

ウーロン茶ポリフェノール多量化機構

岐阜大学 応用生物科学部

柳瀬 笑子

1. 研究の目的と背景

ポリフェノール類は植物の二次代謝成分の一種で、茶においては主にカテキン類を指す。その含有量や成分、成分比などは茶葉の種類や加工方法によって様々である。ウーロン茶は半発酵茶に属する茶であり、元来茶葉に含まれるカテキン類に加えて、製造時に茶の生葉中のカテキン類が茶葉に含まれる酸化酵素によって酸化変換・重合されることによって生じる高分子ポリフェノールが含まれる。ウーロン茶においてこの高分子ポリフェノールは、ウーロン茶ポリフェノールと呼ばれている。近年、これらが持つ中性脂肪の低下、活性酸素の消去などの機能性が注目されており、健康食品や特定保健用食品として利用されている。しかしこのウーロン茶ポリフェノールについては、含有量が多いにも関わらず非常に複雑な構造の混合物であり、クロマトグラフィー等による分離精製やNMR等による構造解析が困難であるため、未だその詳細は明らかになっていない。現在では分離が比較的容易な低分子重合体の構造やMALDI-TOF-MSによる解析から高分子ポリフェノールの構造推定がなされている。しかし、人工的な合成ポリマーと異なり、構成単位や結合様式が多様であり、化学的な根拠が十分とはいえない。本研究では、カテキンや比較的低分子のウーロン茶ポリフェノール関連物質の酸化反応メカニズムを有機化学的に解明するというアプローチで、科学的根拠に基づいたウーロン茶ポリフェノールの構造推定を行うことを目的とした。

2. 研究の方法

ウーロン茶中の高分子ポリフェノールは、生葉中に含まれるカテキン類が酸化重合した化合物である。そのため、カテキン類は高分子ポリフェノールの前駆体であり、ウーロン茶に含まれるカテキンの2量体であるウーロンテアニン類等は、生成中間体であると位置づけることができる (Fig. 1)。そこで、ウーロン茶高分子ポリフェノール生成におけるモデル反応として、カテキン類及びウーロンテアニン類を用いた酸化反応を行い、生成する化合物の単離・構造決定を検討することにした。さらに、得られた化合物の構造から、高分子ポリフェノールの構造推定を行うこととした。

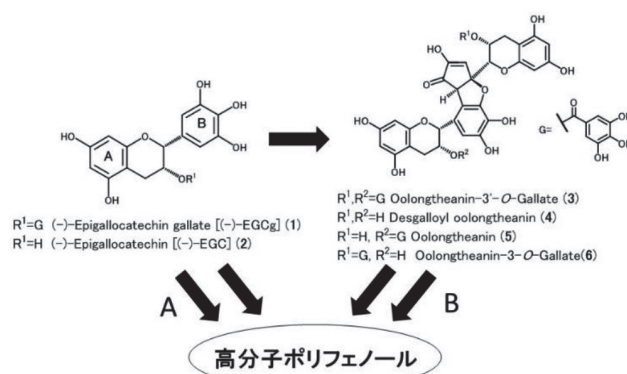


Fig. 1 ウーロン茶高分子ポリフェノールの推定生成機構

3. 研究内容

本研究において、カテキンの酸化生成物として2種の既知化合物及び3種の新規化合物、ウーロンテアニン類の酸化生成物として新規化合物1種の単離構造決定に成功した。また、カテキン類とウーロンテアニン類の酸化速度の差、ウーロンテアニン類の水中での挙動についても明らかにした。これらの結果をもとに、ウーロン茶高分子ポリフェノールの構造推定を行った。詳細は4項及び5項で述べる。

4. 研究の実施経過

4.1 カテキン類の酸化反応

塩化銅(II)水溶液中にカテキン類のひとつであるエピカテキン(EC)を加えて酸化反応を行った。反応液のHPLC分析をおこなったところECのピーク及び、それとは異なる5つのピーク7-11が観察された (Fig. 2)。酸化剤の種類やその当量、反応時間の変化によりこれらのピークの生成量が変化することが分かった。そこで、それぞれの最適条件下で反応を行い、各化合物はHPLCにより精製後、MS及び各種NMR測定を行った。

ESI-MS分析の結果より、ピーク7, 8及び11はECの3量体、9及び10は2量体であることが示唆された。さらに、ピーク9及び10について、各種2D-NMR測定を行った結果、それぞれA環部の6位または8位とB環部2'位で結合した2量体であることが明らかとなった。この化合物は、SangらによりECのラジカル酸化生成物として報告されており、文献値と一致した。同様に、化合物7, 8及び11について、各種2D-NMR測定を行った結

果, いずれも A 環部と B 環部が結合した新規 3 量体であり, 特に化合物 7 及び 8 は環状化合物であることが明らかとなった (Fig. 2).

