そこで文献 7 記載のポリプロトン酸の  $\text{p}K_a$  算出法に準じて解析することとした。すなわち,

式 (6) を式 (1)~(5) を用いて変形して式 (7) を得た. これを非線形回帰曲線をサポートしている KaleidaGraph に入力し, pH を独立変数,  $K_{a1}$ ,  $K_{a2}$ ,  $K_{a3}$ ,  $\varepsilon_{H_2A^-}$ ,  $\varepsilon_{HA^{2-}}$ ,  $\varepsilon_{A^{3-}}$  をパラメータとして吸光度 Abs の pH 変化すなわち滴定曲線に対しカーブフィットした.  $\varepsilon_{H_3A}$  は低 pH (pH 6.0~7.0) における吸光度から決定した.

$$\text{Abs} = \left\{ \frac{\frac{\varepsilon_{H_3A} \cdot a_{H^+}^3}{K'_{a1} \cdot K'_{a2} \cdot K'_{a3}} + \frac{\varepsilon_{H_2A^-} \cdot a_{H^+}^2}{K'_{a2} \cdot K'_{a3}} + \frac{\varepsilon_{HA^{2-}} \cdot a_{H^+}}{K'_{a3}} + \varepsilon_{A^{3-}}}{\frac{a_{H^+}^3}{K'_{a1} \cdot K'_{a2} \cdot K'_{a3}} + \frac{a_{H^+}^2}{K'_{a2} \cdot K'_{a3}} + \frac{a_{H^+}}{K'_{a3}} + 1} \right\} \cdot A_T \quad (7)$$

イオン強度  $I = 0.1$  におけるプロトンの活量係数  $\gamma_{H^+} = 0.83^{(8)}$  を用い, 得られた  $K'_{a1\sim3}$  を濃度平衡定数  $K_{a1\sim3}$  に変換した.

## 2.3 結果及び考察

### 2.3.1 クルクミン

クルクミンは空気の存在下, 中性から弱アルカリ pH 範囲で比較的速やかに分解することが知られている. そこでアルゴン中及び比較のため空気中において安定性の検討を行った. 代表的な pH におけるスペクトルを Fig. 2-2 に示す. クルクミン水溶液は酸性では淡黄色, アルカリ性では赤褐色を示した. pH 3.00, 6.86, 8.04, 10.00, 11.98 について, 極大波長での吸光度の時間依存性をアルゴン及び空気中で調べた (Fig. 2-3). pH や空気の有無によらず, ほぼ一時間以内でクルクミンは分解し, 一次の減衰曲線を与えた. 式 (8) より分解速度定数  $k_{obs}$  と半減期  $t_{1/2}$  を求めた (Table 2-1). ここで  $A_t$ ,  $A_\infty$  はそれぞれ時間  $t$ , 及び無限大における吸光度を示す.

$$\frac{A_t - A_\infty}{A_0 - A_\infty} = \exp(-k_{\text{obs}} t) \quad (8)$$

pH 8.04, アルゴン雰囲気下の場合, 式 (8) に従わないので 半減期を Fig. 2-3 より直接読み取り 3.1 min と算出した. pH 8.04 空気飽和条件下では速やかに分解したが, pH 10, 及び 3 ではそれぞれ  $t_{1/2} = 17.7$  min, 47.5 min 程度とより安定な結果を与えた. 各 pH における半減期はいずれも空気飽和下よりアルゴン雰囲気下の方が若干長く, アルゴンの使用はクルクミンの分解を遅らせる効果があった. なお, 以下の光度滴定の各滴定点の pH・吸光度のデータ取得に要する時間は 1 min 程度とした.

