

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700734

研究課題名（和文）：焙煎処理による茶葉ポリフェノール成分の新規褐変反応機構

研究課題名（英文）：New browning reaction of tea polyphenols during the roasting process of green tea leaves

研究代表者

松尾 洋介（MATSUO YOSUKE）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10432981

研究成果の概要（和文）：

茶葉の焙煎処理による茶葉ポリフェノール成分の化学変化の詳細を解明することを目的として、実際の茶葉の焙煎処理を模倣した、試験管内におけるモデル実験を行った。茶の主要アミノ酸のテアニンと、茶カテキンのエピガロカテキンガレートの混合物を加熱した結果、テアニンとエピガロカテキンガレートが縮合した 6 種の化合物が得られた。これらの生成物のうち、2 種は *p*-キノン型構造を持つ赤色色素であった。本色素は茶葉の焙煎による色調の変化に大きく寄与していると考えられる。続いて、茶葉に含まれる遊離糖の一つであるグルコースとエピガロカテキンガレートの混合物を加熱処理したところ、エピガロカテキンガレートの A 環 6 位または 8 位にグルコースが結合したものが生成した。さらに、EGCg、テアニン、グルコースの三種類を混合して加熱したところ、二種類を混合した場合とは生成物が大きく異なることが分かった。三種混合の場合、まずテアニンとグルコースとの間でアミノ・カルボニル反応が起こり 1-エチル-5-ヒドロキシ-2-ピロリジノンが生成後、EGCg の A 環 8 位（及び 6 位）と縮合して生成したと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Green tea is produced from the leaves of *Camellia sinensis*. Some green tea products are further roasted to add a characteristic flavor. By roasting, color of the tea leaves changes from green to reddish brown, and the amount of catechins, amino acids, and free sugars decreased. However, details of the chemical reactions of catechins on roasting still are not clarified. In this study, we demonstrated that epigallocatechin-3-*O*-gallate reacted with theanine and glucose to afford condensation products. Epigallocatechin-3-*O*-gallate was heated at 150 °C in the presence of theanine to yield six new compounds. Two products are red pigments having *p*-quinone structure, and the production of these pigments may explain the color change of tea leaves by roast treatment. On the other hand, heating of mixtures of epigallocatechin-3-*O*-gallate, theanine, and glucose at 150 °C afforded two products. These products are considered to be produced by condensation of 1-ethyl-5-hydroxy-2-pyrrolidinone, which is produced by Strecker degradation of theanine, with epigallocatechin-3-*O*-gallate at the A-ring 8 and 6 positions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ポリフェノール、褐変反応、アミノ・カルボニル反応、アクリルアミド

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ポリフェノールの健康維持・促進効果が大きな注目を集めている。ポリフェノールを豊富に含む茶葉 (*Camellia sinensis*) は、緑茶、ウーロン茶、紅茶、ほうじ茶、プアール茶など、様々な形に加工されて、世界中で広く飲用されている。緑茶は、生茶葉を加熱処理して作られるため、ほとんど色調・成分は変化しない一方、ウーロン茶及び紅茶は、茶葉中に含まれるカテキン類が酵素酸化を受けることにより、色調が橙色～赤色へと変化する。ウーロン茶及び紅茶の製造過程では、含有成分が大きく変化して非常に複雑な組成となることから、大部分の含有成分の化学構造は明らかとなっていない。申請者はこれまでに、紅茶ポリフェノール成分の全体像を明らかにすることを目的として研究を行い、茶カテキン類の酵素酸化機構を解明することに成功している。

