

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870532

研究課題名(和文) 紅茶及びほうじ茶の製造過程における茶葉ポリフェノール成分の化学変化機構

研究課題名(英文) Chemical change of tea polyphenol in the production process of black tea and roasted green tea

研究代表者

松尾 洋介 (MATSUO, Yosuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：10432981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：茶葉の主要カテキンであるエピガロカテキンの新たな酵素酸化生成物の構造を明らかにした。さらに、既知酸化生成物の一部について立体構造が未決定のままとなっていたことから、各種スペクトルデータの理論計算に基づいて立体構造を決定した。紅茶色素テアフラビン類は、ガロイル基の有無や結合位置の違い、あるいは酸化条件の違いによって、異なる酸化生成物を与えることが明らかとなった。また、その反応機構では分子間電荷移動相互作用が重要な役割を果たしていることも分かった。ほうじ茶の製造過程において生成する高分子ポリフェノールは、糖のカaramel化化合物と茶カテキン類との重合反応によって生成していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Enzymatic oxidation of theaflavins in the presence of epicatechin was examined. Benzotropolone moiety of theaflavins with a free hydroxyl group at C-3' easily reacted with epicatechin; however, benzotropolone moiety of theaflavins having galloyl group at C-3' could not react with epicatechin. The charge-transfer interaction between benzotropolone ring and o-quinone ring of epicatechin-quinone is important in benzotropolone oxidation. The structure of a new enzymatic oxidation product of epigallocatechin was determined. In addition, we assigned the stereostructure of known oxidation products of pyrogallol-type catechins, such as quinone dimers, theacitrins, and proepitheafalagallins, by using theoretical calculations of ECD spectra and NMR chemical shifts. In the course of roasted green tea production, high molecular weight polyphenols are produced. We found that they are generated by condensation reaction between tea catechins and caramelized sugars.

研究分野：天然物化学、食品化学

キーワード：ポリフェノール 紅茶 ほうじ茶 エピガロカテキン テアフラビン DFT ECD

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、プアール茶などのさまざまな形に加工されて、世界中で広く飲用されている。緑茶は新鮮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、ウーロン茶および紅茶は、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、テアフラビン類などが生成することによって、色調が橙色～赤色へと変化する。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。

ほうじ茶は紅茶とは異なり、酸化酵素は関与せず、緑茶葉を 160～180 °C で焙煎することによって作られる。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、焙煎工程では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持つガロカテキン-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ものの、詳細な成分研究は行われていない。

研究代表者はこれまでに、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、製造工程を模倣した茶カテキン類モデル酵素酸化実験によって、紅茶ポリフェノールが生成する上で重要なデヒドロテアシネンシン類の生成・分解機構や、ピシクロ[3.2.1]オクタン型中間体の生成・分解機構などの新規カテキン酸化機構を解明している。さらに、ほうじ茶ポリフェノールについても同様に研究を行い、製造過程を模倣した加熱処理によって茶カテキン類とアミノ酸(テアニン)や糖類(グルコース)との新規縮合反応が起こることを明らかにした。本研究は、これまでに行った研究をさらに発展させて行うものである。

2. 研究の目的

本研究は、紅茶及びほうじ茶の製造過程において、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化学的に解明することを目的とする。研究代表者はこれまでに、紅茶製造過程を模倣したモデル酸化反応研究によって、多数の新規酸化生成物を単離・構造決定している。しかし、紅茶ポリフェノールの全体像を理解する上では、未だ解明されていないことが多い。特に、紅茶成分として知られるテアフラビン類などのカテキン二量体はさらに酸化を受けることが知られているが、その詳細は明らかになっていなかった。そこで本研究では、まずテアフラビン類の酸化機構について詳細に

検討した。

茶葉中に最も多く含まれるポリフェノールであるピロガロール型カテキンは、紅茶製造過程で酸化的二量化を起こし、デヒドロテアシネンシン類やプロエピテアフラギン類、テアシトリン類、キノンダイマー類などのさまざまな二量体が生成する。しかし、マイナーな生成物についてはこれまで十分に検討されておらず、さらにテアシトリン類やキノンダイマー類など既知二量体の一部については立体構造が決定されていない。カテキン二量体の立体構造を正確に決定することは、二量化の際の詳細なメカニズムを考察する上でも重要である。そこで本研究では、ピロガロール型カテキンのマイナー生成物について詳細に検討するとともに、立体構造が決定されていないテアシトリン類などの既知二量体について、計算化学的手法を用いて立体構造を検討した。