水溶液中におけるクルクミンの安定性に関しては Bernabé-Pineda<sup>2)</sup>, 及び Wang<sup>1)</sup> らが検討している. 前者らはアルカリ性, 窒素雰囲気下, 25°C, 468 nm におけるスペクトルを測定し, pH > 9 では吸光度の減少はゆるやかであり, 数分間は安定だと述べており, この pH 範囲では著者らの測定結果も同様の傾向を示した. また, Wang らの観測した  $k_{\text{obs}}$  の pH 依存性は我々のケースとでは温度や緩衝剤などの条件は異なるものの pH 8.0 で  $k_{\text{obs}}$  が極大を示す同様の傾向を示した. また, Wang らはクルクミンの分解生成物としてその脂肪鎖二重結合部位への酸素の付加・開裂により生成したと思われる *trans*-6-(4-ヒドロキシ・3-メトキシフェニル)-2,4-ジオキソ-5-ヘキサナール, バニリン, フェルラ酸, フェルロイルメタンを同定している. 本実験では大気中に比べアルゴン雰囲気下の場合分解速度定数が小さい. これはクルクミンの開裂が酸素に起因することを示唆している. 初めに溶存酸素による自動酸化で  $\beta$ -ジケトン部分が開裂し, その後バニリンまで分解が進行してゆくと考えられる.

光度滴定曲線を Fig. 2-4 に示す. 得られた  $pK_{a1}$  と  $pK_{a3}$  は Bernabé-Pineda<sup>2)</sup> らの求めたもの (Table 2-2, Ref. 2) にほぼ一致したが,  $pK_{a2}$  には差がみられた. これは解析ルーチンの違いによるものと思われる. いずれも非線形最小二乗法により解析しているが, Ref. 2 は SQUAD により多波長で, 本研究は単波長で行ったことによる差と考えられる. なお Jovanovic<sup>8)</sup> らは 2 つの  $pK_a$  を仮定して解析しているが ( $pK_{a1}: 8.55 \pm 0.05$ ,  $pK_{a2}: 10.41 \pm 0.05$ ) 仮定自体が妥当ではない.

Table 2-1 Rate constants and  $t_{1/2}$  for the degradation of curcumin in aqueous solutions

pH	$\lambda$ /nm	Atm. <sup>a)</sup>	Buffer	$k_{obs}$ / min <sup>-1</sup> × 10 <sup>3</sup>	$t_{1/2}$ /min	temp./°C
3.00	432	air	-	16.3	47.5	25
3.00	432	Ar	-	14.8	9.5	25
6.86	408	air	0.025 M Phosphate	72.0	9.6	25
6.86	408	Ar	0.025 M Phosphate	58.3	11.9	25
8.04	415	air	0.066 M Phosphate	678.5	1.0	25
8.04	415	Ar	0.066 M Phosphate	-	3.1	25
10.0	443	air	0.04 M Carbonate	39.2	17.7	25
10.0	443	Ar	0.04 M Carbonate	37.9	18.3	25
6.8	280	air	0.1 M Phosphate	39.755	39.75	37
8.0	280	air	0.1 M Phosphate	656.65	1.05	37
10.0	280	air	0.1 M Carbonate	49.32	14.05	37

