

茶カテキン類及び紅茶テアフラビン類の化学的研究

学位論文：博士(農学) 乙103

2 0 0 5 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

柳 瀬 笑 子

目次	
序章	1
第1章 茶カテキン類の大量分離と抗アレルギー性メチル化カテキンの合成	
1-1 茶カテキン類の大量分離法の確立	5
1-2 ジアゾメタンによるカテキン類のメチル化反応	10
1-3 メチル化カテキン類の光安定性	22
第2章 紅茶テアフラビン類の化学	
2-1 これまでの研究経過とテアフラビンの改良合成	27
2-2 酸化剤として o -キノンを使用したベンゾトロポロン環の合成と反応中間体の単離	46
2-3 カテガリンの効率的合成	53
結語	58
実験の部	60
参考文献	91
謝辞	95

序章

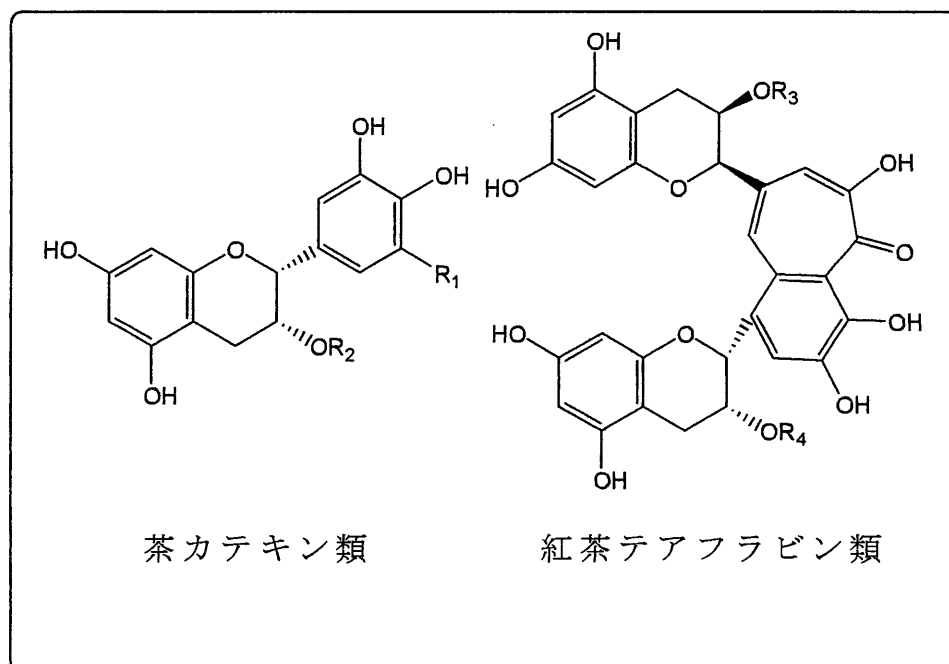
茶は古くから、香りと渋味を楽しむ嗜好品としてだけでなく健康保持に良い飲料として親しまれてきた。近年では、その機能性が再認識されるとともに抗酸化作用、抗がん作用、抗菌・抗ウイルス作用、ラジカルスカベンジング作用、虫歯予防などの生理活性が見出されて注目を集めている(Fig. 1)¹。

茶には、日本で広く親しまれている緑茶の他、烏龍茶や紅茶など緑茶を発酵させることによってできる発酵茶があり、世界中で親しまれている茶飲料の約 8 割は紅茶である。

緑茶中のカテキン類や紅茶中の赤色色素テアフラビン類は、一般にポリフェノールと総称される物質の 1 つである。これらは茶中の主要な構成成分であり、渋味成分として、また機能性成分として重要である。そして、分子内に多数含まれるフェノール性水酸基がその性質を担っている。

茶葉中のカテキン類としては、Fig.2 に示したように Epicatechin (1), Epigallocatechin (2), Epigallocatechin-3-O-gallate (3), Epicatechin-3-O-gallate (4) の 4 種主要成分があるほか、その他の微量成分として約 70 種が知られている^{2,3}。その中で最近では、メチル化カテキン：3"-O-Me-Epigallocatechin-O-gallate (5)⁴ に強い抗アレルギー作用が見出されて注目を集めている⁵。

一方、紅茶中のテアフラビン類は発酵茶特有の成分で緑茶が発酵する際に生成する。ここで発酵とは微生物によるものではなく、茶生葉中に含まれるポリフェノールオキシダーゼの作用によるものであり、カテキン 2 分子がこの酵素によって酸化的に重合する

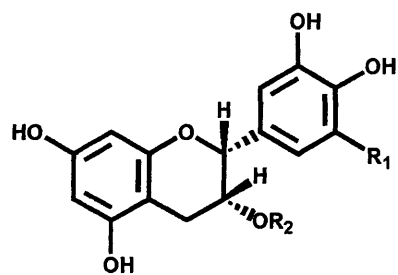


- 抗酸化作用 (Antioxidative activity)
- 消臭作用 (Deodrant activity)
- 抗菌・抗ウイルス作用 (Anti-bacterial activity)
- ラジカルスカベンジング作用 (Radical-scavenger)
- 抗突然変異作用・抗癌作用 (antimutagenic, anticancer activity)
- 歯垢合成酵素阻害作用 (Inhibition of insoluble glucan formation)

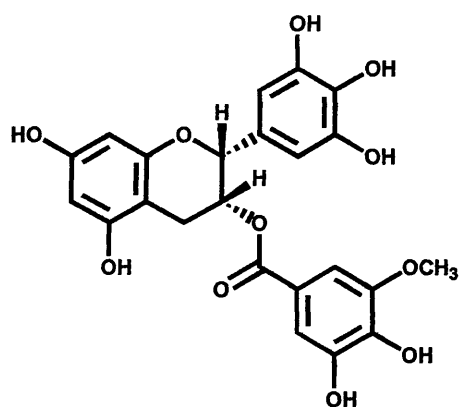
Fig. 1. Major polyphenols of green tea and black tea and its bioactivities.

ことによって生成する。そして、出発物質であるカテキン類の組み合わせによって Theaflavin (6)、Teaflavin 3-*O*-gallate (7), Teaflavin 3'-*O*-gallate (8), Teaflavin 3,3'-*O*-di-gallate (9), の4種類が知られている (Fig.3)^{10, 11}。また、発酵茶にはテアフラビン類よりも、さらに酸化重合が進んだテアルビジン類が含まれている。しかしながら、テアルビジン類は含量が多いにも関わらず、その構造が複雑で取り扱いにくいために、今だ化学構造すら不明である²⁴。

本研究では、カテキン類及びテアフラビン類の化学的性質や反応性を詳細に検討することによって、近年強い抗アレルギー性を示すことで注目されているメチル化カテキン類の合成法を開発すると共に、テアフラビン類についてはその生成機構の解明を行うことでカテキン類からの合成収率の改善を図ることを目的とした。

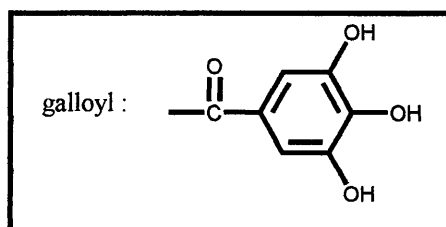
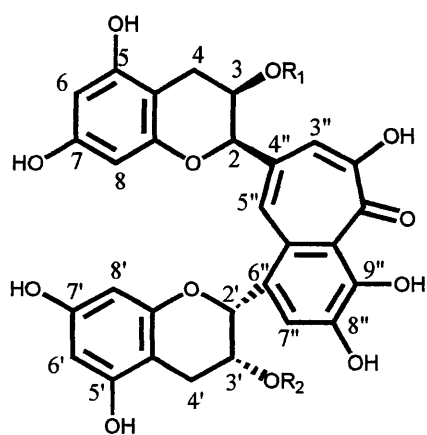


- 1: $R_1=R_2=H$, Epicatechin (EC)
- 2: $R_1=OH$, $R_2=H$, Epigallocatechin (EGC)
- 3: $R_1=OH$, $R_2=galloyl$, Epigallocatechin gallate (EGCg)
- 4: $R_1=H$, $R_2=galloyl$, Epicatechin gallate (ECg)



5: (-)-EGCg-CH₃

Fig. 2. Catechins



- 6: $R_1=R_2=H$, Free Theaflavin
- 7: $R_1=galloyl$, $R_2=H$, Theaflavin 3-*O*-gallate
- 8: $R_1=H$, $R_2=galloyl$, Theaflavin 3'-*O*-gallate
- 9: $R_1=R_2=galloyl$, Theaflavin 3,3'-*O*-digallate

Fig. 3. Theaflavins

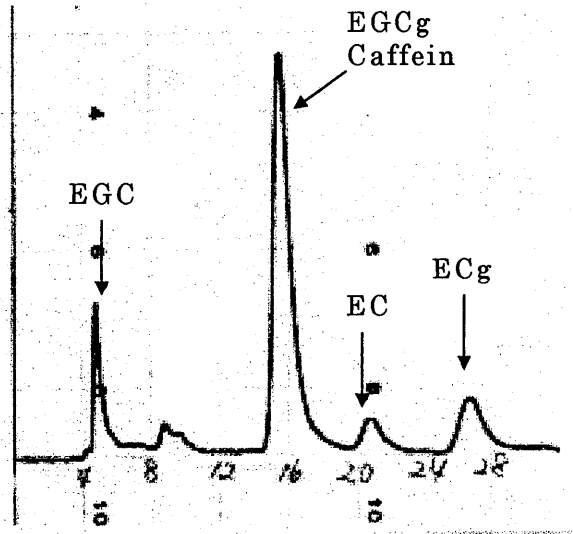
第 1 章 茶カテキン類の大量分離とメチル化反応

1-1 茶カテキン類の大量分離法の確立

茶カテキン類は、乾燥茶葉中に約 10~18%含まれており、EC (1), EGC (2), EGCg (3), ECg (4)がその主要成分である。その中でも EGCg (3)が最も多く全体の 50~60%を占めている。これらカテキン類の化学的反応性の研究を進めるにあたり、それぞれの成分を純粋にそして十分に得る必要がある。しかしながら、これらの成分は、類似した構造を持ち、また多数のフェノール性水酸基を持っている。そのため、反応性に富み、非常に不安定な物質で、その分離は大変困難であった。また、一部市販品も存在するが、このような性質を持つため非常に高価であり、十分に得ることが難しかった。そこでまず、茶カテキン類の大量分離法の確立を行うことにした。

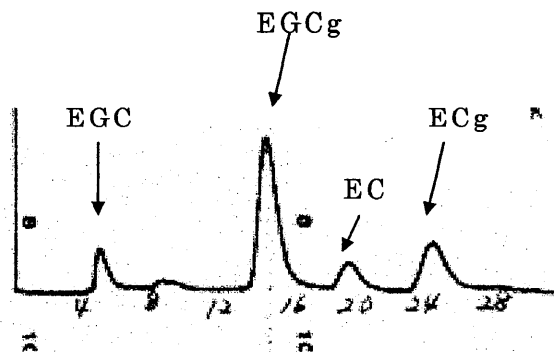
カテキン類の分離法としては、まず始めに HPLC による方法を試みた。材料として、三井農林㈱製のポリフェノン G を用いた。このサンプルは、茶葉を熱湯抽出したものであり、分解が少なく、茶葉中におけるカテキン類とほぼ同様の比で各成分が含まれているという特徴がある。しかし、目的のカテキン類のほか、各種の生体成分やカフェインなども含まれている。そのため、酢酸エチル抽出及び強酸性樹脂(DIAION SK1B-S)による脱カフェインを行うことでカテキン含量を高めたあとに HPLC で分離を行うことにした。このような処理を行ったサンプルの逆相 HPLC 分析結果を Fig. 1-1 に示す。この分析結果から明らかのように、カフェインのピークは全く見られず、またそれぞれの成分は良い分離を示

ポリフェノンG



NB-ODS-9 4.6 mm ϕ \times 250
Flow 1ml/min, Detec. 280nm,
Solv. 25% MeOH, 1% AcOH / H₂O,
Sample 2 μ l (10mg/ml)

脱カフェイン後



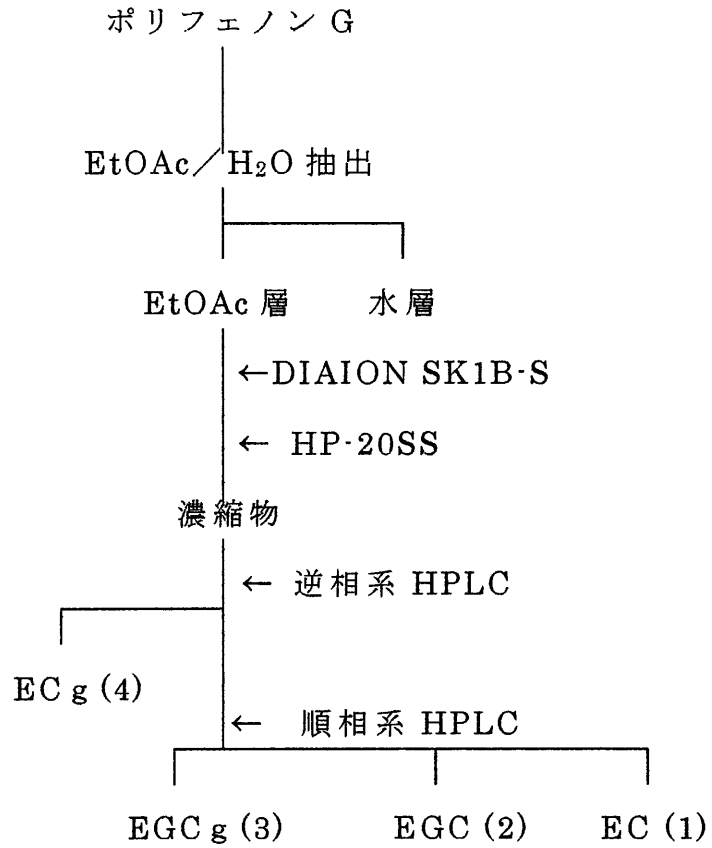
NB-ODS-9 4.6 mm ϕ \times 250
Flow 1ml/min, Detec. 280nm,
Solv. 25% MeOH, 1% AcOH / H₂O,
Sample 2 μ l (6.7mg/ml)

Fig. 1-1. The analysis of tea extract by reversed phase HPLC.

している。そこで、この溶媒(25% CH₃OH, 1% AcOH in H₂O)で分離を行うことにした。なお、この系では、最も良い分離が見られた ECg (4) 及び微量成分の分離を行った。その後、EC (1), EGC (2), EGCg (3)については再度、順相系 HPLC を用いることにより各成分の分離に成功した。この方法では、HPLC を用いるため高純度のサンプルを得ることができた。しかしながら、サンプルの溶解度が悪いため一度に分離できる量が限られており大量化には不向きであった。また、2 種のカラムを用いる必要があるため時間がかかり、一部分解が起こることによって化合物の損失が見られた。そこで次にオープンカラムを用いた大量分離法の確立を目指すことにした(Fig.1-2)。

材料として、三井農林(株)製のポリフェノン 70S を用いた。これは、茶抽出後、脱カフェインとカテキン濃度を高める処理をしたサンプルである。その処理の過程で茶中における各成分の比に対して EC (1)及び EGC (2)が減少しており、相対的に EGCg (3)及び ECg (4)含量が高いという特徴がある。これを水に溶解し、逆相系オープンカラムにのせた。溶出溶媒としては 7% EtOAc/水を用いた。また、カラムを湯で加熱して、その温度を徐々に上げることで各成分を順番に溶出することに成功した。これにより EGCg (3) と ECg (4)はほぼ純粋に得られ、さらに結晶化を行うことで純度を上げることに成功した。また、抗アレルギー作用があるとして注目を集めている微量成分 EGCg-3"-OCH₃ (5)に関してはさらに、逆相系で分離を行うことにより得ることに成功した。この方法では、一度に大量を分離することができるとともに、溶媒はほぼ水であるため安価であり大量化に適した方法と言える。

HPLC による方法



オープンカラム法

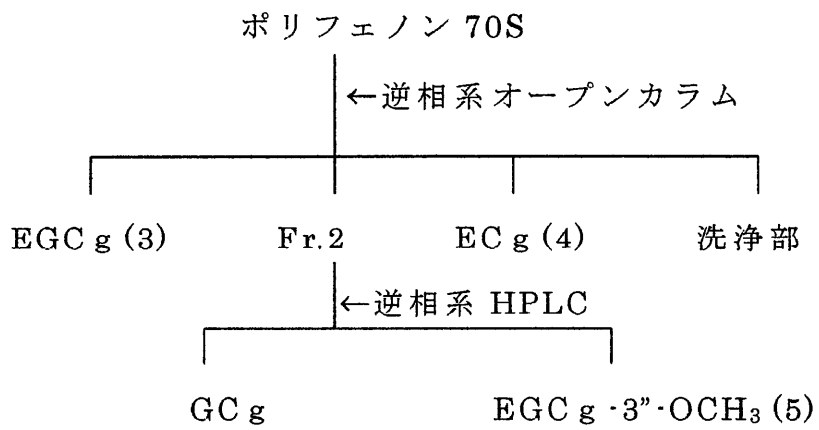


Fig.1-2. Purification of Catechins.

しかしながら、このサンプルは EC (1)と EGC (2)の含有量が少なくこれらを得るためには先に用いたポリフェノン Gを材料として用いた方がよいと言える。

1-2 ジアゾメタンによるカテキン類のメチル化反応

1-1では、主要な4種カテキンの大量分離に成功したのでこれらを用いて次に化学的反応性の検討を行うことにした。

カテキン類は、フラバン骨格に多数のフェノール性水酸基を持った構造をしていて、このフェノール性水酸基が様々な活性に重要であることが知られている。これらの反応性の違いを解明できれば、カテキン類の持つ活性発現機構を知る手がかりになる可能性が期待できる。また、特に抗酸化活性が強いとされているEGCg(3)やECg(4)については各水酸基の保護が活性の強さにどのような影響を及ぼすかを検討することで、どの水酸基が活性発現に重要であるかを知ることができる可能性がある。これについては1.3節で述べる。

カテキン類の化学反応性の検討には、ジアゾメタンによるメチル化を用いた。ジアゾメタンは、中性条件下で反応が可能であり、また反応がきれいの後処理が容易であることから酸・塩基に不安定なカテキン類でも反応が可能である。各フェノール性水酸基の反応性の差を知るためには、すべてがメチル化されるのではなく反応性の高い部位から順番にメチル化される必要がある。ジアゾメタンはガス状の物質であり、通常エーテル溶液として用いる。そのため、一定濃度の試薬を作成することが難しく試薬量の調節による反応コントロールが難しい。そのため、反応温度を低温にすることでコントロールすることにした。

まず始めに、EC(1)について検討した。(1)を5倍量のメタノールに溶解後-50℃に冷却し、同様に冷却した100倍量のジアゾメタンエーテル溶液を添加した。10時間反応後、酢酸を1滴加え反

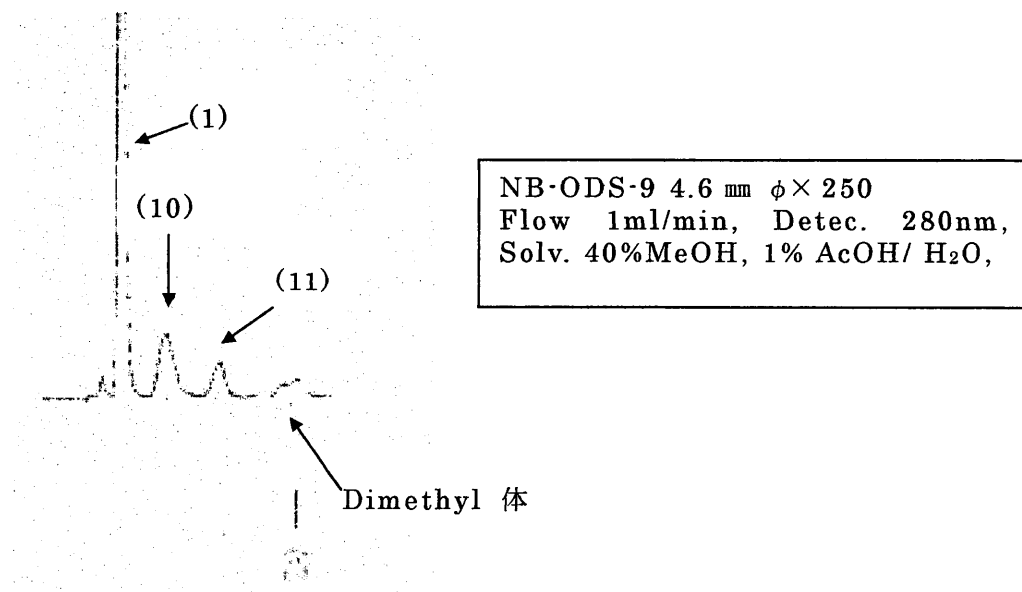
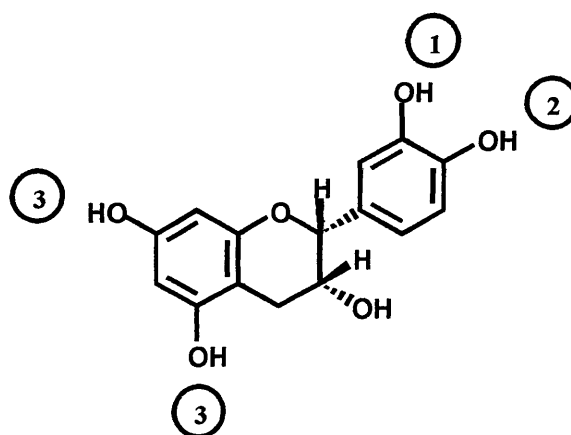
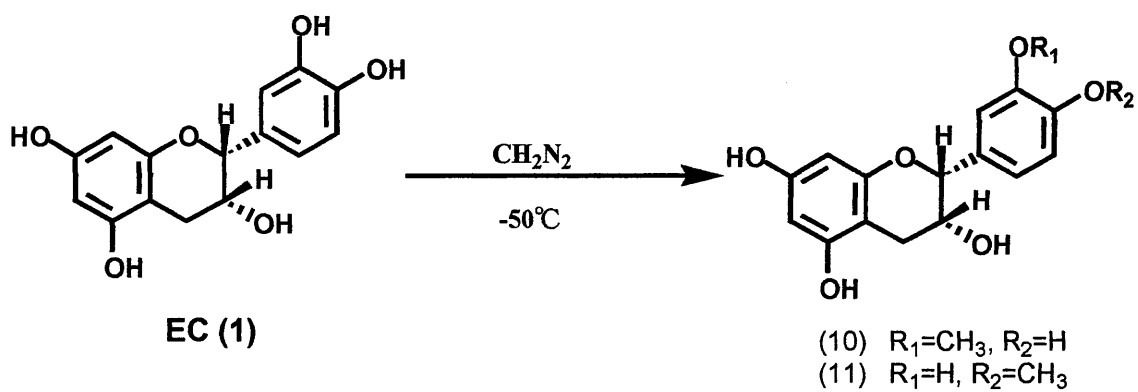
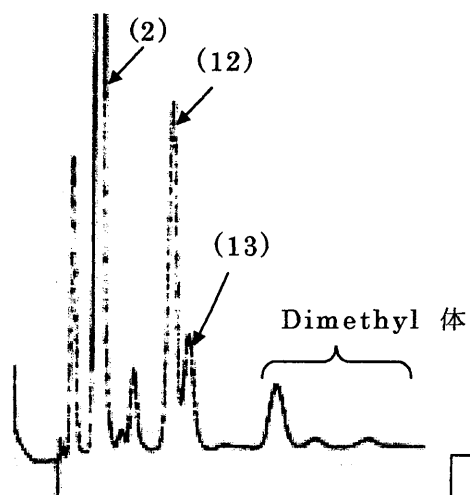
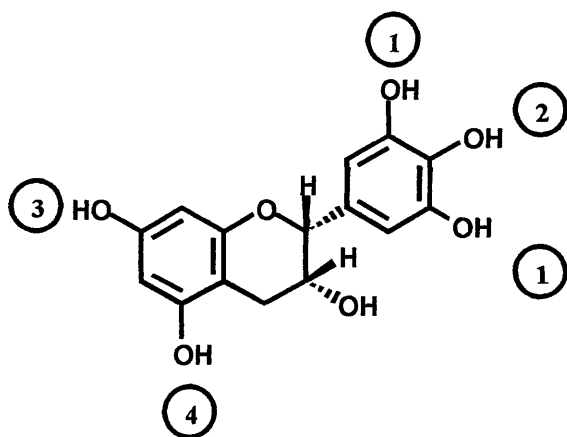
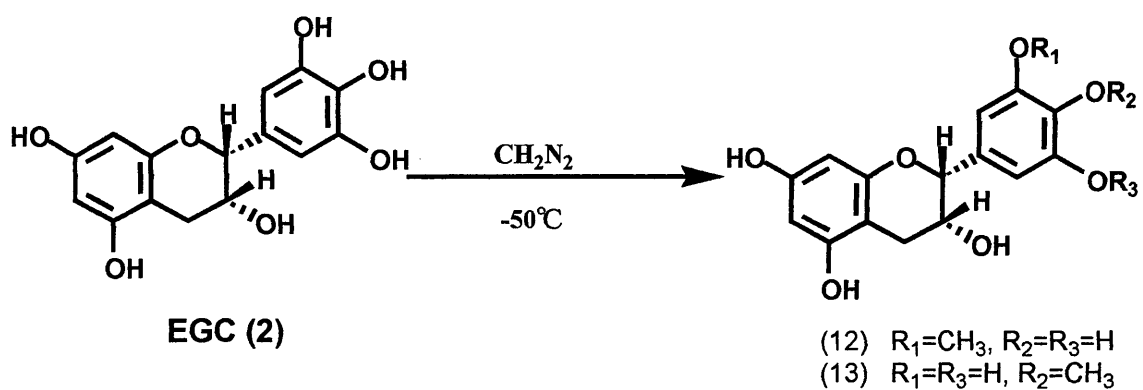


Fig. 1-3. Reactivity of EC (1) with CH_2N_2 .

