

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450174

研究課題名(和文) 紅茶テアフラビン類の機能性に関する化学的解析

研究課題名(英文) Physicochemical analysis of theaflavins in black tea

研究代表者

中山 勉 (Nakayama, Tsutomu)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：50150199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カテキン類やテアフラビン類などの茶ポリフェノールの酸化還元特性を評価するため、クーロアレイ検出器を備えたHPLCを用いる新しい方法を開発した。HPLC測定の結果を、縦軸に流れた電気量(C)、横軸にパラジウム参照電極との相対電位(V)としてプロット(quantity versus potential plot, QPプロット)した。得られた結果から、カテキン類とテアフラビン類はその部分構造の寄与を反映した形でQPプロットのピークが現れることを見出した。したがって、QPプロット法のピーク電位から、カテキン類とテアフラビン類に共通した酸化還元特性を予測することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：A novel method to evaluate the redox properties of tea polyphenols such as catechins and theaflavins by HPLC-coulometric-array analysis was established. The quantity of electricity (C) on the vertical axis and the electric potential (V), adjusted with the associated palladium reference electrode, on the horizontal axis were plotted to provide "quantity versus potential (QP) plot". The patterns of the plots correspond to the derivative of a hydrodynamic voltammogram or a current-voltage curve, with the electric potentials of the peaks in the QP plot corresponding to the half-wave potentials in the current-voltage curve. It was confirmed that catechins and theaflavins are oxidized depending on the electric potentials of their partial structures, and that all compounds showing a peak at 0 mV in the QP plots produce hydrogen peroxide during the autoxidation process.

研究分野：食品科学

キーワード：テアフラビン類 カテキン類 HPLC クーロアレイ検出器 過酸化水素 酸化還元電位 電気化学検出器

1. 研究開始当初の背景

人類全体で最も多量に飲用されている液体は水そのものであるが、その次は茶である。茶の中でも紅茶が最も多く、緑茶がそれに続いている。緑茶に関しては国内外で多くの研究があり、近年、その成分であるカテキン類のさまざまな機能が明らかになっている。一方、紅茶に関する研究は増加傾向があるものの、論文数は緑茶ほど多くない。その理由は、紅茶にはカテキン類に加えて赤色色素であるテアフラビン類やテアルピジンが含まれており、これらの成分が多様なことと個々の成分の含有量がカテキン類に比べるとはるかに少ないことにある。いわゆる紅茶の発酵過程において、テアフラビン類は茶葉に含まれるポリフェノールオキシダーゼによるカテキン類の酸化重合反応により生成するが、精製した標品が貴重なため化学的性質に限ってもいまだに明らかになっていない項目が多い。そこで本研究は紅茶の赤色色素であるテアフラビン類の機能性を開発するため、その物理化学的性質を解析することを目的とした。当初は、(1)細胞膜モデルとしてのリン脂質との相互作用の解析と(2)酸化還元電位と化学構造の関係を、それぞれ明らかにすることを目的としたが、本研究の採択と代表研究者の異動がまったく同じ時期に重なったため、(2)の研究項目に焦点を絞ることにした。

2. 研究の目的

緑茶はカテキン類を紅茶はカテキン類とテアフラビン類をそれぞれ含有しているが、それぞれ個々の物質の酸化還元電位を同一条件で網羅的に測定した研究はなかった。その一つの理由は、サイクリックポルタンメトリ等の実験結果において、カテキン類やテアフラビン類の複数のフェノール性水酸基に由来する酸化反応が重なり、解釈が困難になるためと思われる。

カテキン類やテアフラビン類などのポリフェノール類は、クーロアレイ等の電気化学検出器により高感度分析が可能である。電気化学検出器における酸化還元反応は、反応の起こる電位が高いほど酸化性が強く、低いほど還元性が強い。そのため、電極反応が起こる電位と当該物質の抗酸化性または酸化安定性との間に相関があると考えられる。本研究ではポリフェノール類の酸化機構を解明するため、クーロアレイ HPLC を用いた新しいプロトコルを開発することにより電極反応の起こる電位を詳細に調べ、さらに種々の酸化安定性試験や抗酸化性試験の結果との関連性を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

カテキン類は緑茶に含まれる代表的な 4 種類 (epicatechin:EC, epigallocatechin:EGC, epicatechin gallate:ECg, epigallocatechin gallate:EGCg) を用いた (Fig. 1)。また、カ

テキン類の部分構造を持つモデル物質として、レゾルシノール、カテコール、ピロガロール、没食子酸メチルエステルを用いた。テアフラビン類 (TF1, TF2A, TF2B, TF3) はテアフラビン類の混合物から、中圧クロマトグラフィーと HPLC を用いて単離精製したものをを用いた (Fig.2)。

