

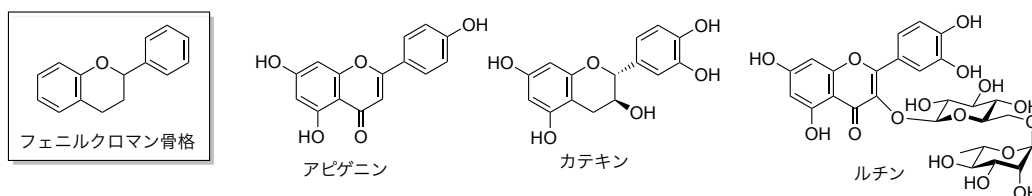
# 茶の変色反応によるフラボノイド成分変化に関する研究

## 【背景・目的】

フラボノイドは、植物中に豊富に含まれる天然成分である。フラボノイドは、空气中で酸化されやすく容易に構造変化を起こすため、特定の構造を持つ化合物を得ることは一般に困難である。しかし最近、これらにはよく知られる抗酸化作用以外にも重要な生物活性が見出されつつあるため<sup>1,2</sup>、より詳細な成分分析と化学的性質の解明が求められている。

本研究では、フラボノイドを多く含む茶に注目し<sup>3</sup>、それらがどのような環境下で、どのような化学変化を起こすか調べるとともに、有用成分を効率的に得るための方法を探った。具体的には、茶の空气中における変色現象と、それらに含まれるフラボノイドの成分変化の関係を調べた。さらに、化学反応で生じた新たな化合物の検出も試みた。

本研究は、筆者と他の化学部部員2名で共同して行った。得られた成果を日本化学会関東支部主催の第@@回化学クラブ研究発表会にて発表し、研究奨励賞を受賞した。



図@ 天然フラボノイドの構造の一例

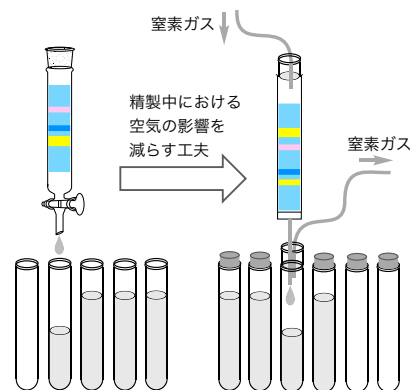
## 【実施方法】

### 1. 茶の変色実験および分光分析

市販されている緑茶、紅茶およびウーロン茶の茶葉から、一定条件下のもとで抽出操作を行って得た水溶液の空气中における色の変化を観察した。さらに実験条件を変えて変色反応に与える影響を調べた。そして、各溶液の紫外可視分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定し、その変化を確認した。

### 2. フラボノイド成分の精製

各反応溶液を様々な固定相に展着し、カラムクロマトグラフィーを試みた。ここで、分離操作時に空气中の酸素の影響を極力排除するため、クロマトグラフィーには一般によく用いられる開放系ではなく、カートリッジ化されたカラムを用い、また、溶出液も窒素雰囲気下で回収できるよう、実験装置を工夫した (図@)。....



図@ 工夫したカラムクロマトグラフィー装置

### 3. 各成分の定性分析および新たな定性分析方法の開発

得られたサンプルに含まれるポリフェノール成分を確認するため、塩化鉄によるフェノールの呈色反応実験を行った。さらに特定のフラボノイド構造を持つ成分が含まれているか確認するため、Mgと塩酸を用いた反応(篠田反応)による呈色反応実験を行った。

なお、オリゴマーなどの一部の多量体型フラボノイドは、これらの定性分析法では検出できなかったことから、別の検出方法を開発することにした。具体的には、青色を呈し特徴的な紫外-可視光吸収を有するアズレン誘導体を用いた検出反応が行えないかと考え、その可能性を探った。....

## 【結果】

### ・変色実験およびクロマトグラフィーによる化合物の精製

室温下、空气中で一昼夜静置した各水溶液の色の変化を観察したところ、緑茶の色変化が顕著であったが、意外にもその他の茶には目立った変化は見られなかった。しかし、紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、全ての水溶液にて長波長領域の吸収強度が増大していることが分った。ここで、一般に抗酸化作用のある添加物として知られるグルタミン酸やアスコルビン酸を加えたものは、予想どおり茶の着色変化がかなり抑えられたが、興味深いことにホウ酸を加えた水溶液も同様に抑制効果が観察された。……一方で、水溶液@にリンゴの皮の断片を加えてみたところ、着色反応が著しく促進された。これら一連の変色反応で変色が大きかったものについては、多くの着色性不溶物が生じた。これらは、水にも有機溶媒にも難溶であったが、水酸化ナトリウム溶液には溶けることが分った。

表@. 変色反応させた試料の収量および UV スペクトル変化

サンプル名	収量 [g]	目視による色の变化	あらたに観測された UV 吸収波長 (nm)
A	0.40	大	295, 352, 405
B	0.79	中	299, 330
C	1.23	小	305
D	0.08	小	213, 352, 405, 423
....		大	299, 330, 415
....			
.....			



