

植物ポリフェノールに関する化学的研究とその紅茶色素生成機構解明への展開

田中 隆

Chemical Studies on Plant Polyphenols and Formation of Black Tea Polyphenols

Takashi TANAKA

Graduate School of Biomedical Sciences, Division of Natural Product Chemistry,
Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki City 852-8521, Japan

(Received April 28, 2008)

Recent biological and pharmacological studies strongly suggested that plant polyphenols in foods, beverages and crude drugs have various health benefits. However, still there are chemically uncharacterized polyphenols, especially those with large molecular weights. The typical example is black tea polyphenols. Four tea catechins of fresh tea leaves are enzymatically oxidized in tea fermentation process of black tea manufacture to give a complex mixture of the oxidation products. Despite many efforts since 1950's, major part of the black tea polyphenols has not been clarified yet. We have investigated the oxidation mechanism of each catechin by employing a newly developed *in vitro* model fermentation system. The oxidation was initiated by enzymatic dehydrogenation of catechins, and subsequent intermolecular quinone-phenol coupling reactions followed by cascade-type degradation of the unstable products resulted in the formation of complex black tea polyphenols. Besides black tea polyphenols, this review introduces the chemistry of insolubilization of persimmon proanthocyanidins, wood polyphenols in connection with whisky polyphenols, and co-polymerization of cinnamaldehyde and proanthocyanidins in cinnamon bark.

Key words—polyphenol; black tea; proanthocyanidin; catechin; tannin

1. はじめに

本総説では、筆者が携わってきたタンニン¹⁾及びポリフェノールに関する化学的研究の中から、植物の生きざまと人との係わりに関連するテーマを選んで紹介する。植物界に非常に広く分布し、様々な葉草や食品の健康維持効果を持つ成分として世界的に注目され続けている植物ポリフェノールであるが、化学的にいまだ解明されていない事柄も多く残されており、可能性を秘めた未利用のポリフェノール資源も多くある。われわれはそれらを対象にした基礎的研究や、応用を目指した試行錯誤の過程で多くの興味深い知見を得ることができた。本総説では構造解析研究について概観したのち、渋柿が甘くなるメカニズム、木材のポリフェノールからウイスキー成

分研究への展開、いまだに多くの成分が未解明のまま残されている紅茶ポリフェノールを、その生成機構を解明することで理解しようとする研究、さらにこれらと関連して最近明らかになった桂皮の高分子ポリフェノールについても述べる。

2. 植物ポリフェノールの分離構造解析研究

ダイオウの血中尿素窒素減少作用²⁻⁷⁾を端緒に始まった九州大学の西岡、野中らによるタンニン・ポリフェノールに関する化学的研究はその後めざましい展開をみせたが、筆者は幸運にもその初期から研究室の一員として分離構造解析に従事することができた。同じ頃いくつかの新しいクロマト担体が開発されたこともあって、それまで分離困難な厄介者とされていたタンニン類が、実は極めて多様な構造を持つ化学的に興味深い物質群であることが次々に明らかにされ、多くの共同研究によりそれらの生物活性についても知見が蓄積されていった。⁸⁾ 筆者が係わった構造解析としては、ワレモコウの加水分解型タンニンオリゴマー(1)、⁹⁻¹²⁾ 不安定で存在し得な

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬学系天然物化学
(〒852-8521 長崎市文教町 1-14)

e-mail: t-tanaka@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、平成19年度宮田記念学術論文賞の受賞を記念して記述したものである。

いと考えられていた分子間ビフェニル結合を持つ加水分解型タンニン二量体(2),^{13,14)} カテキンとエラジタンニンユニットを持つ高度に酸化されたタンニン(3),¹⁵⁾ タンニン-アスコルビン酸複合体類(4),^{16,17)} 生薬丹参の高度に酸化されたコーヒー酸代謝産物(5)¹⁸⁻²⁰⁾ など, 次々と新しい展開が続いた(Fig. 1). また, 共同研究を通して和漢薬成分²¹⁻²⁷⁾ や機能性天然物²⁸⁻³¹⁾ としてのタンニン・ポリフェノールの重要性を明らかにすることもできた. さらに, タンニン生合成における構造変化と水への溶解性の相関や, 共存成分との位置選択的な疎水性相互作用など, タンニン類が持つ多様な化学構造と物理化学的性質の関係についての知見も得た.³²⁻³⁵⁾ ところが, そのような研究を展開する中で, 薄層クロマトで明確なスポットにならず HPLC でもシャープなピークとして検出できないため, 単一構造の物質として取り出すことが困難なポリフェノールが存在し, 素材によってはそれらが主成分となっていることも分かってきた. これらは高分子ポリフェノールや, 性質が類似した複雑な類縁体の混合物と考えられるが, 化学的にはよく分からないのが現状で, 生

葉や食品の場合, 製造過程で生じる二次成分である場合もある. 以下, そのようなタンニンについて得た知見を述べる.

3. 渋柿が甘くなる理由—プロアントシアニジンの反応性を利用した柿の戦略—

ポリフェノールの中でタンニンと呼ばれるグループは, タンパク質と強く疎水会合してその機能を損なう性質を有し,³⁶⁾ 植物界に非常に広く分布していることから, 植物が進化の早い時期に獲得した防御物質とされている.³⁷⁾ 動物に食べられると唾液タンパク質と結合して口腔壁にざらざらした沈殿を形成することで不快な渋味を呈し,³⁸⁾ タンパク質の不溶化や酵素阻害などにより消化管機能を障害する. 渋柿はプロアントシアニジン (=縮合型タンニン) を防御物質とする典型的な植物で, 猿蟹合戦の猿のように動物は未熟な果実は食べない. しかし, 種子が発芽能力を持つと渋柿の渋味はなくなり, 動物に食べさせて種子を運ばせる. その渋味消失に成熟種子から分泌されるアセトアルデヒドが関与していることは示唆されていたが,³⁹⁻⁴¹⁾ 直接的な化学的証拠は得られていなかった. われわれは, 渋柿をアルコー