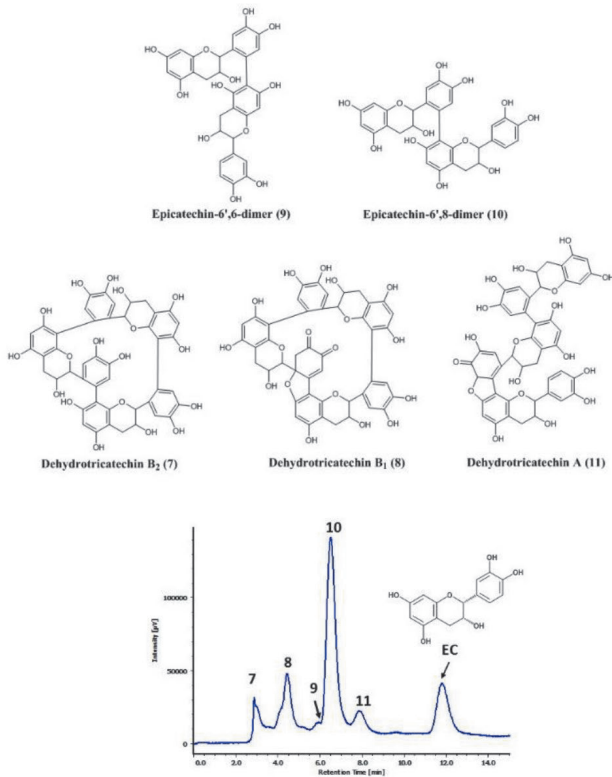


Fig. 2 Epicatechin 酸化反応生成物の構造と反応液の HPLC 分析

4.2 ウーロンテアニン類の酸化反応

ウーロンテアニン類がカテキンの重合化の際の反応中間体の 1 つであると仮定すると, その反応性の解明は高分子ポリフェノールの構造を理解するうえで重要である. そこで, ウーロンテアニン類のさらなる酸化反応を試みた. デスガロリルウーロンテアニン(4)を原料として, 酸化剤としてフェリシアン化カリウム / 炭酸水素ナトリウムを添加し室温で激しく攪拌した. HPLC で反応追跡を行ったところ, 4 のピークの衰退とともに新たなピークの生成が確認された. この新たなピークについて, 分取 HPLC により分離・精製し, MS 及び各種 NMR 測定を行った. その結果, 得られた化合物は A 環部の芳香属性が失われ, B 環部と分子内で結合した化合物 12 であることが明らかとなった (Fig. 3).

化合物 12 の生成メカニズムは, 化合物 4 の 7'' 位のフェノール性水酸基由来のフェノキシラジカルと, 6'' 位の水素 (α 水素) が引き抜かれた炭素ラジカルとの分子内カップリング反応であると考えられる. 互いの反応点は非常に遠いように見えるが, 分子内であり 6'' 位と 4a'' 位の距離はちょうど 6 炭素であるため反応したものと推測している.

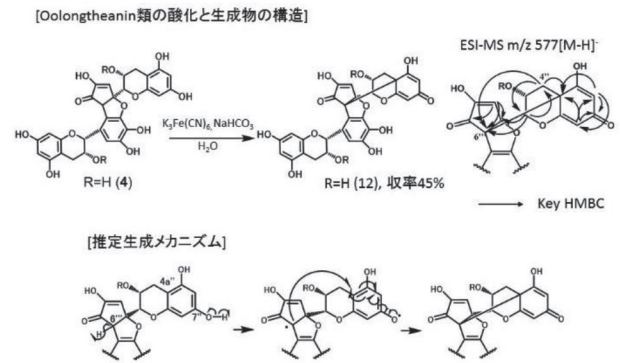


Fig. 3 Oolongtheanine 類の酸化

4.3 カテキン類とウーロンテアニン類の競合酸化反応

EGC(2)とデスガロリルウーロンテアニン(4)を共存下で酸化反応を行うことで, EGC-デスガロリルウーロンテアニン複合体ができると予測し, 酸化剤としてフェリシアン化カリウム / 炭酸水素ナトリウムをもちいて酸化反応を行った. HPLC にて反応を追跡したところ, 反応開始直後から 2 が速やかに減少したのに対し, 4 の減少は見られず, 2 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, 2 あるいは 4 の酸化物であり, 2 と 4 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, 2 と 4 の酸化反応における反応性の差はかなりあり, 2 の方が酸化されやすいことが明らかになった.