ほうじ茶の場合は、ウーロン茶や紅茶とは異なり、酵素は関与せず、緑茶葉を 160～180℃ で焙煎することによって作られ、色は赤茶色に変化する。ほうじ茶は、焙煎処理によってカフェインの含量が減少しており、胃への負担が少ないことから、子供、老人や病人が安心して飲むことができる重要な飲料である。また、焙煎工程で茶葉ポリフェノールから、強いコレステロール吸収阻害活性をもつガロカテキン 3-O-ガレートや、強い抗炎症活性を持つチャフロサイド A が生成することが知られている。このように、ほうじ茶には有用な成分が含まれているが、ほうじ茶中に含まれる成分についての詳細な研究は行われておらず、また、焙煎処理によって生成する色素成分についても明らかとなっていない。茶葉の焙煎によってポリフェノール成分がどのように変化しているのかを解明することは、ほうじ茶の食品としての生理機能性を解明する上で大きな意義がある。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、焙煎処理によって茶葉中に含まれるポリフェノールがどのような構造に変化しているのかを、褐変反応を中心に解明することを目的とする。茶葉中には、ポリフェノールの他にも、アミノ酸や糖類など、様々な共存成分が含まれているが、いずれの成分も焙煎処理によって、含量が大きく減少することが以前より知られている。しかし、ポリフェノールが焙煎によってどのような化学構造へと変化しているのかについては、これまでほとんど明らかとなっていない。そ

こで本研究では、茶葉に含まれる主要ポリフェノールである *epigallocatechin-3-O-gallate* (EGCg) について、茶の主要アミノ酸であるテアニンや、遊離糖のグルコース共存下における加熱処理生成物の化学構造及び生成機構について検討した。

(2) アミノ酸や糖類を多く含む食品が加熱処理を受けると、発がん性を有するアクリルアミドが生成することが知られており、アクリルアミドの摂取による健康への悪影響が懸念されている。茶カテキン類にはアクリルアミド生成抑制効果があることが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで、EGCg によるアクリルアミド生成抑制機構を解明するために、アクリルアミド共存下における EGCg の加熱処理生成物、及びアクリルアミドの前駆体であるアスパラギンとグルコース共存下における EGCg の加熱処理生成物について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) ①EGCg の加熱処理

凍結乾燥した EGCg 粉末を 150℃ で 60 分間加熱した。生成物を Sephadex LH-20 で分離した結果、*galocatechin-3-O-gallate* (GCg), *gallic acid*, 及び *tricitinidin* が得られた。これらの生成物は、スペクトルデータを標品あるいは文献値と比較することにより同定した。

### ②市販ほうじ茶成分に含まれる色素成分の分析

2 種類の市販ほうじ茶について、1% TFA 含 50% アセトニトリルで抽出後ろ過し、フォトダイオードアレー検出 HPLC で分析した (検出波長: 490 nm)。

### (2) テアニン共存下での EGCg の加熱処理

EGCg およびテアニンの混合水溶液を凍結乾燥後、150℃ で 30 分間加熱し、生成物を MCI-gel CHP20P および Sephadex LH-20 などの各種カラムクロマトグラフィーを用いて分離精製した結果、*gallic acid*, GCg, 化合物 **1-6** が得られた。化合物 **1-6** の化学構造は、1D-及び 2D-NMR などの各種スペクトルデータに基づいて決定した。

### (3) グルコース共存下での EGCg の加熱処理

EGCg とグルコースを含む水溶液を凍結乾燥後、150℃ で 30 分間加熱し、生成物を MCI-gel CHP20P および Sephadex LH-20 を用いて分離精製した結果、GCg 及び化合物 **7-9** が得られた。化合物 **7-9** の化学構造は、1D-

及び 2D-NMR などの各種スペクトルデータに基づいて決定した。

#### (4) テアニン及びグルコース共存下における EGCg の加熱処理

EGCg、テアニン、およびグルコースを含む水溶液を凍結乾燥後、150 °C で 30 分間加熱し、生成物を MCI-gel CHP20P および Sephadex LH-20 を用いて分離精製した結果、gallic acid、**10**、および **11** が得られた。化合物 **10** 及び **11** の化学構造は、1D-及び 2D-NMR などの各種スペクトルデータに基づいて決定した。

