茶葉の熟度別抗酸化能の変化

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 野菜茶業研究所*

木幡 勝則・峰 伸一・氏原ともみ・堀江 秀樹**

(平成15年7月31日受理)

Changes in Anti-oxidative Activities during the Development of Tea Shoots

Katsunori Kohata, Shinichi Mine, Tomomi Ujihara, Hideki Horie

National Institute of Vegetable and Tea Science

National Agricultural and Bio-oriented Research Organization

Summary

Changes in anti-oxidative activities of fresh tea and crude tea leaves were investigated by the discoloration of β -carotene coupled with the oxidation of linolic acid (β -carotene anti-oxidative activity) and the scavenging activity of DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical. Furthermore, relationship between the anti-oxidative activities and the contents of tea components were also investigated. The anti-oxidative activities decreased during the development of tea shoots. The decreasing rate of the β -carotene anti-oxidative activity approximately corresponded to that of ester typed catechins (EGCg + ECg) or EGCg, suggesting that the changes in the anti-oxidative activities were more reflected on the β -carotene anti-oxidative activity. There was a strong relationship between the anti-oxidative activity and contents of ester-typed catechins, especially EGCg. This tendency was enhanced by the addition of ascorbic acid (VC) to the contents of ester typed catechins or EGCg, but the contribution of VC to the relationship was relatively small.

Key Words : anti-oxidative activity, DPPH, β -carotene, tea leaves, catechins

1. 緒 言

茶葉の抗酸化能に関しては、これまで数多くの報告がなされている。その中で、カテキン類と抗酸化能との間に正の相関のあることや¹⁾、カテキン類の抗酸化能に対してアスコ

ルビン酸 (VC) が強い相乗効果を示すことが明らかにされている²⁾。

ところで、主要なカテキン類の総量は茶葉の熟度が進むに従って減少することが知られているが³⁾、カテキン類について個々にみると、エステル型カテキン類 (EGCg +

* 〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷2769

** 現 〒514-2392 三重県安芸郡安濃町大字草生360

ECg)が減少するのに対し、遊離型カテキン類(EGC+EC)は増加するなど、必ずしも増減は一定ではない。一方、通常よく用いられている抗酸化能測定法として、 β -カロテン-リノール酸法⁴⁾、大豆油またはラードを用いる抗酸化能測定法¹⁾、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)ラジカル捕捉能測定法⁵⁾等が挙げられるが、これらの方法を用いてカテキン類の個々の抗酸化能を測定した結果では、総じてエステル型カテキン類が遊離型カテキン類よりも強い抗酸化能を有することが報告されている。

これらの事実から、茶葉の熟度が進むに伴い抗酸化能も低下することが予想されるが、これまで熟度と抗酸化能との相関について検討した報告例はほとんど見当たらない。そこで、本論文では茶葉の抗酸化能に及ぼす熟度の影響をカテキン類およびVC含有量との相関から検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 茶試料の調製

生葉は、品種として‘やぶきた’を用い、野菜茶業研究所試験圃場(金谷)で2002年4月15日、18日、22日、25日および29日に採摘した(20cm×20cm, 5反復, 出開度は、順に0, 16, 30, 68, 88%)。次いで、直ちに電子レンジ(500W)で1~2分ブランチング処理し、70°Cで一晩温風乾燥後、粉碎したものを茶生葉試料とした。

荒茶試料は、品種として‘やぶきた’を用い、野菜茶業研究所試験圃場(金谷)で2002年4月22日、23日、25日、5月1日および7日に機械摘みし、通常の煎茶製造方法で製造した煎茶の荒茶を粉碎して調製した。

2.2 β -カロテン退色法による抗酸化能

β -カロテン退色法による抗酸化能(以後 β -カロテン抗酸化能と略す。)の測定法は、リノール酸の自動酸化に伴い生じるリノール酸過酸化物が、 β -カロテンの二重結合と反応することによって、 β -カロテンの色が消失することを利用した方法である^{6,7)}。加えた試料の

抗酸化能が高いほどリノール酸の酸化が抑えられ、 β -カロテンの退色が抑えられる。反応を開始してから0, 15, 30および45分後に、 β -カロテンの吸収極大波長である417nmにおける吸光度(減少)を測定する。本法は、比較的短時間に数点の試料の測定ができ、簡便な方法であり、野菜等の抗酸化能の評価にもしばしば用いられていることから、本論文でも採用した。