ほうじ茶の製造過程において、カテキン類の含量が減少するとともに高分子ポリフェノールが増加するが、その構造については明らかとなっていない。そこで、ほうじ茶より高分子ポリフェノールを分離し、各種スペクトルデータに基づいて構造を検討した。さらに、さまざまなモデル焙煎実験によって生成する高分子ポリフェノールを調製し、ほうじ茶高分子ポリフェノールと比較することにより、ほうじ茶製造過程における高分子ポリフェノールの生成機構を検討した。

3. 研究の方法

(1) 紅茶色素テアフラビン類の酸化機構

テアフラビン類のポリフェノール酸化酵素による酸化機構を明らかにするために、まず茶カテキン類の酸化によってテアフラビン類 4 種 (1-4) を調製後、エピカテキン (5) 共存下においてポリフェノール酸化酵素で処理した。生成物を分離・精製後、スペクトルデータに基づいて構造を決定した。さらに、中性条件下におけるテアフラビン類の自動酸化機構を解明するために、pH 7 リン酸緩衝液中で各種テアフラビン類を室温で 24 時間攪拌し、生成物の構造を解析した。

(2) ピロガロール型カテキンの酵素酸化機構

エピガロカテキン (18) をポリフェノール酸化酵素で処理し、生成物を詳細に分離・精製した。得られた新規化合物 22 について、各種スペクトルデータに基づき平面構造を決定した。さらに、22 および立体構造が決定されていなかった既知化合物 20, 24, 25 について、配座探索後 DFT 最適化し、ECD スペクトルまたは NMR ケミカルシフトの理論計算を行うことにより立体構造を解析した。エピガロカテキン-3-*O*-ガレート (19) の酵素酸化によって生成する既知化合物 21, 23 についても同様に立体構造の検討を行った。

(3) ほうじ茶製造過程で生成する高分子ポリフェノールの生成機構

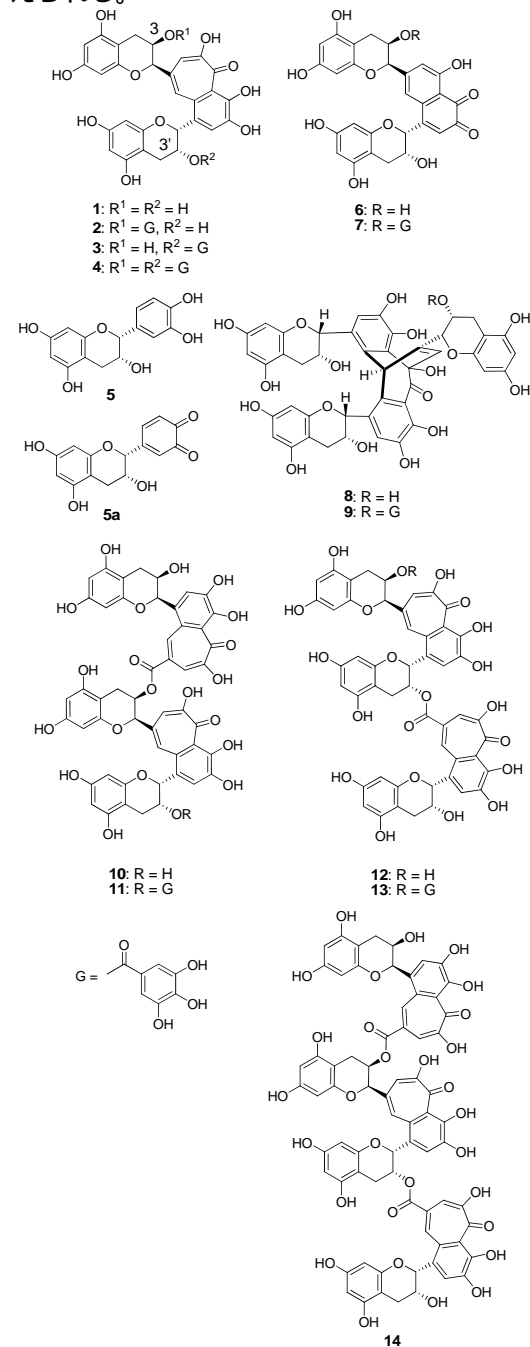
ほうじ茶抽出エキスを各種クロマトグラフィで分離することにより得た高分子ポリフェノール画分について、 ^{13}C -NMR スペクトルの測定を行った。さらに、高分子生成に糖類が寄与していると考えられたことから、グルコースや hydroxyacetone, methylglyoxal と茶カテキン類を用いたモデル焙煎実験を行い、得られた高分子ポリフェノール画分について同様に ^{13}C -NMR スペクトルの測定を行った。