#### (5) EGCg のアクリルアミド生成抑制機構

EGCg、アスパラギン及びグルコースを含む水溶液を凍結乾燥後、150 °C で 30 分間加熱し、生成物を MCI-gel CHP20P および Sephadex LH-20 を用いて分離精製した結果、GCg, gallic acid 及び **12** が得られた。EGCg, アクリルアミドを含む水溶液についても同様に凍結乾燥後、加熱処理を行った結果、GCg, gallic acid 及び **13-16** が得られた。

### 4. 研究成果

#### (1) EGCg の加熱処理

EGCg 単独での加熱処理生成物について検討した結果、gallo catechin-3-O-gallate (GCg)、gallic acid、および tricetinidin が得られた (図 1)。EGCg の加熱処理によって GCg が生成することはすでに知られており、GCg は、EGCg から quinone methide 構造を経て、C 環 2, 3 位がより安定な *trans* 体へと変化することにより生成したと考えられる。赤色色素である tricetinidin は、EGCg から、カテコール酸化酵素による酸化、あるいは加熱処理によって生成することが報告されており、その生成機構については、EGCg から quinone methide 構造を経て、ガロイル基が脱離することによって生成すると考えられている。市販されているほうじ茶 2 種類について、HPLC で成分を分析した結果、tricetinidin が検出された。Tricetinidin がほうじ茶中に含まれていることが明らかとなったのは、今回が初めてであり、本色素は、ほうじ茶の色に寄与していると考えられる。

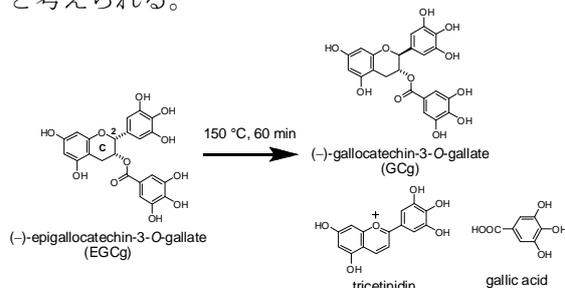


図 1

#### (2) テアニン共存下での EGCg の加熱処理

テアニン共存下における EGCg の加熱処理生成物について検討した結果、gallic acid、GCg、及びテアニンと EGCg の縮合生成物 **1-6** が得られた (図 2)。化合物 **1** については、EGCg の A 環 7 位炭素と theanine のアミノ基との間でアミノ・カルボニル反応が起きた後、エチルアミドが加水分解を受け、最終的に  $\gamma$ -ラクタム環を形成することによって生成したと考えられた。化合物 **3** は、化合物 **1** の生成過程で生じるエチルアミンのアミノ基が EGCg の A 環 7 位炭素と縮合することによって生成したと考えられた。化合物 **5** は、化合物 **3** が酸化されて A 環部が *p*-quinone 構造へと変化することによって生成したと考えられた。また、化合物 **2**、**4**、および **6** は、EGCg から **1**、**3**、および **5** が生成するまでのいずれかの段階において、C 環 2 位が異性化して生成したと考えられた。化合物 **5**、**6** のような、カテキン類とアミノ酸が縮合して A 環が *p*-quinone 構造へと変化した赤色色素が生成することが明らかとなったのは、今回が初めてである。このような *p*-quinone 型色素が、茶葉の焙煎による色調の変化に大きく寄与していることが示唆された。