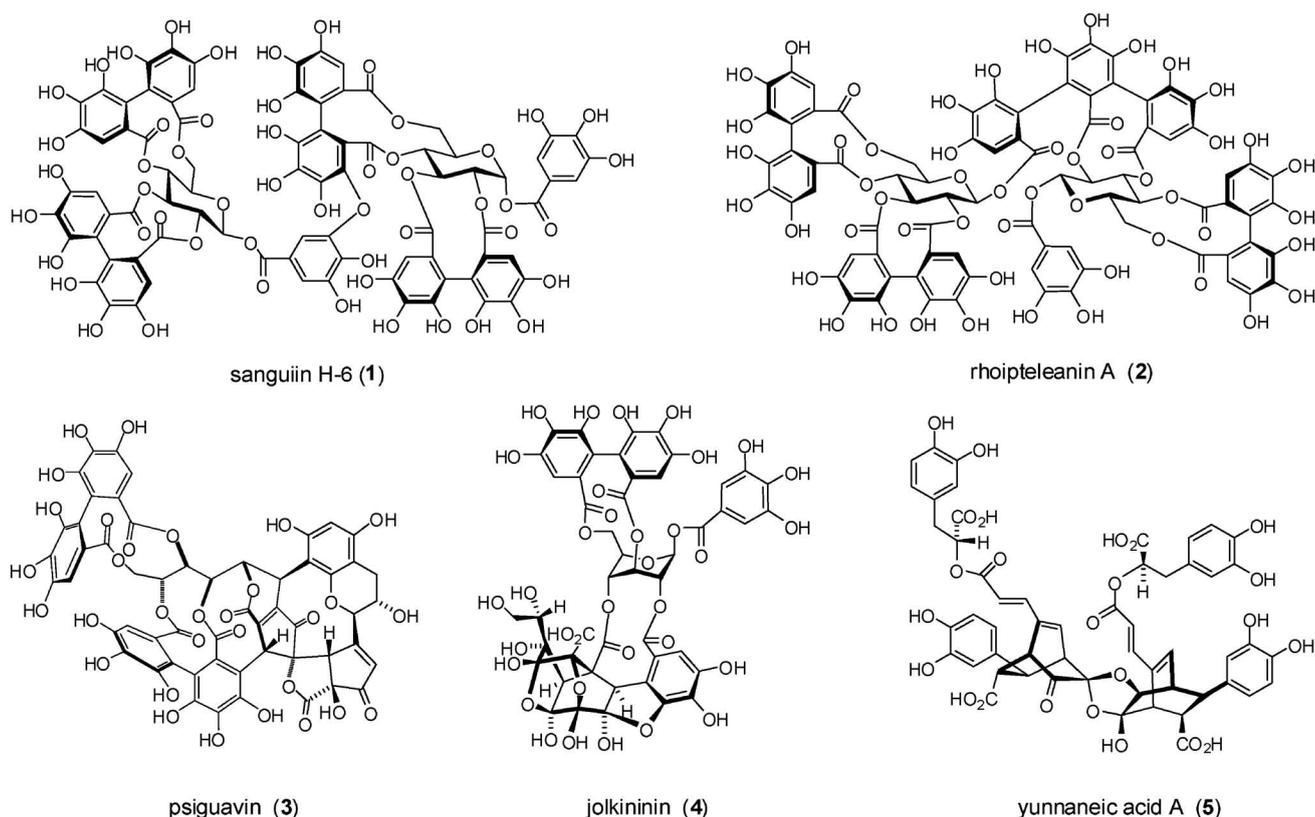


Fig. 1. Structures of Tannins and Related Polyphenols

ル処理する方法で渋抜きをして、その前後で柿タンニンをチオール分解法により断片化し (Fig. 2), 渋抜き後にタンニンが組織中に不溶化していることを確認した. さらに, 渋柿からはチオール分解で7しか得られないのに対して, 渋抜きした柿からは, 7に加えて C₂ ユニットが結合した断片 6 を取り出すことに成功した.⁴²⁾ その C₂ ユニットがアセトアルデヒド由来であることは, 重水素でラベルしたアルコールで渋抜きすると C₂ ユニットが重水素化されることで確かめられた. アセトアルデヒドはプロアントシアニジン分子の複数の場所で反応するので, 分子が網目状に架橋されてタンニン細胞内に不溶化すると思われる.

この研究はいくつか展開をみせた. まず, アルデヒドで重合したタンニンのチオール分解にヒントを得て, 本来水溶性のカテキンを脂溶性にした物質を合成した (Fig. 3).⁴³⁾ カテキンはラジカルによる脂質過酸化を抑制するが, カテキンが主に水溶性ラジカルを消去するのに対し, 得られた化合物は脂質二重膜上で水溶性ラジカルだけでなく脂溶性ラジカルに対しても強い消去作用を示した. もう1つの展開は, 柿タンニンのように分子量が大きく利用し難いプロアントシアニジンを低分子化してオリゴマーに変換する方法の開発である.⁴⁴⁾ 柿の研究で用いた有機合成用の試薬の代わりに, 食品として使用可能な物質のみを用いて高分子プロアントシアニジンを断片化することで, 食品に安心して使える機能性物質

を容易に製造可能とした (Fig. 4).

4. 木材のタンニンからウイスキーポリフェノールへ—タンニンのタイムカプセル—

樹木の樹皮については生物活性物質探索を目的とする多くの研究があるが, 材部についての成分研究は決して多くない. しかし, 天然物化学の視点から樹木の生きざまをみると興味深い. 樹皮との境界にある形成層で増殖した細胞はほとんどが導管などに分化して死んでしまい, 生きているのは柔細胞と呼ばれるわずかな細胞である. 柔細胞も光合成で作られた栄養分で生きているが, その栄養分は樹皮から供給されるため, 幹の成長肥大に伴い材の中心部に取り残された細胞は栄養の取り分が減り, ついには死んでしまう. ブナ科のクリ属やコナラ属植物 (オーク類) の木材ではその柔細胞が死ぬ間に多量のタンニンを合成する. タンニン類が抗菌作用を持つことはよく知られているが,^{45,46)} すべての細胞

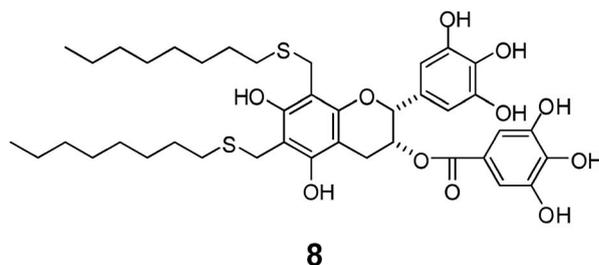


Fig. 3. A Lipophilic Derivative of (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate

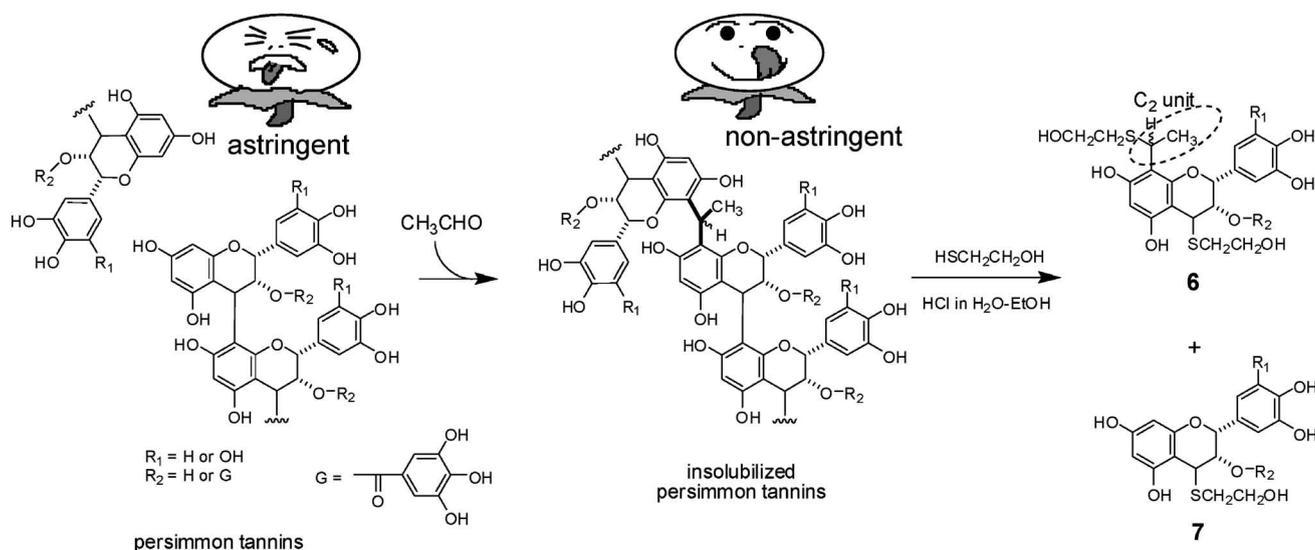


Fig. 2. Reaction of Persimmon Tannins with Acetaldehyde and the Thiol Degradation Products