4. 研究成果

(1) 紅茶色素テアフラビン類の酸化機構

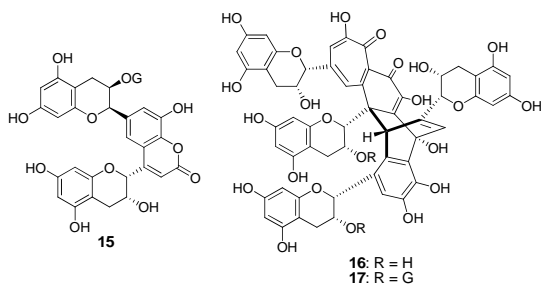
エピカテキン (5) 共存下において3位にガロイル基を持つ theaflavin-3-*O*-gallate (2) をポリフェノール酸化酵素で処理した結果、theanaphthoquinone-3'-*O*-gallate (7), flavantheaflavin B (9), および theadibenzotropolone A (10) が得られた。化合物7はベンゾトロポロン環が酸化を受けてナフトキノン環へと変化したものであり、9はベンゾトロポロン環と5が酸化的に縮合したものである。一方、10は2のガロイル基と5が縮合して新たなベンゾトロポロン環を形成した生成物であった。同様の条件で3'位にガロイル基を持つ theaflavin-3'-*O*-gallate (3) を酸化したところ、ガロイル基と5が縮合した theadibenzotropolone F (12) が生成し、ベンゾトロポロン環が酸化を受けたものは得られなかった。3位および3'位にガロイル基を持つ theaflavin-3,3'-*di-O*-gallate (4) の場合も3と同様に、ガロイル基と5が縮合した theadibenzotropolones D (13), E (11), および theatribenzotropolone A (14) が得られ、ベンゾトロポロン環が酸化を受けたものは得られなかった。さらに、テアフラビン類1-4単独あるいは5共存下における酵素酸化反応について経時変化を調べたところ、テアフラビン類単独ではポリフェノール酸化酵素によって酸化を受けなかったが、5共存下では1および2は急速に減少し、3および4はゆっくりと減少することが分かった。以上の結果から、3'位に遊離水酸基を持つ1および2の場合、まず5が酸化を受けて *o*-キノン体 5a が生成後、1および2のベンゾトロポロン環と5a が反応し、酸化や縮合を起こして6-9が生成すると考えられる。一方、3'位にガロイル基がエステル結合した3および4では、立体障害のためベンゾトロポロン環が5a と反応することができず、ガロイル基のみが5a と反応して新たなベンゾトロポロン環を形成した11-14が生成したと考えられた。エピカテキン (5) 共存下におけるテアフラビン類の酵素酸化反応過程において、1および2では反応液の長波長シフトが認められたが、3および4ではそのようなシフトは認められなかった。この長波長シフトは、ベンゾトロポロン環と5aの *o*-キノン環との電荷移動相互作用によるものと考えられ、このことはDFT最適化によって得られた1/5a錯体の

UV/Vis スペクトルについての TDDFT 計算および分子軌道解析によって裏付けられた。テアフラビン類のベンゾトロポロン環の酸化において、このような電荷移動相互作用が重要な役割を果たしており、3'位水酸基にガロイル基がエステル結合している場合は、ガロイル基の分子内スタッキングによりキノンとの分子間相互作用が妨げられていると考えられる。



