



## ◇◇◇ コラム ◇◇◇

皆さん「和紅茶」ってご存じですか？最近では、デパートなどでおしゃれなパッケージに入った和紅茶が販売されていますのでご存じの方もいるかもしれません。紅茶というと、インドやスリランカ産がとて有名で、わが国においても輸入品が大半を占めます。一方、量的にはわずかですが、日本産の紅茶、いわゆる「和紅茶」があります。私も研究を始めるまでは知りませんでしたが、和紅茶は実は明治時代から製造されていたそうです。

紅茶も和紅茶も同じ茶の樹の葉を原料に製造されます。生産者によって少し工程が異なることもありますが、おおざっぱに言うと葉を摘採した後、萎凋(萎れさせる)―揉捻(揉む)―発酵―乾燥の4工程を経て作られます。それでは、紅茶と和紅茶の違いは何でしょうか？実は、茶の樹に違いがあるんです。インドやスリランカで製造される紅茶は、タンニン量

が多いアッサム種を用います。一方和紅茶は、「べにふうき」のような紅茶品種もありますが、一般には緑茶製造に用いられる茶の生葉を加工して製造されます。日本の茶の品種はアッサム種と比べてタンニン量が少ないため、和紅茶は紅茶と比べて淡い色の水色を持つ渋みの少ないまろやかな味に仕上がると言われています。わが国では、お茶は年に3回ほど収穫されます。1番茶は皆さんもよくご存じの新茶のことで、価格が高いです。一方、2番茶以降は価格が低く、茶農家さんによっては刈り落して(製品にしない)しまいます。この価格の低い2番茶以降を使用して和紅茶を製造することで、収益アップを図る試みが全国で行われているようです。茶の品種という「やぶきた」が有名ですが、わが国にはその土地に適したいろんな茶の品種があります。また、本稿の中でも紹介していますが、紅茶は加工の過程で成分が大きく変化しますので作り方によっても味わいが違います。全国各地のいろんな「和紅茶」を試してみたいはかがででしょうか？

ためカテキン類の含有量は非常に少なく、発酵茶の機能性成分は発酵工程で新たに生成するポリフェノール、特に高分子ポリフェノールが担っていると考えられる。

しかしながらこの高分子ポリフェノールについては、分離精製に用いられる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析や構造解析に用いられる核磁気共鳴分光法(NMR)において“瘤状”に観測されることから分離・構造解析が困難であり、未だその詳細は明らかになっていない。一方、カテキン類に限らずポリフェノールに関する研究ではその機能性に注目が集まり、近年では特に構造-活性相関に関する知見が多数報告されている。そのような報告では、構造中の水酸基の有無や立体化学など、わずかな化学構造の違いが機能性の増強や減衰につながる事が知られている。このことは、構造情報が乏しいまま機能性についての研究が先行して行われている高分子ポリフェノールの現状と矛盾している。筆者は、高分子ポリフェノールの全体像解明のためのアプローチとして、茶製造中におけるカテキン類の変化を有機化学的に明らかにすることを目指して研究を進めてきた。本稿ではその一部を紹介したい。

### カテキン低分子重合体の生成メカニズム

発酵茶に含まれるカテキン重合体は、カテキン類が数分子縮合した低分子ポリフェノールとさらに重合が進んだ高分子ポリフェノールに分けることができる。前者

は、テアフラビン類、テアシネンシン類、ウーロンテアニン類等(図1)が知られている。筆者らは、これらの化合物が高分子ポリフェノールの生成反応における重要な反応中間体として位置付けることができるのではないかと考えた。そして、その生成メカニズムや反応性の理解が高分子ポリフェノールの化学構造解明につながると期待した。そこで、ウーロンテアニン類(5)及びテアフラビン類(6)の生成反応について研究を進めてきた。