応を停止し HPLC で分析した。その結果を Fig1-3 に示す。各フラクションは、分取して $^1\text{H-NMR}$ を測定したところそれぞれ B 環の 3 位、4 位の水酸基にメチル基が導入されたものであることが分かった。得られた化合物の量比から、ジアゾメタンによるメチル化反応において反応性は B 環部が高く、3'位 > 4'位であることが分かった。また、次に同様の反応を室温 8 時間の条件で行った。その結果すべてのフェノール性水酸基がメチル化されたテトラメチル体と B 環部がメチル化されたジメチル体の他に、B 環部 2 つと A 環部の 1 つがメチル化されたトリメチル体 2 種が約 1:1 の比で得られた。このことから、A 環部の 5 位及び 7 位には反応性の差があまりないことが分かった。以上の結果より、EC (1) のジアゾメタンメチル化反応では、3'位 > 4'位 > 5 位 \approx 7 位の順であることが分かった。

次に、EGC (2) について検討した。(2) を 5 倍量のメタノールに溶解後 -50°C に冷却し、同様に冷却した 100 倍量のジアゾメタンエーテル溶液を添加した。7 時間反応後、酢酸を 1 滴加え反応を停止し HPLC で分析した。その結果を Fig. 1-4 に示す。各フラクションは、分取して $^1\text{H-NMR}$ を測定したところそれぞれ B 環の 3 位、4 位の水酸基にメチル基が導入されたものであることが分かった。得られた化合物の量比から、ジアゾメタンによるメチル化反応において反応性は(2)の場合においても B 環部が高く、3'位 > 4'位であることが分かった。ここで (2) の場合、(1) に比べ 3'位メチル体と 4'位メチル体の生成比の差が大きかった。このことは EGC (2) の B 環は左右対称な構造をとっており 3'位となりうる水酸基は 2 つあることから確率的に 3'位がメチル化される可能性が高いためであると考えている。また、次に同様の反応を室温 8 時



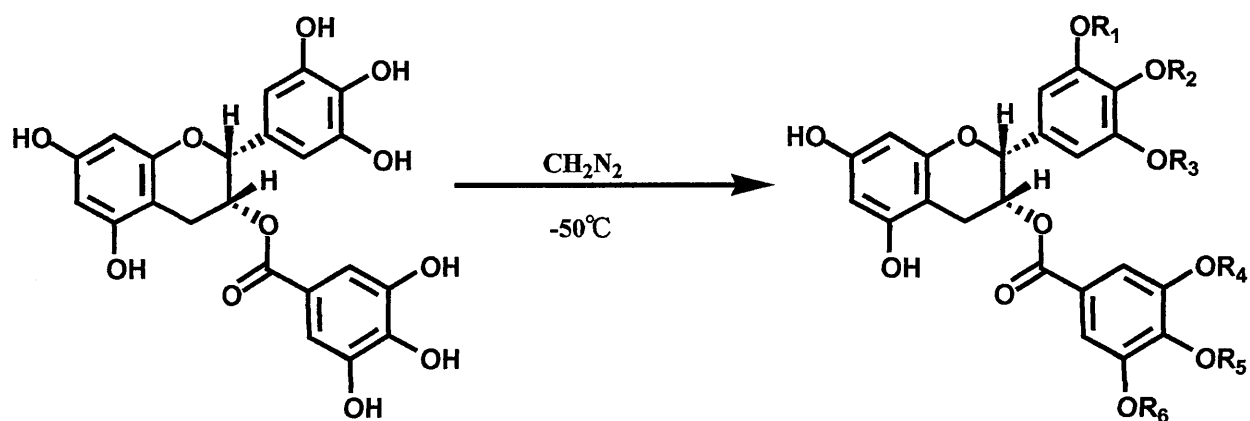
NB-ODS-9 4.6 mm $\phi \times 250$
 Flow 1ml/min, Detec. 280nm,
 Solv. 30%MeOH, 1% AcOH/ H₂O,

Fig. 1-4. Reactivity of EGC (2) with CH₂N₂.

間の条件で行った。その結果、すべてメチル化されたペンタメチル体と B 環部がメチル化されたトリメチル体の他に、B 環部 3 つと A 環部の 1 つがメチル化されたテトラメチル体 2 種が得られた。A 環部の反応性については、ここで得られた B 環部トリメチル体をさらにジアゾメタンで反応させることで生成するテトラメチル体の比を $^1\text{H-NMR}$ で比較することにより、7 位 > 5 位であることが明らかになった。以上の結果より、(2)のジアゾメタンメチル化反応では、3'位 > 4'位 > 7 位 > 5 位の順であることが分かった。

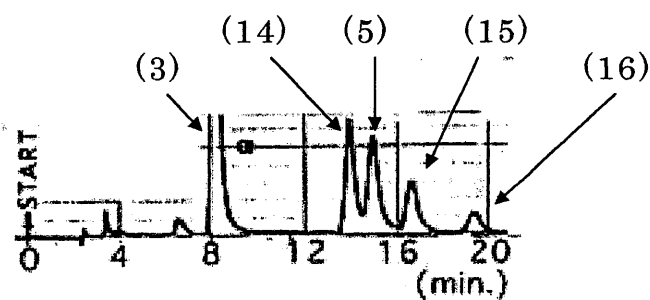
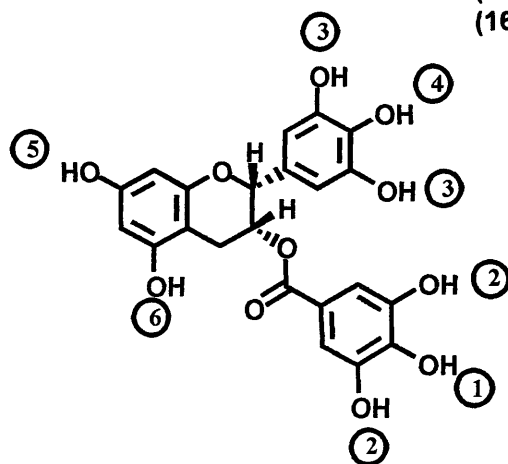
次に EGCg (3)について検討した。(3)を 5 倍量のメタノールに溶解後 -50°C に冷却し、同様に冷却した 100 倍量のジアゾメタンエーテル溶液を添加した。3.5 時間反応後、酢酸を 1 滴加え反応を停止し HPLC で分析した。その結果を Fig. 1-5 に示す。各フラクションは、分取して $^1\text{H-NMR}$ を測定したところ、それぞれガレート基の 3 位、4 位、B 環の 3 位、4 位の水酸基にメチル基が導入されたものであることが分かった。得られた化合物の量比から、ジアゾメタンによるメチル化反応において反応性は、ガレート基 > B 環 > A 環の順であり、4''位 > 3''位 > 3'位 > 4'位であることが分かった。ここで、ガレート基において、先の EGC (2)の B 環部同様 3''位が確率的に多くなると予想したが 4''位の生成量が多かった。このことは、4''位はカルボニル基の p 位に位置し、他の水酸基に比べ酸性度が高く反応性に富むためであると考えている。A 環部の水酸基、すなわち 5 位及び 7 位については、先の EC (1) や EGC (2)同様室温でメチル化を行うことにより 7 位 > 5 位の順であることが分かった。

最後に ECg (4) について検討した。(4)を 5 倍量のメタノールに溶解後 -50°C に冷却し、同様に冷却した 100 倍量のジアゾメタ



EGCg (3)

- (14) $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_6=\text{H}$, $\text{R}_5=\text{CH}_3$
- (5) $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_5=\text{R}_6=\text{H}$, $\text{R}_4=\text{CH}_3$
- (15) $\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_5=\text{R}_6=\text{H}$, $\text{R}_1=\text{CH}_3$
- (16) $\text{R}_1=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_5=\text{R}_6=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{CH}_3$



NB-ODS-9 4.6 mm $\phi \times 250$
 Flow 1ml/min, Detec. 280nm,
 Solv. 25%MeOH, 1% AcOH/ H₂O,

Fig. 1-5. Reactivity of EGCg (3) with CH_2N_2 .

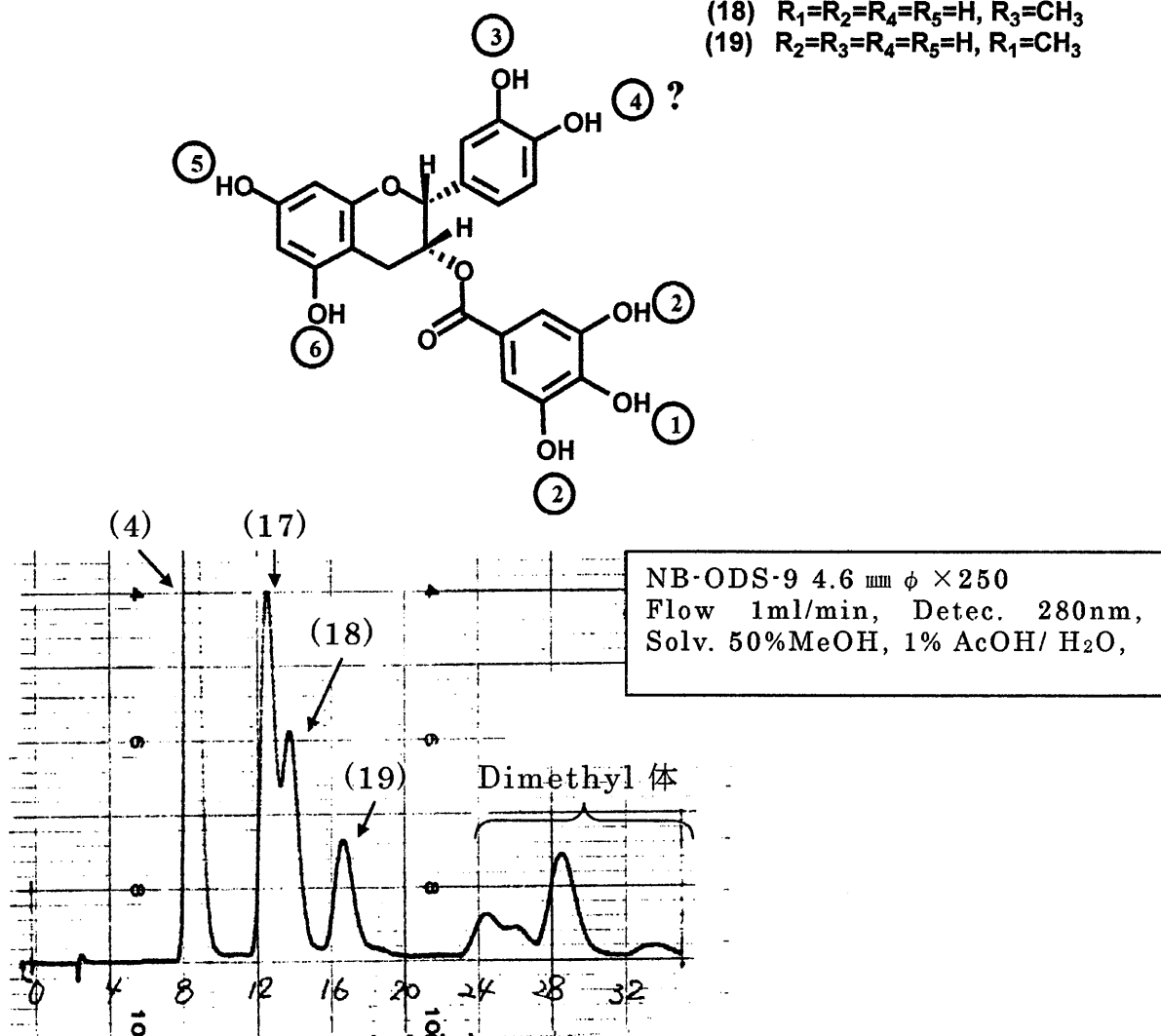
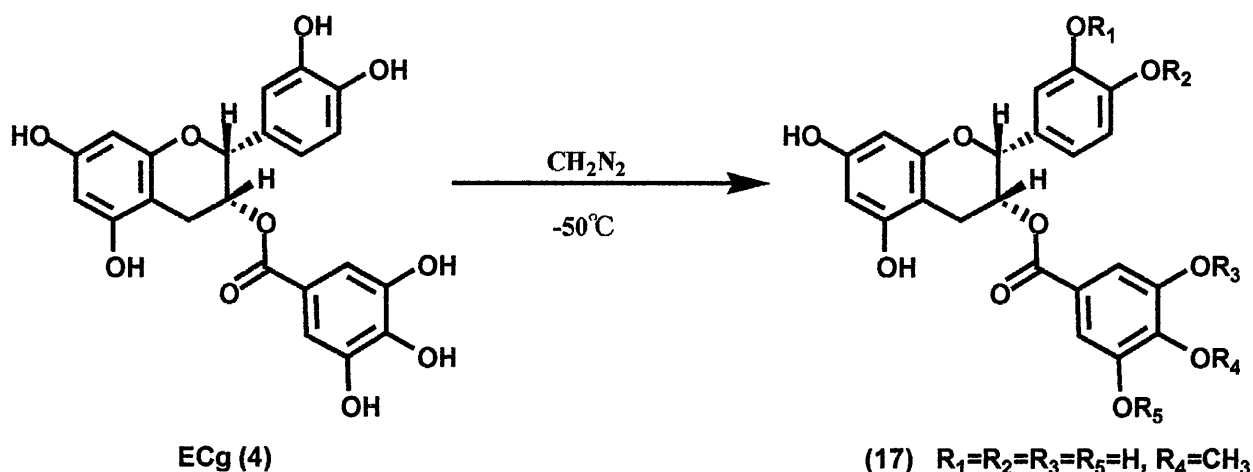


Fig. 1-6. Reactivity of ECg (4) with CH₂N₂.

ンエーテル溶液を添加した。3.5 時間反応後、酢酸を 1 滴加え反応を停止し HPLC で分析した。その結果を Fig. 1-6 に示す。各フラクションは、分取して $^1\text{H-NMR}$ を測定したところそれぞれガレート基の 3 位、4 位、B 環の 3 位の水酸基にメチル基が導入されたものであることが分かった。得られた化合物の量比から、ジアゾメタンによるメチル化反応において反応性は EGCg (3)と同様、ガレート基 > B 環 > A 環の順であり、4"位 > 3"位 > 3'位であることが分かった。しかしながら、B 環の 4 位の水酸基にメチル基が導入されたものに関しては得ることができなかった。A 環についても同様に検討し 7 位 > 5 位の順であることが分かった。

以上の結果より、4 種カテキン類のジアゾメタンにおける反応性は共通してガレート基 > B 環部 > A 環部であった。このことは、ガレート基や B 環部が活性発現に重要であることを示唆している。また、カテキン類の様々な機能性においてガレート基を持つ EGCg (3)や ECg (4) が EC (1)や EGC (2)に比べて極めて高いことと相関があると言える。

天然に存在するメチル体として、EGCg-3"-OCH₃ (5)と ECg-3"-OCH₃ (18)がある^{3,4}。特に EGCg-3"-OCH₃ (5)は強い抗アレルギー性を持つことが知られ注目を集めている⁵。しかし、茶中における含量は非常に少なく十分な量を得ることが難しい。そこで、EGCg (3)あるいは ECg (4)からの人工的な合成法を確立することにした。

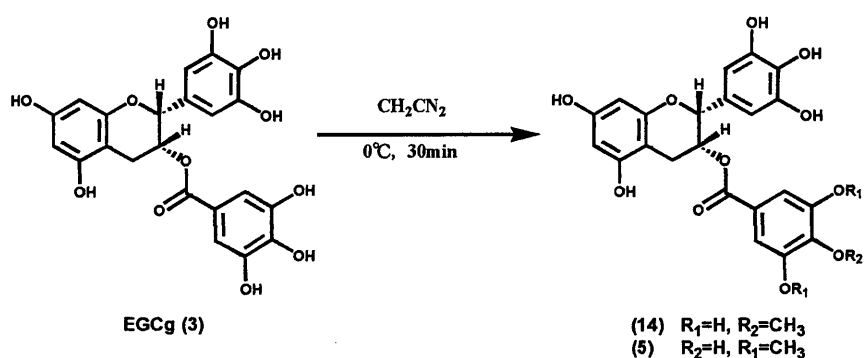
本節において、ジアゾメタンによるメチル化反応を検討してきた。しかしながら、これまでの方法ではガレート基の 4"位が優先的にメチル化され 3"位メチル体は少なかった。そこで、反応条件

をさらに検討して 3"位メチル体を効率的に合成する方法を検討することにした。反応をコントロールする手法としては、これまで述べてきた①試薬量の制限、②反応温度を下げるという2つの他に③溶媒の極性を変えるという方法がある。通常ジアゾメタンのメチル化反応では、メタノール中で行われることが多い。これは、原料がメタノールに溶解しやすい極性の高いものが多く、また反応が早く完結するためである。しかしながら、メタノール中に行うと反応が早く進みコントロールが難しいこと、またジアゾメタンの一部がメタノール中で分解するため過剰に試薬が必要であると言う欠点があった。

そこで、極性がメタノールより低く、原料もジアゾメタン/エーテル溶液も溶解可能な THF とジオキサンを試みた。Table. 1-1 及び 1-2 は、モノメチル体が約 50%生成した際の 4"位メチル体及び 3"位メチル体の生成比を示した。

表から明らかのように、メタノール中では、4"位メチル体が多かったのに対し、THF やジオキサン中に行うと 1:1 あるいはむしろ 3"位メチル体が多くなることが分かった。特に、EGCg (3)では THF 中において、ECg (4) ではジオキサン中において 3"位メチル体が 4"位メチル体の約 1.5 倍となることが分かった。また、溶媒を THF やジオキサンのような非プロトン性溶媒としたことで反応は著しく遅くなり、反応温度を -50℃ から 0℃ まで上げることができた。また、ジアゾメタンの分解が見られないため試薬の量も節約でき、この方法は大量化に適した方法だと言える。なお、Fig.1-7 に緑茶抽出物由来と合成品の EGCg-3"-OCH₃ (5) の ¹H-NMR を示した。合成品の ¹H-NMR は天然物由来品と完全に一致しており、また純度もよいと言える。

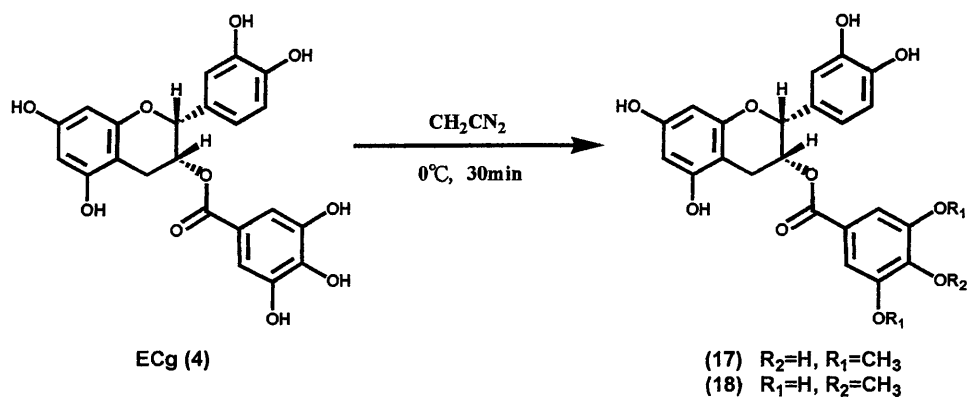
Table 1-1. The effect of solvent (EGCg).



溶媒	CH_2N_2 (エーテル溶液)	4''-OMe (14)	3''-OMe (5)
CH_3OH 1ml	1ml	1.2	1
THF 1ml Et_2O 0.8ml*	0.2ml	2	3
Dioxane 1ml Et_2O 0.8ml*	0.2ml	1	1.2

*反応液中の Et_2O を 1ml とするために添加した。

Table 1-2. The effect of solvent (ECg).



溶媒	CH_2N_2 (エーテル溶液)	4"-OMe (18)	3"-OMe (17)
CH_3OH 1ml	1ml	4	1
THF 1ml Et_2O 0.8ml*	0.2ml	1	1
Dioxane 1ml Et_2O 0.8ml*	0.2ml	2	3

*反応液中の Et_2O を 1ml とするために添加した。

1-3 メチル化カテキン類の光安定性

食品を変質させたり劣化させたりする原因として、微生物による腐敗が良く知られている。しかし、光や酸素が存在するところに食品を長時間保存しておくことで起こる食品の酸化も食品衛生上、非常に重要な問題である。多くの食品は、酸化によってその風味や色の劣化が起こり、栄養価の低下の原因にもなる。これは、食品成分が光酸化によって変化するためである。これらを防ぐために加工食品の多くには酸化防止剤が添加されている。天然由来の酸化防止剤としてよく用いられるのが α -トコフェロール(ビタミン E)やアスコルビン酸(ビタミン C)である。また、合成の酸化防止剤としては、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) やブチルヒドロキシアニソール (BHA) が知られている。

茶カテキン類も同様に強い光酸化抑制作用を持つことが知られている。これらは、光酸化の原因となる活性酸素を捕捉し自分自身が分解することで食品成分の変質を防ぐ。カテキン類は、その分子内に多くのフェノール性水酸基を持っており、これが活性に関与することは必至である。しかし、どのような機構でこのような活性を示すのかは明らかにされていない。本節では、特に活性が強いとされている EGCg (3)及び ECg (4)について、多数存在するフェノール性水酸基のどれが活性発現に重要かを明らかにすることにした。

サンプルとして、1-2節で作成した各種モノメチル誘導体を使用した。光酸化抑制効果を示すには、光を当てることによってこれらの化合物が分解する必要があるため、フェノール性水酸基をメチル化することによって、化合物が安定になれば、その化合物の光酸化抑制作用は弱くなったと考えられる。そして、その部

位の水酸基は光酸化抑制作用に必要であったと言える。

実験は、以下のように行った。EGCg (3)とそのメチル体4種 (5、14、15、16) を1:1:1:1の比で混合し、20ppmの水溶液を作成した。これを10mlの三角フラスコに2ml入れ Fig.1-8 のようにして光を照射し、各成分の量の経時的变化を HPLC で追跡した。ここで光源として100Wのシリカランプを用い、電球の熱によってサンプルが分解するのを防ぐため水冷した。また、ECg (4) とそのメチル体3種(17, 18, 19)に関しても同様に行った。

EGCg (3)とそのメチル体4種 (5、14、15、16) の結果を Table. 1-3 に示した。表から明らかのように、ガレート部をメチル化した3''-メチル体(5)、4''-メチル体(14)はEGCg (3)とほぼ同じ速度で分解するのに対し、B環部をメチル化した3'-メチル体(15)、4'-メチル体(16)はEGCg (3)と比べて分解が遅く約10倍安定であった。このことから、EGCg (3)の光酸化抑制効果には、B環部の水酸基が重要であることが分かった。

次に、ECg (4) とそのメチル体3種(17, 18, 19)の結果を Table. 1-4 に示した。ECg の場合、EGCg ほどの差は見られなかったが、ガレート部をメチル化した3''-メチル体(18)、4''-メチル体(17)及びB環部をメチル化した3'-メチル体(19)はどれもECg (4) と比べ分解速度が緩やかであった。このことから、ECg (4) の光酸化抑制効果には、B環部の水酸基だけでなくガレート基の水酸基も重要であることが分かった。

以上の結果より、光酸化抑制作用にはEGCgにおいてはB環部が、ECgにおいてはB環部とガレート基が重要であることが分か

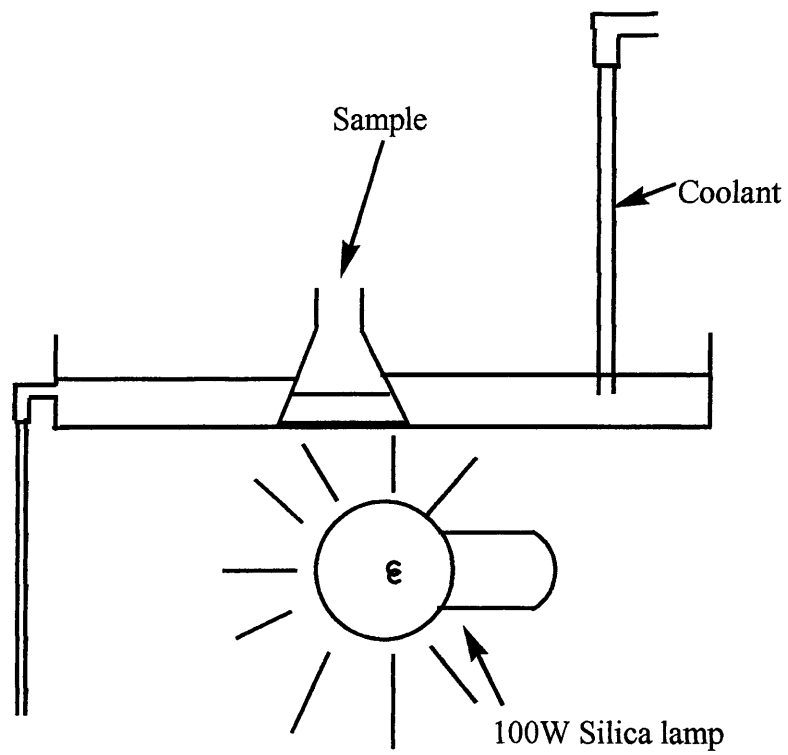


Fig. 1-8. The method of experiment for Photo-Sensibility.