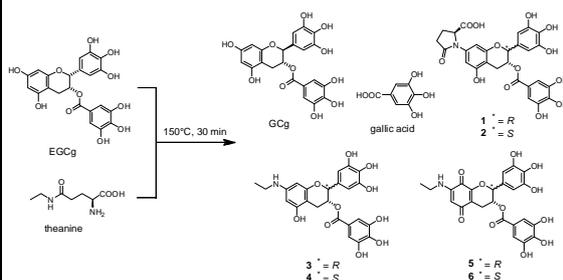


図 2

#### (3) グルコース共存下での EGCg の加熱処理

グルコースと EGCg を混合した状態における、加熱処理生成物について検討した結果、GCg 及び化合物 **7-9** が得られた。化合物 **8** は、まず EGCg の A 環 6 位炭素がグルコースの 1 位に求核付加し、脱水後、グルコースの 5 位水酸基が 1 位炭素に 1,4-付加して、生成したと考えられた。化合物 **7** についても、EGCg の 8 位とグルコース 1 位との間で同様の反応が起きて生成したと考えられる。このような flavan-3-ol の A 環と糖との縮合反応は、アルカリ水溶液中で起こることが知られていたが、無溶媒条件下、加熱処理により起こることが明らかとなったのは今回が初めてである。化合物 **9** は、化合物 **7** のグルコースユニットから水が 2 分子脱水した後、もう一つの EGCg A 環 8 位がグルコースユニットの 3 位に付加することによって生成したと考えられた。

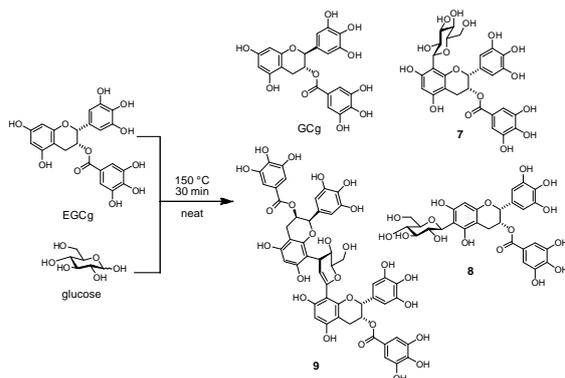


図 3

#### (4) テアニン及びグルコース共存下における EGCg の加熱処理

(2)および(3)では、テアニンあるいはグルコース共存下における EGCg の加熱処理生成物について検討したが、実際の茶葉中ではこれらの成分が同時に存在しており、これらが複雑に組み合わさった縮合生成物が生じていると考えられる。そこで、より実際の茶葉に近い状態、すなわち EGCg、テアニン、およびグルコースの3種の成分を混合した状態における、加熱処理生成物について検討した結果、gallic acid、**10**、および**11**が得られた(図4)。アミノ酸と還元糖との間でアミノ・カルボニル反応が起こることは良く知られており、まずテアニンとグルコースが縮合してシッフ塩基が形成後、アマドリ転位を経て3-deoxyglucosoneなどの $\alpha$ -dicarbonyl化合物が生成する。そして $\alpha$ -dicarbonyl化合物とテアニンのアミノ基との間でシッフ塩基が形成後、脱炭酸が起こることにより theanine Strecker aldehyde が生成し、さらに環化して1-ethyl-5-hydroxy-2-pyrrolidinone となった後、EGCg の A 環 8 位 (及び 6 位) に縮合することによって **10** および **11** が生成したと考えられた。EGCg とテアニンの混合物を加熱処理した(2)および、EGCg とグルコースの混合物を処理した(3)の2種混合系の実験結果と比べると、これら3種類を混合することによって生成物の構造が大きく変化することが明らかとなった。