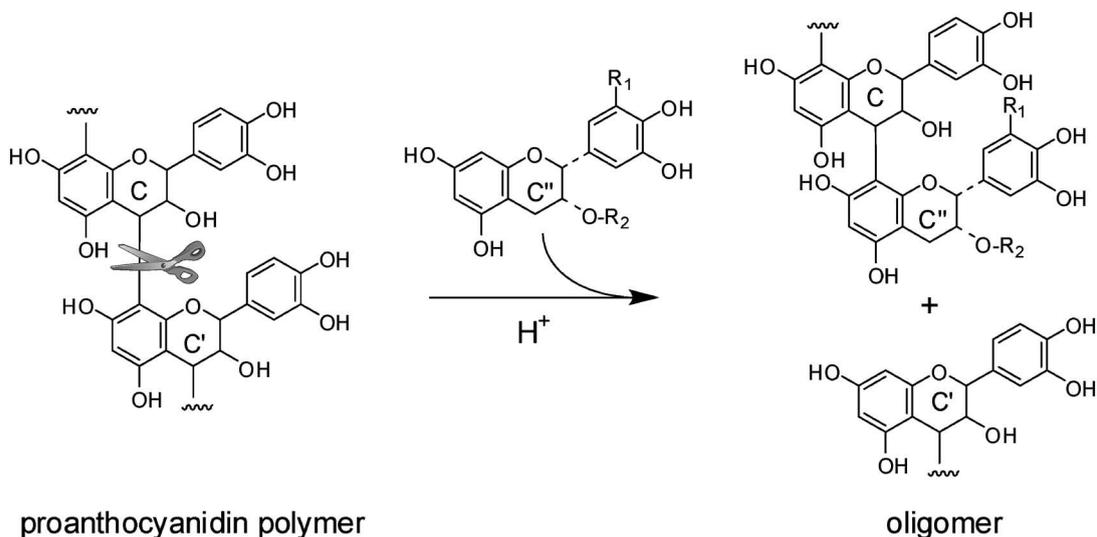


Fig. 4. Production of Proanthocyanidin Oligomers from Polymers

が死んでいるとされる心材には多量のタンニンが蓄積され木材の防腐材としての役割を担っている。樹齢の長い樹木の心材中央部にはタンニン類が生合成されて数十年間もタイムカプセルのごとく閉じ込められていることになる。われわれは、クリの材部について年輪毎にタンニン類を分析してみた。その結果、柔細胞のある辺材とそれが死んでしまった心材との境界に最も高濃度の castalagin (9) などのタン

ニンが蓄積され、それらは心材中心部では減少していた。その心材中心部ではタンニン類は部分的に加水分解と脱水を受け、他の部位にはない特異な castacrenin B (10) などに変化していた (Fig. 5).^{47,48)} クルミ科のノグルミでは辺材部に多いエラグ酸類の配糖体が心材部では劇的に加水分解されており、さらにエラジタンニン類が蓄積されていた。⁴⁹⁾ ノグルミ材からはウイスキーやワインの香り

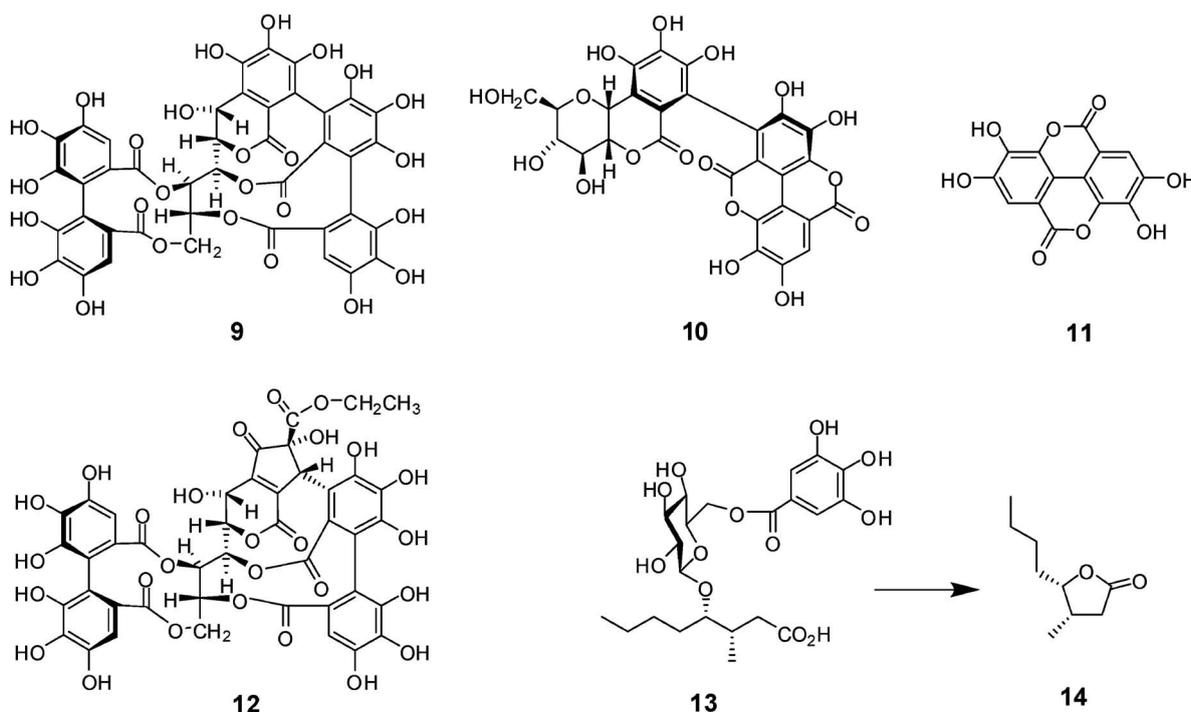


Fig. 5. Structures of Wood Polyphenols and Whisky Polyphenols

成分の1つであるオークラクトン **14** の前駆体 **13** も得られた。⁵⁰⁾ その後 **13** はウイスキーの樽材であるオーク材からも分離されて、⁵¹⁾ 異性体の合成も行われている。⁵²⁾ オーク材のタンニン成分はウイスキーやブランデーの熟成に大きく影響するが、ウイスキーにオーク材のタンニンそのものは検出されず、樽製造時の加熱処理や熟成過程で大きく変化しているようである。市販ウイスキーからはエラジタンニン由来の *ellagic acid* (**11**)、ガロイルグルコース類及び **9** の酸化生成物である **12** などが分離されたものの⁵³⁾、ポリフェノール組成は極めて複雑で、現在さらに詳細な検討を行っている。

5. 紅茶ポリフェノール—カテキン酸化と色素形成—

フランスでの心疾患死亡率の低さと赤ワインポリフェノールとの関連が明らかにされて世界的にポリフェノールへの関心が高まった。また、日本や中国で多く飲まれる緑茶についても主要成分であるカテキン類に関する多数の研究結果が報告され、ポリフェノールが健康維持効果を持つことはおそらく間違いないと思われる。しかし、世界の茶生産の8割を占め、世界的にみると最も重要なポリフェノール撰

取源である紅茶についての研究はワインや緑茶に比べて少ない。紅茶は、茶 (*Camellia sinensis*) の生葉⁵⁴⁾を揉捻することで製造され、その過程で4種のカテキン類、すなわち(−)epigallocatechin (EGC, **15**)、(−)epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCg, **16**)、(−)epicatechin (EC, **17**)、及び(−)epicatechin-3-*O*-gallate (ECg, **18**) (Fig. 6) が酵素酸化されて紅茶特有のポリフェノールが生成する。⁵⁵⁾ この反応は本来、物理的障害を受けた茶葉が示す防御反応であるが、人為的にその反応を起こさせて製造されたものが紅茶であり、生葉を最初に加熱して酵素を失活させ、この反応を起こさずに製造したものが緑茶である。緑茶の成分が比較的にシンプルなのに対して、紅茶のポリフェノール組成は非常に複雑で、1950年代からの日本やイギリスにおける研究にも係わらず、テアフラビン類(**19** 及びその gallate 類)⁵⁶⁾やテアシネンシン類(**20** 及び類縁化合物)^{57,58)} (Fig. 6) など一部を除いて、大部分の酸化生成物の構造はいまだに解明されていない。^{59,60)} 紅茶の種類にもよるが未解明ポリフェノールはポリフェノール全体の7割とも言われ、特に HPLC でベースライン上の盛り上がりとしてしか検出できないテアルビジンと呼