Table 1-3. The Photo-Sensibility of EGCg(3) and its *O*-methyl derivatives (5,14,15,16).

Time (hr)	EGCg (3)	3'-OCH ₃ (15)	4'-OCH ₃ (16)	3''-OCH ₃ (5)	4''-OCH ₃ (14)
0	100	100	100	100	100
4	85	100	100	75	95
8	74	94	93	76	82
22	41	88	83	38	45

Sample = 1:1:1:1, Condition = 2ml of 20ppm in H₂O, Solution was put into the 10ml Erlenmeyer flask.

Table 1-4. The Photo-Sensibility of ECg(4) and its *O*-methyl derivatives (17,18,19).

Time (hr)	ECg (4)	3'-OCH ₃ (19)	3''-OCH ₃ (18)	4''-OCH ₃ (17)
0	100	100	100	100
1	76	87	87	88
2	72	83	80	81
4	59	75	73	76

Sample = 1:1:1:1, Condition = 2ml of 20ppm in H₂O, Solution was put into the 10ml Erlenmeyer flask.

った。この EGCg と ECg の違いは次のように考えている。EGCg のように B 環部に水酸基を 3 つ持つガロタイプのは、ガレート基より B 環部の光分解抑制効果に対する寄与が大きいため B 環部がメチル化されるとその効果は大きく、化合物は約 10 倍安定となる。一方 ECg のように B 環部がガロタイプでない場合は、B 環部とガレート基の光分解抑制効果に対する寄与の差が少ないため B 環部メチル体とガレート基メチル体の安定性に差があまり見られなかったと言える。この違いは、一般的に様々な機能性が EGCg の方が ECg より強いこと、またガレート基を持たない ECg が比較的安定であることに関与していると考えている。

第2章 紅茶テアフラビン類の化学

2-1 これまでの研究経過とテアフラビンの改良合成法

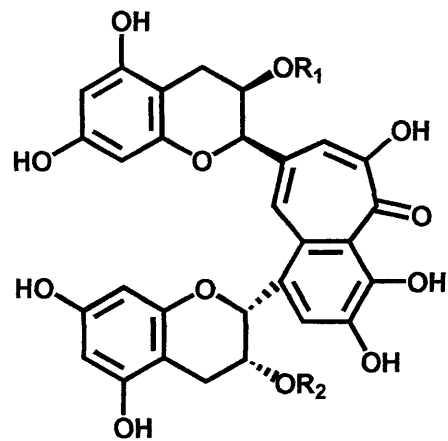
紅茶特有の赤色色素は、その製造過程で葉に含まれるカテキン類がポリフェノールオキシダーゼで酸化的に縮合することによって生成する。この色素に関する研究は、1950年代後半に紅茶研究の先駆者であるイギリスの E. A. H. Roberts によって行われたのが始まりである⁶⁻⁹。Roberts は、緑茶カテキンを茶葉粗酵素で処理しペーパークロマトグラフィーを用いて詳細な研究を行っている。また、紅茶色素をテアフラビン類とテアルビジン類の大きく2つに分類した。

テアフラビン類に関する研究は、これまで多くの研究者によってなされてきた。構造は1962年 Roberts により初めて報告されているが⁹、その後1964年に滝野らによって訂正されている¹⁰。また、その立体構造については Olls らによって決定された¹¹。その構造はカテキン類の2量体で、カテキン類のB環部が酸化的に縮合した6員環—7員環からなるベンゾトロポロン骨格を持つ。また、出発物質であるカテキン類の組み合わせにより、Free Theaflavin (6)、2種の Theaflavin mono-gallate (7)、(8)、Theaflavin di-gallate (9)の4種が知られている(Fig. 2-1)。

テアフラビン類の共通母核であるベンゾトロポロン骨格の構築法については、テアフラビンの構造決定以前から興味を持たれており、古くは1869年までさかのぼる¹²。その後、1930年 T.W.Evans らは Purpurogallin (23)を合成し¹³、また1954年三島らはよりテアフラビン骨格に近いベンゾトロポロン環を Catechol (24)と Pyrogallol (21)から合成している¹⁴。これらは酸

Tea Catechins

Oxid.



EC (1)

Free Theaflavin (6)

$R_1=R_2=H$

EGC (2)

Theaflavin 3-*O*-gallate (7)

$R_1=\text{gallate}, R_2=H$

EGCg (3)

Theaflavin 3'-*O*-gallate (8)

$R_1=H, R_2=\text{gallate}$

ECg (4)

Theaflavin 3,3'-*di-O*-gallate (9)

$R_1=R_2=\text{gallate}$

Fig. 2-1. Theaflavins.

化剤として NaIO_3 を用いた方法である。また、滝野らは 1964 年に、酸化剤として $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ を使用したベンゾトロポロン及びその誘導体の合成を行っている¹⁵。

また、テアフラビン類の合成は 1963 年に滝野らによって初めて行われており、その方法はカテキン類を紅茶葉中の酸化酵素によって酸化するという方法であった¹⁶。さらに、滝野らは酸化剤として $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ を使用した合成に成功した^{17,18}。また、1973 年 P. D. Collier らは滝野らの方法を改良して主要テアフラビン類 4 種の詳細な合成法を報告している¹⁹ (Fig. 2-2)。

ベンゾトロポロン環の生成機構に関する研究は 1957 年 J. C. Salfeld²⁰、1959 年 L. Horner らの Purpurogallin (23) に関する研究²¹ が知られている。また 1964 年滝野らはテアフラビン類の生成機構を提案している²²。しかしながら、これらすべては Catechol 部と Pyrogallol 部が両方酸化されて、*o*-キノンとなった後に縮合するという機構で現在まではこれが定説²³となってきた。

一方テアルビジン類は、紅茶中に約 10~15% 含まれているにも関わらず溶解性が悪く取扱いが難しいことから、まだあまり解明がなされていない。しかし、その構造は多数のカテキン類が複雑に結合したポリマーであると予想されている²⁴。

テアルビジンもテアフラビン同様、酸化重合生成物であることから、私たちはテアフラビン類の化学をより詳細に研究することがテアルビジン類の解明への近道であると考えている。そこで、当研究グループでは、テアフラビン類の化学的解明を目標に研究を行ってきた。

テアフラビン類はカテキンと同様不安定であり、またその含量

Theaflavin の合成

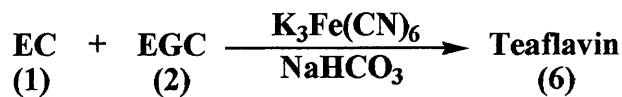
1963 年 滝野 慶則ら

Tea Oxidase による Theaflavin の合成



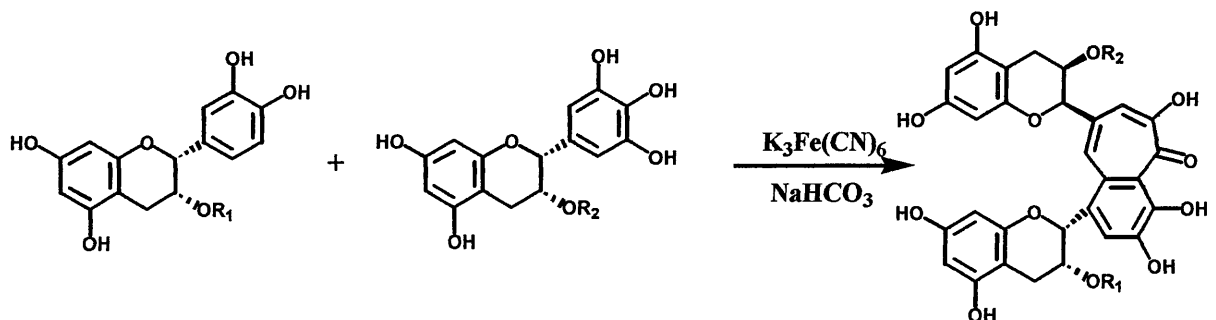
1964 年 滝野 慶則ら

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{NaHCO}_3$ による Theaflavin 及び類縁体の合成



1973 年 P. D. Collier *et al.*

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{NaHCO}_3$ による 4 種 Theaflavin 及び類縁体の合成



R ₁	R ₂	Theaflavins	Yield(%)
H	H	Free theaflavin (6)	18.8
H	G	Theaflavin 3- <i>o</i> -gallate (7)	11.9
G	H	Theaflavin 3'- <i>o</i> -gallate (8)	7.2
G	G	Theaflavin 3,3'- <i>di-o</i> -gallate (9)	8.1

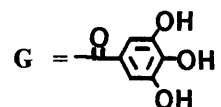


Fig.2-2. Synthesis of Theaflavins.

が紅茶葉中に 0.5~1% と低いため、分離法に関する報告は少ない。しかしながら、これらの化学的性質を詳細に検討するためには、純粋な化合物の入手が必須であった。そこで当研究グループでは、まずこれらの成分の大量分離法の確立を試みた。

材料として紅茶熱湯抽出物 500 g を用いて、Fig.2-3 に示したように数段階を経て、Free Theaflavin (6) を 1.6 g、Theaflavin mono-gallate (7, 8) の 2 種を混合物として 2.3 g、Theaflavin 3,3'-digallate (9) を約 1 g 得ることに成功した。なお、(7), (8) の 2 種に関してはさらに HPLC を用いることによって分離を行った。しかしながら、テアフラビン類は含量が少なく、このように段階数が多いことからこれ以上のスケールでの分離は困難であった。1-1 章で述べたように、当研究グループでは、茶カテキン類の大量分離に成功している。そこで、これを原料にして次にテアフラビン類の人工的な合成を試みることにした。

テアフラビン類の合成法としては、先にも述べたように 1964 年の $K_3Fe(CN)_6/NaHCO_3$ を用いた滝野らの方法^{17,18} が一般的である。当研究グループでもこの方法にならって追試、さらに様々な改良を試みた。その結果、最もシンプルな構造をもち収率も良い Free Theaflavin (6) においては 52% と 2 倍以上まで改善することに成功した。しかし、その他のテアフラビン類、特にもっとも収率の悪い Theaflavin 3,3'-digallate (9) においては 8% と全く改善が見られなかった。

このように、テアフラビン類の合成収率改善のためにさまざまな検討を行ってきたが、テアフラビン類 4 種どれにおいてもこれ以上の改善はみられず、もっと抜本的な改良が必要であると示唆

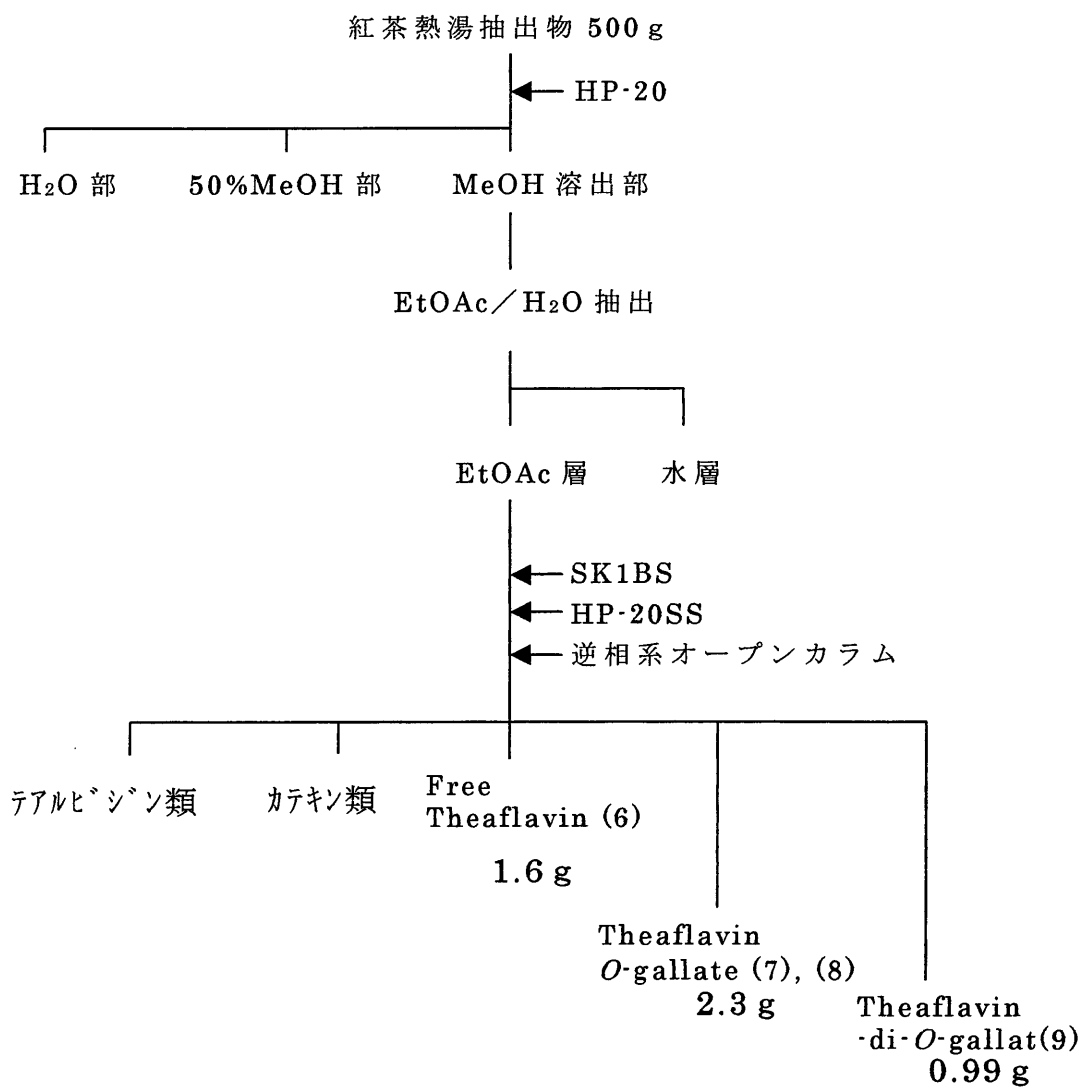


Fig.2-3. Purification of Theaflavins.

Takino, Y. et al., Can. J. Chem., 45, 1949, (1967).

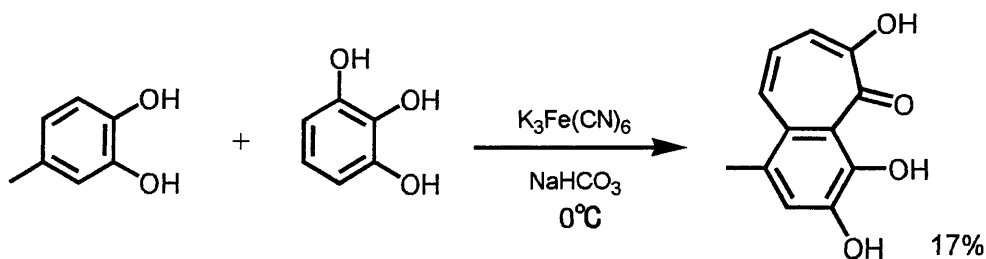


Fig. 2-4. Synthesis of 6-Methyl-8,9-dihydrobenzotropolone (22).

された。そこで、テアフラビン類の合成収率の改善を最終目的として、まずその生成機構の解明を目的に研究を進めることにした。

テアフラビン類は、B環部が Catechol タイプと Pyrogallol タイプのカテキンから生成されるが、これらは非常に高価である。そのため、テアフラビン類の生成機構を検討するにあたり、そのモデル反応として Catechol と Pyrogallol からテアフラビン類の共通母核であるベンゾトロポロン環の合成を検討することにした。

ベンゾトロポロン骨格の構築法については、テアフラビンの構造決定以前から興味を持たれており、さまざまな研究者がその合成を行っているが¹²⁻¹⁴、現在ではテアフラビン類の合成と同様、酸化剤としてフェリシアン化カリウム・ $K_3Fe(CN)_6$ を用いた方法が一般的である。1967年滝野らは、4-Methylcatechol (20)と Pyrogallol (21)の水溶液に0℃で $K_3Fe(CN)_6$ と $NaHCO_3$ の水溶液を添加する方法で、生成する 6-Methyl-8,9-dihydrobenzotropolone (22)の合成を報告しているがその収率は、粗結晶で44%、再結晶後でわずか17%であった¹⁵ (Fig. 2-4)。これは、副生成物である Purpurogallin (23)が生成するのが主な原因と考えられた。6-Methyl-8,9-dihydrobenzotropolone (22)は 4-Methylcatechol (20)と Pyrogallol (21)から生成するのに対し、2分子の(21)が結合すると(23)が生成する。4-Methylcatechol (20)と Pyrogallol (21)の酸化を比較した場合、フェノール性水酸基を2つ持つ4-Methylcatechol (20)よりも3つ持つ Pyrogallol (21)の方が高い酸化電位を持つため酸化されやすいと考えられる。そのため、Pyrogallol (21)と 4-Methylcatechol (20)を共存させると

Pyrogallol (21)が先に酸化されて Purpurogallin (23)が生成してしまうのではないかと予想された。

実際のテアフラビン類においては、 Purpurogallin (23)生成に必要な Pyrogallol の 5 位はエーテル環との結合に使用されているため Purpurogallin タイプの化合物は、構造上生成し得ない。しかし、モデル反応の場合と同様に Pyrogallol タイプのカテキン同士の反応が起こり別の副生成物が生成している可能性がある。そして、その生成を抑制できればテアフラビン類の合成を改良し収率を改善できるのではないかと期待し、Pyrogallol (21)と Catechol (24)から 8,9-Dihydrobenzotropolone (25)を合成する反応を検討した。

Purpurogallin (23)の生成を抑制するためには Catechol (24)の酸化を優先させる必要がある。K₃Fe(CN)₆水溶液に対し Catechol (24)を先に添加して酸化し、その後 Pyrogallol (21)を添加する方法を試みた。その結果、Purpurogallin (23)の生成はほとんどみられず、8,9-Dihydrobenzotropolone (25)の収率が改善する傾向がみられた。

そこで、Catechol (24)と Pyrogallol (21)を添加する間隔を詳細に検討して、Purpurogallin (23)の生成を抑制し 8,9-Dihydrobenzotropolone (25)の収率が最もよくなる最適時間(t)を決定することにした。その方法および結果は Fig. 2-5 に示したとおりである。

ここで時間 t (sec) は Catechol (24)添加後 Pyrogallol (21)を添加するまでの時間を表しており、t=0 の時が従来の方法である Catechol (24)と Pyrogallol (21)を同時に添加した場合である。

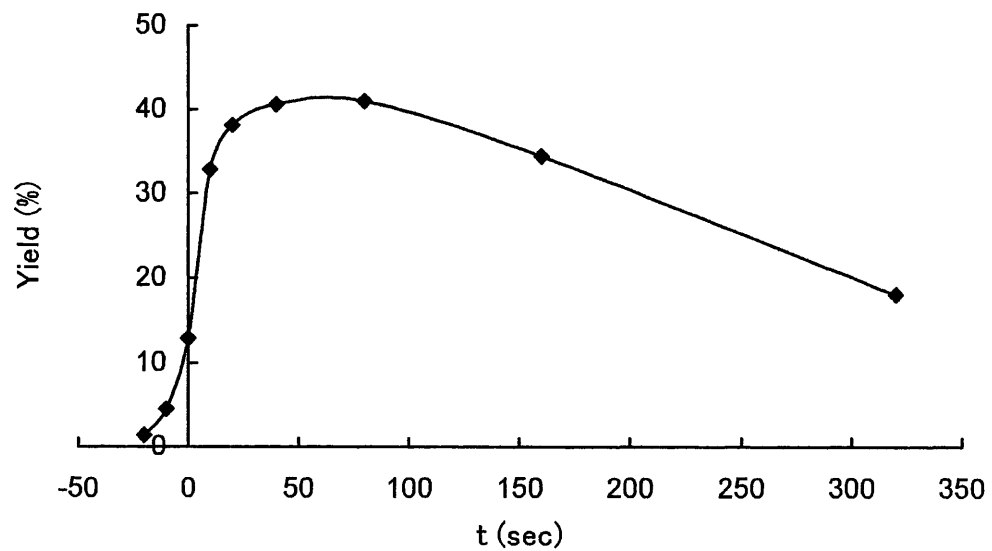
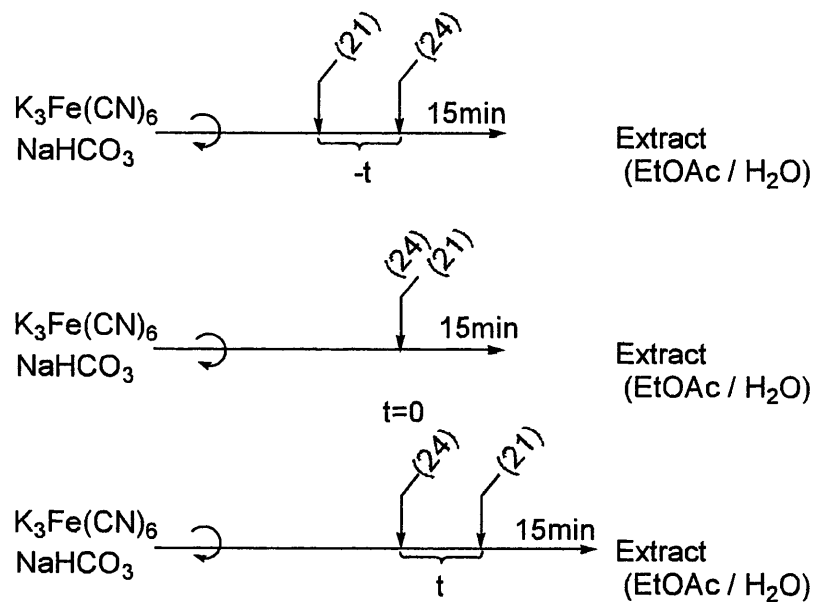
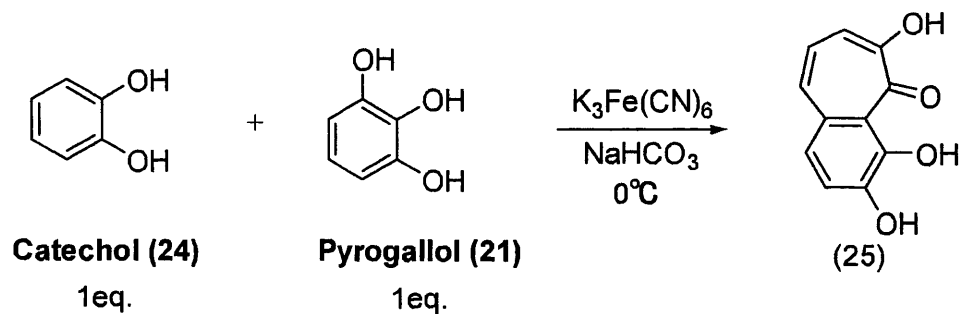


Fig. 2-5. Evidence of formation mechanism of Benzotrololone I .

t=0 の時の収率が約 13%であったのに対し、特に t=60 では約 3 倍の 40%となり、以後なだらかに減少することが分かった。この t=60 以上の場合における収率の悪化は、Catechol (24)の酸化生成物(o-キノン)が不安定であり分解するためであると考えている。また、逆に Pyrogallol (21)を先に添加すると反応は著しく抑制されることが分かった。これは、酸化されやすい Pyrogallol (21)を先に添加することによって、Purpurogallin (23)の生成あるいはさらに酸化がすすんだ酸化重合体の生成が促進されたためであるとと考えている。

この結果を利用し、各種の 8,9-Dihydrobenzotropolone 類縁体の合成を試みたところ、どの化合物でも収率の改善がみられ、特に Catechol 類縁体を 3 当量用いた場合には、70%以上の収率を得ることに成功した。

このようにモデル反応である 8,9-Dihydrobenzotropolone (25) 合成において大幅な収率の改善に成功したため、同様の部分構造を持つ Theaflavin 類においても、この手法を利用することで収率が改善するのではないかと期待した。そこで、構造がシンプルでこれまでの改良合成で最も収率改善が見られた Free Theaflavin (6)について検討した。

モデル反応の場合と同様に、EC (1)添加後さらに 60 秒間後に EGC (2)を添加したところ、予想に反して収率の低下が見られた。そこで、添加する間隔について様々な条件を検討した結果、t=0 すなわち従来の方法である EC (1)と EGC (2)を同時に添加した場合が最も収率がよいことが分かった。このモデル反応とは異なる結果については次の 3つの理由が考えられる。1つ目は、EC (1)