つづいて、テアフラビン類の中性条件下における自動酸化を明らかにするために、まず、2をpH 7緩衝液で処理した結果、7および theacoumarin B (15) が得られた。化合物15はベンゾトロポロン環が酸化されてナフトキノン環となった後、さらに酸化を受けてクマリン環へ変化したものである。一方、3からはクマリン環が生成する前の中間体と3のキノン体との間で縮合が起こることにより、

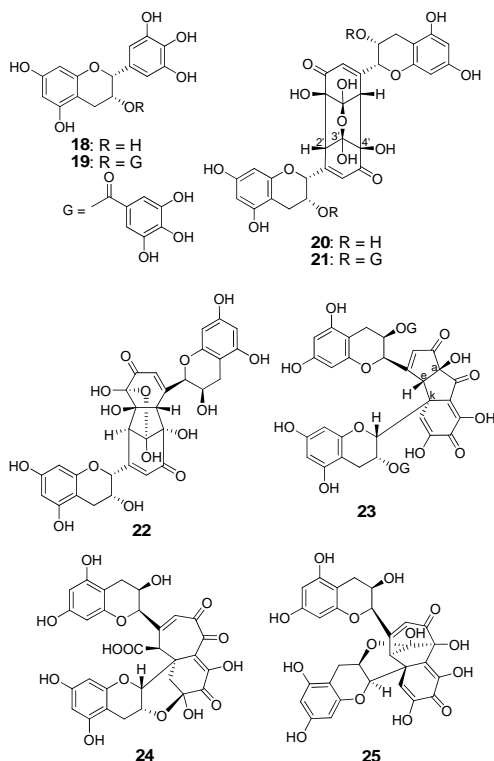
bistheafavin C (17) が生成した。すなわち、中性条件下における自動酸化反応はポリフェノール酸化酵素による酸化反応とは異なる機構で進行し、3 位水酸基にガロイル基がエステル結合しているかどうかで反応機構が異なることが明らかとなった。



本研究により、紅茶色素テアフラビン類はガロイル基の有無や結合位置の違い、あるいは酸化条件の違いによって、異なる生成物を与えることが明らかとなった。また、その反応機構では分子間電荷移動相互作用が重要な役割を果たしていることも分かった。組成が未だ十分に解明されていない紅茶ポリフェノール形成においてこのようなテアフラビン類の多様な酸化は重要であると考えられる。

(2) ピロガロール型カテキンの酵素酸化機構

紅茶製造過程におけるカテキン類の化学変化機構解明を目的として、茶葉の主要カテキンであるエピガロカテキン (18) の酵素酸化生成物について詳細に検討した。これまでの研究で、18 を酵素酸化すると dehydrotheasinensin C が主生成物として生成する他、マイナーな生成物として 20, proepitheafagallin (24), proepitheafagallin B (25) が生成することが明らかとなっている。



本研究では 18 の新たな酵素酸化生成物として 22 が得られ、その各種スペクトルデータより平面構造を決定した。さらに立体構造について、可能性のある二種類のジアステレオマーの ECD スペクトルについて理論計算を行うことにより決定した。化合物 20, 24, 25 は既知化合物であるが立体構造は未決定のままとなっていたことから、ECD スペクトルおよび NMR ケミカルシフトの理論計算に基づき立体構造を決定した。さらに、エピガロカテキン-3-O-ガレート (19) の酵素酸化によって生成する二量体 21 および theacitrin C (23) についても立体構造が決定されていないことから、同様の方法で決定した。

(3) ほうじ茶製造過程で生成する高分子ポリフェノールの生成機構

ほうじ茶の製造過程において生成する高分子ポリフェノールの生成機構を解明するために、まずほうじ茶より高分子ポリフェノールを分離した。さらに、茶の主要成分テアニンやグルコースなどの共存下においてカテキン類を焙煎処理し、生成する高分子ポリフェノールを分離して ^{13}C -NMR スペクトルを測定した。これらスペクトルの解析により、還元糖とカテキン類の A 環 6,8 位との縮合反応がほうじ茶高分子ポリフェノールの生成に大きく寄与していることが分かった。糖類は加熱によってカラメル化を起こすことが知られていることから、カラメル化反応生成物 hydroxyacetone や methylglyoxal を用いてモデル焙煎実験を行い、高分子生成物を得た。その ^{13}C -NMR スペクトルはほうじ茶高分子ポリフェノールのスペクトルとよく類似していたことから、糖のカラメル化化合物と茶カテキン類との重合反応によってほうじ茶ポリフェノールが生成していることが示された。

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 5 件)

Yosuke Matsuo, Fumiya Tadakuma, Takuya Shii, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, Selective oxidation of pyrogallol-type catechins with unripe fruit homogenate of *Citrus unshiu* and structural revision of oolongtheanins, *Tetrahedron*, 査読有, Vo. 71, 2015, 2540-2548.