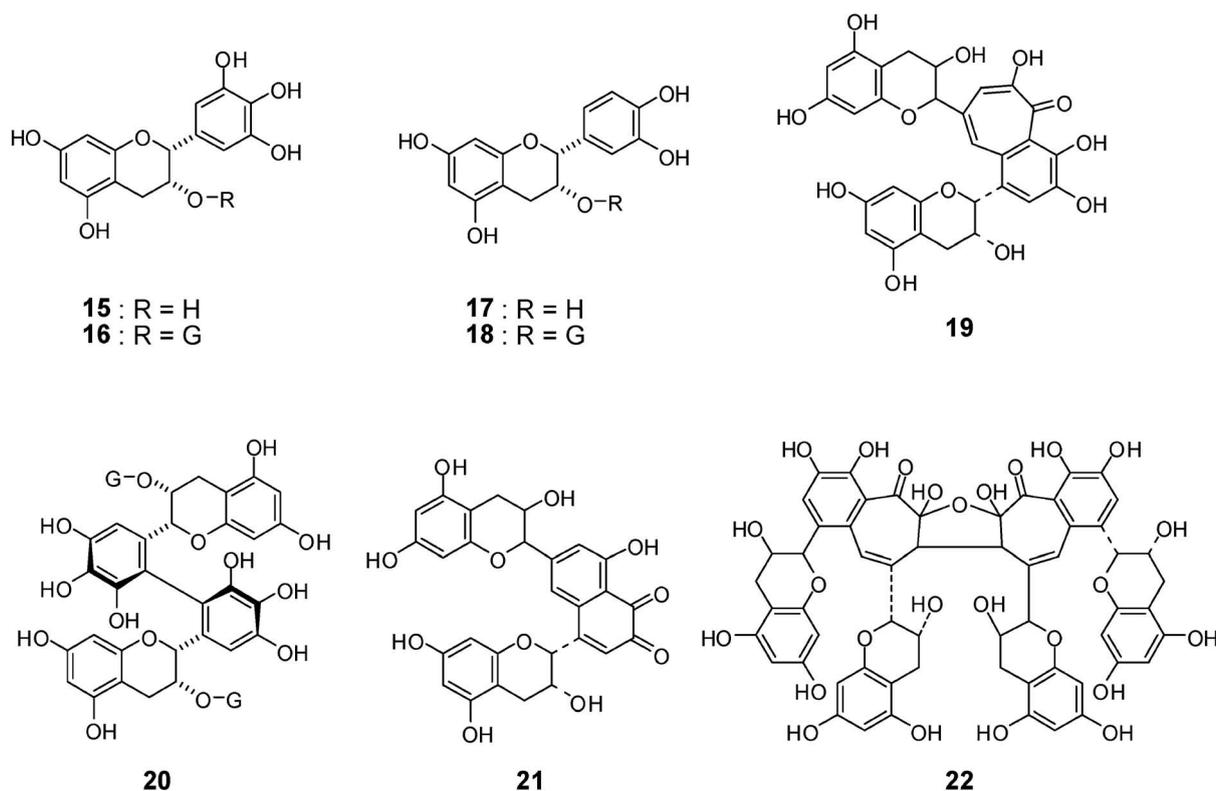


Fig. 6. Structures of Green and Black Tea Polyphenols

ばれる物質は十分な化学的定義もされないまま名前だけが1人歩きしているのが実態である。⁶¹⁾ 4種類のカテキン(15-18)が酸化されてできる生成物の組成は極めて複雑で、そのような紅茶成分をこれまで以上に理解するためには通常分離構造解析の手法では限界がある。しかし、酸化の過程で起こっている素反応のメカニズム自体は恐らく限られたものであり、どのような反応がどのような頻度で起こるのかが予測できれば、紅茶ポリフェノール全体を推測することが可能と思われる。われわれは、そのような戦略の基で純粋なカテキンを *in vitro* で酵素酸化する手法により研究を展開している。

茶葉で起こる酵素反応を試験管内でのモデル酸化実験により解析するためには、本来茶葉から調製した酵素で実験すべきであるが、茶葉の粗酵素を用いると反応が遅く、実験スケールも小さくなり生成物の分離が困難であった。そこで、茶以外の植物も茶カテキンから紅茶色素を合成するかどうか検討したところ、ナシやビワの果実を加えると非常に効率よく反応が進むことを見出した。⁶²⁾ 特にナシは、茶の酵素と完全に同じではないものの、⁶³⁾ 分離の邪魔になる成分を含まないため、果汁をそのまま反応に供することができ、大きいスケールでの実験を行う

上で極めて有効であった。

茶にはB環がピロガロールのEGC(15)とEGCg(16)が主成分として含まれ、B環がカテコール型のEC(17)とECg(18)がそれにつぐ。化学的にはピロガロール型カテキンの方が酸化されやすいが、酵素はカテコール型カテキンの方を速く酸化する。^{64,65)} 生成したカテコールキノン(17a, 18a)は酸化力が強く、EGC(g)をキノン(15a, 16a)に酸化して自身はカテコールに戻る(Fig. 7)。これは共役酸化と呼ばれクロロゲン酸でも同様な機構が提唱されている。⁶⁶⁾ われわれの実験でもECとEGCそれぞれ別々に酵素酸化した場合ECが速く減少するのに、両者を共存させると減少速度が逆転した。そこで酵素酸化時にグルタチオンを加えてキノンをトラップするとECが完全にグルタチオン結合体に変換され、EGCは残ることから、茶カテキン酸化における共役酸化機構を確認した。⁶²⁾

その際、キノン17aとEGCが酸化的にカップリングすると紅茶色素 theaflavin(19)が生成する(Fig. 7)。⁵⁶⁾ EGCが消費されてなくなると、ECキノン(17a)は theaflavin を酸化し始め、theanaphthoquinone(21)という色素が生成することも明らかにした。^{62,67)} また、テアフラビンの酸化生成物