a) Atmosphere

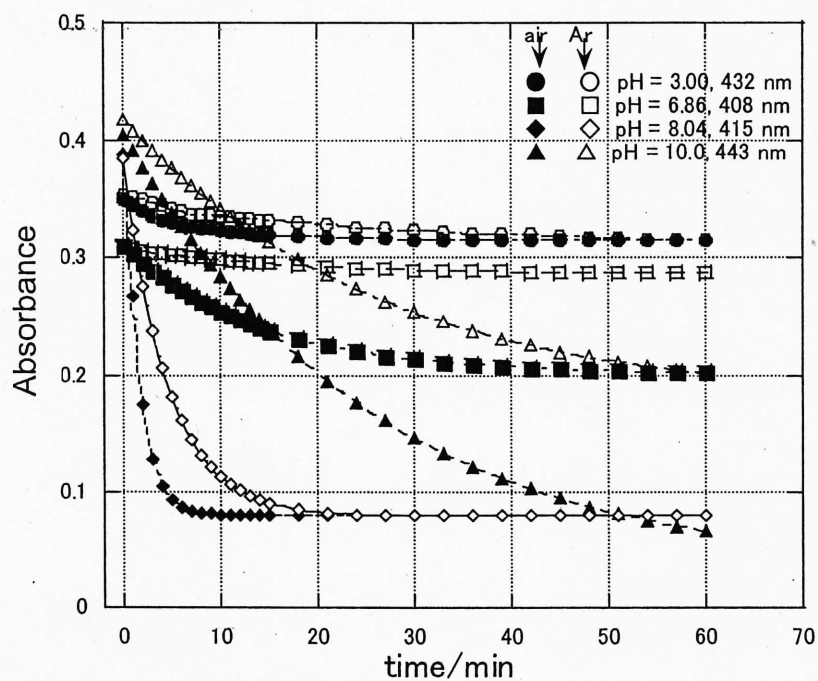


Fig. 2 - 3 Time - dependence of absorbance of solutions containing curcumin at various pH .

$C_{\text{cur}} = 1.18 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $25^{\circ}\text{C}$  ; observed under air and Ar atmosphere in 1 hour;

● air, ○ Ar: pH 3.00 , 432 nm; ■ air, □ Ar: pH 6.86 , 408 nm; ◆ air, ◇ Ar: pH 8.04 , 415 nm; ▲ air, △ Ar: pH 10.0 , 443 nm



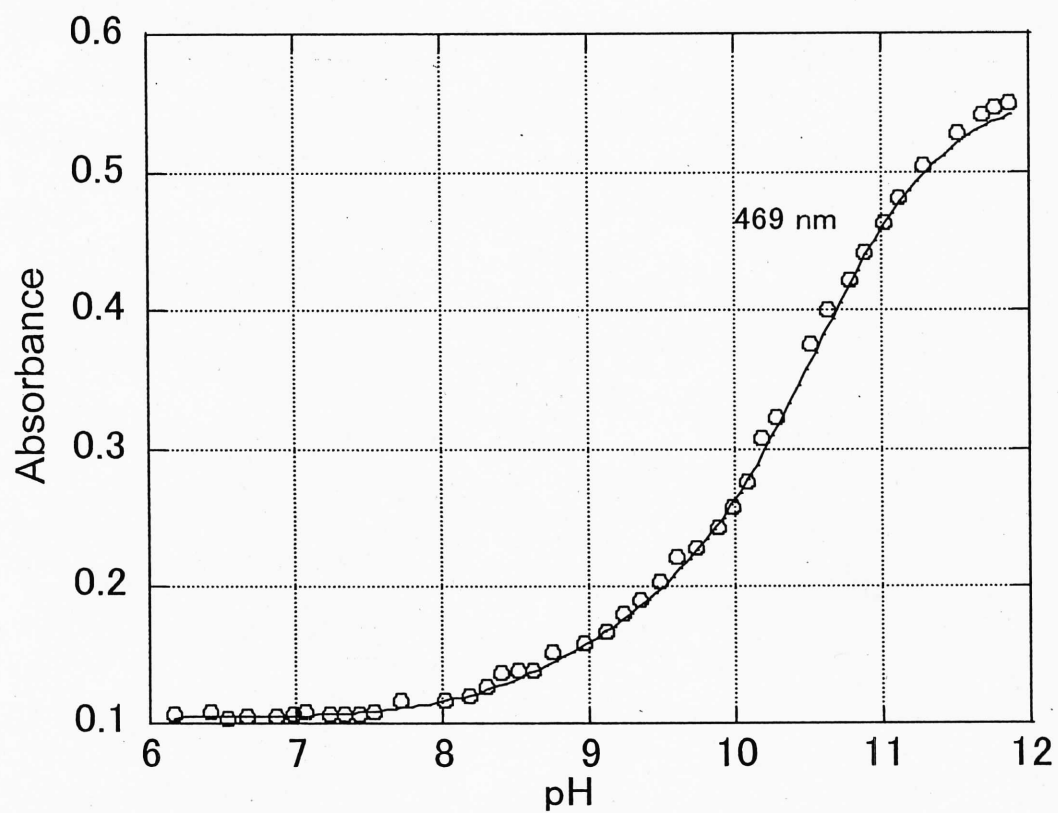


Fig. 2 - 4 pH-Dependence of absorbance of curcumin solution.  
 $C_{\text{cur}} = 1.18 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $\lambda = 469 \text{ nm}$  ;  $25^\circ\text{C}$ .