ウーロンテアニン類(5, 図1)はその名が示すように、ウーロン茶から単離・構造決定<sup>(2)</sup>されたカテキン2量体であり、カテキン類4種のうち、B環がピロガロールタイプの(-)-Epigallocatechin(1:以下EGC)または(-)-Epigallocatechin gallate(2:以下EGCg)が酸化的に2量化した化合物である。筆者らは1または2の塩化銅(II)水溶液を用いた酸化反応により5の合成法<sup>(3)</sup>を確立し、この反応が2つの反応中間体を経た3段階の反応で生成することを明らかにした<sup>(4)</sup>。また中間体の1つはテアシネンシン類(7)の生成中間体として報告されていた化合物<sup>(5)</sup>であったことから、ウーロンテアニン類とテアシネンシン類が共通の反応で生成するという興味深い知見を見出した。本内容については、筆者らの前記事で詳細に紹介しているためそちらをご覧くださいと幸いです<sup>(6)</sup>。

紅茶の代表的色素の1つであるテアフラビン(図1)は、カテコールタイプ(EC, ECg)とピロガロールタイプ(EGC, EGCg)のカテキン類がB環部で酸化的に縮

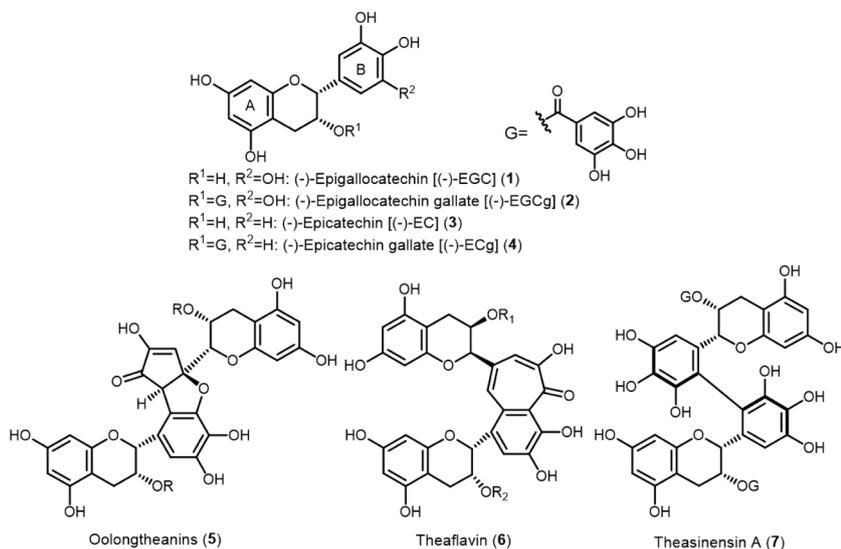


図1 ■ 茶ポリフェノール類の化学構造

合することによって生成する特徴的なベンゾトロポロン骨格を有している。1964年Takinoらは、フェリシアン化カリウム ( $K_3Fe(CN)_6$ ) を用いた酸化反応によりテアフラビンの合成に成功している<sup>(7)</sup>。その生成機構は多く研究者によって提案されている<sup>(7-9)</sup>。その生成機構はいずれも、カテコール及びピロガロールが酸化されて生成する $o$ -キノン同士のカップリングであった。しかしながらこの機構に対する明確な科学的証明はなされていない。筆者らは、テアフラビン類に代表されるベンゾトロポロン環の生成機構を解明するためにその開始段階の詳細な検討を行った。

カップリングの開始段階には次の3つの可能性がある。

- ①カテコール及びピロガロールの両方が酸化されて生成する $o$ -キノン同士のカップリング (定説)
- ②カテコールから生成する $o$ -キノンとピロガロールのカップリング
- ③ピロガロールから生成する $o$ -キノンとカテコールのカップリング

筆者らは、 $K_3Fe(CN)_6$ を酸化剤として用いてCatechol (9a) と Pyrogallol (10a) から8,9-dihydrobenzotropolone (8) を合成する反応を利用して検討した。