の酸化生成物 (o-キノン) がモデル反応の場合と比べて不安定である可能性である。そのため生成してすぐに EGC (2) と縮合しないと分解反応が進行する。2つ目は、カテキン類には A 環部があり、フェノール性水酸基が存在するためそちらも $K_3Fe(CN)_6$ によって酸化を受けて様々な副反応が進行する可能性である。3つ目は、A 環部のフェノール性水酸基が生成した o-キノンと反応する可能性があるということである。なお、A 環部フェノール性水酸基の影響については、これを適切な保護基で保護することによって改善できる可能性があると考えている。

ベンゾトロポロン環の生成機構に関する研究は 1957 年 J. C. Salfeld²⁰、1959 年 L. Horner らの Purpurogallin に関する研究²¹ が知られている。また、テアフラビン類の生成機構は、1964 年に滝野らによって提案されている²² ほか、Fig. 2-6 に示したように多くの報告がなされている²³。しかし、これらはいずれもその開始段階が、Catechol 部と Pyrogallol 部が酸化されて o-キノンが生成しそれ同士がカップリングする (①) というラジカル的な機構を推定しておりこれが現在定説となっている。しかしながら、これに対する明確な証明はなされていない。

Catechol (24) と Pyrogallol (21) のカップリングは、これまで定説となっているものの他に片方のみが o-キノン型となり Hydroquinone とカップリングする、すなわち Catechol (24) が o-キノンとなり Pyrogallol (21) 自身とカップリングする (②)、あるいは Pyrogallol (21) が o-キノンとなり Catechol (24) 自身とカップリングする (③)、という 2 つの可能性がある (Fig. 2-7)。

しかしながら、Fig. 2-5 の結果、つまり収率が $t = 0$ の場合よ

Benzotoropolone 生成機構

1957年 J. C. Salfeld

Purpurogallin の生成

1959年 L. Horner *et al.*

Purpurogallin の生成

1964年 滝野 慶則ら

$K_3Fe(CN)_6 / NaHCO_3$ による Theaflavin 生成

2002年 河野 功ら

Polyphenol Oxidase による Theaflavin 生成

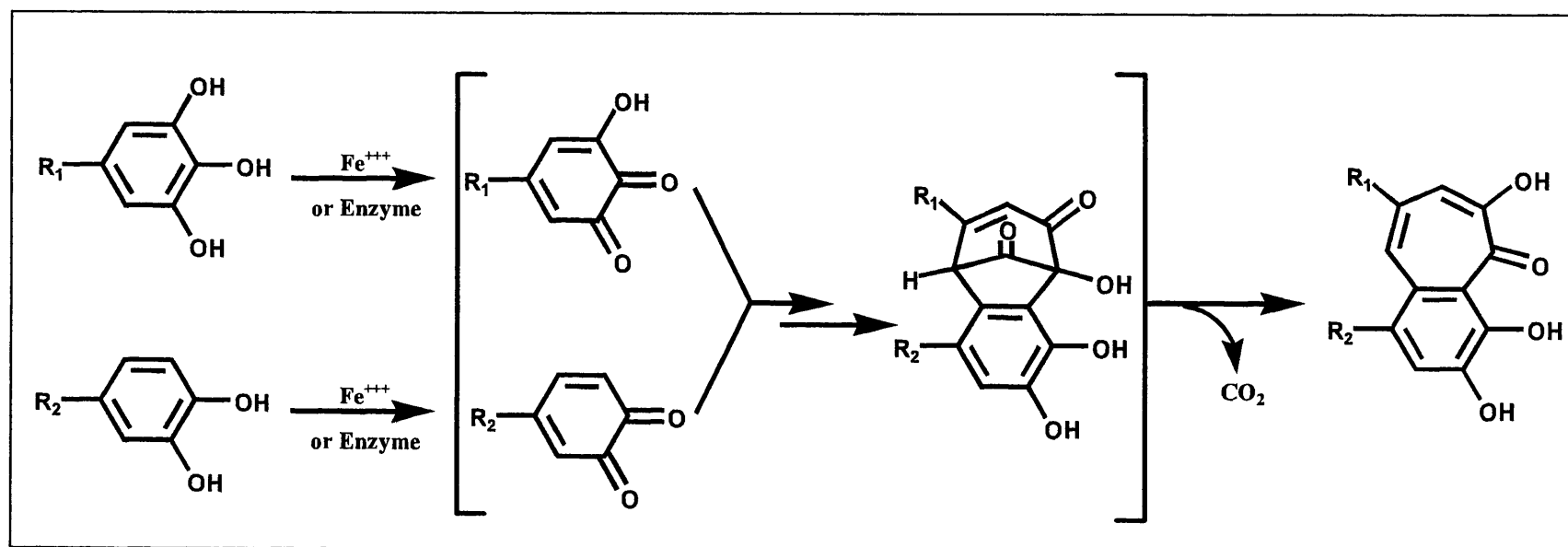


Fig. 2-6. Proposed formation mechanism of Benzotoropolones.

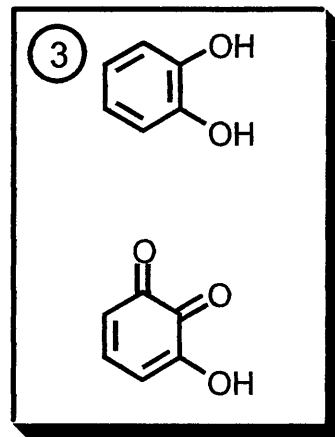
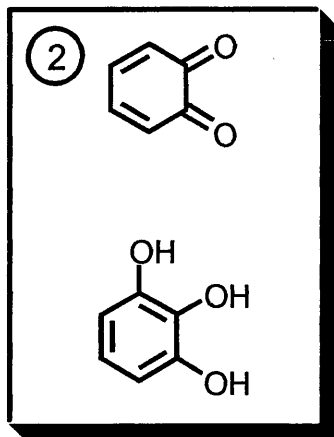
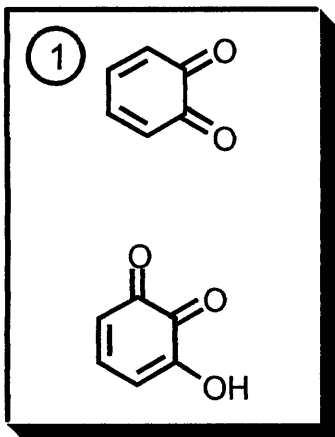
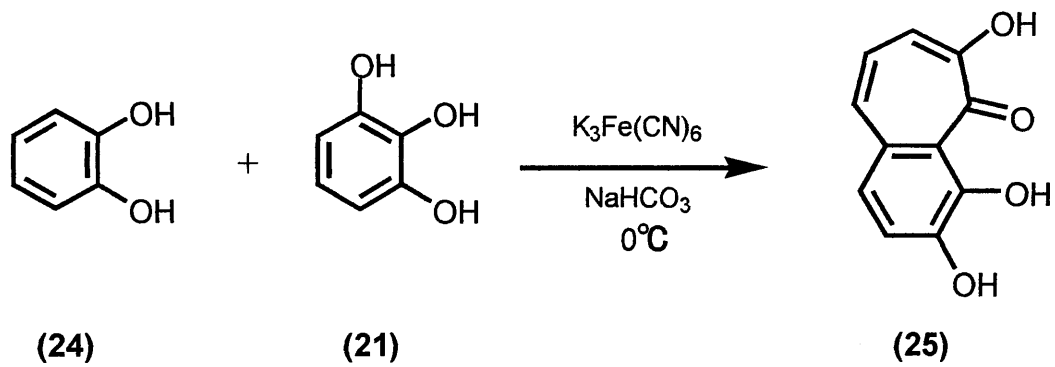


Fig. 2-7. Three possible mechanisms for coupling of 24 and 21.

り t=60 の方が良いということは、Benzotropolone 環の生成には、まず Catechol 部の酸化が重要であり、生成した o-キノンが Pyrogallol 部とカップリングするという②の説である可能性を示唆しており、これはイオンの反応である。また、Pyrogallol がまず o-キノンとなり Catechol とカップリングするという③の説については、Pyrogallol を先に添加した場合に収率が著しく悪化することから完全に否定されたと言える。しかしながら、両方が酸化されるという①の定説については、生成した Catechol の o-キノンの酸化段階が Pyrogallol に移ることによって o-キノンとなり o-キノン同士で反応しているという可能性があるため、完全に否定することはできなかった。

さらに、詳細な検討を行うために、次に Catechol (24) と Pyrogallol (21) さらに 4-Methylcatechol (20) を使用して次のような実験を行うことにした。すなわち、Fig. 2-8 に示したように、まず 1 当量の Catechol (24) を添加し、t 秒間後 (ここで t は先の実験で最も収率の良かった 60 秒間とした。) に Pyrogallol (21) と 4-Methylcatechol (20) を 1 当量ずつ同時に添加してその際の生成物とその収率について検討した。反応が①のように進行すると仮定すると先に添加する Catechol (24) は酸化されて o-キノンとなるが、この酸化段階が他へ移る必要がある。その時、Pyrogallol (21) だけではなく 4-Methylcatechol (20) へも同様に移ると考えられる。その結果、生成物は Catechol (24) と Pyrogallol (21)、4-Methylcatechol (20) と Pyrogallol (21) あるいは Pyrogallol (21) 同士が反応することによって生成する Purpurogallin (23) が約 1 : 1 : 1 で生成するはずである。

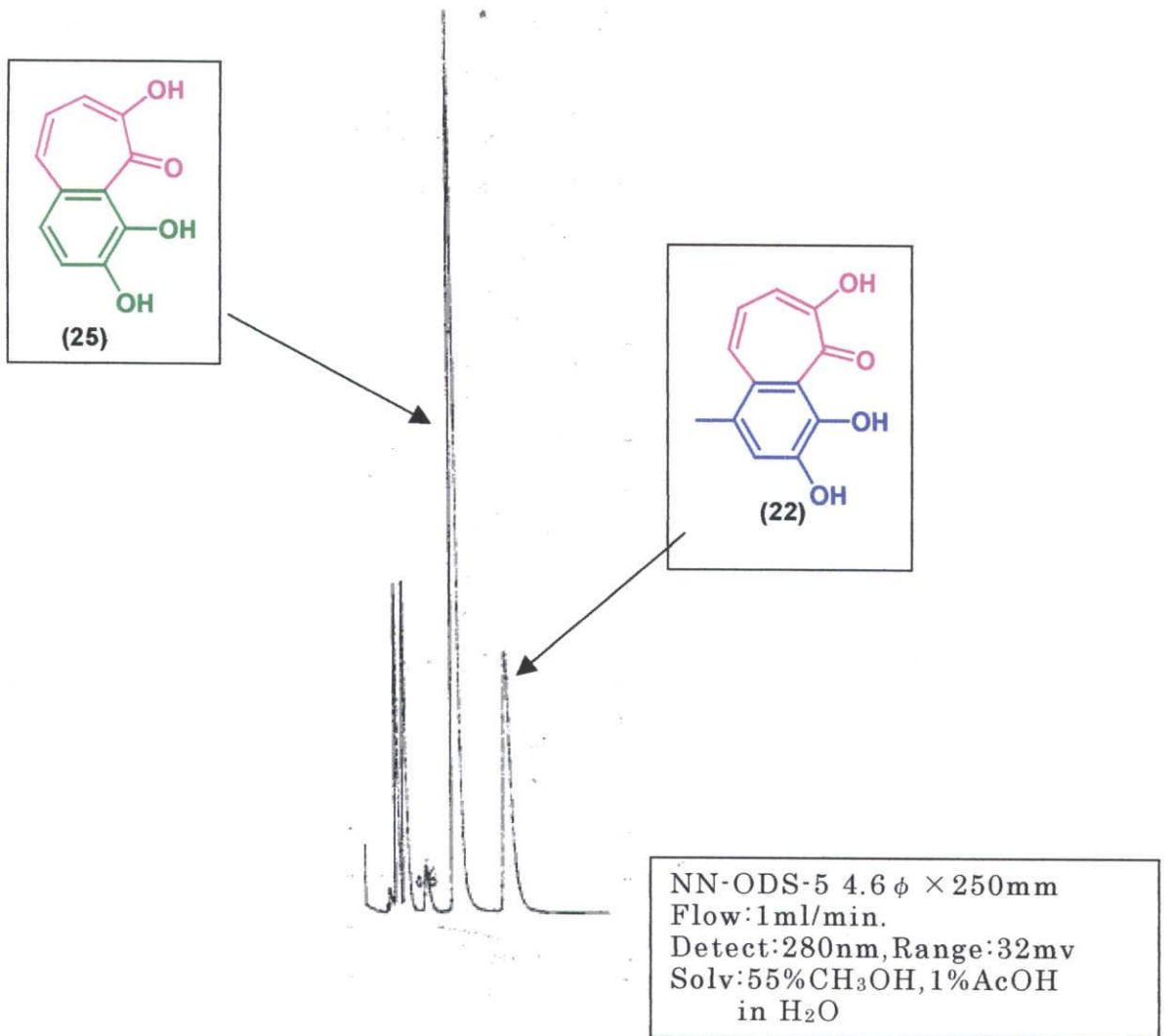
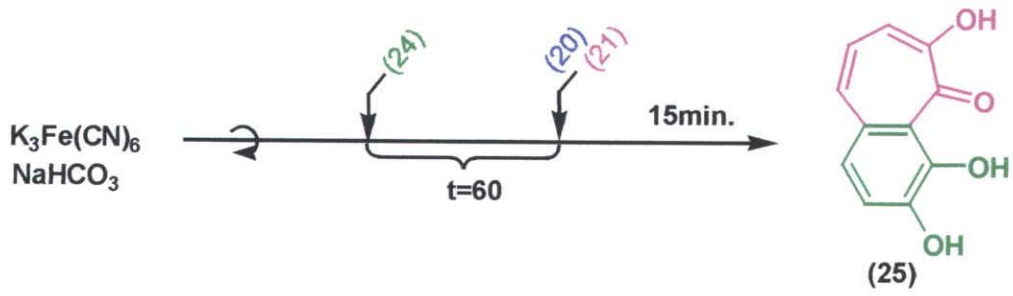
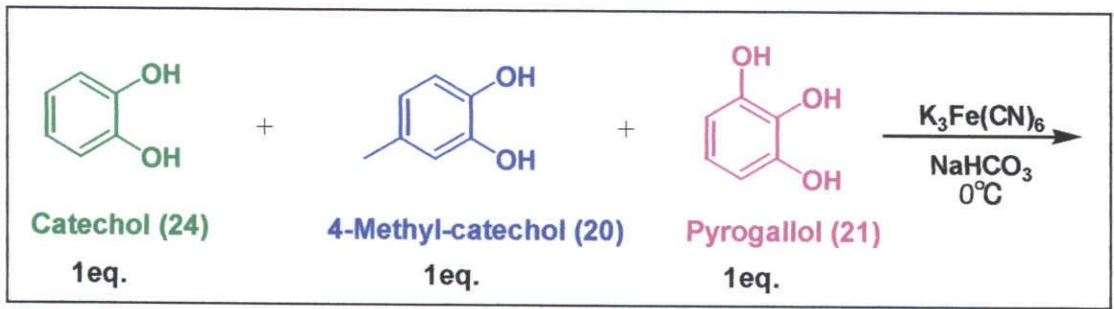


Fig. 2-8. Evidence of formation mechanism of Benzotrololone II.

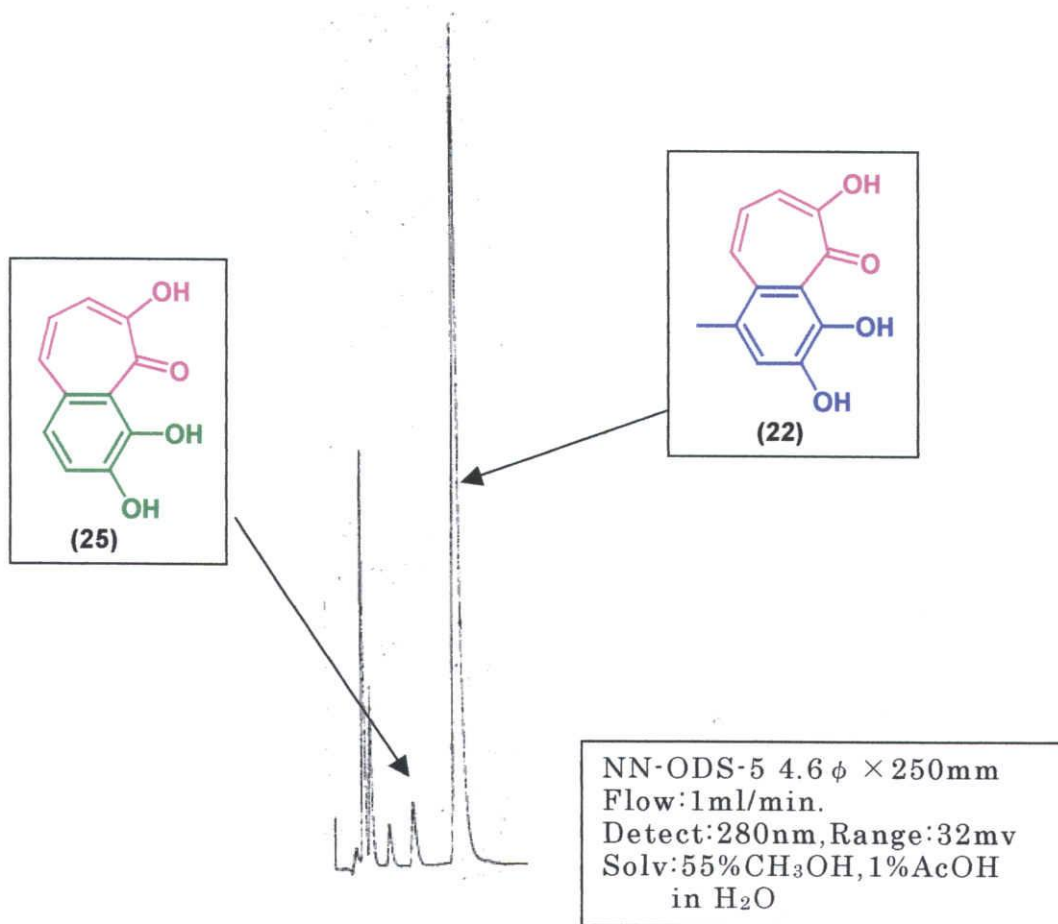
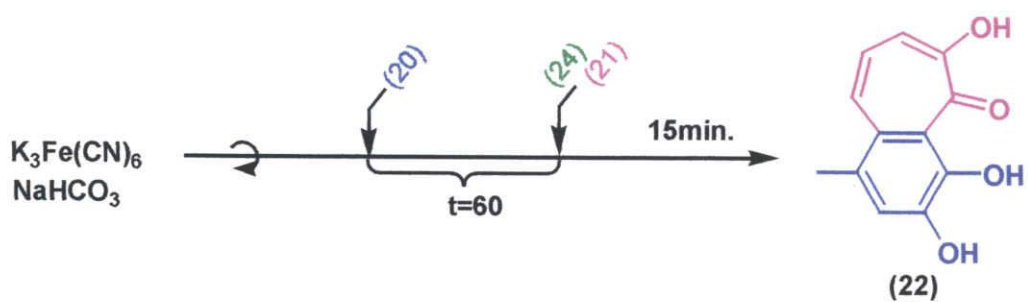
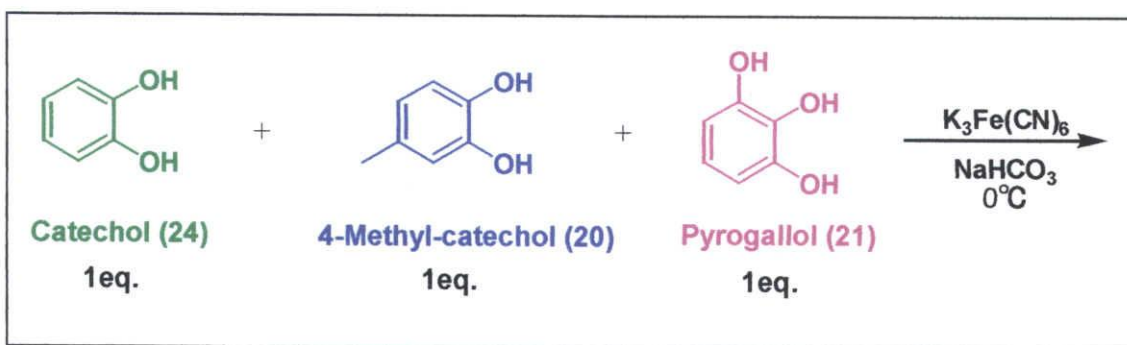


Fig. 2-9. Evidence of formation mechanism of Benzotrololone III.

また、同様に Fig. 2-9 では、まず 4-Methylcatechol (20)を添加し、t 秒間後に Catechol (24)と Pyrogallol (21)を同時に添加した。この場合の生成物も同様の理由から Fig. 2-8 と同じ結果になると考えられる。

しかし、Fig. 2-7 においては、Catechol (24)と Pyrogallol (21)が縮合することによって生成する 8,9-Dihydroxybenzotropolone (25)が収率 44%で主要な反応生成物であり、4-Methylcatechol (20)と Pyrogallol (21)が縮合することによって生成する 6-Methyl-8,9-dihydroxybenzotropolone (22)は 13%、Purpurogallin (23)は 3.3%であった。また、Fig. 2-8 では、6-Methyl-8,9-dihydroxybenzotropolone (22)が収率 78%で主要な反応性生物であり、8,9-dihydroxybenzotropolone (25)が 2.3%、Purpurogallin (23)はわずか 1.9%であった。なお、Fig. 2-8 において主要生成物である 8,9-Dihydroxybenzotropolone (25)の収率が Fig. 2-9 に比べて低い理由としては、生成する Catechol (24)由来の o-キノンの安定性が 4-Methylcatechol (20)由来に比べて低いためであると考えている。

この結果は、Fig. 2-8, 9 のようにして反応を行うと、先に添加した Catechol 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 Pyrogallol や別の Catechol 類に移ることはなく直接反応しているということを示している。このことから、これまで定説となっている①両方が酸化されて o-キノンとなった後でそれ同士がカップリングするという機構を完全に否定することができた。

以上の 2 つの実験結果から、Catechol (24)と Pyrogallol (21)のカップリングにおける開始段階は、これまでの定説①及び説③

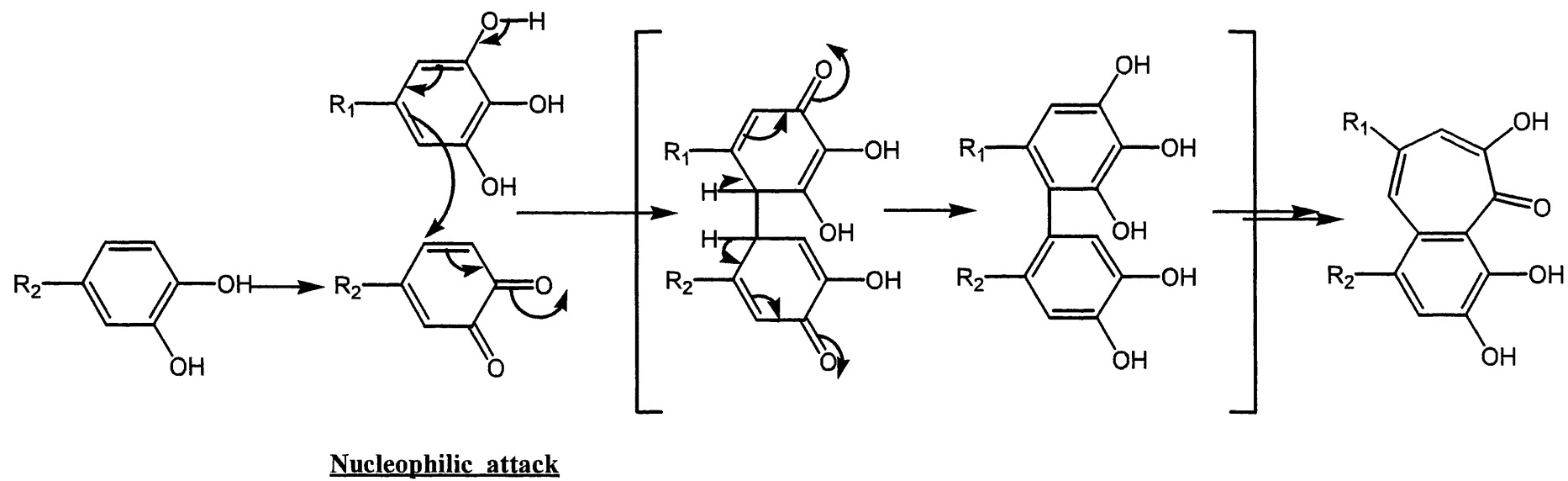


Fig. 2-10. The formation mechanism of the first step of Benzotropolone.