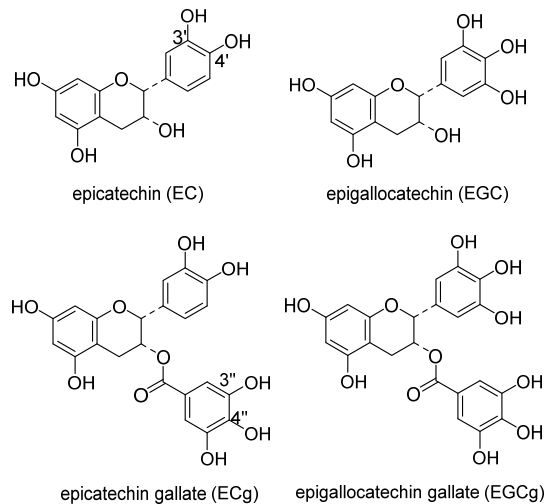
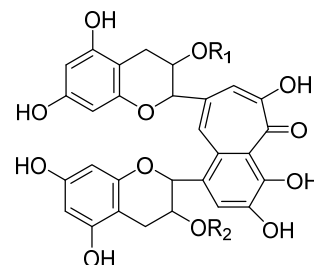


Fig. 1 カテキン類の構造式



R₁=H, R₂=H: TF1
 R₁=gallate, R₂=H: TF2A (3-O-gallate)
 R₁=H, R₂=gallate: TF2B (3'-O-gallate)
 R₁=gallate, R₂=gallate: TF3 (digallate)

Fig. 2 テアフラビン類の構造式

クーロアレイ HPLC を用いて -400 ~ +860 mV または -200 ~ +150 mV の範囲で電位を設定し、カテキン類やテアフラビン類の電極反応を解析した。測定結果について、流れた電気量 (Quantity) を縦軸に、各電極に設定した電位 (Potential) を横軸にプロット (QP プロット) し、電気量のピークが見られる電位を電極反応が起こるピーク電位と定義した。ここで、従来の測定法に比べて電位の幅を小さくしたことで、電流値ではなく、電気量を解析対象にしたことが、QP プロットの開発に大きく貢献したものと考えている。

また、各種ラジカル捕捉活性試験、抗酸化試験、および自動酸化の過程で生成した過酸化水素の定量により、物質ごとの酸化安定性と抗酸化性を評価し、各電位における電気量

との相関係数を算出した。

4. 研究成果

カテキン類のクーロアレイ HPLC 分析において、ピロガロール構造、カテコール構造、ガロイル基およびレゾルシノール構造に基づく電極反応がそれぞれ 0 mV, 50 mV, 100 mV, 860 mV で独立して起こることを初めて明らかにした。また、テアフラビン類についても、ベンゾトロポロン環、ガロイル基およびレゾルシノール構造に基づく電極反応がそれぞれ 0 mV, 100 mV, 860 mV で独立して起こることが明らかになった。なお、モデル化合物の電極反応もまったく同じ電位で起こることを確認した。

カテキン類の水酸基をメトキシ基に変化した物質(メチル化カテキン類)についても、同様の測定を行い、QP プロットにおけるピークの電位を調べ、下の表 (Table1) のような結果が得られた。例えば EC-4'-OMe の場合だとカテコール構造がなくなるので、-150 ~ +200 mV 間のピークが消失したと考えられる。一連のメチル化カテキン類の結果から、水酸基がメトキシ基に置き換わると、あたかも何も置換基がついていない物質に予想される QP プロットとほとんど同一のプロットが得られることが明らかになった。

Compounds	-150 ~ +200 mV
Resorcinol	—
Catechol	50 mV
Pyrogallol	0 mV
Methyl gallate	100 mV
Purpurogallin	0 mV
EC-3'-OMe	—
EC-4'-OMe	—
EGC-3'-OMe	50 mV
EGC-4'-OMe	—
ECg-3'-OMe	100 mV
ECg-4'-OMe	100 mV
ECg-3"-OMe	100 mV
ECg-4"-OMe	100 mV
EGCg-3'-OMe	100 mV
EGCg-4'-OMe	100 mV
EGCg-3"-OMe	0, 100 mV
EGCg-4"-OMe	0 mV

表1. メチル化カテキン類のQPプロットにおけるピーク電位

DPPH などのラジカルを捕捉する活性はクーロアレイ HPLC 分析を 860 mV で行った時の電気量との相関係数が高く、これらの試験においてはカテキン類のすべての水酸基がラジカルに電子を供与しているものと考えられる。抗酸化試験法である FRAP 法と PAO 法の結果は 50 mV における電気量との相関係数が高く、これらの試験法により評価される抗酸化性はカテコール構造のキレート性を加味した形での電子供与性を反映していると考えられる。過酸化水素生成量は 0 mV での電気量との相関係数が高く、ピロガロール構造の電子供与性とスーパーオキシドおよび過酸化水素の生成が密接に関連していることを確認した。