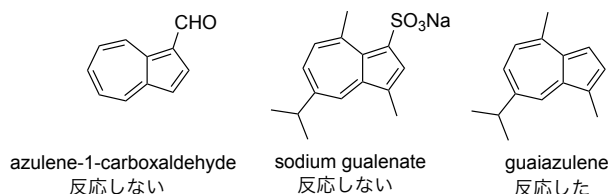
図@ 紫外可視分光光度計

得られた反応液を各種の固定相を用いたカラムクロマトグラフィーにて精製を試みたが、適切な固定相を見出すのにかなりの時間を要した。まず、逆相クロマトグラフィーで頻用されているオクタデシル基化学結合型 (C<sub>18</sub>, ODS) を用いたクロマトグラフィーでは、溶出物の回収率が悪かった。種々検討した結果、分子ふるい型樹脂を担持したサイズ排除カラムクロマトグラフィーを行うと回収率が大きく向上した。また着色成分の分離も良好だった。

### ・呈色実験

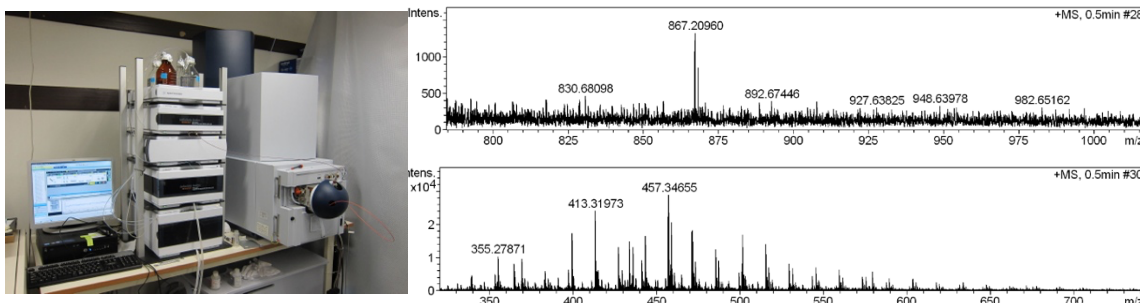
得られた各画分について、それぞれ塩化鉄を用いたフェノールの呈色実験を行った結果、サンプルによって呈色の様子がかなり異なったが、殆どのものについて、フェノールの存在が確認された。一方で、Mg と塩酸を用いた反応 (篠田反応)<sup>4</sup>による呈色反応実験では、予想に反して着色性成分が含まれるフラクションでの呈色感度が低かった。……

そこで、フラボノイドオリゴマー成分の新たな呈色反応を開発するため、検討を行った。具体的には、青色を呈するアズレン誘導体を用いたフラボノイドオリゴマーの分解による呈色実験を行った。始めに azulene-1-carboxaldehyde を用いたが、水に対する溶解性が悪く反応が進行しなかった。次に水に対する溶解性に優れた sodium gualenate を用いて反応を試みたが、やはり反応しなかった。しかし、guaiazulene を用いたところ、水への溶解が良くないものの、sample@と@から分離された着色画分から得られた濃縮物を用いた反応にて、アズレンと反応したと思われる成分を検出することができた。



図@検討したアズレン誘導体の構造

...得られた変色成分の構造については、より精密な分析機器の利用が必要不可欠と考えられたため、@@大学理学部化学科@教授のご指導の下、質量分析を行った。その結果、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにて初期に溶出される成分は、変色反応前のサンプルには含まれず、また分子量が著しく増大していることが分った。さらに、上記のアズレン誘導体を用いた反応にて得られた青色を呈する生成物のMS/MS分析を行ったところ、予想どおりこの化合物はアズレン構造とフラボノイド構造が連結したものであることが明らかになった。



図@ 質量分析計を用いた反応生成物の分析

### 【考察】

#### ・変色反応について

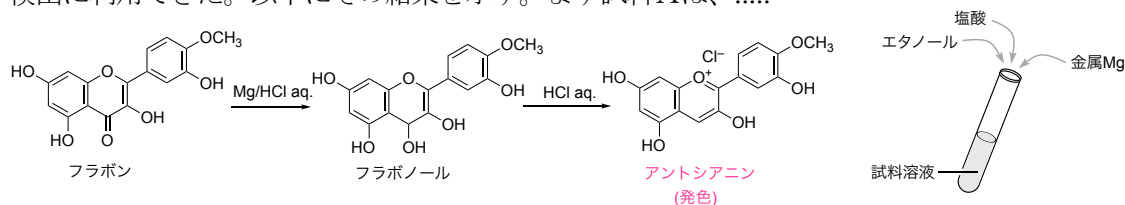
茶の変色実験においては、単に空气中に放置しただけでも変色反応が進行したが、変化の速度はさほど大きくなかった。一方で、茶にアルカリ性水溶液を加えたり、酸素を吹き込んだりすると変色反応が促進された。この結果から、フラボノイドはアルカリ水溶液中で酸化されやすいことが確認できた。また興味深いことに、試料にリンゴやバナナなどの果皮の断片を加えると、変色反応が劇的に進んだ。これは果皮に含まれる酵素が、フェノール部の酸化反応を促進させたためと考えられる。.....