を完全に否定することができた。そして、Fig. 2-10 に示したように、まず Catechol が酸化されて o-キノンとなりこれが Pyrogallol 自身と反応するという新規なイオンの機構で反応が開始することを証明できた。そして、この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。

2-2 酸化剤としてo-キノンを使用したベンゾトロポロン環の合成と反応中間体の単離

テアフラビン類の合成法としてはこれまで述べてきたように $K_3Fe(CN)_6$ による方法が一般的である。しかしながら、この方法ではカテキン類が不安定な塩基性条件下で酸化縮合を達成する必要がある。そのため、目的の反応以外の分解反応が同時に進行するのが低収率の原因であると考えた。このため、テアフラビン類の合成収率を改善するためには反応を中性条件下で行う必要があると考えた。

ベンゾトロポロンを合成する方法としては、 $K_3Fe(CN)_6$ による方法の他に、水溶媒中で o-Quinone (26) と Pyroagllol (21) を反応させる方法が 1959 年 L. Horner 等によって報告されており、その収率は 34% であった²⁵⁻²⁷。この方法は中性条件下でのベンゾトロポロン環合成であり、塩基性状態に不安定なテアフラビン類の合成にも利用できるのではないかと考えた。

そこで、まずモデル反応として 8,9-Dihydrobenzotropolone 類縁体(29)の合成を検討することにした。なお、モデル化合物として o-キノンが安定で、またその生成物がテアフラビンと同様ベンゾトロポロン部の 4、6 位に置換基を持つ 4-Methyl-o-quinone (27) と 5-Methylpyrogallol (28) を使用した。L. Horner 等は Catechol 類を Tetrachloro-o-benzoquinone あるいは Tetrabromo-o-benzoquinone により酸化することによって様々な o-キノンが得られることを報告しているが²⁵、炭酸銀、特に炭酸銀をセライトに吸着させた Fetizon 試薬²⁸ を用いると容易かつ簡便に o-キノンが得られることが知られている。本研究ではこの方法を用

いた。その結果、4-Methylcatechol (20)を定量的に 4-Methyl-o-quinone (27)に酸化することができ、さらにこの化合物は結晶として得ることに成功した。また、L. Horner らの方法では、反応溶媒として水を使用していたが、o-キノンはプロトン性な溶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た。

その結果、特に 4-Methyl-o-quinone (27)を 3eq.用いた場合で 8,9-Dihydrobenzotropolone 類縁体(29)を定量的に得ることに成功した。一方、4-Methyl-o-quinone (27)から 8,9-Dihydrobenzotropolone 類縁体(29)が生成するには、2段階の酸化が必要である。この方法では、酸化剤を別に添加していないため添加した 3eq.のキノンの内、1eq.分のキノンのみが原料として生成物に取り込まれる。残りの 2eq.分は酸化剤として反応に関与し、カテコールとなって回収される。したがって、4-Methyl-o-quinone (27)を 1eq.加えた場合の収率は定量的に反応が進行した場合でも、33.3%、2eq.の場合は 66.7%にしかならないといえる。このことから 1eq.及び 2eq.の場合についても、反応はほぼ定量的であったと言える。以上のことから o-キノンを利用したこの方法は、ベンゾトロポロンを定量的に合成可能であることが分かった。なお、この反応を利用して、ベンゾトロポロン環を持つテアフラビン類のモデル化合物であるカテガリンの合成を行った。それについては 2-3 節で述べる。

また、この反応をジクロロメタン中で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(30)は、水を添加することにより目的とする 8,9-Dihydrobenzotropolone 類縁体(29)となったことから反応中間体であることが分かった。

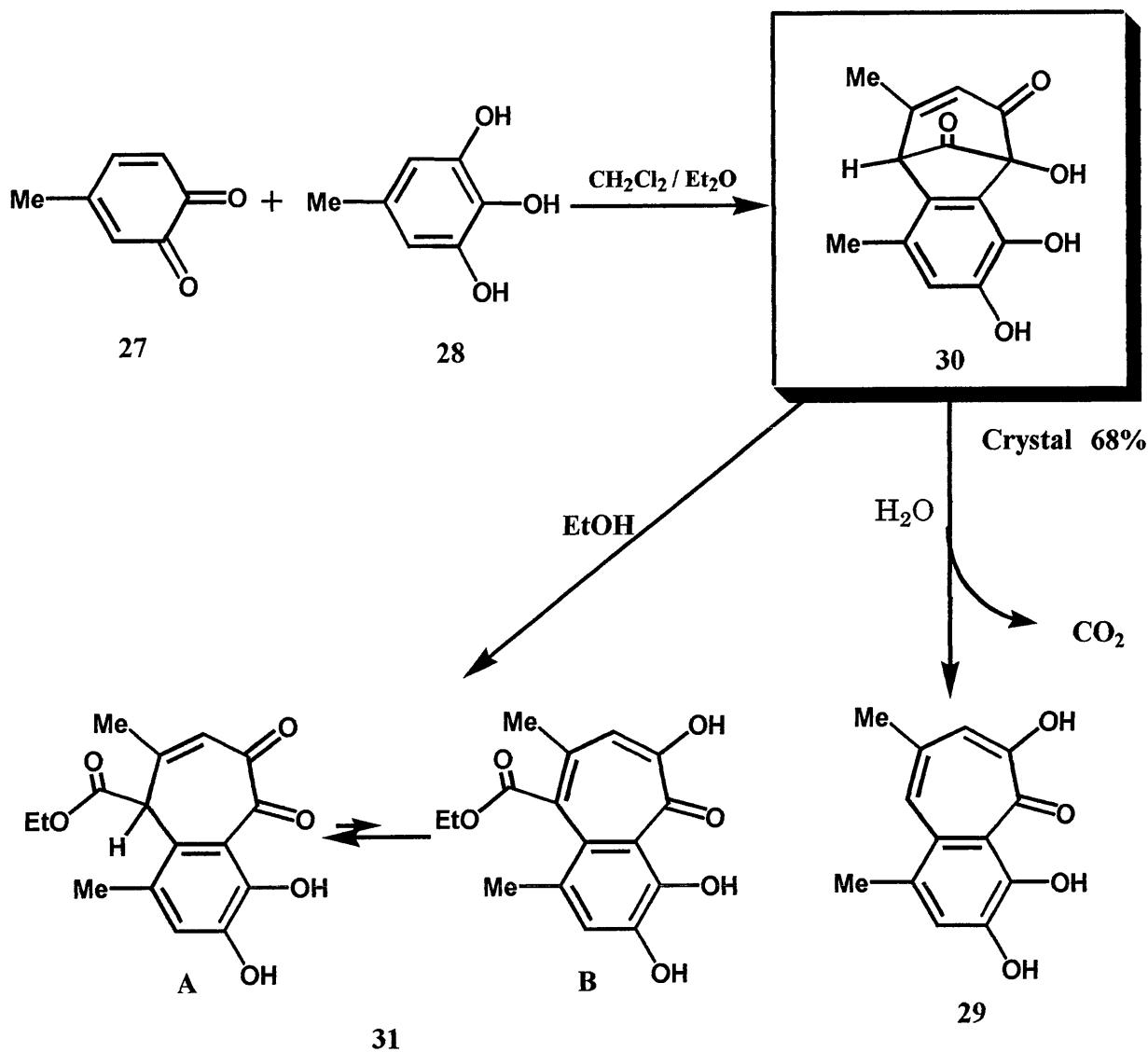


Fig. 2-11. Synthesis of Bicyclo Intermediate 30 and 4,6-Dimethyl benzotropolone 29.

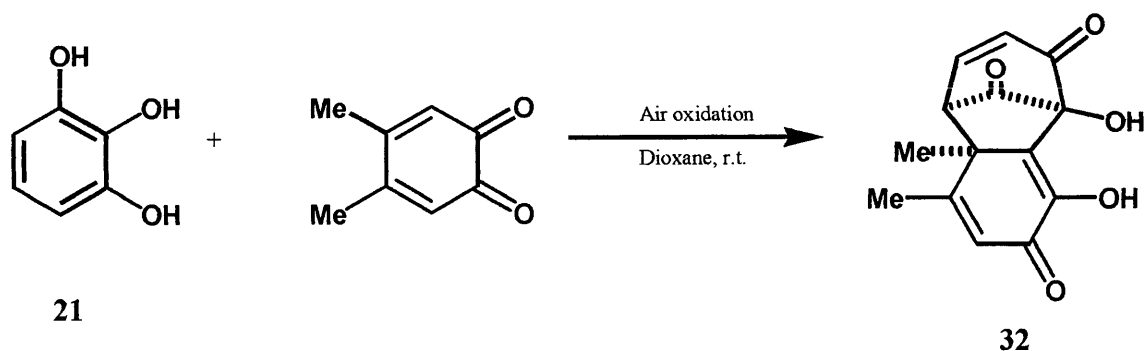


Fig. 2-12. Bicyclo Intermediate 32 by W. Durckheimer (1985).

その他、MS, $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMBC、HMQC 等の各種スペクトルデータにより化合物 (30) はビシクロ[3.2.1]構造を持つ Fig2-11 に示した構造であることが明らかとなった。

さらに、水の代わりにエタノールを添加して加熱することによってエチルエステルを持つ化合物 (31) を得ることに成功した。これは添加したエタノールが架橋部のカルボニル基に作用することによって開環したと言える。なお、化合物(31)にはケトエノールの存在があるが、実際には 1 位及び 2 位にカルボニル基をもつケト体のみが得られている。これは 4 位メチル基と 5 位エチルエステルの立体障害のためであると考えている。一方、4 位にメチル基を持たない、つまり原料として 5-Methylpyrogallol (28) の代わりに Pyrogallol (21)を用い同様にエタノールを添加した場合には、5 位の水素はエノール化により脱離してベンゾトロポロンと同様にエノール体として存在することが分かっている。

化合物 (30) は、ベンゾトロポロン環生成の反応中間体としてこれまで多くの研究者によってその存在が予想されてきた²¹⁻²³。1985 年 W. Durckheimer 等は(21)と 4,5-Dimethyl-o-quinone よりビシクロ環化合物(32)が 81%の収率で生成することを見出した (Fig.2-12)²⁹。しかしながら、化合物(32)は、脱炭酸して、ベンゾトロポロン環になることはない化合物である。ベンゾトロポロン環生成の反応中間体(30)を実際に単離に成功したのは本研究が初めてであり、直接的に証明できた。

反応中間体(30)から 8,9-Dihydrobenzotropolone 類縁体(29)へは、水の付加・開環、1 段階の酸化及び脱炭酸が必要である。酸化及び水の付加・開環については、先に化合物(30)が酸化されて

キノンとなることにより化合物は電子不足となり、そのため水の付加が起こりやすくなり反応が速やかに進行するという反応電子論的な側面から考えて酸化が先であると予想した。しかしながら、化合物(30)と酸化剤である *o*-キノンを d_6 -Acetone に溶解して $^1\text{H-NMR}$ で観察したところ、化合物(30)の酸化体は観察されず、*o*-キノンの混合物として観察された。このことから、予想に反して酸化反応は水の付加の後に起こることが明らかとなった。

また化合物(30)を d_6 -Acetone に溶解して D_2O を窒素気流下で添加して $^1\text{H-NMR}$ による追跡を行ったところ、8,9-Dihydrobenzotropolone 類縁体(29)はほとんど生成しなかった。このことからこの酸化反応は、空気酸化によって起こると考えている。また、このとき化合物(30)は酸素存在下で水と反応させる場合よりもかなり遅いが消費された。しかしながら、(30)が消費されたあとに窒素ガスを除去して空気と置換しても 8,9-Dihydrobenzotropolone 類縁体(29)は生成しなかった。このことから、水の付加・開環後、速やかに酸化される必要があることが分かった。

一方、同様の実験を *o*-キノン共存下で行なった場合は、速やかに反応が進行して 8,9-Dihydrobenzotropolone 類縁体(29)が生成することから、空気酸化ではなく、*o*-キノンが酸化剤として作用していることが明らかとなった。

このことから、この反応は①水の付加・開環、②酸化、③脱炭酸の順で進行していることが明らかとなった。

2-1 及び 2-2 節の結果より、ベンゾトロポロンの生成機構を Fig. 2-13 のようであると考えている。この機構は、その開始

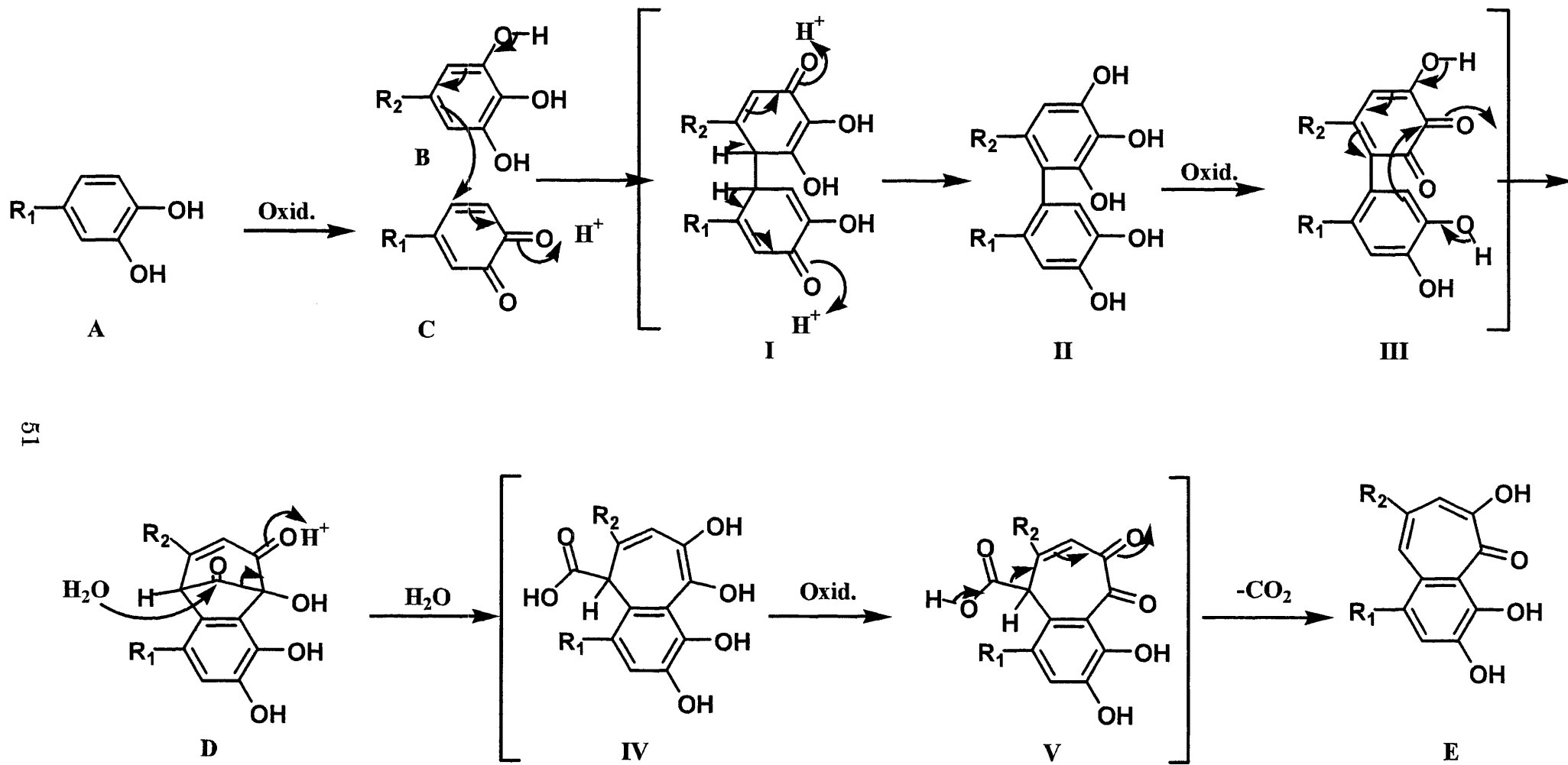


Fig. 2-13. Formation mechanism of Teaflavins.

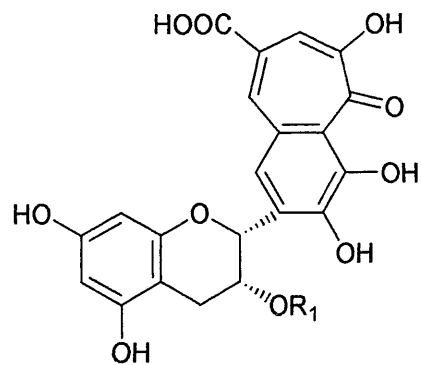
段階において Pyrogallol が o-キノンにイオンの的に求核攻撃すると言
う点がこれまでのものとは大きく異なる。なお、この機構はモ
デル反応のみでなくテアフラビン類でも同様であると考えている。

2-3 カテガリンの合成

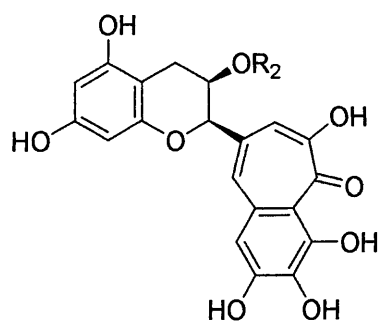
テアフラビンと同様に茶葉中に含まれる酸化酵素によって酸化的に重合して生成する紅色色素として、テアフラビン酸類(33,34)及びテアフラガリン類(35,36)が知られている(Fig.2-14)。テアフラビン酸類は1970年 W. D. Olli らが(+)-Catechin と Gallic acid (37)を $K_3Fe(CN)_6$ で酸化して合成に成功し³⁰、その後 P. D. Colier らによって紅茶より分離されている¹⁹。またテアフラガリン類は1986年西岡らによって紅茶及び烏龍茶より分離されるとともに Gallocatechin 及び Pyrogallol を $K_3Fe(CN)_6$ で酸化することにより合成されている³¹。その構造的な特徴は、テアフラビン類と同様にベンゾトロポロン環を持つことである。しかし、テアフラビン類は B 環部が Catechol タイプと Pyrogallol タイプのカテキンから生成するのに対し、テアフラビン酸類は Catechol タイプのカテキンと Gallic acid (37)から、テアフラガリン類は Pyrogallol タイプのカテキンと Gallic acid (37)から生成する点が異なる。

1964年滝野らは、テアフラビン類のモデル化合物として Categallin (38)を、EGC (2)と Catechol (24)を $K_3Fe(CN)_6$ によって酸化することで合成している^{10,18}。しかしながら、その収率は約6%と非常に低いものであった。 $K_3Fe(CN)_6$ による合成法は、このようなベンゾトロポロン骨格の構築法として一般的ではあり、後に同様の方法でテアフラビン酸類及びテアフラガリン類の合成が行われているが、これらに限らず大方低収率であるため、これを高収率で得るためには、既存の $K_3Fe(CN)_6$ による方法ではなく全く別の合成法を確立する必要がある。

2-3節で述べたように我々は、ベンゾトロポロン環を合成する方法として $K_3Fe(CN)_6$ による方法に変わる、o-キノンを利用す



- 33: $R_1=H$, Epitheaflavic acid
 34: $R_1=$ galloyl, Epitheaflavic acid 3-*O*-gallate



- 35 : $R_2=H$, Epitheaflagallin
 36 : $R_2=$ galloyl, Epitheaflagallin 3-*O*-gallate

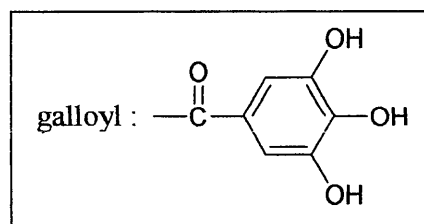


Fig. 2-14. Structures of Theaflavic acids and Theaflagallin.

る方法を確立した。この方法は、酸化剤を別途添加しないために *o*-キノンを 3 当量必要とする。しかし、既存の $K_3Fe(CN)_6$ において収率が低い原因は、生成物がさらに酸化され反応が進行してしまうことにあるが、*o*-キノンではそれが起こらないという利点がある。また、*o*-キノンの原料であるカテコール類は安価であり、反応終了後回収も可能である。この方法が利用できれば高収率でテアフラビン酸類やテアフラガリン類が得られるのではないかと考えた。特に、モデル化合物である Categallin(38)は EGC (2)と Catechol (24)から合成できる。あらかじめ Catechol (24)を酸化することによって *o*-Quinone(26)を生成すればベンゾトロポロン環と同様定量的に合成できる可能性が示唆された。そこで、まず Categallin (38)の合成を試みることにした。

2-2 節と同様に Catechol (24)を酸化銀で酸化した 3eq.の *o*-Quinone (26)と EGC (2)を、非プロトン性溶媒であり *o*-Quinone (26)とともに EGC (2)も可溶である酢酸エチルを用いて 0°Cで反応させたところ、87%の収率で Categallin (38)を得ることに成功した。また、同様の反応を 4-Methylcatechol (20)を用いて行ったところ化合物(39)を 82%の収率で得ることに成功した(Fig.2-15)。

また、テアフラビン酸のモデルとして EC (1)と Pyrogallol (21)から化合物 (40) の合成を検討した。この反応では EC (1)を *o*-キノンにする必要があった。まず EC (1)を直接酸化銀で酸化したところ、*o*-キノンの生成は認められなかった。これは、EC (1)は B 環部のほかに A 環部にもフェノール性水酸基を持っており、仮に B 環部が *o*-キノンとなったとしても、A 環部の水酸基との反応によってポリマー化するためであると考えている。そこで、EC (1)の A 環部フェノール性水酸基をメチル基で保護した化合物 (41)

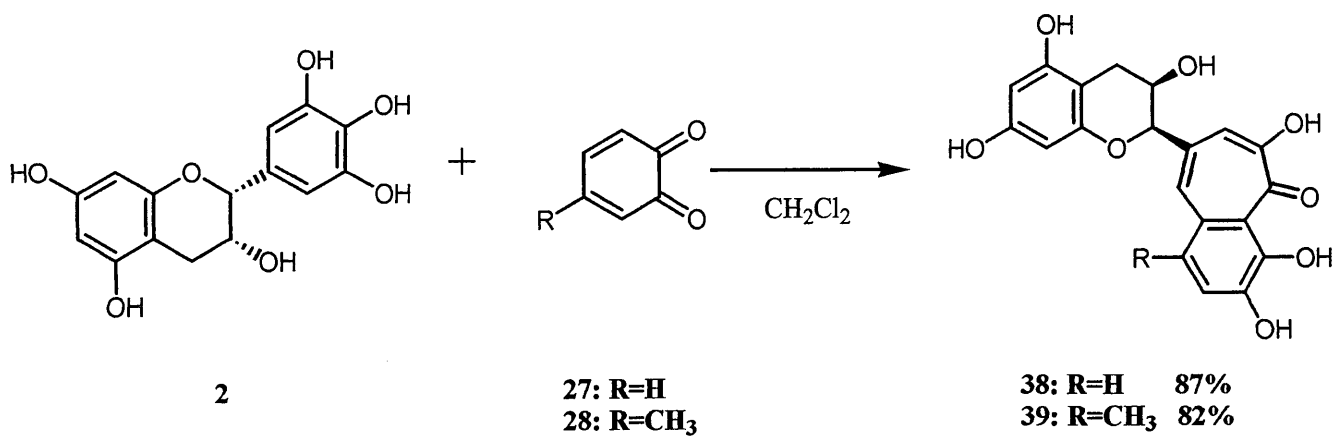


Fig. 2-15. The synthesis of Categallin **38**.

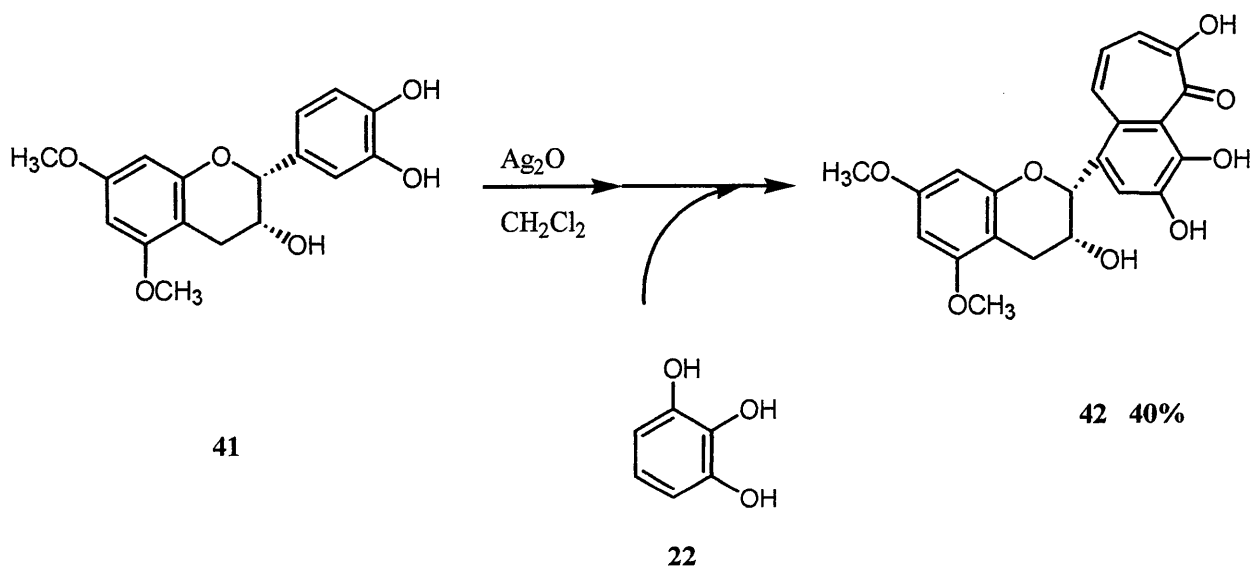


Fig. 2-16. The synthesis of Compound **42**.