抗酸化能は、試料溶液における0分後の吸光度から30分後の吸光度を引いた値(A)と、抗酸化剤であるBHA(3(2)-t-Butyl-4-hydroxy anisole, 1 mg/100ml)溶液における0分後の吸光度から30分後の吸光度を引いた値(B)から、A/B(%)で求めた。即ち、試料の抗酸化能の強さをBHA(1 mg/100ml)を標準として表した値で、100%であればBHAと同じ抗酸化能ということになる。なお、本論文では30分後の値を用いたが、15分後あるいは45分後の値を用いてもよい。

試料の調製法は、茶生葉および荒茶試料各々3 gを耐熱ガラスポット(セレックVポット, セレック(株)製)に採り、沸騰水200mlを加えて時々攪拌しながら5分間放置した。抽出液をろ過してろ液を約20ml採取し、直ちに室温まで冷却後、10倍希釈して試料液とした。試料の調製は3連で行った。

2.3 DPPHラジカル捕捉能の測定

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)を用い、試料を加えたときのDPPHの吸収極大波長である517nmの吸光度変化を測定する方法に従った^{8,9)}。補足能が大きい程、吸光度の減少が大きくなる。本法は、DPPHが安定なラジカルで取り扱いやすく、消去能を簡便に評価できることから、茶試料を初めとする様々な試料に応用されており、本論文でも採用した。捕捉能の値は、抗酸化剤であるTrolox(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)濃度相当量として表した。試料の調製法は、 β -カロテン抗酸化能の測定法と同様であるが、希釈は20倍とした。

2. 4 カテキン類およびVC測定

堀江らの方法¹⁰⁾に従い，主要カテキン類4種(EG, EGC, EGCg, ECg) およびVCを同時定量した。試料の調製法は， β -カロテン抗酸化能の場合と同じである。

2. 5 統計処理

チューキーの多重比較より行った。

3. 実験結果と考察

3. 1 茶生葉試料

β -カロテン抗酸化能は，熟度が進むにつれて減少する傾向を示し，30分後の測定では，最大で約30%程度減少した(表1)。

一方，DPPHラジカル補足能は，4月18日に一端増加し，その後は減少する傾向にあったが，減少の大きさは最大で約10%程度と β -カロテン抗酸化能と比較してそれ程大きくなかった(図1)。

カテキン類含有量では，これまでに知られているように，熟度が進むにつれて遊離型カテキン類のEGCは増加したが，反対に，エステル型カテキン類のEGCgおよびECgは減少した。主要4種のカテキン類(以後主要カテキン類と略す。)は摘採初期に増加し，その後は減少する傾向にあったが，減少は最大で10%程度とそれ程大きくなかった(図2)。これは，摘採最終日(4月29日)の出開度(88%)が示すように，摘採期間が短か過ぎたためと思われる。

図1 茶生葉試料における熟度別DPPH捕捉能の変化

捕捉能はTrolox濃度(μmol)相当量として表した。4月18日の値を基に，*は5%で，**は1%で有意差のあるものを示す。

図2 茶生葉試料における熟度別カテキン類含有量の変化

4月18日の値を基に，*は5%で，**は1%で有意差のあるものを示す。

表1 茶生葉および荒茶試料の熟度別 β -カロテン抗酸化能

		抗酸化能(%)±標準偏差 ^{a)}	
茶生葉試料		荒茶試料	
4月15日	89.08±8.88	4月22日	86.11±6.35
4月18日	92.68±4.09	4月23日	66.45±3.50**
4月22日	87.26±4.10	4月25日	65.14±5.25**
4月25日	78.26±1.91*	5月1日	39.95±5.85**
4月29日	62.69±4.46**	5月7日	32.74±5.31**

a) 試料溶液0分の吸光度-30分後の吸光度)×100

(BHA(1mg/100ml)0分後の吸光度-30分後の吸光度)

生葉試料は4月15日，荒茶試料は4月22日の抗酸化能を基に，*は5%で，**は1%で有意差のあるものを示す。

VC含有量は、摘採初期には増加し、4月22日の中期において最大に達した後、徐々に減少した(図3)。この結果は、これまでに報告されてる結果と異ならない¹¹⁾。最初の摘採日である4月15日の値が著しく低くなったのは、摘採した芽が若過ぎたことに起因しているものと考えられる。