### 2.3.2 テトラヒドロクルクミン

代表的 pH におけるテトラヒドロクルクミン水溶液の吸収スペクトルを Fig. 2-5 に示す. 紫外領域に吸収を持つので目視では無色で pH 変化に伴う呈色変化は見られなかった. pH を増加させると 290 nm 付近の吸収が増大した. Fig. 2-6 に比較的吸光度の大きい pH 11.7 において大気下での吸収スペクトルの時間依存性を示す. 少なくとも 2 時間までは吸光度の減少は認められず, 安定性が示唆された. これはアルゴン雰囲気下でも同様であった. このようにテトラヒドロクルクミンはクルクミンと異なり大気下, アルゴン雰囲気下共に高い安定性を示した.

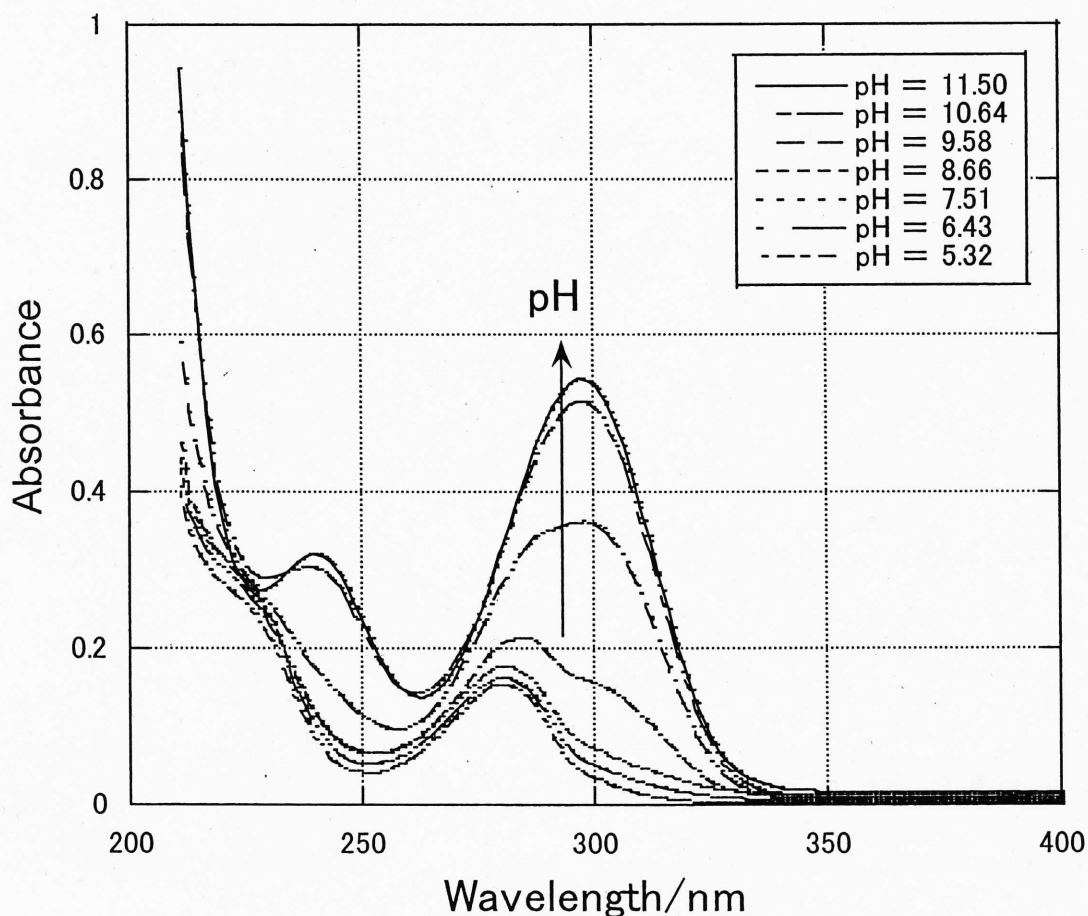


Fig. 2-5 Typical UV-spectra for tetrahydrocurcumin at various pH.