はじめにこの反応において酸化がカテコールとピロガロールの両方必要であるのか (①), あるいはどちらか片方のみ必要であるのか (②, ③) を明らかにするために、 $K_3Fe(CN)_6$ に対してカテコールとピロガロールを時間差で添加したときベンゾトロポロン環の生成収率にどのような影響を与えるかを検討することにした (図2)。ここで時間 $t$ (s) は $K_3Fe(CN)_6$ に対してCatechol (9a) 添加後Pyrogallol (10a) を添加するまでの時間を表している。 $t=0$ の時の収率が約13%であったのに対

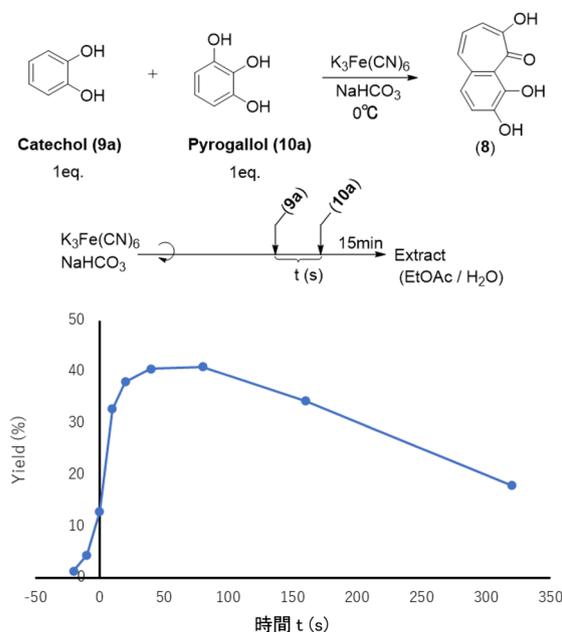


図2 ■ ベンゾトロポロンの収率の変化

時間 $t$  (s) は $K_3Fe(CN)_6$ に対して9a添加後に10aを添加するまでの時間を表している。 $t=0$ は9aと10aを同時に、 $t<0$ は10aを9aより先に添加した場合を示す。

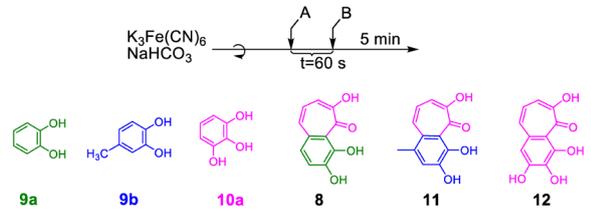
し、特に $t=60$ では約3倍の40%となり、以後なだらかに減少した。一方 $t$ がマイナスの時、すなわち $K_3Fe(CN)_6$ に対してピロガロールをカテコールより先に添加した場合反応は著しく抑制された。この結果はベンゾトロポロン環生成の開始段階では、カテコールの酸化が重要であることを示している。

さらに詳細に検討するため次のような実験を行った (表1)。まず $K_3Fe(CN)_6$ に対してCatechol (9a) を添加し、 $t$ 秒後 (ここで $t$ は先の実験で最も収率の良かった60sとした。) にPyrogallol (10a) とともに4-methyl cat-