図3 茶生葉試料における熟度別アスコルビン酸含有量の変化

4月18日の値を基に,*は5%で,**は1%で有意差のあるものを示す。

成分含有量と β -カロテン抗酸化能との相関に関して(β -カロテン抗酸化能の値は30分における測定値を用いた),VCとの間には相関は認められなかったものの、主要カテキン類との間には比較的強い正の相関が認められた(表2)。この相関は、エステル型カテキン類に限定すればさらに強くなり、EGCgに限定すればさらに強くなった。加えて、エステ

ル型カテキン類およびEGCgにVCを加えればさらに強くなることが明らかとなった。

成分含有量とDPPHラジカル補足能との間の相関では、 β -カロテン抗酸化能における結果と同様に,VCとの間には相関は認められなかったが、主要カテキン類との間には弱いながら正の相関が認められた(表2)。この相関は、エステル型カテキン類に限定すればさらに強くなり、EGCgに限定すればさらに強くなった。加えて、エステル型カテキン類およびEGCgにVCを加えればさらに強くなることが明らかとなった。

β -カロテン抗酸化能とDPPHラジカル捕捉能は、熟度が進むに従い減少することが明らかとなったが、減少は前者で最大30%程度、後者で9%程度であった。エステル型カテキン類およびEGCgの減少割合(約30%)を考慮すると、熟度の変化は β -カロテン抗酸化能の上に、より強く反映されるものと考察される。

一般に、油脂の抗酸化能に関してはEGCgが最も強いとされているが¹⁾、成分含有量と β -カロテン抗酸化能およびDPPHラジカル捕捉能との相関において、エステル型カテキン類との間に強い正の相関が認められたこと、特に、EGCgとの間に強い正の相関が認められたことは、これまでの結果と矛盾しない。

VCが抗酸化能との間にほとんど相関を示さなかったのは、4月15日の含有量が非常に低かったためと考えられる。この値を除いた

表2 成分含有量と抗酸化能との相関

	β -抗酸化能 (R^2)		DPPH捕捉能 (R^2)	
	茶生葉	荒茶	茶生葉	荒茶
EGC+EC+EGCg+ECg	0.807	0.179	0.524	0.607
VC	—	0.513	0.015	0.763
EGC+EC	0.433*	0.582*	0.316*	0.180*
EGCg+ECg	0.894	0.917	0.621	0.939
EGCg+ECg+VC	0.970	0.913	0.709	0.947
EGCg	0.947	0.905	0.645	0.955
EGCg+VC	0.995	0.900	0.730	0.955

R^2 : 相関係数; VC: アスコルビン酸; *: 負の相関

ときの相関係数(R^2)が、 β -カロテン抗酸化能では0.769, DPPHラジカル捕捉能では0.509まで高くなることからこの考察は指示される。すなわち、VCと抗酸化能との相関は弱いながら認められたといえる。

3. 2 荒茶試料

β -カロテン抗酸化能は、茶生葉試料と同様に、熟度が進むにつれて減少する傾向を示したが、30分後の測定では最大で約60%程度減少し、生葉試料より減少の割合がかなり大きいことがわかった(表1)。

DPPHラジカル補足能は、茶生葉試料と同様に、熟度が進むにつれて減少する傾向を示したが、減少割合は最大で約13%と生葉試料よりいく分大きい程度であった(図4)。

図4 荒茶試料における熟度別DPPH捕捉能の変化

捕捉能はTrolox濃度(μmol)相当量として表した。4月22日の値を基に、*は5%で、**は1%で有意差のあるものを示す。

カテキン類含有量の変化では、生葉試料と同様に、5月1日を除いて熟度が進むにつれてEGCは増加したが、反対に、エステル型カテキン類のEGCgおよびECgは減少した。全カテキン類は、5月1日を除いて徐々に減少する傾向にあり、最大で約13%減少した。5月1日の突出した増加はEGCの増加に由来するものであるが、この原因については今のところわかってない(図5)。