$C_{\text{thc}} = 2.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $25^\circ\text{C}$ ; pH 5.32 ~ 11.50

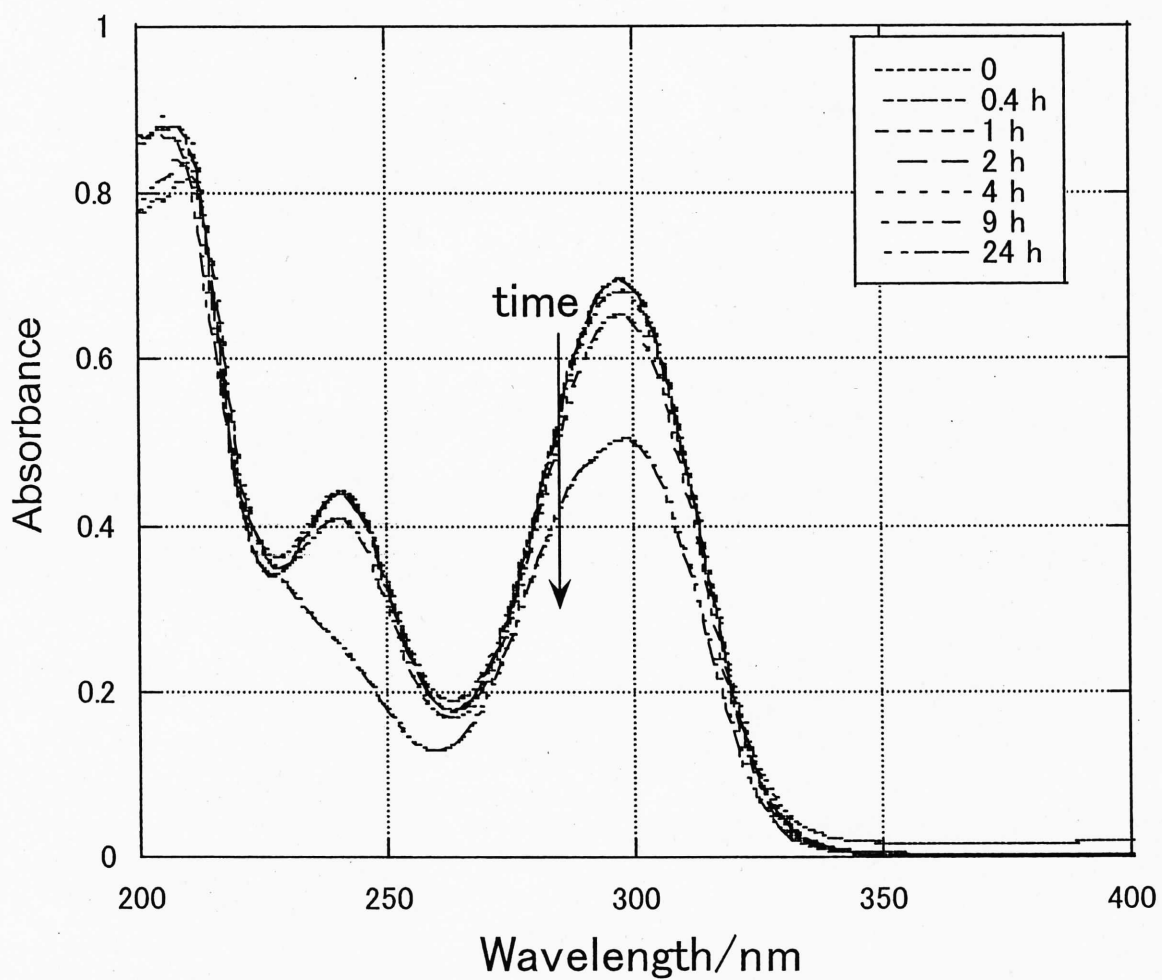


Fig. 2 - 6 UV - spectra of tetrahydrocurcumin as a function of time.