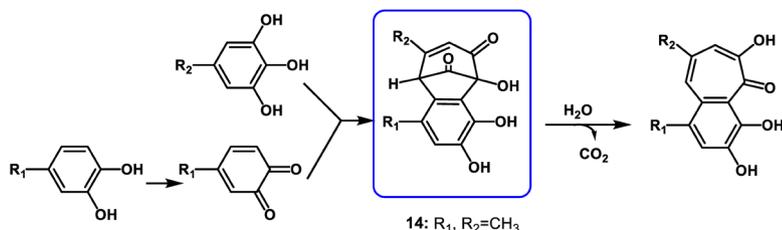
echol (**9b**) を添加した。その結果、主生成物は **9a** と **10a** が縮合することによって生成した 8,9-dihydroxybenzotropolone (**8**) であり、**9b** と **10a** が縮合した 6-methyl-8,9-dihydroxybenzotropolone (**11**) はその3分の1以下であった。また **10a** 同士が縮合することによって生成する purpurogallin (**12**) はほとんど観察されなかった。また同様に、まず  $K_3Fe(CN)_6$  に対して **9b** を添加し、60秒後に **10a** とともに **9a** を添加した。その結果、主生成物は **9b** と **10a** が縮合した **11** であり、**8** や **12** はごくわずかであった。この結果は、先に添加したカテコール類は  $K_3Fe(CN)_6$  によって酸化を受けて *o*-キノンとなるが、その酸化段階は共存するピロガロールや別のカテコール類に移ることはほとんどなく直接的に縮合していることを示している。これらの実験結果は、これまでの定説である①よりも②の可能性、すなわちカテコールから生成する *o*-キノンがピロガロール自身と直接反応する機構を強く支持している。この反応機構は、モデル反応のみならずベンゾトロポロン骨格を有するテアフラビンでも同様であると考えている。

次に 4-methyl catechol (**9b**) と 5-methylpyrogallol (**10b**) を用いて検討した。酸化剤として  $K_3Fe(CN)_6$  の代わりに炭酸銀をセライトに吸着させた Fetizon 試薬を用いると、**9b** は、定量的に 4-methyl-*o*-quinone に変換された。これを **10b** と反応させ、最後に水で処理することにより対応するベンゾトロポロン (**13**) に収率よく変換されることが明らかとなった。また、*o*-キノンはプロトン性溶

表1 ■ ベンゾトロポロン類の生成物とその収率への影響



	A	B	Products (Yield)		
Entry 1	<b>9a</b>	<b>10a + 9b</b>	<b>8</b> (44%)	<b>11</b> (13%)	<b>12</b> (3%)
Entry 2	<b>9b</b>	<b>10a + 9a</b>	<b>8</b> (2%)	<b>11</b> (78%)	<b>12</b> (2%)



媒中で不安定な物質であるため、反応溶媒として非プロトン性溶媒であるジクロロメタンを使用して無水条件下にて反応を行ったところ無色結晶状の化合物が析出した。この化合物は、水を添加することにより目的とする **13** へと変換されたことから、ベンゾトロポロン合成の際の反応中間体であることが示唆された。各種の機器分析による解析結果より化合物 (**14**) は分子内にビスクロ [3.2.1] 骨格を持った化合物であることが明らかとなった (図3)<sup>(10)</sup>。この化合物は、ベンゾトロポロン類の推定生成メカニズムで示されていた構造であったが、単離された初めての例であった<sup>(10)</sup>。

これらの結果より筆者らはテアフラビンの生成メカニズムは図3のようであると推定している。P. D. Collier ら<sup>(11)</sup> によって報告されている  $K_3Fe(CN)_6$  を用いた4種テアフラビン類の収率はいずれも低く、最も単純な EC と EGC から生成する Free theaflavin (**6**) においても 18.8% であった。これらの結果を基にテアフラビン類の合成における収率の改善を図ったところ、**6** においては 52% まで収率を改善することに成功した (未発表)。

### カテキン由来低分子ポリフェノールは高分子ポリフェノールの生成中間体なのか？

筆者らはテアフラビンに代表されるカテキン由来低分子ポリフェノールを高分子ポリフェノールの生成反応における重要な中間体であると仮定してその生成機構に関する研究を行ってきた。実際に、テアフラビンを酸化するとその2量体である bistheaflavin A, bistheaflavin B が得られたとの報告がある<sup>(12)</sup>。そこで筆者らは EGC (**1**) とウーロンテアニン (**5**) を共存下で酸化反応を行うことで、EGC-ウーロンテアニン複合体ができると予測し、酸化反応を行った。HPLCにて反応を追跡したところ、反応開始直後から **1** が速やかに減少したのに対し、**5** の減少は見られず、**1** が消失後に減少する様子が観察された。新しく生成したピークはいずれも、**1** あるいは **5** の酸化物であり、**1** と **5** が反応したと予想されるピークは見られなかった。このことから、**1** と **5** の酸化反応における反応性の差はかなりあり、**1** の方が酸化されやすいことが明らかになった。次に、**5** の酸化反応を検討し