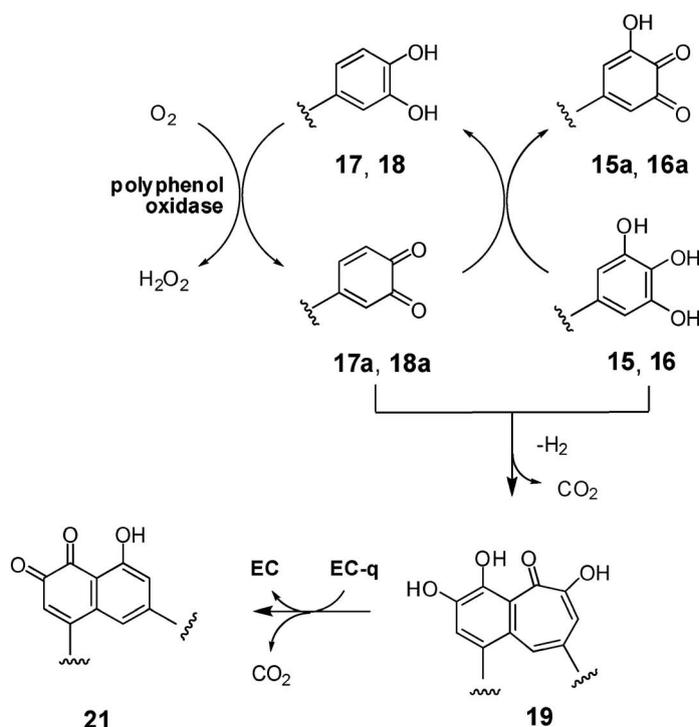


Fig. 7. Oxidation Mechanism of Tea Catechins

としては bistheflavin A (**22**)などの theaflavin の二量体も生成した (Fig. 6).⁶⁸⁾

紅茶の主要成分としては theaflavin 類のほかに EGC(g) の二量体である theasinensin 類(**20**)が知られている (Fig. 6). ところが, 研究室で新鮮茶葉を揉捻してそのままアルコールで抽出し HPLC 分析すると theaflavin の生成は確認できたが theasinensin 類は検出されなかった [Fig. 8(A)]. そこで, 実際の紅茶製造を模して, 揉捻したのちに加熱してから分析したところ theaflavin に匹敵する量の theasinensin 類が生成していた [Fig. 8(B)]. Theasinensin 類は EGC(g) の B 環同士が酸化的にカップリングした単純な二量体であるが, この結果は, theasinensin 類が単なるフェノールのラジカルカップリングではなく, 熱に不安定な前駆体の熱分解により生成していることを示していた. 前駆体はブロードなピークとして検出され [Fig. 8(A)のピーク Q], しかも不安定であるので分離は困難であった. そこで前駆体がキノン誘導体であろうと予想して *o*-phenylenediamine を発酵茶葉に加えたところ, 期待通りフェナチン誘導体 **23** が得られた (Fig. 9).⁶⁹⁾ その構造から theasinensin 前駆体が *o*-キノン構造を持つことが示唆され, しかも **23** のビフェニル結合が **R** 配置であったことから B 環のカップリングが立体選択的に起こっていることも分かった. 次に, EGCg をナシ果汁中で酸化してこの不

安定前駆体を試験管内で合成した. 二次元 NMR の解析により実際の前駆体は theasinensin キノンが水和された構造 **24** であることが分かり dehydrotheasinensin A と命名した.⁷⁰⁾ この物質は EGC(g) キノンと EGC(g) が酸化的にカップリングして生成したキノン二量体で, 水溶液中でゆっくり分解して還元生成物の theasinensin A (**20**)及び D (**20** のアトロプ異性体)に加え, 酸化生成物の galloyl oolongtheanin (**25**)⁵⁸⁾などが生成した. すなわち theasinensin 類は dehydrotheasinensin の酸化還元不均化反応により生成していることが明らかになった. Dehydrotheasinensin A から生成する新しい紅茶色素 dehydrotheasinensin AQ (**26**)の生成も明らかとなり (Fig. 10), この色素が市販紅茶に含まれていることも確認した.⁷¹⁾ また, その他の二量体として tricyclo [5,2,2,0^{2,6}]undecane 構造を持つ化合物 **27**⁷²⁾ や, かご状構造を持つ化合物 **28**⁷¹⁾などがモデル酸化実験で得られ, **27**は紅茶からも分離された.

Galloyl 基を持たない EGC の酸化でも dehydrotheasinensin 型の化合物 **29**が生成するが, 3 位の水酸基が B 環ケトンとアセタールを形成した proepitheflagallin (**30**)も生成した.⁷³⁾ この物質が分解すると既知紅茶色素 epitheflagallin (**31**)と新規色素 hydroxytheaflavin (**32**)が生成した (Fig. 11). 興味深いことに, C 環が 2,3-*cis* の EGC の酸化は反応が速く, **29**が主生成物で **30**の生成は比較

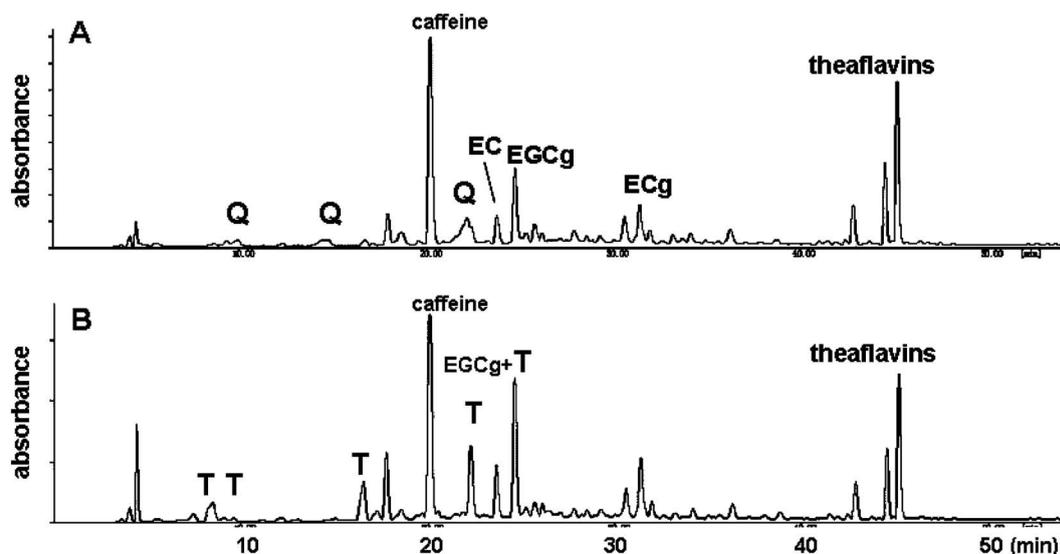


Fig. 8. HPLC of Crushed Fresh Leaves of *Camellia sinensis*

A : HPLC of 70% EtOH extract of Crushed leaves, B : HPLC after heating (80°C), Q : theasinensin precursors, T : theasinensins.