DOI: 10.1016/j.tet.2015.03.016

Takuya Shii, Chiori Asada, Yosuke Matsuo, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, Polyphenols in lahpert-so and two new catechin metabolites produced by anaerobic microbial fermentation of green tea, *Journal of Natural Medicines*, 査読有, Vo. 68, 2014, 459-464

DOI: 10.1007/s11418-014-0816-1

<http://hdl.handle.net/10069/34685>

Yosuke Matsuo, Toshimi Hayashi, Yoshinori Saito, Isao Kouno, Takashi Tanaka, Structures of enzymatic oxidation products of epigallocatechin, Tetrahedron, 査読有, Vol. 69, 2013, 8952-8958.

DOI: 10.1016/j.tet.2013.07.045

<http://hdl.handle.net/10069/33913>

〔学会発表〕(計 18 件)

寺本世生、稲田 葵、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆、茶製品中のカテキン重合生成物に関する化学的研究(第一報)、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 26 日~29 日、岡山大学(岡山県岡山市)

松尾洋介、大渡遼介、齋藤義紀、田中 隆、茶カテキン二量体プロエピテアフラガリン類の立体構造および生成機構の再検討、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 日~28 日、神戸学院大学(兵庫県神戸市) 大渡遼介、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆、中性条件下における紅茶色素テアフラビン類の酸化機構、第 31 回日本薬学会九州支部大会、2014 年 12 月 6 日~7 日、第一薬科大学(福岡県福岡市)

松尾洋介、大渡遼介、齋藤義紀、田中 隆、紅茶色素テアフラビン類の酵素的酸化機構とテアシトリン類の立体構造、第 11 回日本カテキン学会年次学術学会、2014 年 11 月 21 日~22 日、昭和大学(東京都品川区)

松尾洋介、紅茶ポリフェノール生成における茶カテキン類の二量化機構、日本生薬学会第 61 回年会(招待講演)、2014 年 9 月 13 日~14 日、福岡大学(福岡県福岡市)

Yosuke Matsuo, Ryosuke Oowatashi, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, Stereochemistry of black tea pigment theacitrins, The 8th JSP-CCTCNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, 2014 年 9 月 13 日、福岡大学(福岡県福岡市)

Yosuke Matsuo, Ryosuke Oowatashi, Rie Kusano, Yoshinori Saito, Takashi Tanaka, Enzymatic oxidation of black tea pigment theaflavins in the presence of epicatechin by polyphenol oxidase, The XXVIIth International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference, 2014 年 9 月 2 日~6 日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

只熊郁也、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆、ポリフェノール酸化酵素による epigallocatechin と gallic acid との酸化的縮合反応、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 7 日~8 日、長崎国際大学(長崎県佐世保市)

Aoi Inada, Yuji Kunihiro, Yosuke Matsuo, Yoshinori Saito, Isao Kouno, Takashi Tanaka, Chemical change of tea catechins in roasting and suppression mechanism against the

formation of toxic Maillard reaction products, The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science, 2013 年 11 月 6 日~8 日、グランシップ(静岡県静岡市) 只熊郁也、松尾洋介、齋藤義紀、田中 隆、エピガロカテキンの新規酵素酸化生成物及びラジカル酸化反応、日本生薬学会第 60 回年会、2013 年 9 月 7 日~8 日、北海道医療大学(北海道石狩郡)

松尾洋介、内島崇裕、齋藤義紀、田中 隆、紅茶色素テアフラビンの酸化におけるエピカテキンキノンの分子間相互作用、日本生薬学会第 60 回年会、2013 年 9 月 7 日~8 日、北海道医療大学(北海道石狩郡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 洋介 (MATSUO, Yosuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号: 10432981