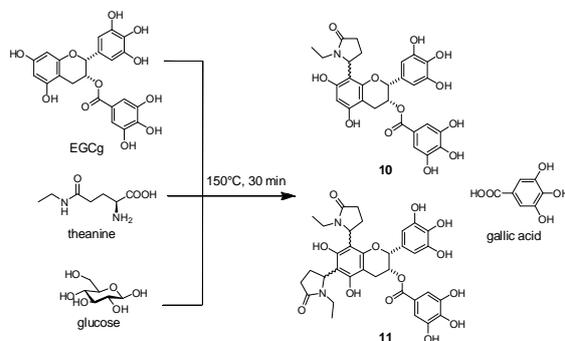


図 4

#### (5) EGCg のアクリルアミド生成抑制機構

アミノ酸や糖類を多く含む食品が加熱処理を受けると、発がん性を有するアクリルアミドが生成することが知られており、アクリルアミドの摂取による健康への悪影響が懸念されている。茶カテキン類にはアクリルアミド生成抑制効果があることが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていないことから、EGCg によるアクリルアミド生成抑制機構について検討した。アクリルアミドの前駆体であるアスパラギンとグルコース共存下における EGCg の加熱処理生成物について分離・精製した結果、アスパラギンとグルコースとの間でアミノ・カルボニル反応が起きてアスパラギンストレッカーアルデヒドが生成後、EGCg の A 環 8 位と縮合してラク톤を形成し、さらに A 環 6 位にグルコースが縮合した生成物 **12** が得られた(図5)。アスパラギンストレッカーアルデヒドはアクリルアミドの前駆体と考えられていることから、アスパラギンストレッカーアルデヒドが EGCg と縮合することによってアクリルアミドの生成が抑制されると考えられた。さらに、アクリルアミド共存下における EGCg の加熱処理生成物について分離・精製した結果、EGCg の A 環にアクリルアミドが縮合した2種の生成物 **13-16** を単離・構造決定した(図6)。このような縮合反応が起こることによって、最終的なアクリルアミドの生成量が低減されていると考えられた。

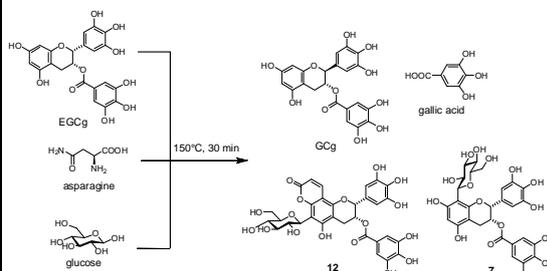


図 5

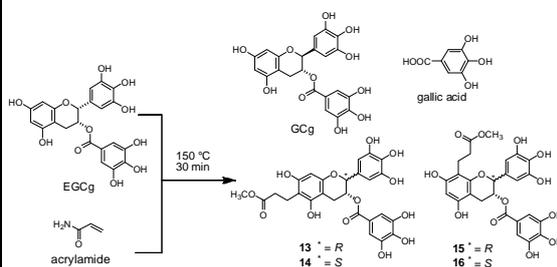


図 6

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Yosuke Matsuo, Yan Li, Sayaka Watarumi, Takashi Tanaka, Isao Kouno, Production and degradation mechanism of theacitrin C, a black tea pigment derived from epigallocatechin-3-*O*-gallate via a bicyclo[3.2.1]octane-type intermediate, Tetrahedron, 査読有, 67 巻, 2011, 2051-2059.

② Takuya Shii, Makoto Miyamoto, Yosuke Matsuo, Takashi Tanaka, Isao Kouno, Biomimetic one-pot preparation of a black tea polyphenol theasinensin A from epigallocatechin gallate by treatment with copper(II) chloride and ascorbic acid, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 査読有, 59 巻, 2011, 1183-1185.

[学会発表] (計 3 件)

① Yuji Kunihiro, Yosuke Matsuo, Takashi Tanaka, Isao Kouno, Condensation reaction of epigallocatechin-3-*O*-gallate with theanine during the roasting process of green tea leaves, 7th Tannin Conference (In 58th International Congress and Annual Meeting of Society for Medicinal Plant and Natural Product Research), 2010 年 8 月 30 日, ドイツ.

② 國平雄士、松尾洋介、田中隆、河野功、茶葉の焙煎加工におけるエピガロカテキンガレートとグルコースとの縮合反応、日本生薬学会第 57 回年会、2010 年 9 月 25 日、徳島.

③ 國平雄士、松尾洋介、田中隆、河野功、エピガロカテキンガレートによるアクリルアミド生成抑制機構、日本生薬学会第 58 回年会、2011 年 9 月 24-25 日、東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松尾 洋介 (MATSUO YOSUKE)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

助教

研究者番号：10432981