$C_{\text{thc}} = 3.4 \times 10^{-5} \text{ M}$  ; pH 11.7 ;  $25^{\circ}\text{C}$  ; 0 ~ 24 h ; observed under air saturated conditions.

代表的な pHでの極大吸収波長で測定した吸光度の時間経過を Fig. 2・7 に示す. Fig. 2・6 の場合と同様, 大気下, アルゴン雰囲気下共, 2 時間経過してもスペクトルの変化は見られなかった. このように, クルクミンに比べてテトラヒドロクルクミンは pH に依存することなく, 自動酸化に対しては長時間安定である. これはクルクミンで起こりやすかった不飽和部位への酸素付加による開裂がないためと推定される. なお Osawa らはクルクミンにくらべてテトラヒドロクルクミンの抗酸化作用が大きいと報告しており<sup>3)</sup>, テトラヒドロクルクミンがより酸化されにくいという本系の結果と一見矛盾するようである. しかしこれは Osawa らの系では脂質の自動酸化によって生成した過酸化脂質とクルクミン類の反応を対象にしているのに対し, 本研究では単純にクルクミン類の二重結合部位への酸素付加による分解を観測しており, それぞれ本質的に異なっているためである.

Fig. 2・8 に 300 nm における滴定曲線を示す. このデータを式 (7) でフィットして求めた  $pK_a$  を Table 2-1 に,  $\epsilon$  を Table 2・2 に示す. テトラヒドロクルクミンの  $pK_a$  はいずれもクルクミンのそれらより 0.1 ほど高く, わずかに酸性度が低くなっていた. これはクルクミンの場合は酸解離して生じた負電荷が脂肪族部分の二重結合へ非局在化して多少安定化し, テトラヒドロクルクミンに比べて若干酸性度が高くなったためと考えられる.

Table 2・2  $pK_a$  values of H<sub>3</sub>cur and H<sub>3</sub>thc

		$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$	conditions
H <sub>3</sub> cur	Ref. 12	$8.38 \pm 0.04$	$9.88 \pm 0.02$	$10.51 \pm 0.01$	unknown
	This work	$8.39 \pm 0.03$	$9.35 \pm 0.02$	$10.51 \pm 0.03$	$I = 0.1, 25^\circ\text{C}$
H <sub>3</sub> thc	This work	$8.51 \pm 0.06$	$9.45 \pm 0.01$	$10.65 \pm 0.02$	$I = 0.1, 25^\circ\text{C}$