#### ・UV スペクトルおよび質量分析について

なお、変色の進んだ試料は、UV スペクトルにて長波長領域に新たな吸収が複数現れたことから、フラボノイド中のポリフェノール構造が酸化され、共役系の伸張した構造が生じたと考えられる。さらに、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにて溶出時間が短縮されたことから、変色反応によって生じた化合物は、変色前に比べ分子量が大きくなったことが示唆された。実際に@@大学@@教授の指導の下、質量分析を行った結果、変色反応によって分子量が2から数倍大きくなった化合物が複数生成していることが明らかになった。.....

#### ・呈色反応について

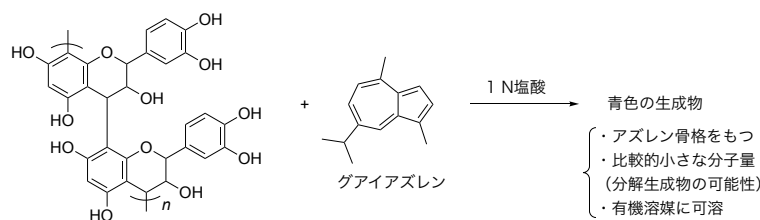
なおフェノールの有無の確認には、塩化鉄  $\text{FeCl}_3$  による呈色反応が極めて有効であった。すなわち.... また、マグネシウム金属  $\text{Mg}$  と塩酸を用いた篠田反応もフラボン構造を有する化合物の検出に利用できた。以下にその結果を示す。まず試料Aは、.....



一方、今回検討したアズレン誘導体を用いた分解呈色反応では、.....

....実際にフラボノイドのオリゴマーが分解した後に、アズレン誘導体と反応したような化合物

が検出できた。生成物はきれいな青色を呈していることから、本反応はフラボノイドオリゴマーのあらたな呈色反応として利用できる可能性がある。文献を調査したところ、このような形式の反応はこれまでに例がなかったことから、本反応で新規の化合物が得られた可能性が高い。



図@ フラボノイドオリゴマーとアズレン誘導体の反応

## 【まとめ】

今回行った一連の実験により、植物中には多くのフラボノイドが含まれていることが確認できた。中でも、@@@の抽出物には、@@@に呈色する成分が多く、であることが分った。

ポリフェノール成分の研究は、健康効果があるとされる植物の薬効成分などを化学的に明らかにするうえで重要である。一般に、変色した茶は鮮度が低いと見なされ敬遠されるが、今回の結果から、変色した茶には、新鮮な茶には含まれない新規の成分が生成していることが明らかになり、それらに有効成分が含まれる可能性が示された。今後、関連する研究をさらに進めることにより、これらの点がより詳細に明らかになると期待される。....

## 【成果発表等】

本研究は、高校の化学部にて他部員（2名）と共同で行った。研究は約1年半かけて行った。茶の成分分析および精製および呈色反応試験については、他の部員と共同で取り組んだ。一方、アズレンを用いた新規呈色反応の開発および精製装置の改良は、私個人が工夫して独自に行った。今回得られた成果は、日本化学会関東支部主催の第@@回化学クラブ研究発表会にて私が代表者として口頭発表し、当発表会の研究奨励賞を受賞することができた。なお、本研究の後半で行った質量分析は上記の発表会後に行ったものである。化学部顧問の助言および引接により、@@大学@@教授にご指導賜る機会を得、MS スペクトル測定を実施することができた。

## 【参考文献】

1. (a) Song, J.-M.; Lee, K.-H.; Seong, B.-L. *Antiviral. Res.* **2005**, *68*, 66–74. (b) Nakayama, M.; Suzuki, K.; Toda, M.; Okubo, S.; Hara, Y.; Shimamura, T. *Antiviral. Res.* **1993**, *21*, 289–299.
2. Hemingway, R. W.; Laks, P. E. *Plant Polyphenols Synthesis, Properties, Significance* New York, pp169–194 (1992) .
3. 村松敬一郎編, シリーズ<食品の科学>茶の科学, 朝倉書店 (1997) .
4. 篠田淳三, 薬学雑誌 **1928**, *48*, 214–220.