を合成して同様に酸化を行った。その結果、B環部 o-キノンが生成し、続いて Pyrogallol (21) を作用させたところ目的とする化合物 (42) を収率 40% で得ることに成功した (Fig. 2-16)。これに関しては、メチル基の代わりに Bn 基など脱保護が容易な保護基を用いることで天然物自身の合成が可能であると考えている。また、EC (1) の B 環部は A 環部の水酸基を保護することによって o-キノンとすることが可能であることが明らかとなった。このことは、この方法がテアフラガリン酸の合成のみならずテアフラビン類の合成に利用できる可能性があることを示している。

結語

1章では、茶カテキン類の化学的研究について述べた。

まず初めに、主要4種カテキン類の大量分離法を検討し、数段階でグラムスケールでの分離法を確立した。カテキン類は、市販されているが非常に高価であり、大量に得られる方法を確立したことは今後カテキン類の研究の発展に大いに役立つものと考えている。

次に、得られたカテキン類を使用して化学的反応性について検討を行った。ジアゾメタンによるメチル化反応を行い数多くあるフェノール性水酸基の反応性の差について検討し、その反応性がガレート基>B環部>A環部の順であることを明らかにした。さらに、反応条件を検討することによって強い抗アレルギー作用で注目されている微量成分 EGCg-3''-OMe (5)の合成に初めて成功した。化学的反応性を明らかとしたことで EGCg-3''-OMe (5)のみならず様々なカテキン誘導体の合成の可能性を示すことが出来た。

また、抗酸化作用が強いとされる EGCg (3)及び ECg (4)、またこれらの各種モノメチル体の光安定性について検討した。その結果 EGCg (3)についてはB環部が、ECg (4)についてはB環部及びガレート基がメチル化されることにより安定となることから EGCg (3)及び ECg (4)の抗酸化作用発現にはこれらの部位が重要であると分かった。本研究で得られた結果は、カテキン類の様々な生理活性発現機構の解明に役立つものと考えている。

2章では、紅茶色素テアフラビン類の化学的研究について述べた。テアフラビン類の効率的合成法を確立するために、テアフラ

ビン類の生成機構について検討した。その結果、まず Catechol 部が酸化されて o-キノンとなりその後、Pyrogallol 部とイオンの反応していることが明らかとなった。この結果はラジカル的であると考えられてきた通説とは異なるものであり、テアフラビン以外においてもこのような例があるのではないかと考えている。また、この結果を考慮することによってモデル反応については収率を約 3 倍まで改善することに成功したことからテアフラビン類への応用が期待される。

次に、o-キノンを使用したベンゾトロポロン環の合成法を検討した。反応条件を検討した結果、塩化メチレン中無水条件下で行うことによって定量的に反応が進行することを明らかとし、また以前より反応中間体として予想されていたビシクロ構造を持つ化合物の単離に初めて成功した。また、この方法を利用してテアフラガリン類及びテアフラビン酸類のモデル化合物の合成を行い 3 種のモデル化合物の合成に成功し、テアフラビン類合成への利用の可能性を示すことができた。

本研究成果が、茶カテキン類及び紅茶テアフラビン類の生理活性発現機構の解明、さらには医薬品等への応用に役立つことを期待する。

実験の部

NMR	バリアン INOVA 500 (500MHz NMR) バリアン INOVA 400 (400MHz NMR)
MS	日本電子 JMS-700/GI
IR	Perkin Elmer 2000
UV	日立 4000U
HPLC	JASCO UNIDEC-100-V JASCO 880-PU JASCO 875UV JASCO 887PU
HPLC カラム	NB-ODS-9, 4.6 mm ϕ \times 250 mm NB-ODS-9, 10 mm ϕ \times 250 mm NB-ODS-9, 20 mm ϕ \times 250 mm NX-9-60A, 4.6 mm ϕ \times 250 mm NX-9-60A, 10 mm ϕ \times 250 mm NX-9-60A, 20 mm ϕ \times 250 mm
融点測定器	Yanako MP-13
TLC	Silicagel 60 F ₂₅₄ (MERCK)
分取 TLC	Kieselgel 60 PF ₂₅₄ (MERCK)
シリカゲルカラムクロマトグラフィー	M 300H (丸石化学商会) NAM 300H (丸石化学商会)

実験 1 茶カテキン類の大量分離 I

茶抽出物ポリフェノン G を EtOAc / 水に溶解して抽出を行った。得られた EtOAc 層を濃縮し、EtOAc を除去した後メタノールに溶解した。次に、強酸性樹脂（三菱化成 DIAION SK1B-S）を用いて脱カフェインを行った。樹脂をメタノールで膨潤させた後、カラムにつめてサンプルをのせた。メタノールでサンプルを溶出後濃縮した。

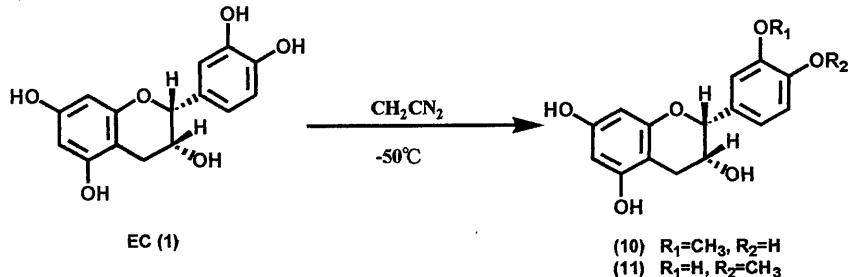
得られたサンプルを次に HPLC により分離した。まず始めに逆相系 HPLC を用いた。逆相系 HPLC カラム NB-ODS-9, 20 φ×250 mm を用い、溶媒 25%MeOH, 1%AcOH / H₂O を使用することで ECg (4) を得ることに成功した。次に、混合物を順相系 HPLC カラム NX-9-60A, 20 φ×250 mm を用い、溶媒 20%MeOH, 1%AcOH, 2.7%H₂O / CH₂Cl₂ を使用することで残りの EC (1)、EGC (2) 及び EGCg (3) を純粋に得ることができた。

実験 2 茶カテキン類の大量分離 II

茶抽出物ポリフェノン 70S 5 g を水に溶解して、水で調整した逆相系オープンカラム (ODS-40, 55 mm ϕ \times 400 mm) にのせた。カラムは 42°C に加熱して、溶出溶媒は 7% EtOAc/H₂O とした。EGCg (3) が溶出した後、カラムの温度を 65°C まで上昇させて ECg (4) を溶出した。同様の操作を 4 回行い計 20g の茶抽出物ポリフェノン 70S を分離した。

得られた 3 フラクシオンは、EtOAc 抽出後濃縮した。メタノール溶出部は濃縮しメタノールを除去してから同様に抽出した。フラクション 1 には EGCg (3) が、フラクション 3 には ECg (4) が含まれており、これらは水を加えて結晶化させた。その結果、EGCg (3) は第 1 晶、2 晶あわせて 4.4 g、ECg (4) は 2.5 g 得られた。

実験 3 EC (1) のメチル化



20ml 容のナスフラスコに、ジアゾメタンエーテル溶液 5ml をいれて -50°C で冷却した。同様に、原料 50mg をメタノール 250 μl に溶解して -50°C に冷却した。10 分間後原料のメタノール溶液を添加して、 -50°C で 10 時間反応させた。反応終了後、酢酸を加えて反応を停止した。反応液は酢酸エチル / 1%NaHCO₃ aq. で抽出して、酢酸エチル層を濃縮した。得られた残渣は、逆相系 HPLC カラム NB-ODS-9, 10 $\phi \times 250$ mm を用い、溶媒 40%MeOH, 1%AcOH/H₂O で分取した。EC-3'-OMe (10) 1.2mg 及び EC-4'-OMe (11) 1mg が得られた。

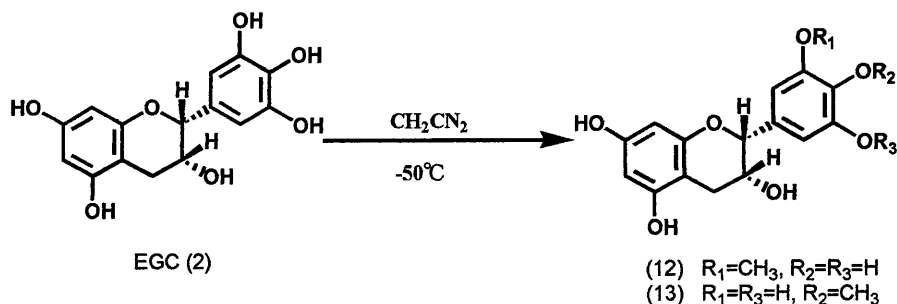
EC-3'-OMe (10)

¹H-NMR (CD₃OD) δ (ppm) : 2.77(1H, br.d, $J=16.5$, H4), 2.90(1H, dd, $J=16.5$ & 4.4, H4), 3.88(3H, s, OCH₃), 4.21(1H, br.s, H3), 4.88(1H, br.s, H2), 5.97(1H, s, H6), 5.97(1H, s, H8), 6.81(1H, d, $J=8.1$, H5'), 6.91(1H, d, $J=8.1$, H6'), 7.12(1H, s, H2').

EC-4'-OMe (11)

¹H-NMR (CD₃OD) δ (ppm) : 2.76(1H, dd, $J=17.0$ & 3.0, H4), 2.89(1H, dd, $J=17.0$ & 3.0, H4), 3.86(3H, s, OCH₃), 4.21(1H, br.s, H3), 4.87(1H, br.s, H2), 5.96(1H, d, $J=2.4$, H6), 5.97(1H, d, $J=2.4$, H8), 6.93(1H, d, $J=8.2$, H5'), 6.94(1H, d, $J=8.2$, H6'), 7.01(1H, d, $J=1.8$, H2').

実験 4 EGC (2) のメチル化



20ml 容のナスフラスコに、ジアゾメタンエーテル溶液 5ml をいれて -50°C で冷却した。同様に、原料 50mg をメタノール 250 μl に溶解して -50°C に冷却した。10 分間後原料のメタノール溶液を添加して、 -50°C で 7 時間反応させた。反応終了後、酢酸を加えて反応を停止した。反応液は酢酸エチル / 1% $\text{NaHCO}_3\text{aq.}$ で抽出して、酢酸エチル層を濃縮した。得られた残渣は、逆相系 HPLC カラム NB-ODS-9, 10 $\phi \times 250$ mm を使い、溶媒 30% MeOH , 1% AcOH / H_2O で分取した。EGC-3'-OMe (12) 2.3mg 及び EGC-4'-OMe (13) 1.0mg が得られた。

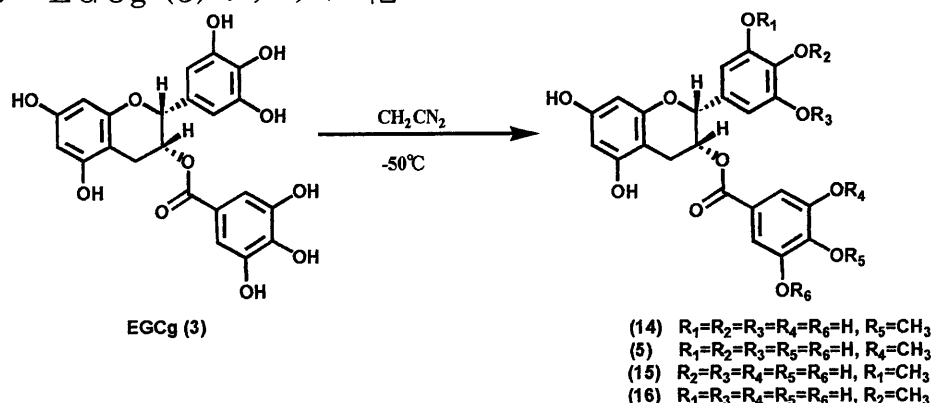
EGC-3'-OMe (12)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 2.77(1H, br.d, $J=16.4$, H4), 2.88 (1H, dd, $J=16.4$ & 4.3, H4), 3.86(3H, s, OCH_3), 4.21(1H, br.s, H3), 5.97(1H, s, H6), 5.97(1H, s, H8), 6.64(1H, s, H6'), 6.67(1H, s, 2').

EGC-4'-OMe (13)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 2.76(1H, dd, $J=16.7$ & 3.0, H4), 2.88(1H, dd, $J=16.7$ & 4.2, H4), 3.81(3H, s, OCH_3), 4.20(1H, br.s, H3), 4.79(1H, br.s, H2), 5.96(1H, s, H6), 5.96(1H, s, H8), 6.54(1H, s, H6' & H2').

実験 5 EGCg (3) のメチル化



30ml 容のナスフラスコに、ジアゾメタンエーテル溶液 10ml をいれて -50°C で冷却した。同様に、原料 100mg をメタノール 500 μl に溶解して -50°C に冷却した。10 分間後原料のメタノール溶液を添加して、 -50°C で 2.5 時間反応させた。反応終了後、酢酸を加えて反応を停止した。反応液は酢酸エチル / 1%NaHCO₃aq. で抽出して、酢酸エチル層を濃縮した。得られた残渣は、逆相系 HPLC カラム NB-ODS-9, 20 ϕ \times 250 mm を使い、溶媒 20%MeOH, 1%AcOH / H₂O で分取した。EGCg-4''-OMe (14) 17.1mg (収率 16.5%)、EGCg-3''-OMe (5) 8.8mg (収率 8.5%)、EGCg-3'-OMe (15) 7.8mg (収率 7.5%) 及び EGC-4'-OMe (16) 8.4mg (収率 3.3%) が得られた。

EGCg-4''-OMe (14)

¹H-NMR (CD₃OD) δ (ppm) : 2.88(1H, dd, J=17.6 & 2.2, H4), 2.99(1H, dd, J=17.6 & 2.2, H4), 3.82(3H, s, OCH₃), 4.97(1H, br.s, H2), 5.53(1H, br.s, H3), 5.97(1H, s, H6 or H8), 5.97(1H, s, H6 or H8), 6.51(2H, s, H2' & H6'), 6.94(2H, s, H2'' & H6'').

EGCg-3''-OMe (5)

¹H-NMR (CD₃OD) δ (ppm) : 2.92(1H, dd, J=17.2 & 2.7, H4), 3.01(1H, dd, J=17.2 & 2.7, H4), 3.81(3H, s, OCH₃), 5.00(1H, br.s, H2), 5.50(1H, br.s, H3), 5.97(1H, s, H6 or H8), 6.00(1H, s, H6 or H8), 6.53(2H, s, H2' & H6'), 7.05(2H, dd, J=29.5&1.8, H2'' & H6'').

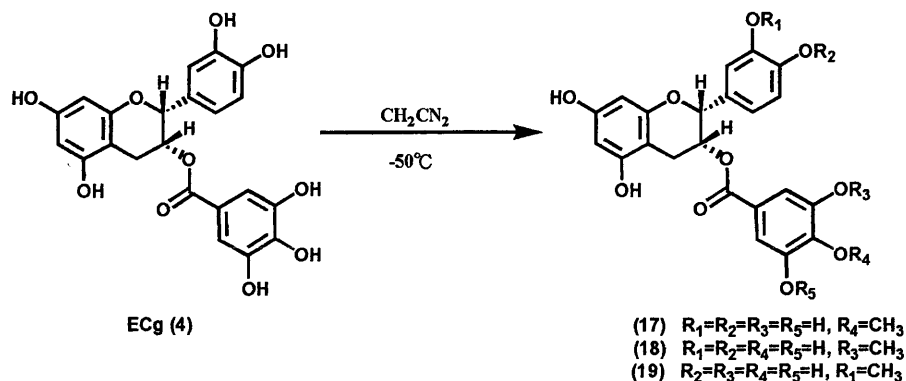
EGCg-3'-OMe (15)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 2.87(1H, br.d, $J=17.8$, H4), 3.01(1H, dd, $J=16.7\&4.6$, H4), 3.60(3H, s, OCH_3), 4.99(1H, br.s, H2), 5.53(1H, br.s, H3), 5.97(1H, s, H6 or H8), 5.98(1H, s, H6 or H8), 6.57(1H, d, $J=1.8$, H6'), 6.65(1H, d, $J=1.8$, H2'), 6.99(2H, s, $J=29.5\&1.8$, H2" & H6").

EGCg-4'-OMe (16)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 2.93(2H, m, H4), 3.76(3H, s, OCH_3), 4.99(1H, br.s, H2), 5.52(1H, br.s, H3), 5.97(1H, s, H6 or H8), 5.97(1H, s, H6 or H8), 6.54(2H, s, H2' & H6'), 6.98(2H, s, H2" & H6").

実験 5 ECg (4) のメチル化



30ml 容のナスフラスコに、ジアゾメタンエーテル溶液 10ml をいれて -50°C で冷却した。同様に、原料 100mg をメタノール 500 μl に溶解して -50°C に冷却した。10 分間後原料のメタノール溶液を添加して、 -50°C で 3 時間反応させた。反応終了後、酢酸を加えて反応を停止した。反応液は酢酸エチル / 1%NaHCO₃aq. で抽出して、酢酸エチル層を濃縮した。得られた残渣は、逆相系 HPLC カラム NB-ODS-9, 20 ϕ × 250 mm を用い、溶媒 30%MeOH, 1%AcOH / H₂O で分取した。ECg-4''-OMe (17) 28mg (収率 27%)、ECg-3''-OMe (18) 8.6mg (収率 8.3%) 及び ECg-3'-OMe (19) 7.8mg (収率 7.5%) が得られた。

ECg-4''-OMe (17)

¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) δ (ppm) : 2.90(1H, dd, J=17.1 & 2.1, H-4), 3.00(1H, dd, J=17.1 & 4.7, H-4), 3.84(3H, s, OCH₃), 5.04(1H, br.s, H-2), 5.54(1H, br.d, d=1.6, H-3), 5.98(1H, d, J=2.5, H-6), 5.99(1H, d, J=2.3, H-8), 6.72(1H, d, J=8.2, H-5'), 6.82(1H, dd, J=8.2 & 2.1, H-6'), 6.95(1H, s, H-2'), 6.95(1H, s, H-2'' & H-6'').

ECg-3''-OMe (18)

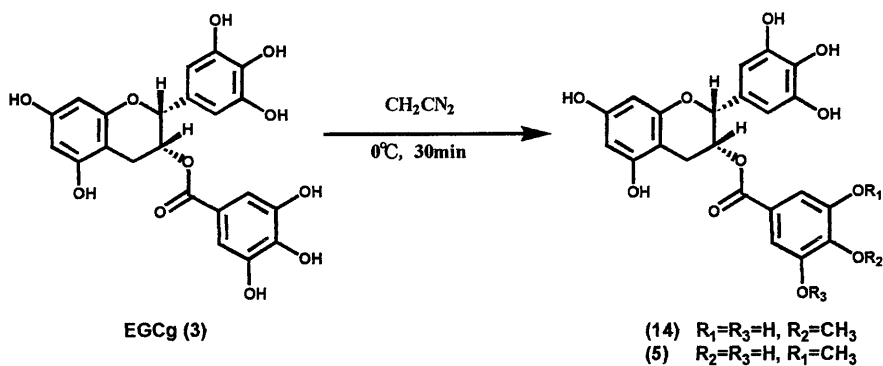
¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) δ (ppm) : 2.94(1H, dd, =17.4 & 2.6, H-4), 3.02(1H, dd, J=17.4 & 4.5, H-4), 3.84(3H, s, OCH₃), 5.06(1H, br.s, H-2), 5.52(1H, br.s, H-3), 5.98(1H, d, J=2.3, H-6), 5.98(1H, d, J=2.3, H-8), 6.72(1H, d, J=8.2, H-5'), 6.82(1H, dd,

J=8.0 & 1.8, H-6'), 6.97(1H, d, J=1.8, H-6''), 7.03(1H, d, J=1.8, H-2''), 7.10(1H, d, J=1.8, H-2').

ECg-3'-OMe (19)

¹H-NMR (CD₃OD, 500MHz) δ (ppm) : 2.89(1H, br.d, J=16.1, H-4), 3.01(1H, dd, J=16.1 & 4.8, H-4), 3.61(3H, s, OCH₃), 5.06(1H, br.s, H-2), 5.53(1H, br.s, H-3), 5.97(1H, d, J =2.2, H-6), 5.98(1H, d, J=2.6, H-8), 6.74(1H, d, J=8.2, H-5'), 6.86(1H, dd, J=8.2 &1.8, H-6'), 7.01(2H, s, H-2'' & H-6''), 7.08(1H, d, J=1.8, H-2').

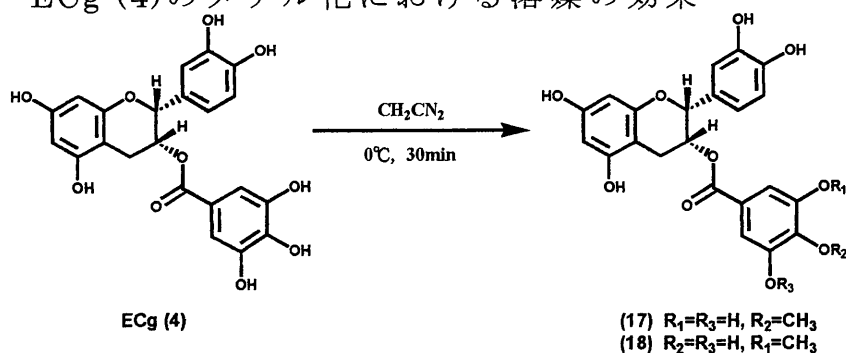
実験 6 EGCg (3) のメチル化における溶媒の効果



10ml 容ナスフラスコに EGCg (3) 10mg と MeOH 1ml または THF 1ml と Ether 0.8ml、または Dioxan 1ml と Ether 0.8ml を加えて溶解した。0°C で 10 分間冷却後、ジアゾメタンエーテル溶液を添加し 30 分間反応させた。反応終了後 N₂ ガスを通じてジアゾメタンを除去した。溶媒を濃縮除去後 MeOH 1ml で溶解し逆相系 HPLC カラム NB-ODS-9, 4.6 φ×250 mm、溶媒 25%MeOH, 1%AcOH / H₂O で分析した。その結果を以下の表に示す。

溶媒	CH ₂ N ₂ (Ether 溶液)	4"-OMe (14)	3"-OMe (5)
CH ₃ OH 1ml	1ml	1.2	1
THF 1ml Ether 0.8ml	0.2ml	2	3
Dioxane 1ml Ether 0.8ml	0.2ml	1	1.2

実験 7 ECg (4) のメチル化における溶媒の効果



10ml 容ナスフラスコに ECg (4) 10mg と MeOH 1ml または THF 1ml と Ether 0.8ml、または Dioxan 1ml と Ether 0.8ml を加えて溶解した。0°C で 10 分間冷却後、ジアゾメタンエーテル溶液を添加し 30 分間反応させた。反応終了後 N₂ ガスを通じてジアゾメタンを除去した。溶媒を濃縮除去後 MeOH 1ml で溶解し逆相系 HPLC カラム NB-ODS-9, 4.6 φ × 250 mm、溶媒 35% MeOH, 1% AcOH / H₂O で分析した。その結果を以下の表に示す。

溶媒	CH ₂ N ₂ (Ether 溶液)	4"-OMe (17)	3"-OMe (18)
CH ₃ OH 1ml	1ml	4	1
THF 1ml Ether 0.8ml	0.2ml	1	1
Dioxane 1ml Ether 0.8ml	0.2ml	2	3

実験 8 EGCg (3)及びそのメチル体の光安定性

EGCg (3) 及び EGCg-4''-OMe (14)、EGCg-3''-OMe (5)、EGCg-3'-OMe (15)、EGC-4'-OMe (16)を 1:1:1:1:1 の比になるように混合した。この混合物を水に溶解し 20ppm の濃度に調整した。この水溶液 2ml を 10ml 容の三角フラスコに入れて、水冷しながら 100W のシリカランプを用いて光照射を行った(Fig.1-8)。その際の各成分の経時的変化を逆相系 HPLC カラム Dev. ODS-5 4.6 ϕ ×100 mm、溶媒 12.5%CH₃CN, 1%AcOH / H₂O で分析した。

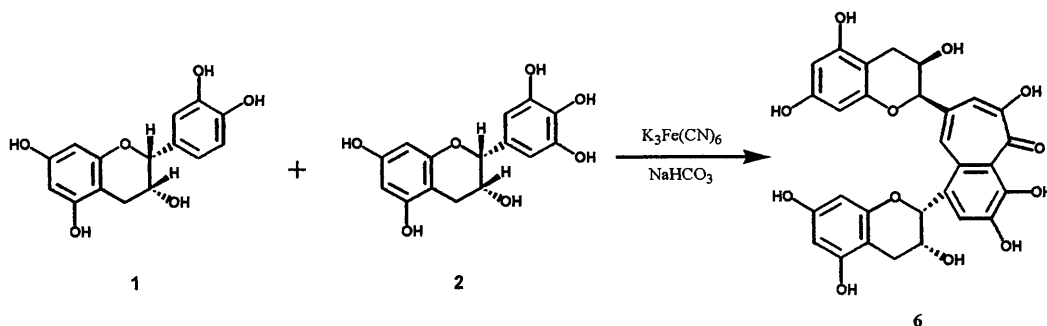
実験 9 ECg (4)及びそのメチル体の光安定性

ECg (4)及び ECg-4''-OMe (17)、ECg-3''-OMe (18)、ECg-3'-OMe (19)を 1:1:1:1 の比になるように混合した。この混合物を水に溶解し 20ppm の濃度に調整した。この水溶液 2ml を 10ml 容の三角フラスコに入れて、水冷しながら 100W のシリカランプを用いて光照射を行った(Fig.1-8)。その際の各成分の経時的変化を逆相系 HPLC カラム Dev.ODS-5 4.6 ϕ \times 100 mm、溶媒 30%MeOH, 1%AcOH / H₂O で分析した。

実験 10 テアフラビン類の大量分取

熱湯 3 に溶解した紅茶熱湯抽出物 500g を三菱化成 HP-20 (中性樹脂) カラム (約 1.3) にのせて H₂O、50%MeOH / H₂O、MeOH の順で溶出した。テアフラビン類が含まれる、MeOH フラクションを濃縮し、EtOAc / H₂O 抽出を行った。得られた EtOAc 層を濃縮後 MeOH に溶解して、三菱化成 SK1BS (強酸性樹脂) カラムで脱カフェインを行った。得られた溶出液を濃縮後さらに三菱化成 HP-20-ss (中性樹脂) カラムにのせ、30~50%MeOH / H₂O で溶出した。テアフラビン類は 50%MeOH / H₂O フラクションに含まれていたため濃縮し、逆相系オープンカラムで分離した。なお溶媒は 24.8%MeOH、14.6%EtOAc / H₂O を使用した。Free Theaflavin (6) 1.6g、2 種の Theaflavin O-gallate (7) (8) 混合物として 2.3 g、Theaflavin di-O-gallate (9) 0.99 g が得られた。

実験 11 Free Theaflavin (6) の合成



EC (1) 290mg と EGC (2) 153mg をメタノールに溶解後濃縮し 145ml の水に溶解した。次に、水 4.5ml に溶解した $K_3Fe(CN)_6$ 1.5g と $NaHCO_3$ 126mg を室温で添加した。5 分間反応後、酢酸で酸性にして反応を停止し EtOAc / H_2O 抽出を行った。EtOAc 層を濃縮し、順相系オープンカラム (NAM-300H 50 倍量、 $CHCl_3$: Acetone:MeOH: H_2O =40:25:6:2) で分離した。Free Theaflavin (6) 149mg (収率 53%) で得た。また同様にして Theaflavin 3-O-gallate (7) (収率 24%), Theaflavin 3'-O-gallate (8) (収率 25%), Theaflavin 3,3'-O-gallate (9) (収率 8%) の合成を行った。

Free Theaflavin (6)

1H -NMR (d_6 -Acetone) δ (ppm) : 2.81-3.00(4H, m, H4 & H4'), 4.43(1H, br.s, H3 or H3'), 4.53(1H, br.s, H3 or H3'), 4.99(1H, s, H2), 5.73(1H, s, H2'), 5.99(1H, d, $J=2.29$, H6 or H6'), 6.02(1H, d, $J=2.29$, H6 or H6'), 6.04(2H, s, H8 & H8'), 7.51(1H, s, H3''), 7.98(1H, s, H5''), 8.04(1H, s, H7'').