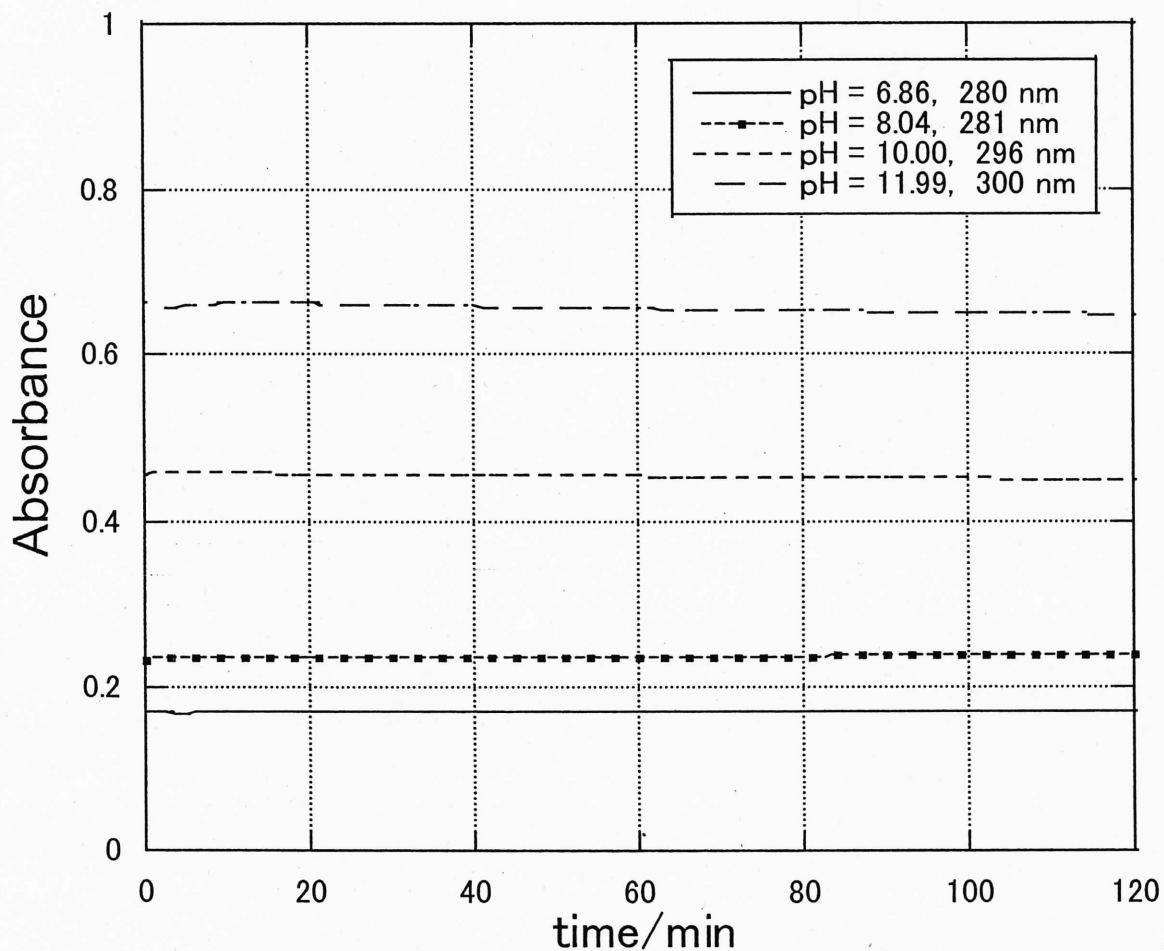


Fig. 2 - 7 Time - dependence of absorbance of solutions containing tetrahydrocurcumin at various pH .

$C_{\text{thc}} = 2.8 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $25^{\circ}\text{C}$  ; pH 6.86 ~ 11.99 ; observed under air saturated conditions.