図3 ■ テアフラビンの生成機構

た。反応の進行は非常に遅いが、2つの生成物がわずかに得られた。酸化物としては、テアフラビンの酸化2量体 bistheaf flavin A や bistheaf flavin B のように分子間反応を期待したが、生成した2つの化合物を単離し構造決定したところいずれも新たに分子内結合が生成した化合物であった<sup>(13)</sup>。これらの結果から、カテキン低分子重合体は高分子ポリフェノールの生成中間体でない可能性が示唆された。

### 和紅茶製造中の成分変化に着目した新たな試み

紅茶中の高分子ポリフェノールは、テアルビジンと呼ばれている。テアルビジンは1960年代にRobertsにより赤褐色で水に溶ける高分子ポリフェノールとして命名された化合物群である<sup>(14)</sup>。その化学構造に関しては、生成メカニズムや分解反応に注目した多くの研究が知られており、現在のところフラバン-3-オール (EGC, EC) とフラバン-3-オールガレート (EGCg, ECg) からなる分子量が700-4000程度の不均一なポリマーであるとされているが詳細な構造は明らかになっていない<sup>(15)</sup>。先に紹介した結果から筆者らは、テアフラビンなどの低分子のカテキン酸化重合体は、比較的安定な副生成物であり高分子化反応という視点では副反応といえるのではないかと考えている。そのため、テアルビジンの生成にはこれまでに知られていない新たな生成中間体を介した別のルートが存在する可能性がある。そこで筆者らは紅茶の製造工程、特に国内でサンプリングが容易な和紅茶を研究対象としてその製造工程中の化合物変化に着目することでテアルビジン形成に関する新たな知見が得られるのではないかと期待した。

紅茶は生葉から、萎凋・揉捻・発酵・乾燥の4工程を経て製造される。萎凋は摘採した生葉を萎れさせる工程、揉捻は揉捻機を用いて茶葉を揉むことで細胞組織を破壊する工程、発酵は茶葉を広げて湿度90%以上の条件で保つことで発酵をさらに進行させる工程、乾燥は茶葉を100~120°Cの熱風によって乾燥させる工程である。工程ごとにサンプルを採取し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によりその抽出物の分析を行った。生葉に含まれるカテキン類は摘採直後の生葉と萎凋後ではあまり変化がなく、揉捻後期から発酵初期にかけて急激に減少、その後もなだらかに減少した。一方、カテキンの酸化2量体であるテアフラビンについては揉捻後期から発酵にかけて急激に増加していた。この変化は、カテキン類の減少とよい相関があるといえる。しかしながら、テアフラビンの生成量は、カテキンの減少量の

10%程度であり、残りのカテキン類がテアルビジンの生成に関与していると考えられる。これらの結果は、テアルビジンが発酵中に生成するとされてきたこれまでの知見<sup>(15)</sup>とよく一致するものである。また、テアルビジンの生成反応が、テアフラビンの生成と競合的に起こっていることを示している (未発表)。現在、各工程のサンプルの液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) を用いた網羅的な解析を行っている。特に揉捻後期から発酵工程にかけて変化量の大きい成分に注目し、その中でもテアルビジンの生成反応に関わっていると推定される成分 (カテキン類に由来する成分) の探索を行っているところである。今後、これらの情報の中からテアルビジンの生成にかかわる鍵中間体の発見や生成メカニズムの解明につながる知見が得られることを期待している。