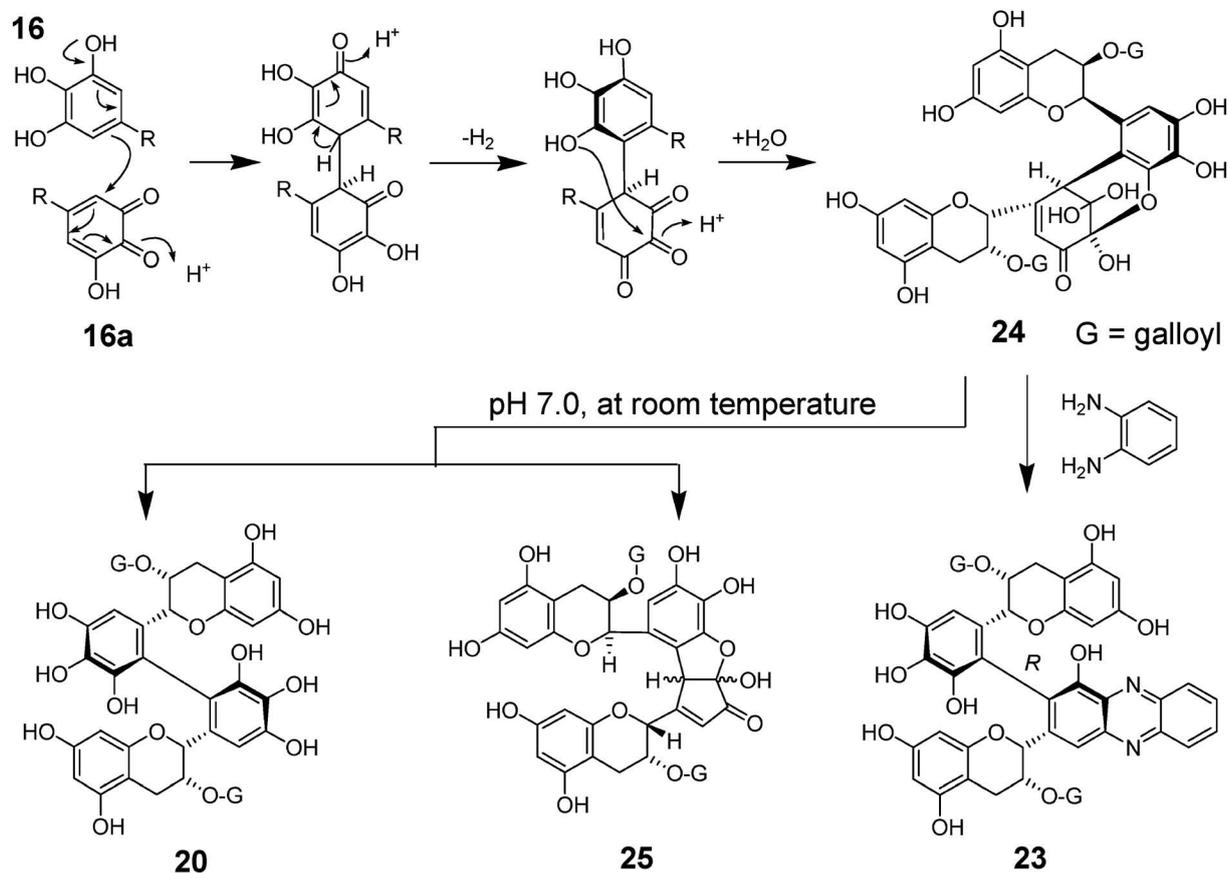
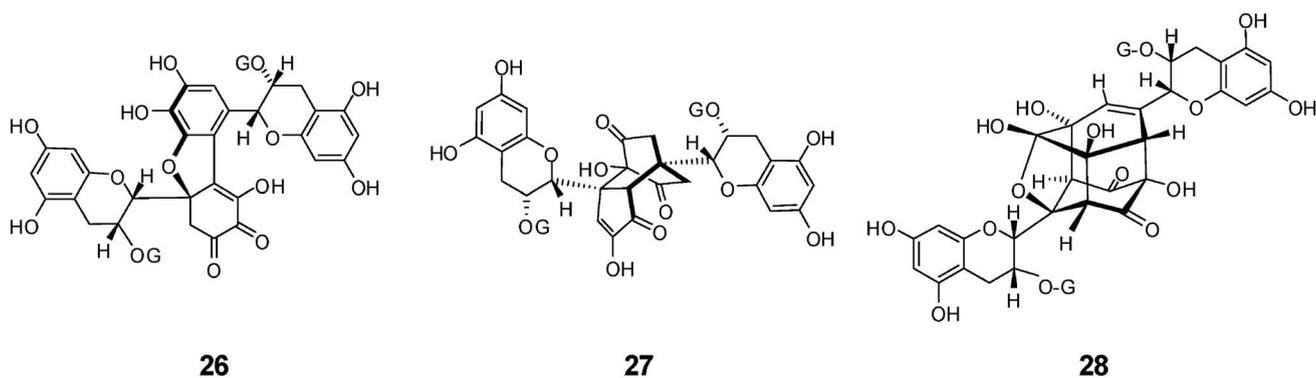
Fig. 9. Production and Reactions of Dehydrotheasinensin A (**24**)

Fig. 10. Structures of Epigallocatechin Gallate Dimers

的少ないが、2,3-*trans* の galliccatechin では反応が遅く、二量体としては proepitheafagallin 型の化合物が主に生成した。また、galliccatechin の場合、(+)-体でも(-)-体でも反応の進行はほぼ同様であった。これらの結果はキノン生成後のカップリング反応が非酵素的反応であり、反応の立体選択性はC環の配置によるものであることを示していた。⁷⁴⁾ さらに、C環3位に galloyl 基が結合している場合、

epitheafagallin 型(**30**)の化合物の代わりに既知色素の theacitrin 類⁷⁵⁾が生成することも分かり、galloyl 基の有無が反応に影響することも分かった。⁷⁶⁾

われわれがこれまで得た結果は、紅茶ポリフェノールの生成においてカテキンのB環同士のカップリング反応が重要であることを示している。ところがB環同士のカップリングだけでは二量体より大きい化合物が得られず、それ以上の分子の伸張反

肉桂には B 環がすべてカテコール型のカテキンやプロシアニジンが含まれているので、それらが酵素酸化されて色素ができていますと考えられました。⁸⁰⁾そこで、純粋なカテキンやプロシアニジンを実験の際に用いた手法で何度か酵素酸化してみたが赤い色素は生成しなかった。ところが、酵素を加えなくても、*cinnamaldehyde* と (+)-catechin を混合し溶媒のない状態で室温放置すると赤い色素がゆっくりと生成した。色素は不安定で分離することはできなかったが、その前駆体 **33** を分離し構造を明らかにすることができた (Fig. 12)。この化合物は黄色であるが容易に空気酸化されて赤色に変化する。MS の検討からその色素の構造は **33a** のような *benzopyrylium* イオン構造を持つものと推定された。さらに、(+)-catechin と *cinnamaldehyde* 各 2 分子が結合した化合物 **34** も得られ、さらに分子量の大きいオリゴマーの生成も確認された。カテキン二量体である *procyanidin B-1* と *cinnamaldehyde* を混合してもやはり赤い色素が生成した。混合物の MALDI-TOF-MS を測定すると、規則的な間隔でいくつかのオリゴマー由来のピークが検出され、例えば m/z 1497

のピークは **35** に示すようなイオンあるいはその異性体とするとつじつまが合うことが分かった。これにより **33** や **34** と同様の縮合反応によりオリゴマーが生成していることが示唆された。このことから肉桂樹皮を剥いたときの着色は、組織の破壊に伴いカテキンやプロシアニジンが *cinnamaldehyde* と混合されて縮合し、それが酵素によって酸化されて *benzopyrylium* イオン構造を持つ色素が生成したためと推定された。⁸¹⁾ 通常のプロシアニジン、前述の柿の実験で用いたチオール分解によって構成ユニットであるカテキンとチオエーテルに分解できるが、プロシアニジンと *cinnamaldehyde* を含む市販の生薬桂皮にはチオール分解されないプロシアニジン様物質が存在している。このことは桂皮でもプロシアニジンと *cinnamaldehyde* との反応によるプロシアニジンの重合が起こっている可能性を示唆していた。そこで、桂皮から高分子ポリフェノール画分を取り出して ¹³C-NMR スペクトルを測定し、*procyanidin B-1* と *cinnamaldehyde* との反応生成物のもものと比較したところ両者はよく類似しており、特に 129 ppm 付近にフェニル基の特徴的なシグナルが観