以上のようにクーロアレイ HPLC 分析の結果をQPプロットとして表すことにより、そのピーク電位が各物質の化学構造と密接に関係していることを明らかにした。さらに、様々な抗酸化試験法における酸化還元反応の機構を推定することができた。QPプロットによる解析は現時点では他に類例がなく、今後、食品成分の酸化安定性や抗酸化性の評価、さらに抗酸化試験法自体の評価などへの幅広い応用が期待される。(詳細は論文(6)を参照のこと)

なお、精製したテアフラビン類を共同研究先に供与することにより、多くの成果が得られた。(論文(1)~(5), (7))

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8件)

(1) A. Saito, R. Nakazato, Y. Suhara, M. Shibata, T. Fukui, T. Ishii, T. Asanuma, K. Mochizuki, T. Nakayama, N. Osakabe: The impact of theaflavins on systemic-and microcirculation alterations: The murine and randomized feasibility trials: *Journal of Nutritional Biochemistry* (査読有), 32, 107-114, 2016. DOI: 10.1016/j.nutbio.2016.01.012

(2) Y. Kayashima, S. Murata M. Sato, K. Matsuura, T. Asanuma, J. Chimoto, T. Ishii, K. Mochizuki, S. Kumazawa, T. Nakayama, K. Yamakawa-Kobayashi: Tea polyphenols ameliorate fat storage induced by high-fat diet in *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry and Biophysics Reports* (査読有), 4, 417-424, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrep.2015.10.013.

(3) A. Yoto, T. Moriyama, H. Yokogoshi, Y. Nakamura, T. Katsuno and T. Nakayama: Effect of smelling green tea rich in aroma components on EEG activity and memory task performance. *International Journal of Affective Engineering* (査読有), 13, (4, Special Issue), 227-233, 2014.

(4) Y. Shimamura, N. Aoki, Y. Sugiyama, T. Nakayama and S. Masuda: Screening of tea extract and theaflavins for inhibitory effects on the biological activity and production of staphylococcal enterotoxin A. *Journal of Food Science* (査読有), 79, M2294-M2300, 2014. DOI: 10.1111/1750-3841.12566

(5) T. Yamazaki, M. Sagisaka, R. Ikeda, T. Nakamura, N. Matsuda, T. Ishii, T. Nakayama and T. Watanabe: The human bitter taste receptor hTAS2R39 is the primary receptor for the bitterness of theaflavins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有), 78, 1753-1756, 2014. DOI: 10.1080/09168451.2014.930326

(6) K. Matsuura, Y. Usui, T. Kan, T. Ishii, and T. Nakayama: Structural specificity of electric potentials in the coulometric-array analysis of catechins and theaflavins. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* (査読有), 55, 103-109, 2014.8:21, 2014. DOI: 10.1186/1751-0759-8-21

(7) N. Aruga, M. Toriigahara, M. Shibata, T. Ishii, T. Nakayama, N. Osakabe: Responses to a single dose of different polyphenols on the microcirculation and systemic circulation in rats. *Journal of Functional Foods* (査読有), 10, 355-363, 2014.

(8) M. Kobayashi, M., Nishizawa, N. Inoue, T. Hosoya, M. Yoshida, Y. Ukawa, Yuko M. Sagesaka, T. Doi, T. Nakayama, S. Kumazawa, and I. Ikeda: Epigallocatechin gallate decreases the micellar solubility of cholesterol via specific interaction with phosphatidylcholine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (査読有), 62, 2881-2890, 2014. DOI: 10.1021/jf405591g.

〔学会発表〕(計4件)

(1) T. Nakayama, Chemical Biology of theaflavins, pigments in black tea, The 6th International Conference on Food Factors (ICoFF 2015), 2015年11月22日~25日、Seoul (Republic Korea)

(2) T. Nakayama, K. Matsuura, Y. Usui, T. Kan, and T. Ishii. A novel method to evaluate antioxidant activity of polyphenols. Phytonutrients and Healthy Foods, 2015 KFN International Symposium and Annual Meeting, 2015年8月24日~26日、Peonchang (Republic Korea)

(3) T. Nakayama, K. Matsuura, Y. Usui, T. Kan, and T. Ishii. Structural specificity of electric potentials in the coulometric-array analysis of catechins, methylated catechins and theaflavins. 27th International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference, 2014年9月2日~6日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

(4) 松浦加奈子、臼井由美子、石井剛志、中山勉、クーロアレイ HPLC を用いたカテキン類とそのメチル誘導体の電気化学的解析、第73回分析化学討論会、2013年5月18日~19日、北海道大学函館キャンパス(北海道、函館市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 勉 (NAKAYAMA, Tsutomu)
日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・
教授
研究者番号：50150199

(2) 研究分担者

石井 剛志 (ISHII, Takeshi)
神戸学院大学・栄養学部・准教授
研究者番号：50448700

奈良井 朝子 (NARAI, Asako)
日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・
講師
研究者番号：00339475