VC含有量の変化は、茶生葉同様初めに増加した後、徐々に減少する傾向にあり、減少割

図5 荒茶試料における熟度別カテキン類含有量の変化

4月22日の値を基に、*は5%で、**は1%で有意差のあるものを示す。

図6 荒茶試料における熟度別アスコルビン酸含有量の変化

4月22日の値を基に、*は5%で、**は1%で有意差のあるものを示す。

合は最大で約18%であった(図6)。

成分含有量と β -カロテン抗酸化能との相関では、VCとの間には弱いながら正の相関が認められたが、主要カテキン類含有量との間には相関は認められなかった。エステル型カテキン類およびEGCgとの間には生葉試料同様に強い正の相関が認められた(表2)。しかし、茶生葉試料に見られたような、EGCgに限定することによる効果の向上やVCを加えることによる効果の向上はほとんど認められなかった。

成分含有量とDPPHラジカル補足能との間の相関では、VCおよび主要カテキン類含有量との間には正の相関が認められた。主要カテキン類含有量との相関は、エステル型カテキン類やEGCgに限定すればさらに強くなる

ことが明らかとなったが、 β -カロテン抗酸化能の場合と同様に、EGCgに限定することによる効果の向上やVCを加えることによる効果の向上はほとんど認められなかった。

VCは、カテキン類の抗酸化能に対して強い相乗効果を示すことが知られているが²⁾、その時のVCはカテキン類と同程度か、10倍濃い濃度であった。本論文での実験条件下では、VCは全カテキン類の1/15程度しか含まれておらず、このことが茶生葉および荒茶試料の双方においても強い相乗効果を示さなかった要因と推察される。

以上、熟度が増すと抗酸化能は減少するが、それはエステル型カテキン類、中でもEGCgの減少によるところが大きく、VCも一部は関与していることが明らかとなった。茶生葉および荒茶試料で得られた結果が大筋で一致していたことから、一番茶期における茶葉の熟度別抗酸化能の変化が、概ね明らかにされたものと思われる。

4. 摘 要

- (1) β -カロテン抗酸化能とDPPHラジカル捕捉能は、熟度が進むに従い減少することが明らかとなった。減少は前者で最大30~60%程度、後者で10~13%程度で、エステル型カテキン類およびEGCgの減少割合(約30%)を考慮すると、熟度の変化は β -カロテン抗酸化能により強く反映されるものと考察される。
- (2) β -カロテン抗酸化能とDPPHラジカル補足能との強い正の相関は、主要カテキン類よりもエステル型カテキン類、特にEGCgとの間にあることが明らかとなった。この相関は、エステル型カテキン類やEGCgにVCを加えることでわずかながら強くなる傾向にあった。しかし、VCの抗酸化能に及ぼす影響は、その含有量が主要カテキン類と比較して1/15程度と少ないことから、小さいか、あってもそれほど大きいとはいえなかった。

5. 引 用 文 献

- 1) 原征彦(1955): 茶の抗酸化作用, 村松敬一郎編, 茶の科学, 朝倉書店, 東京, pp. 124-131.
- 2) 松崎妙子・原征彦(1985): 茶葉カテキン類の抗酸化作用について, 農化, 59, 129-134.
- 3) 吉田優子・木曾雅昭・長島等・後藤哲久(1996): 茶芽の生育に伴う化学成分含量の変化, 茶研報, No83, 9-16.
- 4) Amarowicz, R. and F. Shahidi (1995): Antioxidant activity of green tea catechins in β -carotene-linoleate model system, J. Food Lipids, 2, 47.
- 5) Chen, C.-W. and C.-T. Ho (1995): Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas, J. Food Lipids, 2, 35.
- 6) 農林水産省農林水産技術会議事務局・食品総合研究所: 食品の機能性評価マニュアル集, pp. 23(1999).
- 7) 津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木柁吉(1994): 各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定, 日食工誌, 41, 611-618.
- 8) 農林水産省農林水産技術会議事務局・食品総合研究所: 食品の機能性評価マニュアル集, pp. 19-20(1999).
- 9) Yamaguchi, T., H. Takamura, T. Matoba and J. Terao(1988): HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Bioci. Biotechnol. Biochem., 62, 1201-1204.
- 10) 堀江秀樹・山本(前田)万里・氏原ともみ・木幡勝則(2003): 茶葉中カテキン類分析のための抽出方法の検討, 茶研報, No94, 60-64.
- 11) 高柳博次・阿南豊正・池ヶ谷賢次郎・中川致之(1985): 茶芽の熟度と成分変動, 茶研報, No61, 20-25.