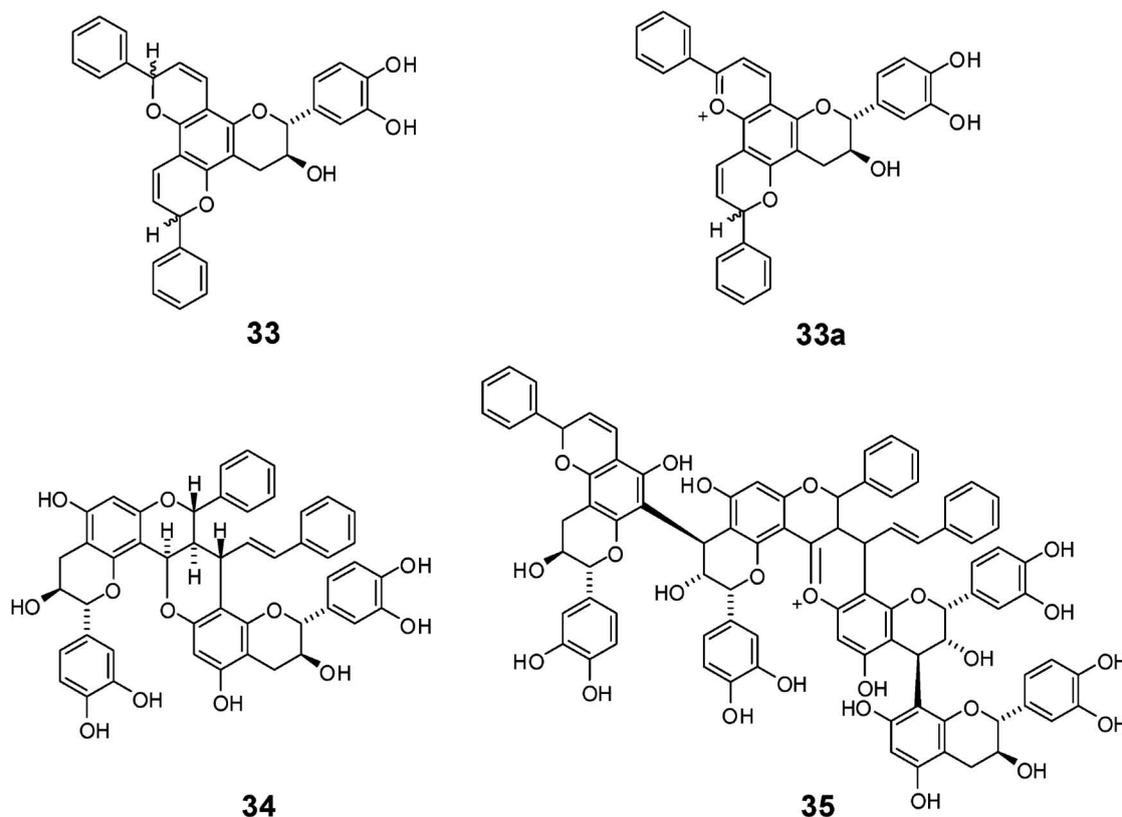


Fig. 12. Structures of Reaction Products of Cinnamaldehyde with Catechin and Procyanidin B1

察された。したがって、桂皮のタンニンも cinnamaldehyde と共重合している可能性が高い。⁸²⁾

高分子プロアントシアニジンは様々な植物に存在し、精製可能な限られた数のオリゴマーの構造からポリマーの構造が推測されているが、^{83,84)} 桂皮や柿のように、植物によっては高分子化の機構は一様ではないかもしれない。紅茶ポリフェノールと同様に、TLC や HPLC で検出することが困難な高分子ポリフェノールはこれまであまり注目されていないが、生薬や食品中には量的にかなり多く含むものもある。今後、様々な視点から検討する必要があるものと思われる。

7. おわりに

生薬や食品のポリフェノールが人の健康維持に寄与していることは膨大な数の学術論文が支持しており、多くの製品が開発されている。その流れの中で、われわれもポリマー断片化による機能性プロシアニジンオリゴマー製造法を開発し、⁴⁴⁾ また、長崎地域の農産物の特性を生かした新しい機能性発酵茶飲料の開発を行っている。^{85,86)} 自然界に豊富に存在し、食品だけでなく、皮なめし、染色、接着剤、コーティング剤、日本酒清澄剤などとして古くから利用されてきたポリフェノールは、今でも可能性を秘めた機能性天然素材である。地方大学に地域産業振興への貢献が求められている中で、緻密な分離構造解析を得意とする薬学の天然物化学が、医薬のみならず、農学、工学、栄養学など異分野の研究者と協力することでそのようなポリフェノールの機能性を応用した新たな展開が期待される。

謝辞 本研究の遂行に当たり、多くのご指導ご支援を頂いた故西岡五夫教授、野中源一郎博士、河野 功教授に深謝致します。また、ともに研究に携わっていただいた多くの学生諸氏や共同研究者の方々に心より感謝します。この研究は科学研究費補助金、静岡県茶業会議所茶学術研究助成、サッポロ生物科学振興財団研究助成金などの援助により可能となったものでありここに御礼申し上げます。

REFERENCES AND NOTES

- 1) Tannins are polyphenols that precipitate proteins and heavy metals.
- 2) Nonaka G., Nishioka I., Nagasawa T., Oura

- H., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2862–2870 (1981).
- 3) Shibutani S., Nagasawa T., Oura H., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2378–2385 (1983).
- 4) Nagasawa T., Oura H., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 715–721 (1985).
- 5) Nagasawa T., Oura H., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4494–4499 (1985).
- 6) Nagasawa T., Oura H., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2937–2943 (1986).
- 7) Yokozawa T., Suzuki N., Oura H., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4718–4723 (1986).
- 8) Nishioka I., Nonaka G., *Farumashia Rebyu*, **21**, 27–43 (1986).
- 9) Nonaka G., Tanaka T., Nishioka I., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1067–1073 (1982).
- 10) Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., *J. Chem. Res.*, (S) 176–177, (M) 2001–2029 (1985).
- 11) Yokozawa T., Chen C. P., Tanaka T., Kitani K., *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 853–858 (2002).
- 12) Yokozawa T., Chen C. P., Rhyu D. Y., Tanaka T., Park J. C., Kitani K., *Nephron*, **92**, 133–141 (2002).
- 13) Jiang Z., Tanaka T., Kouno I., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1467–1468 (1995).
- 14) Tanaka T., Jiang Z., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1915–1921 (1997).
- 15) Tanaka T., Ishida N., Ishimatsu M., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2092–2098 (1992).
- 16) Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., Miyahara K., Kawasaki T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 369–376 (1986).
- 17) Lee S.-H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., *J. Nat. Prod.*, **67**, 1018–1022 (2004).
- 18) Tanaka T., Nishimura A., Kouno I., Nonaka G., Young T.-J., *J. Nat. Prod.*, **59**, 843–849 (1996).
- 19) Tanaka T., Nishimura A., Kouno I., Nonaka G., Yang C.-R., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1596–1600 (1997).
- 20) Tanaka T., Morimoto S., Nonaka G., Nishioka I., Yokozawa T., Chung H. Y., Oura H., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 340–344 (1989).