### おわりに

ポリフェノール類は植物中に広く存在する化合物群であり、多くの種類が知られている。クロマトグラフィーや機器分析技術の発展とともに、多彩な化学構造を持つことが明らかにされてきた。一方で、紅茶やウーロン茶中で知られる高分子ポリフェノールはその複雑さから構造解析が難しくその情報が乏しいという現状がある。筆者は、紅茶やウーロン茶などの発酵茶中で知られるテアフラビンなどの比較的低分子のカテキン酸化重合体が、高分子ポリフェノールの生成中間体であると位置づけ、カテキンの酸化反応について詳細に研究することがその解明のきっかけになると考えて研究を進めてきた。しかし研究を進める中で、これらの低分子化合物は酸化重合反応という観点から考えると、むしろ比較的安定な副生成物なのではないかと考えている。今後は、本稿の最後でも紹介した茶葉の加工中での変化も含めた新たなアプローチを展開することで1960年代からの長年の謎である高分子ポリフェノールの構造解明にむけて研究を進めていきたい。

謝辞：本研究の実施にあたり長年ご指導・ご支援いただきました、恩師である中塚進一先生 (現・長良サイエンス(株)代表取締役社長、岐阜大学名誉教授) に厚く御礼申し上げます。また、岐阜大学応用生物科学部の先生方、研究を一緒に行っていた同大生物有機化学研究室の卒業生・学生の皆様及び同大高等研究院科学研究基盤センターの職員及び先生方に深く感謝申し上げます。

### 文献

- 1) 伊奈和夫, 坂田完三編: 緑茶・中国茶・紅茶の化学と機能, アイ・ケイコーポレーション, 2007, p. 167.
- 2) F. Hashimoto, G. Nonaka & I. Nishioka: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1676 (1988).
- 3) K. Ogawa, S. Hirose, H. Yamamoto, M. Shimada, S. Naga-

- oka & E. Yanase: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 749 (2015).
- 4) S. Hirose, Y. O. Kamatari & E. Yanase: *Tetrahedron Lett.*, **61**, 151601 (2020).
  - 5) T. Shii, M. Miyamoto, Y. Matsuo, T. Tanaka & I. Kouno: *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 1183 (2011).
  - 6) 廣瀬紗弓, 柳瀬笑子: *化学と生物*, **56**, 665 (2018).
  - 7) Y. Takino, H. Imagawa, H. Horikawa & A. Tanaka: *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 64 (1964).
  - 8) J. C. Salfeld: *Angew. Chem.*, **69**, 723 (1957).
  - 9) L. Horner, W. Dürckheimer, K.-H. Weber & K. Dolling: *Chem. Ber.*, **97**, 312 (1964).
  - 10) E. Yanase, K. Sawaki & S. Nakatsuka: *Synlett*, **17**, 2661 (2005).
  - 11) P. D. Colier, T. Bryce, R. Mallow, P. E. Thomas, D. J. Frost, O. Korver & C. K. Wilkins: *Tetrahedron*, **29**, 125 (1972).
  - 12) T. Tanaka, K. Inoue, Y. Betsumiya, C. Mine & I. Kouno: *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5785 (2001).
  - 13) Y. Ochiai, K. Ogawa, Y. Sawada & E. Yanase: *Tetrahedron Lett.*, **73**, 153140 (2021).
  - 14) E. Haslam: *Phytochemistry*, **64**, 61 (2003).
  - 15) K. Zhu, J. Ouyang, J. Huang & Z. Liu: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **61**, 1556 (2021).

## プロフィール



柳瀬 笑子 (Emiko YANASE)

<略歴>1996年岐阜大学農学部生物資源利用学科卒業/1998年同大学大学院農学研究科修了/1999年同大学農学部助手/2005年博士(農学)/2006~2007年米国コロンビア大学博士研究員/2011年岐阜大学応用生物科学部准教授/2021年同大学応用生物科学部教授, 現在に至る<研究テーマと抱負>植物ポリフェノール類の構造解析, 分析と化学反応性に関する研究<趣味>フルーツ<所属研究室ホームページ><https://www1.gifu-u.ac.jp/~biochem/>

Copyright © 2022 公益社団法人日本農芸化学会  
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.60.346