Theaflavin 3-O-gallate (7)

1H -NMR (d_6 -Acetone) δ (ppm) : 2.91-3.10(4H, m, H4 & H4'), 4.55 (1H, br.d, $J=2.75$, H3'), 5.26(1H, br.s, H3), 4.99(1H, s, H2), 5.74 (2H, s, H2 & H2'), 6.03(1H, d, $J=2.29$, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.04(1H, d, $J=2.29$, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.04(1H, s, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.05(1H, s, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.87(2H, s, gallate), 7.53(1H, s, H3''), 7.86(1H, s, H5''), 8.03(1H, s, H7'').

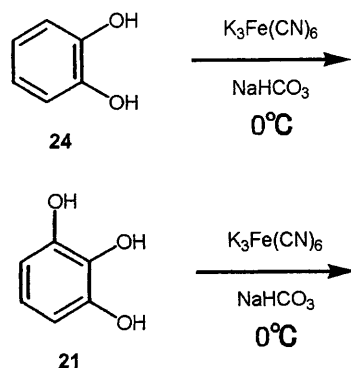
Theaflavin 3'-O-gallate (8)

¹H-NMR (d₆-Acetone) δ (ppm) : 2.89-3.26(4H, m, H4 & H4'), 4.45 (1H, br.s, H3), 5.10(1H, s, H2), 5.80(1H, br.d, H3'), 6.00 (1H, s, H2'), 6.01(1H, d, J=2.29, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.06 (1H, d, J=2.29, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.10(1H, s, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.15(1H, s, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.98(2H, s, gallate), 7.59(1H, s, H3''), 8.04(1H, s, H5''), 8.07(1H, s, H7'').

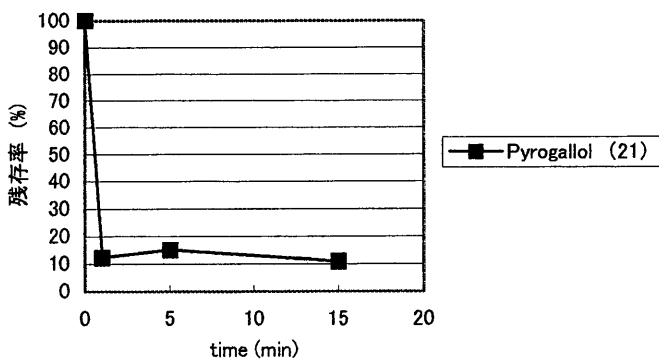
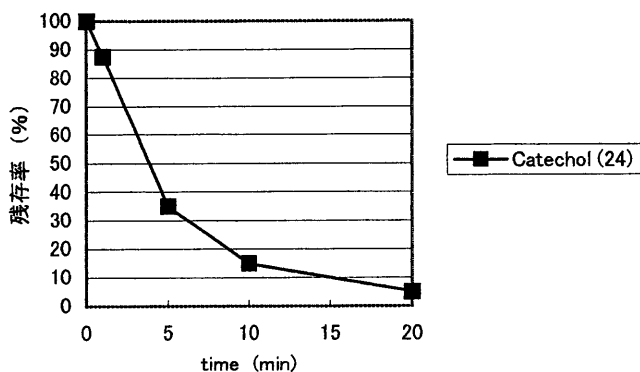
Theaflavin 3,3'-di-O-gallate (9)

¹H-NMR (d₆-Acetone) δ (ppm) : 2.94-3.31(4H, m, H4 & H4'), 5.39 (1H, br.s, H2), 5.76(1H, s, H3'), 5.80(1H, s, H3'), 6.05 (1H, s, H2'), 6.04(1H, d, J=2.29, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.07 (1H, d, J=2.29, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.09(1H, s, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.11(1H, s, H6 or 6' or 8 or 8'), 6.94(2H, s, gallate), 6.98(2H, s, gallate), 7.69(1H, s, H3''), 7.93(1H, s, H7''), 7.98(1H, s, H5'').

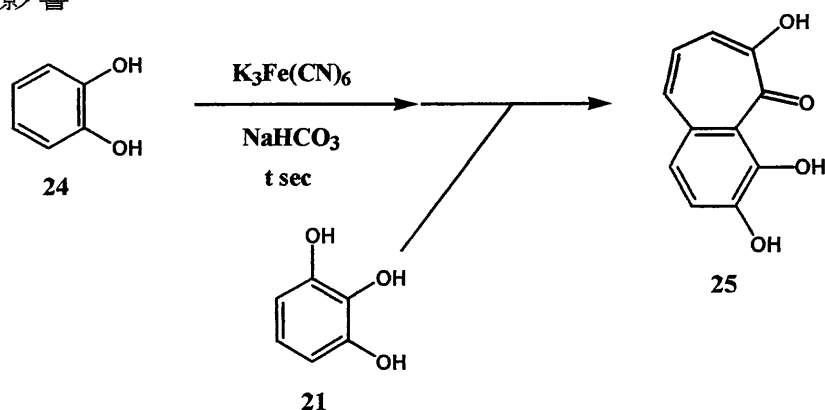
実験 12 Catechol (24)及び Pyrogallol (21)の酸化速度



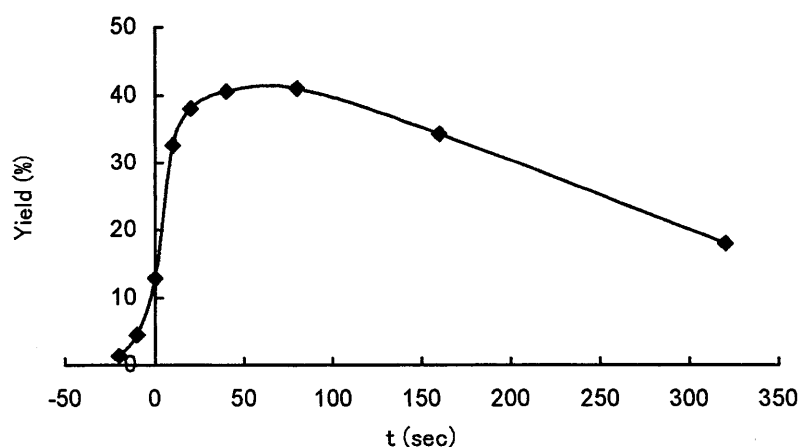
10ml 容のナスフラスコに 3 当量の $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ と 7 当量の NaHCO_3 をはかりとり、水 0.4ml に溶解した。0°C で 5 分間攪拌後 20 μl の水に溶解した、Catechol (24) 1.10mg または Pyrogallol (21) 1.26mg を添加し、0°C で反応させた。(24)及び(21)の減少の様子を HPLC (NN-ODS-5 4.6 ϕ × 250mm, Solv:55% CH_3OH , 1% AcOH in H_2O または 10% CH_3OH , 1% AcOH in H_2O) で追跡した。



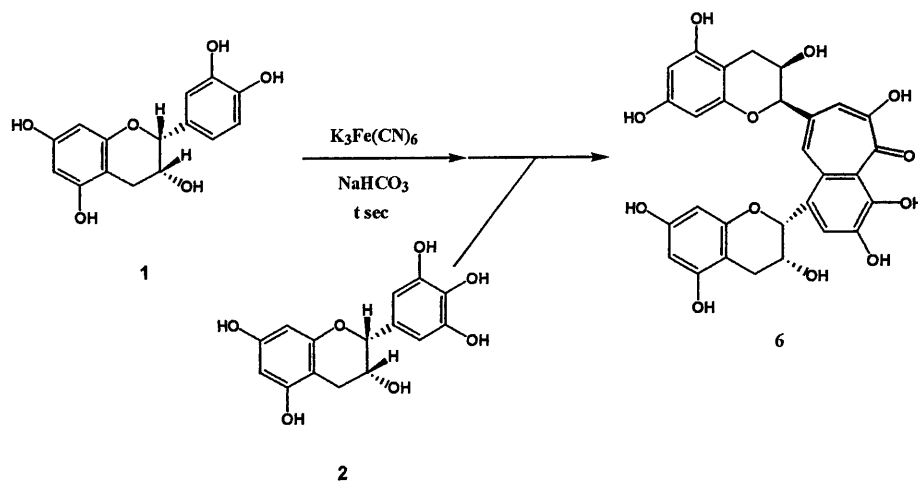
実験 13 Catechol (24)と Pyrogallol (21)添加法の収率に与える影響



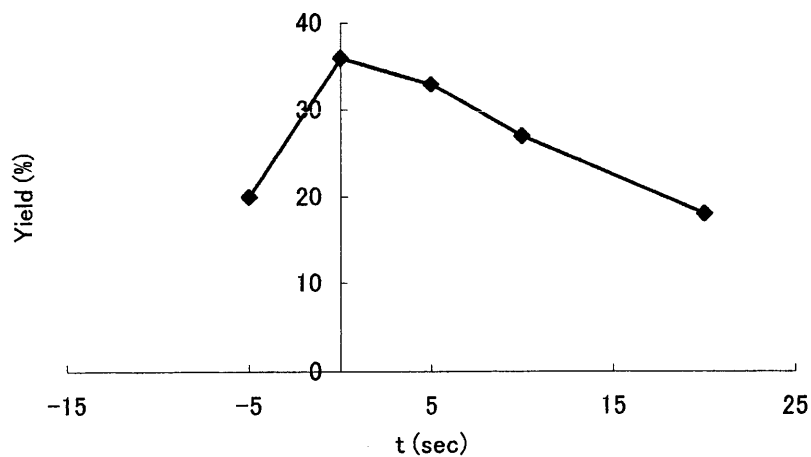
5ml 容の試験管に 3 当量の $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ と 7 当量の NaHCO_3 をはかりとり、水 0.44ml に溶解した。0℃で 5 分間冷却した後、水 20 μl に溶解した Catechol (24) 1.1mg を添加し、t 秒間後 20 μl に溶解した Pyrogallol (21) 1.26mg を添加した。0℃で 15 分間反応させた後、酢酸 0.1ml 及び酢酸エチル 0.5ml を添加し、抽出した。酢酸エチル層 10 μl を HPLC で分析した。なお $t=10\sim 80$ とし、生成するベンゾトロポロンの収率の変化をグラフに示した。



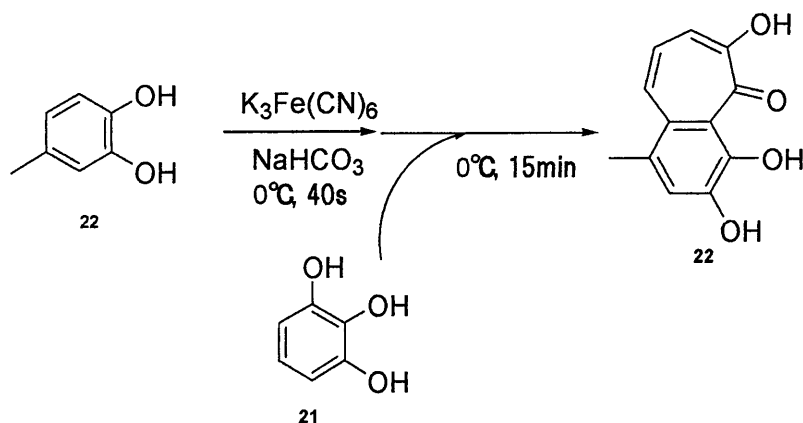
実験 14 EC (1)と EGC (2)添加法の Free Theaflavin(6)の収率に
与える影響



10ml 容のナスフラスコに 3 当量の $K_3Fe(CN)_6$ と 7 当量の $NaHCO_3$ をはかりとり、水 0.4ml に溶解した。0℃で 5 分間冷却した後、ジオキササン 40 μ l に溶解した EC (1) 2.9mg を添加し、t 秒間後 40 μ l に溶解した EGC (2) 3.1mg を添加した。0℃で 15 分間反応させた後、酢酸 0.1ml 及び酢酸エチル 0.5ml を添加し、抽出した。濃縮後、メタノール 1ml で溶解しその内 10 μ l を HPLC で分析した。なお $t = -5 \sim 20$ として、生成する Free Theaflavin(6) の収率の変化をグラフに示した。



実験 15 化合物(22)の合成

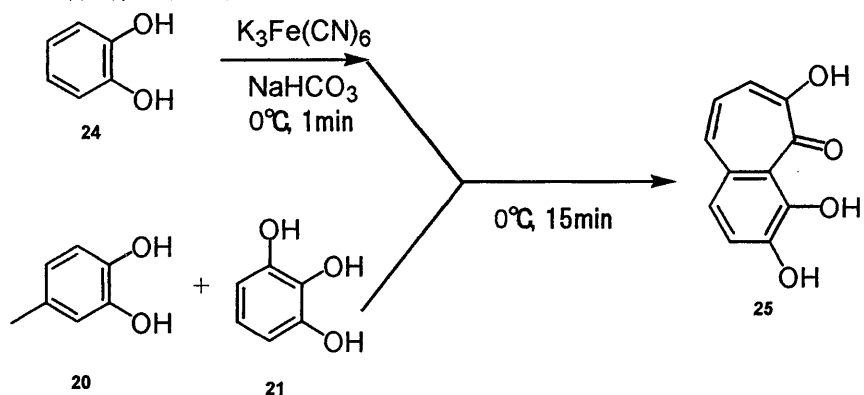


100ml 容のナスフラスコに、594mg の $K_3Fe(CN)_6$ と 352.8mg の $NaHCO_3$ と水 29ml を入れて溶解した。 $0^\circ C$ に冷却後、水 0.4ml に溶解した 4-Methylcatechol (20) 74.4mg を添加し、 $0^\circ C$ で 40 秒間攪拌後 Pyrogallol (21) 25.2mg を水 0.4ml に溶解して添加してさらに $0^\circ C$ で 5 分間反応させた。反応終了後、酢酸と EtOAc を添加して抽出後濃縮し、残渣は MeOH で結晶化した(24.1mg)。ろ液は逆相系 HPLC (NB-ODS-9, $10\phi \times 250mm$ 、溶媒 60%MeOH, 1%AcOH / H_2O) で分取した(10.6mg)。収率 80%。

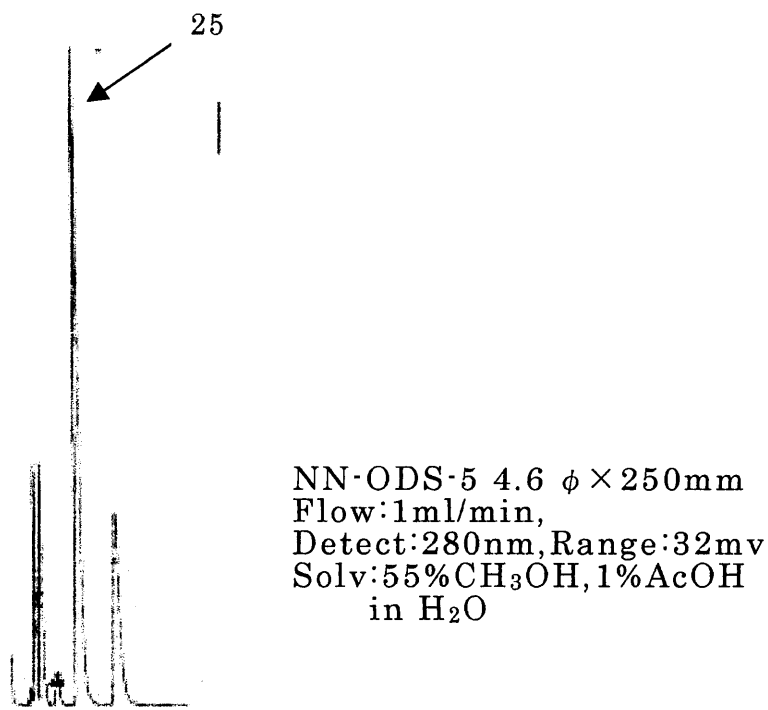
6-Dimethyl benzotropolone (22) :

m.p. 210° (165° 昇華), MS (EI-DI) : m/z 218 (M^+), 1H -NMR (d_6 -Acetone) δ (ppm) : 2.63(3H, s, C_{12} -H), 6.89(1H, dd, $J=11.9$, 9.38, C_4 -H), 7.26(1H, d, $J=9.38$, C_3 -H), 7.44(1H, s, C_8 -H), 7.72(1H, d, $J=11.9$, C_5 -H).

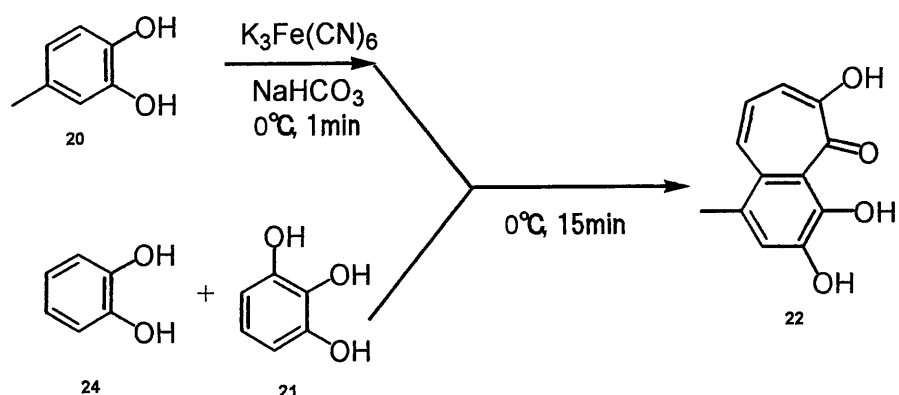
実験 16 生成機構の証明 I



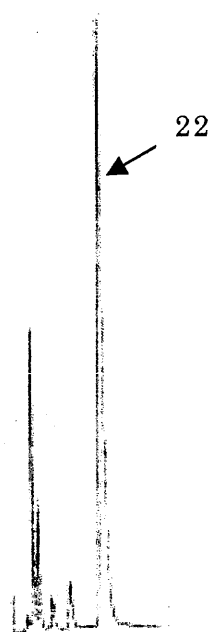
10ml 容のナスフラスコに、Catechol (24) 2.2mg を量り取り水 3.0ml で溶解した。0°C に冷却後、19.8mg の $K_3Fe(CN)_6$ と 11.8mg の $NaHCO_3$ を水 0.6ml に溶解して添加した。0°C で 1 分間後 4-Methylcatechol (20) 2.5mg と Pyrogallol (21) 2.5mg を水 40 μl に溶解して添加してさらに 0°C で 15 分間反応させた。反応終了後、酢酸 0.1ml と EtOAc 2ml を添加し抽出後、EtOAc 層を HPLC で分析した。以下に HPLC チャートを示した。



実験 17 生成機構の証明 II

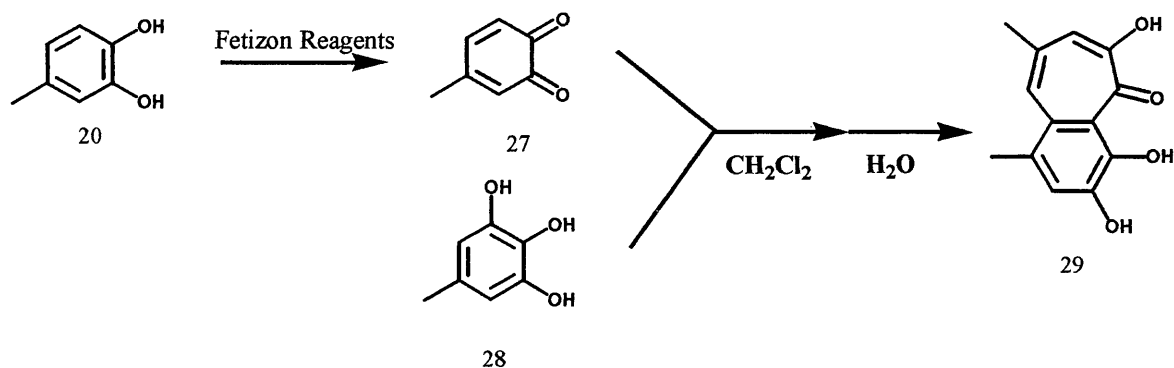


10ml 容のナスフラスコに、4-Methylcatechol (20) 2.5mg を量り取り水 3.0ml で溶解した。0°C に冷却後、19.8mg の $K_3Fe(CN)_6$ と 11.8mg の $NaHCO_3$ を水 0.6ml に溶解して添加した。0°C で 1 分間後 Catechol (24) 2.2mg と Pyrogallol (21) 2.5mg を水 40 μ l に溶解して添加してさらに 0°C で 15 分間反応させた。反応終了後、酢酸 0.1ml と EtOAc 2ml を添加し抽出後、EtOAc 層を HPLC で分析した。以下に HPLC チャートを示した。



NN-ODS-5 4.6 ϕ \times 250mm
 Flow: 1ml/min,
 Detect: 280nm, Range: 32mv
 Solv: 55% CH_3OH , 1% $AcOH$
 in H_2O

実験 18 o-キノンからのベンゾトロポロン環の合成

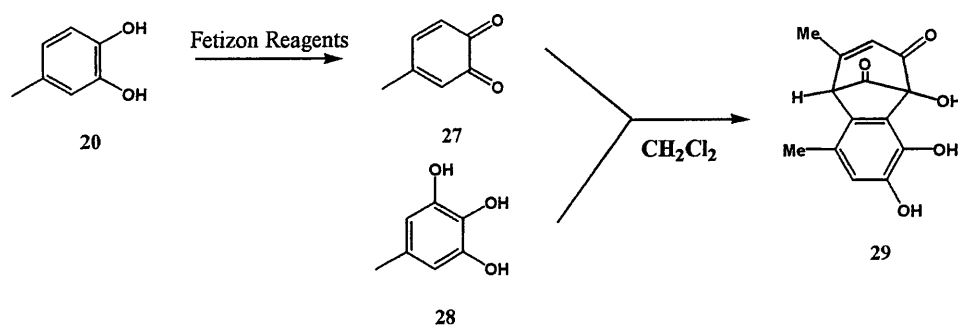


10ml ナスフラスコに Fetizon 試薬 230.6mg はかり、ベンゼンで共沸した。活性アルミナで乾燥した塩化メチレン 1.6ml を加え 0℃ に冷却後、4-Methylcatechol (20) 18.6mg を添加して 0℃ で 10 分間反応させた。反応終了後セライトろ過により Fetizon 試薬を除去し、濃縮した。得られた o-Quinone (27) を活性アルミナで乾燥した塩化メチレン 1.6ml を加えて溶解し氷浴中で 0℃ に冷却した。それに 5-Methylpyrogallol (28) 7mg をエーテル 32 μ l に溶解して添加し 2 時間反応させた。反応終了後濃縮し、水を添加して 30 分攪拌し、析出した結晶をろ取した。8.9mg (収率 76.7%)。またろ液は濃縮し逆相系 HPLC (NB-ODS-9, 10 ϕ × 250mm、65%MeOH, 1%AcOH / H₂O) で分取した。3.1mg(26.7%)。

4,7-Dimethyl benzotroporone (29)

m.p. 228° (174° 昇華), MS (EI-DI) : m/z 232 (M⁺), ¹H-NMR (d₆-Acetone) δ (ppm) : 2.41(3H, s, H12 or H13), 2.53(3H, s, H12 or H13), 7.13(1H, s, H3), 7.37(1H, s, H8), 7.47(1H, s, H5). ¹³C-NMR (d-DMSO) δ (ppm) : 22.2 (13), 27.0(12), 121.3 (11), 125.2 (5), 127.9 (7), 128.5 (3), 129.3 (6), 131.8 (4), 144.7 (10), 148.7 (9), 154.0 (2), 184.0 (1).