- 21) Yokozawa T., Chung H.-Y., Lee T.-W., Oura H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., Hirai A., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1568–1571 (1989).
- 22) Yokozawa T., Chung H.-Y., Lee T.-W., Oura H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2766–2769 (1989).
- 23) Yokozawa T., Zhou J.-J., Oura H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., *Phytother. Res.*, **9**, 105–109 (1995).
- 24) Yokozawa T., Liu A.-W., Chen C.-P., Tanaka T., *Pharm. Pharmacol. Commun.*, **5**, 365–370 (1999).
- 25) Yokozawa T., Chen C. P., Tanaka T., Kouno I., *Phytomedicine*, **5**, 367–373 (1998).
- 26) Nakagawa T., Yokozawa T., Kim Y.-A., Kang K.-S., Tanaka T., *Am. J. Chin. Med.*, **33**, 817–829 (2005).
- 27) Yamabe N., Kang K.-S., Matsuo Y., Tanaka T., Yokozawa T., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1289–1296 (2007).
- 28) Hayashi T., Maruyama H., Kasai R., Hattori K., Takasuga S., Hazeki O., Yamasaki K., Tanaka T., *Planta Medica*, **68**, 173–174 (2002).
- 29) Kinjo J., Nagao T., Tanaka T., Nonaka G., Okawa M., Nohara T., Okabe H., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1238–1240 (2002).
- 30) Kashiwada Y., Nishizawa M., Yamagishi Y., Tanaka T., Nonaka G., Cosentino L. M., Snider J. V., Lee K.-H., *J. Nat. Prod.*, **58**, 392–400 (1995).
- 31) Kosuge S., Maekawa T., Saito C., Tanaka T., Kouno I., Ohtsuki K., *J. Biochem.*, **129**, 403–409 (2001).
- 32) Zhang Y.-J., Tanaka T., Betsumiya Y., Kusano R., Matsuo A., Ueda T., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 258–262 (2002).
- 33) Tanaka T., Kataoka M., Tsuboi N., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 201–207 (2000).
- 34) Tanaka T., Jiang Z.-H., Nonaka G., Kouno I., “Plant Polyphenols 2 Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology,” eds. by Gross G. G., Hemingway R. W., Yoshida T., Branham S. J., Klumer Academic/Plenum Publishers. New York, 1999, pp. 761–778.
- 35) Tanaka T., Zhang H., Jiang Z., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1891–1897 (1997).
- 36) Haslam E., “Practical Polyphenolics, from Structure to Molecular Recognition and Physiological Action,” Cambridge University Press, Cambridge, 1988, pp. 138–177.
- 37) Harborne J. B., “Introduction to Ecological Biochemistry,” Academic Press, London, 1977, pp. 160–162.
- 38) Murry N. J., Williamson M. P., Lilley T. H., Haslam E., *Eur. J. Biochem.*, **219**, 923–935 (1994).
- 39) Matsuo T., Ito S., *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 683–689 (1982).
- 40) Sugiura A., Tomana T., *HortScience*, **18**, 319–321 (1983).
- 41) Pesis E., Ben-Arie R., *J. Food Sci.*, **49**, 896–899 (1984).
- 42) Tanaka T., Takahashi R., Kouno I., Nonaka G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3013–3022 (1994).
- 43) Tanaka T., Kusano R., Kouno I., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 1801–1806 (1998).
- 44) Tanaka T., Yoshitake N., Zhao P., Matsuo Y., Kouno I., Nonaka G., *Jpn. J. Food Chem.*, **14**, 134–139 (2007).
- 45) Taguri T., Tanaka T., Kouno I., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1965–1969 (2004).
- 46) Taguri T., Tanaka T., Kouno I., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2226–2235 (2006).
- 47) Tanaka T., Ueda N., Shinohara H., Nonaka G., Fujioka T., Mihashi K., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1751–1755 (1997).
- 48) Tanaka T., Ueda N., Shinohara H., Nonaka G., Fujioka T., Mihashi K., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 2236–2242 (1996).
- 49) Tanaka T., Jiang Z., Kouno I., *Phytochemistry*, **47**, 851–854 (1998).
- 50) Tanaka T., Kouno I., *J. Nat. Prod.*, **59**, 997–999 (1996).
- 51) Masson E., Baumes R., Le Guerneve C., Puech J.-L., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4306–4309 (2000).
- 52) Wilkinson K. L., Elsey G. M., Prager R. H., Tanaka T., Sefton M. A., *Tetrahedron*, **60**, 6091–6100 (2004).
- 53) Fujieda M., Tanaka T., Kouno I., Abstracts of papers, the 126th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Sendai, March 2006, No. 3, p. 62.
- 54) Two major varieties of *Camellia sinensis* are used for tea production. *Camellia sinensis* var.

- assamica* is usually used for black tea production and *C. sinensis* var. *sinensis* for green tea production.
- 55) Hashimoto F., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1383–1389 (1992).
 - 56) Takino Y., Imagawa H., Horikawa H., Tanaka A., *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 64–71 (1964).
 - 57) Nonaka G., Kawahara O., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3906–3914 (1983).
 - 58) Hashimoto F., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1676–1684 (1988).
 - 59) Haslam E., *Phytochemistry*, **64**, 61–73 (2003).
 - 60) Tanaka T., Kouno I., *Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 128–133 (2003).
 - 61) Roberts E. A. H., “The Chemistry of Flavonoid Compounds,” Pergamon Press. Oxford, 1962, pp. 468–512.
 - 62) Tanaka T., Mine C., Inoue K., Matsuda M., Kouno I., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2142–2148 (2002).
 - 63) Japanese pear homogenate showed hydroxylase (oxygenase) activity to phloretin glucoside. Tea leaf homogenate did not showed the activity: Kawanoue H., Tanaka T., Kouno I., Abstracts of papers, the 127th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Toyama, March 2007, No. 4, p. 73.
 - 64) Roberts E. A. H., *Chem. Ind.*, 1354–1355 (1957).
 - 65) Robertson A., *Phytochemistry*, **22**, 889–896 (1983).
 - 66) Cheynier V. F., Van Hulst M. W. J., *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 10–15 (1988).
 - 67) Tanaka T., Betsumiya Y., Mine C., Kouno I., *Chem. Commun.*, 1365–1366 (2000).
 - 68) Tanaka T., Inoue K., Betsumiya Y., Mine C., Kouno I., *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5785–5789 (2001).
 - 69) Tanaka T., Mine C., Watarumi S., Fujioka T., Mihashi K., Zhang Y.-J., Kouno I., *J. Nat. Prod.*, **65**, 1582–1587 (2002).
 - 70) Tanaka T., Watarumi S., Matsuo Y., Kamei M., Kouno I., *Tetrahedron*, **59**, 7939–7947 (2003).
 - 71) Tanaka T., Matsuo Y., Kouno I., *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7571–7578 (2005).
 - 72) Tanaka T., Mine C., Kouno I., *Tetrahedron*, **58**, 8851–8856 (2002).
 - 73) Matsuo Y., Tanaka T., Kouno I., *Tetrahedron*, **62**, 4774–4783 (2006).
 - 74) Matsuo Y., Yamada Y., Tanaka T., Kouno I., *Phytochemistry* (in press) (Available online 20 September 2007).
 - 75) Davis A. L., Lewis J. R., Cai Y., Powell C., Davis A. P., Wilkins J. P. G., Pudney P., Clifford M. N., *Phytochemistry*, **46**, 1397–1402 (1997).
 - 76) Matsuo Y., Yamada Y., Tanaka T., Kouno I., Abstracts of papers, the 49th Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai, Sapporo, September 2007, pp. 329–334.
 - 77) Li Y., Tanaka T., Kouno I., *Phytochemistry*, **68**, 1081–1088 (2007).
 - 78) Kusano R., Tanaka T., Matsuo Y., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1768–1772 (2007).
 - 79) Kusano R., Andou H., Fujieda M., Tanaka T., Matsuo Y., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 266–272 (2008).
 - 80) Morimoto S., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4338–4345 (1985).
 - 81) Matsuo Y., Yamada Y., Tanaka T., Kouno I., Abstracts of papers, the 128th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Sendai, March 2008, No. 2, p. 109.
 - 82) Tanaka T., Matsuo Y., Yamada Y., Kouno I., *J. Agric. Food Chem.* (in press).
 - 83) Nonaka G., Morimoto S., Nishioka I., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2139–2145 (1983).
 - 84) Morimoto S., Nonaka G., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 633–642 (1986).
 - 85) Tanaka T., Kusano R., Kouno I., Miyata Y., Tamaya K., Maeda M., Abstracts of papers, the 52th Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy, Kanazawa, September 2008, p. 56.
 - 86) Tanaka K., Nishizono S., Miyata Y., Tamaya K., Maeda M., Abstracts of papers, the 59th Annual Meeting of Japanese Society of Nutrition and Food Science, Tokyo, May 2005, p. 144.