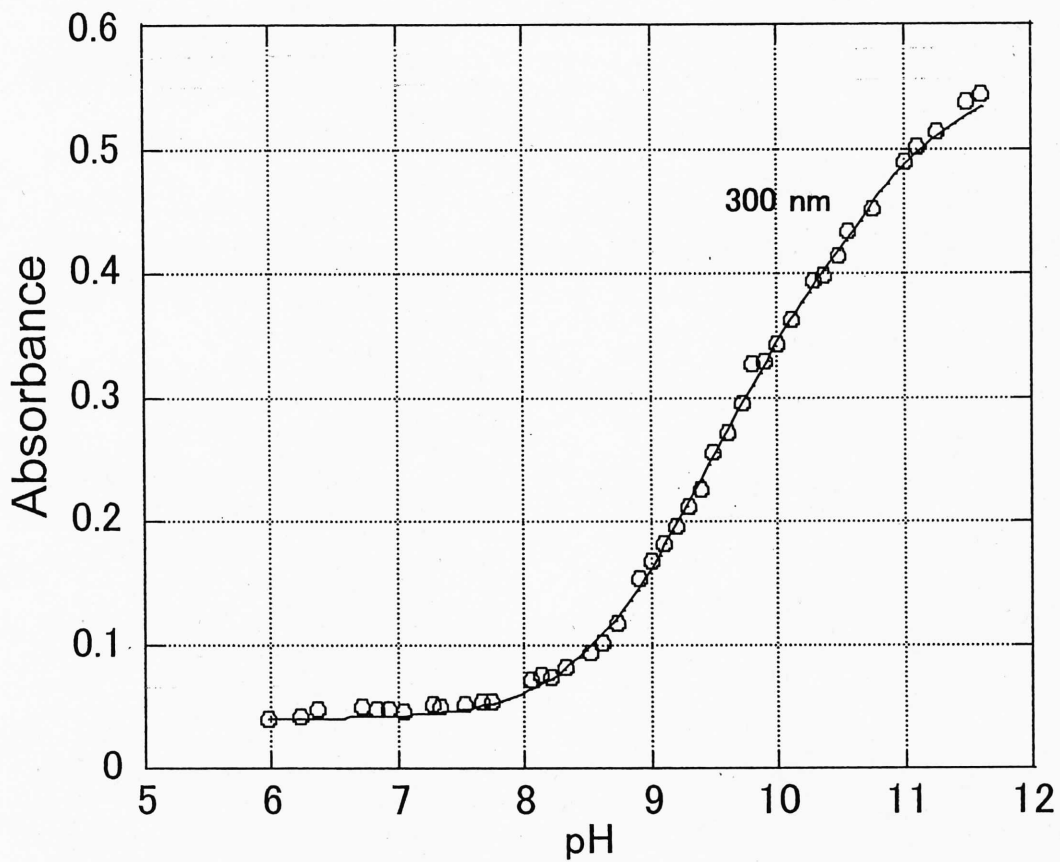


Fig. 2-8 pH - Dependence of absorbance of tetrahydrocurcumin solution.  
 $C_{\text{thc}} = 2.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $\lambda = 300 \text{ nm}$ ;  $25^\circ\text{C}$ .

Table 2-3 Molar absorptivities  $\epsilon$  of curcumin and tetrahydrocurcumin

$\text{H}_3\text{A}$	$\lambda / \text{nm}$	$\epsilon_{\text{H}_3\text{A}}$	$\epsilon_{\text{H}_2\text{A}^-}$	$\epsilon_{\text{HA}^{2-}}$	$\epsilon_{\text{A}^{3-}}$
$\text{H}_3\text{cur}$	465	$87600 \pm 300$	$14100 \pm 1600$	$20100 \pm 1900$	$46900 \pm 2400$
$\text{H}_3\text{thc}$	298	$1740 \pm 300$	$69700 \pm 2000$	$14400 \pm 1900$	$20200 \pm 400$

## 2.4 結 言

クルクミン類の水溶液中での空気酸化に対する安定性を調べた。クルクミンは弱アルカリ性 pH 条件下で比較的速やかに分解されるが、テトラヒドロクルクミンは pH によらず安定であった。テトラヒドロクルクミンのこの特性は本研究で始めた明らかになった。これより、生体におけるテトラヒドロクルクミンの抗酸化作用は必ずしも酸素との反応に基づくものではないことが示唆される。一方、酸解離特性を評価したところテトラヒドロクルクミンはわずかながらクルクミンより弱い酸性度を示した。今後テトラヒドロクルクミンの Fe ( II, III ) イオンとの錯形成反応特性や錯体の酸化還元特性を評価し、抗酸化作用解明に結びつける予定である。

参 考 文 献 (第 2 章)

- 1) Y. - J. Wang, M. - H. Pan, A. - L. Cheng, L. - I. Lin, Y. - S. Ho, C. - Y. Hsieh, J. - K. Lin : *J. Pham. Biomed. Anal.*, **15**, 1867 (1997) .
- 2) M. Bernabé, M. Teresa, M. Romero, E. Gonzales, A. Rojas: *Spectrochim. Acta PartA*, **60**, 1091 (2004).
- 3) T. Osawa, Y. Sugiyama, M. Inayoshi, S. Kawakishi: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1609 (1995).
- 4) S. Uehara, I. Yasuda, K. Akiyama, H. Morita, K. Takeda, H. Itokawa: *Chem. Pharm.Bull.*, **35**, 3298 (1987) .
- 5) P. J. Roughley, D. A. Whiting : *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2379 ( 1973) .
- 6) 日本化学会編：“化学便覧 基礎編Ⅱ”，改定5版, p. 341 (2004), (丸善) .
- 7) 日本化学会生体機能関連化学部会編：“生体機能関連化学実験法”，第1版, p. 12 (2003), (化学同人) .
- 8) J. Kieland : *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 1675 (1937).
- 9) S. V. Jovanovic, S. Steenken, C. W. Boone, M. G. Simic : *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9677 (1999) .