4.4 ウーロンテアニン類の水中における挙動

比較的低分子のウーロン茶ポリフェノールのひとつとして知られるウーロンテアニン類は, カテキンからの酸化反応により合成できることを以前報告している. その際, 特にガレート基を持つ化合物 3 の合成時に目的物以外のピークが HPLC で観察された. この副生成物は茶の製造時にも同様に生成している可能性があり, 重合化の反応経路の 1 つであると推測された. そこでこの副生成物の単離・構造決定を行った. その結果, この化合物は, メタノールやアセトンなどの有機溶媒中では 1 種類の化合物として観察されるが, 水中では 2 種の混合物として観察される, いわゆる平衡反応により生じていることが明らかとなった. そ

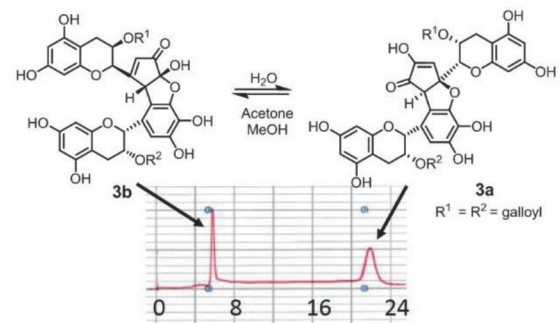


Fig. 4 ウーロンテアニンの中での平衡反応

の構造は元来ウーロンテアニンの構造として報告されている 3a の 5 員環部が開環し再環化した 3b のような構造であり、水中では 3a よりもむしろ 3b の方が多く存在することが明らかとなった。

5. 研究から得た結論・考察

ウーロン茶中の高分子ポリフェノールの構造をその生成機構を基にして行うために、カテキン類の酸化反応を行った。これまでカテキン類の多量化反応機構には Fig. 1 に示したように、ウーロンテアニンのような 2 量体が生成しそれがさらに酸化重合する (ルート B) とカテキン類が直接多量化していく (ルート A) があると考えられており、特にルート B に注目してきた。そのため、2 量体であるウーロンテアニン類は多量化における重要な鍵中間体であり、この化合物の酸化重合機構を明らかにすることが多量体の構造推定のための重要な足がかりになるだろうと予想してきた。しかしながら、本研究において、4.2 で示したようにウーロンテアニンのみを酸化すると、重合化ではなく分子内環化反応が生じたこと、また 4.3 に示したようにカテキンとの競合酸化反応からは 2 量体の反応性が比較的低い (カテキン >> ウーロンテアニン) ことが示されたことから、B 環部同士の縮合した 2 量体であるウーロンテアニンは酸化重合反応の中間体ではなく、むしろ副生成物であり、安定な重合物として重合化反応のメインルートからは外れた存在である可能性が示唆された。また、4.1 で示したように、一般的に B 環部が酸化されやすいと考えられてきたが、A 環部の求核性に由来する縮合生成物が主に得られたことから、ウーロン茶ポリフェノールの生成は主にルート B で起こり B 環部と A 環部が関与した酸化重合体であることが示唆された。

6. 残された問題、今後の課題

本研究では、有機合成反応を利用してカテキン類の多量化メカニズムの解明を目指し、これまで推定していたルートとは異なるルートでの多量化機構が示唆された。しかしながらこの結論は、あくまでも有機合成試薬を酸化剤として用いた結果であり、実際に茶葉中での酸化反応とは異なる可能性がある。このことから今後は、酵素を用いてこの反応を検証する必要がある。また、本研究はカテキン類の酸化反応機構を解明するというアプローチでウーロン茶高分子ポリフェノールの構造解明を目指したものであるが、最終的には、ウーロン茶ポリフェノール側からの構造情報も重要であると考えている。今後は、ウーロン茶ポリフェノールの直接的な構造解析を目指し、選択的な加水分解反応等の反応開発を行うことで、より科学的根拠に基づいたウーロン茶ポリフェノールの構造提案ができるものと考えている。