実験 19 Bicyclo-intermediate (30)の合成

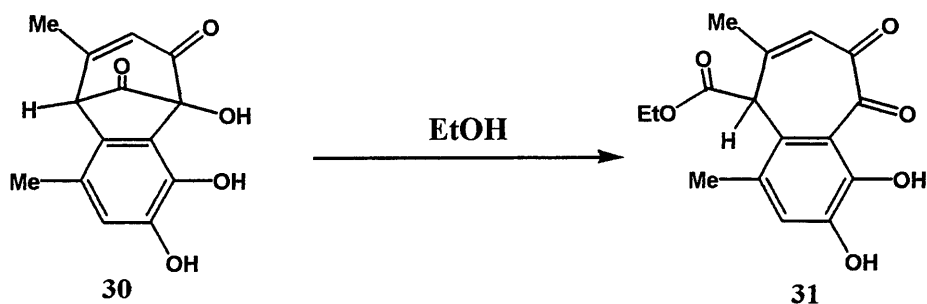


10ml ナスフラスコに Fetizon 試薬 615mg 量り、ベンゼン 2ml で共沸した。活性アルミナで乾燥した塩化メチレン 4.4ml を加え 0℃に冷却後、4-Methylcatechol (20) 49.6mg を添加して 0℃で 10 分間反応させた。反応終了後セライトろ過により Fetizon 試薬を除去し、濃縮した。得られた o-キノンを活性アルミナで乾燥した塩化メチレン 1.6ml を加えて溶解し氷浴中で 0℃に冷却した。それに 5-Methylpyrogallol (28) 28mg をエーテル 88 μl に溶解して添加し 2 時間反応させた。反応終了後、白色の析出物(30)をろ取した。33.1mg (収率 64%)。

Bicyclo-intermediate (30)

m.p. 169° , MS (EI-DI) : m/z 260, ¹H-NMR (d₆-Acetone) δ (ppm) : 2.30(3H, d, J=0.7, H14), 2.35 (3H, d, J=1.4, H13), 4.37(1H, d, J=1.1, H5), 5.92 (1H, quin, J=1.4, H3), 6.08(1H, br.s, OH), 6.62(1H, d, J=0.46, H8), 7.43(1H, br.s, OH), 7.93(1H, br.s, OH). ¹³C-NMR (d₆-Acetone) δ (ppm) : 17.5 (14), 23.9 (13), 57.4 (5), 92.3 (8), 117.5 (7), 123.0 (4), 124.9 (11), 128.6 (13), 128.9 (6), 145.2 (9), 166.6 (10), 191.2 (2), 197.6 (12).

実験 20 Bicyclo-intermediate と EtOH の反応

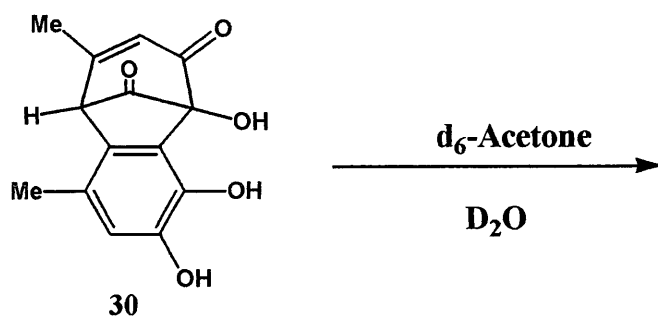


実験 13 で得られた、Bicyclo-intermediate (30)に、約 40 倍量のエタノールを加えた。なおこの化合物は室温ではエタノールに難溶性だが 70℃に加熱することですぐに溶解した。70℃80 分間反応後、濃縮し逆相系 HPLC (NB-ODS-9, 10 φ×250mm、溶媒 45%MeOH, 1%AcOH / H₂O) で分析及び分取を行った。

化合物 (31)

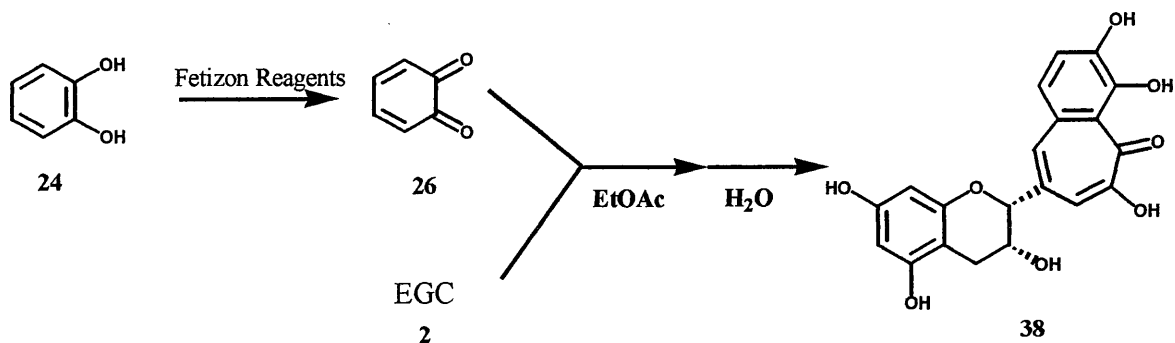
MS (EI-DI) : m/z 304 (M⁺), 276, 231, 203, 175, ¹H-NMR (d₆-Acetone) δ (ppm) : 1.11(3H, t, J=7.09, H14), 2.24 (3H, s, H15), 2.37(3H, s, H16), 3.99-4.08 (2H, m, H13), 4.86(1H, s, H5), 6.20(1H, s, H3), 6.92(1H, s, H8). ¹³C-NMR (d₆-Acetone) δ (ppm) : 14 (14), 20 (16), 27 (15), 54 (5), 64 (13), 120 (11), 123 (8), 126 (6), 128 (7), 129 (3), 146 (9), 150 (10), 155 (4), 173 (12), 184 (2), 189 (1).

実験 21 N₂ 気流下における Bicyclo-intermediate と水の反応



実験 13 で得られた、Bicyclo-intermediate(30)1.7mg を、窒素気流下で 0.45ml の d₆-Acetone に溶解し窒素置換した NMR 用サンプル管に入れた。0.15ml の D₂O を添加し、よく混合した後封管した。室温で放置し NMR で追跡した。その結果、はじめに極少量の 4,7-Dimethyl-benzotroporone (29)が生成したがそれ以上の増加は見られず、30 の複数の分解物と見られるピークの増大が観察された。

実験 22 Categallin (38)の合成

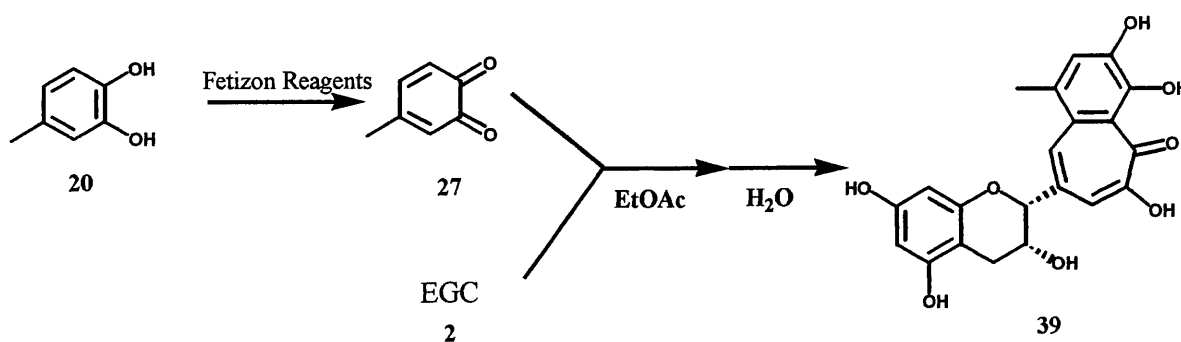


30ml ナスフラスコに Fetizon 試薬 230mg はかり、ベンゼン 1ml で共沸した。活性アルミナで乾燥した塩化メチレン 1.5ml を加え 0℃ に冷却後、Catechol (24) 16.5mg を添加して 0℃ で 10 分間反応させた。反応終了後セライトろ過により Fetizon 試薬を除去し、濃縮した。得られた o-キノンに EtOAc 1.5ml を加えて溶解し氷浴中で 0℃ に冷却した。それに EGC (2) 28mg を Dioxan 200 μ l に溶解して添加し 2 時間反応させた。続いて、水 2ml を添加し室温で攪拌して析出した結晶をろ過した。13.9mg (収率 72%)。ろ液は逆相系 HPLC (NB-ODS-9, 10 ϕ \times 250mm、溶媒 50%MeOH, 1%AcOH /H₂O) で分取した。2.9mg (収率 15%)。

Benzotroporone (38)

m.p. 205℃, ¹H-NMR (d₆-Acetone) δ (ppm): δ 2.76 (1H, br. d, J=16.8, C₄-H), 2.84 (1H, dd, J=4.2 & 16.8, H₄), 4.25 (1H, br. s, H₃), 4.85 (1H, br. s, H₂), 5.88 (1H, d, J=2.3, H₆ or H₈), 5.95 (1H, d, J=2.3, H₆ or H₈), 7.35 (1H, d, J=8.6, H_{6'}), 7.38 (1H, d, J=8.6, H_{7'}), 7.53 (1H, s, H_{5'}), 7.66 (1H, s, H_{3'}), UV λ_{max} (CH₃CN) nm (ϵ): 260 (19,000), 278 (19,000), 373 (9,300), 452 (3,700), IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3391 (OH), 1611 (C=O).

実験 23 6'-Methyl-Categallin (39) の合成

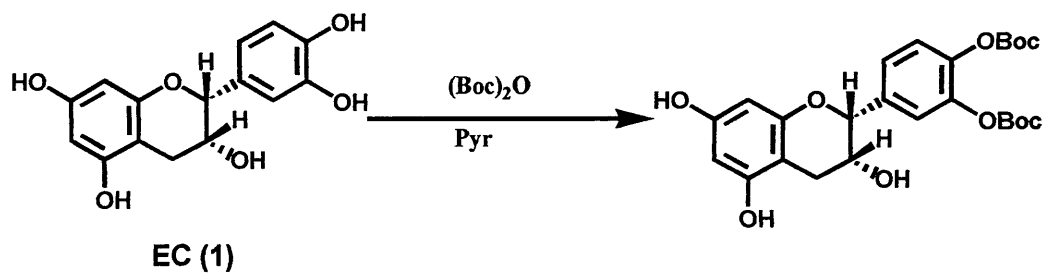


30ml ナスフラスコに Fetizon 試薬 231mg はかり、ベンゼン 1ml で共沸した。活性アルミナで乾燥した塩化メチレン 1.6ml を加え 0℃に冷却後、4-Methylcatechol (20) 18.6mg を添加して 0℃で 10 分間反応させた。反応終了後セライトろ過により Fetizon 試薬を除去し、濃縮した。得られた o-キノンを EtOAc 1.6ml を加えて溶解し氷浴中で 0℃に冷却した。それに EGC (2) 15.5mg を Dioxan 200 μ l に溶解して添加し 30 分間反応させた。続いて、水 2ml を添加し室温で 1 時間攪拌して析出した結晶をろ過した。15.2mg (収率 76.4%)。ろ液は逆相系 HPLC (NB-ODS-9, 10 ϕ \times 250mm、溶媒 50%MeOH, 1%AcOH / H₂O) で分取した。1.2mg (収率 6.0%)。

Benzotroporone (39)

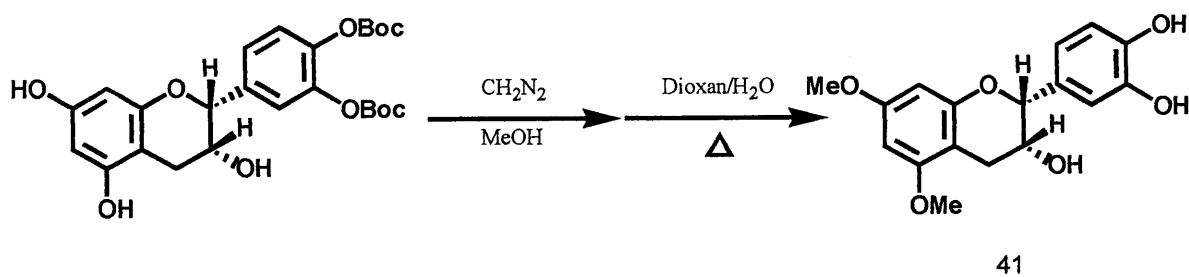
m.p. 270℃, ¹H-NMR (d₆-Acetone, 500MHz) : δ 2.63 (3H, s, -CH₃), 2.79 (2H, br.d, J=16.8, H4), 4.40 (1H, br. s, H3), 5.07 (1H, br. s, H2), 6.02 (1H, d, J=2.3, H6 or H8), 6.07 (1H, d, J=2.3, H6 or H8), 7.47 (1H, s, H3'), 7.64 (1H, s, H7'), 8.03 (1H, s, H5'), UV λ_{\max} (CH₃CN) nm (ϵ) : 270 (19,000), 382 (9,500), 496 (3,700), IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹ : 3426 (OH), 1626 (C=O).

実験 24 EC (1)への保護基の導入



10ml 容のナスフラスコに、EC(1) 151mg を入れピリジン 1.5ml に溶解した。これに(Boc)₂O を 0.36ml 加え室温で 5 分間反応させた。反応終了後、抽出(EtOAc/H₂O)して濃縮した。残渣はシリカゲルオープンカラム (M 300H, EtOAc:Hex=1:1) を行い EC の B 環部 Boc 保護体 106.9mg を得た(収率 42%)。

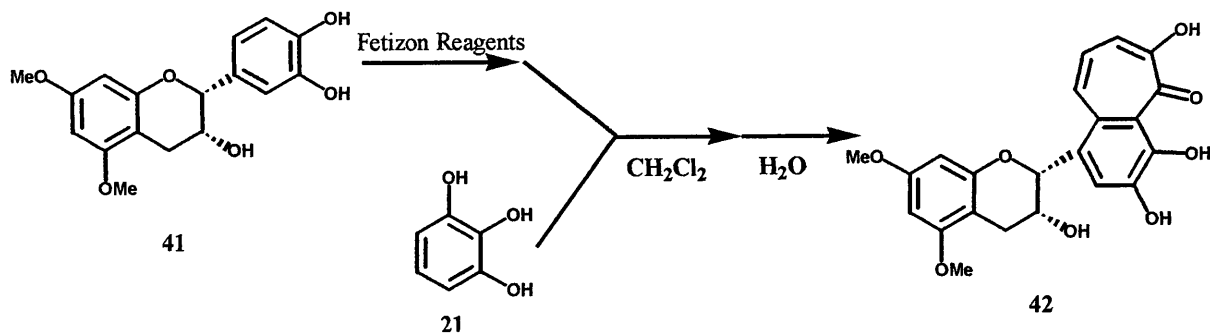
実験 25 5,7-di-O-methyl-EC (41)の合成



10ml 容のナスフラスコに、実験 20 で合成した 3',4'-di-O-Boc-EC をメタノール 3.5ml に溶解し、ジアゾメタンエーテル溶液を随時添加しながら一晩反応させた。反応終了後濃縮し、シリカゲルオープンカラム (M 300H, EtOAc:Hex=2:3) で精製した。(収率 68%)

得られたメチル体を 20ml 容のナスフラスコに移し、Dioxan 1.6ml、H₂O 1.6ml を加えた。これを 80℃で 2 時間反応させた。反応終了後、濃縮して pTLC (EtOAc:Hex=1:1) にて精製した。(収率 98%)

実験 26 化合物 (42) の合成



10ml ナスフラスコに Fetizon 試薬 28.5mg はかり、ベンゼン 0.5ml で共沸した。活性アルミナで乾燥した塩化メチレン 0.5ml を加え 0°C に冷却後、化合物(41)を塩化メチレン 0.1ml に溶解して 5.8mg 添加した。 0°C で 20 分間反応させた後セライトろ過により Fetizon 試薬を除去し、活性アルミナで乾燥した塩化メチレン 0.4ml で洗いこんだ。その *o*-キノン溶液を氷浴中で 0°C に冷却し、Pyrogallol (21) 0.77mg をエーテル $20\ \mu\text{l}$ に溶解して添加して 80 分間反応させた。続いて、水 0.5ml を添加し室温で 1 時間攪拌した後濃縮した。残渣は逆相系 HPLC (NB-ODS-9, $10\ \phi \times 250\text{mm}$ 、溶媒 65%MeOH, 1%AcOH/ H_2O) で分取した。1mg (収率 40%)。

化合物(42)

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -Acetone, 500MHz): δ 3.78(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.83(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.44(1H, brs, H3), 5.76(1H, brs, H2), 6.18(2H, s, H6, H8), 6.95(1H, t, $J=9.4$, H4), 7.30(1H, d, $J=9.4$, H5'), 7.80(1H, d, $J=9.4$, H3'), 8.08(1H, s, H7').

文献

・茶カテキン類

1. 「茶の科学」松村敬一郎編 朝倉書店
2. Nishioka, I. et al. : Tannins and Related compounds. LIV. Isolation of four new acylated Flavan-3-ols from Oolong Tea (1). Chem. Pharm. Bull., 35 (2), 611~616, 1987.
3. Saijo, R.: Isolation and chemical structures of Two new catechins from fresh tea leaf. Agric. Biol. Chem., 46 (7), 1969~1970, 1982.
4. Saijo, R. et al. : Antioxidative activity of (–)-Epigallocatechin-3-(3'')-O-methylgallate. Isolated from fresh tea leaf and preliminary results on its biological activity. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64 (10), 2218~2220, 2000.
5. Yamamoto, M. M. et al. : Novel antiallergic catechins perivatives isolation from Oolong tea. J. Agric. Food Chem., 47, 1906~1910, 1999.

・紅茶テアフラビン類

6. Roberts, E. A. H. : Oxidative condensation of flavonols in tea fermentation. Chem. & Ind., 1355-1356, 1957.
7. Roberts, E. A. H. : The chemistry of Tea manufacture. Sci. Food Agric., 9, 381-390, 1958.
8. Roberts, E. A. H., Myers, M.: Phenolic substances of manufactured tea VI. Preparation of theaflavin and theaflavin gallate. Sci. Food Agric., 10, 176-179, 1959.
9. Roberts, E. A. H. : Economic importance of flavonoid substances, tea fermentation. Chem. Flavonoid Compds. 468-512, 1962.
10. Takino, Y., Ferretti, A., Flanagan, V., Gianturco, M. A., Vogel, M. : Structure of

- Theaflavin, a polyphenol of black tea. *Tetrahedron Lett.*, 4019-4025, 1965.
11. Ollis, W. D., Brown, A. G., Haslam, E., Falshaw, C. P., Holmes, A. : The constitution of theaflavin. *Tetrahedron Lett.*, 1193-1204, 1966
 12. Girard, A.: *Ber.*, 2, 562-563, 1869.
 13. Evans, T. W., Dehn, W. M.: Organic oxidation by iodic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 3647-3649, 1930.
 14. 村上増雄, 鈴木洗次郎, 三島英一: プルプロガリン類似合成 (第1報)。日本化学雑誌, 75(6), 620-622, 1954.
 15. Takino, Y., Ferretti, A., Flanagan, V., Gianturco, M. A., Vogel, M. : Spectral evidence for the structure of three flavanotropolones related to theaflavin, an orange-red pigment of black tea. *Can. J. Chem.*, 45, 1949-1956, 1967.
 16. Takino, Y., Imagawa, H.: Studies on the oxidation of Myricetin Glycosides by Tea Oxidase. Formation of Erycitin, a New Red-colored Glycoside, having a benzotropolone nucleus. *Agr. Biol. Chem.*, 27(9), 666-669, 1963.
 17. Takino, Y., Imagawa, H.: studies on the oxidation of catechins by tea oxidase. Formation of crystalline reddish orange pigment of benzotropolone nature. *Agr. Biol. Chem.*, 27(4), 319-321, 1963.
 18. Takino, Y., and Imagawa, H.: Studies on the mechanism of tea leaf catechins. Part IV. Formation of categallin and pyrogallin, new compounds of benzotropolone nature derived from epigallocatechin. *Agr. Biol. Chem.*, 28(2), 125-130, 1964.
 19. Colier, P. D., Bryce, T., Mallow, R., Thomas, P. E., Frost, D. J., Korver O., Wilkins, C. K. : The theaflavins of black tea. *Tetrahedron*, 29, 125-142, 1972.
 20. Salfeld, J. C.: Zum Reaktions mechanismus der Purpurogallin-Bildung. *Angew. Chem.*, 69, 723, 1957.
 21. Horner, L., Durckheimer, W., o-Quinones XV. The mechanism of purpurogallin

- formation. *Z. Naturforsch.*, 14b, 744-746, 1959.
22. Takino, Y., Imagawa, H., Horikawa, H., Tanaka, A.: Studies on the mechanism of the oxidation of Tea leaf catechins .part III. Formation of Reddish orange pigment and its spectral relationship to some benzotropolone derivatives. , *Agr. Biol. Chem.*, 28(1), 64-71, 1964.
 23. Tanaka, T., Mine, C., Inoue, K., Matsuda, M., Kouno, I. : Synthesis of theaflavin from EC and EGC by plant homogenates and Role of EC quinone in the synthesis and degradation of theaflavin. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2142-248, 2002.
 24. Haslam, E. : Thoughts on thearubigins., *Phytochem.* , 64, 61~73, 2003.
 25. Horner, L., Dürckheimer, W.: *o*-Quinones. XIII. Dimerization principles of *o*-benzoquinones. *Z. Naturforsch.*, 14b, 742-743, 1959.
 26. Horner, L., Dürckheimer, W.: *o*-Quinones. XIV. Benzotropolons from *o*-quinones. *Z. Naturforsch.*, 14b, 743-744, 1959.
 27. Horner, L., Dürckheimer, W., Weber, K-H., Dolling, K. : *o*-Quinones. XXIV. Synthesis, structure, and properties of 1', 2'-dihydroxy-6, 7-benzotropolone. *Chem. Ber.*, 97, 312-324, 1964.
 28. Balogh, V., Fétizon, M., Golfier, M.: Oxidations with silver carbonate/celit. V. Oxidation of phenols and related compounds; *J. Org. Chem.*, 36(10), 1339-1341 1971.
 29. Durckheimer, W., Paulus, Erich F. : Mechanism of purpurgallin formation : an adduct from 3-hydroxy-*o*-benzoquinone and 4, 5-dimeethyl-*o*-benzoquinone. *Angew. Chem.*, 97, 219, 1985.
 30. Coxon, D. T., Holmes, A., Ollis, W. D.: Theaflavic and epitheaflavic acid. *Tetrahedron Lett.*, 60, 5247-5250, 1970.
 31. Nonaka, G., Hashimoto, F. Nishioka, I.: Tannins and related compounds.

XXXVI. Isolation and structures of theaflagallins, new red pigments from black tea. *Chem. Pharm. Bull.*, 34(1), 61-65, 1986.

謝辞

平成7年に、卒論生としてこの生物有機化学研究室に配属され、丸10年が過ぎました。あのころは、10年後この研究室にいるとは思っていませんでした。ちょうど農芸化学会が北海道で開催された年で、発表に出かける先輩をとてもうらやましく思って、また北海道での学会が10年に1度と聞いてとてものがっかりしたことをよく覚えています。今年その10年目で、やはり学会は北海道で行われました。時の流れというのは本当に早いものだと実感しております。

博士課程2年の途中、平成11年5月には助手に採用していただきました。立場が変わり研究以外の仕事が増え、思うようにいかず戸惑うことが多い中、中塚進一教授には在学中と変わらずご指導いただき大変感謝しております。6年が経過した今、ここに博士論文として研究成果をまとめることが出来たことをとても嬉しく思っております。

また、私の博士論文審査にあたり副査としてご指導いただきました篠田善彦先生、信州大学の茅原紘先生、静岡大学の河合真吾先生に深く感謝いたします。

最後に、この10年間一緒に研究をしてくださった生物有機化学研究室的の皆様に御礼申し上げます。

平成17年6月18日

柳 瀬 笑 子