‘べにふうき’ 緑茶抽出条件の違いによるメチル化 カテキン含量及びフェオホルビド生成量の変動

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所

山本(前田)万里・前原明日香・江間かおり・水上 裕 造・

加藤 史子・廣野 久子・物部真奈美

(平成19年 9 月25日受理)

Changes in *O*-methylated Catechins and Pheophorbide Contents under Various Extraction Conditions of ‘Benifuuki’ Green Tea

Mari Maeda-Yamamoto, Asuka Maehara, Kaori Ema, Yuzo Mizukami,

Fumiko Kato, Hisako Hirono, Manami Monobe

National Institute of Vegetable and Tea Science,

National Agriculture and Food Research Organization

Summary

To clarify the suitable extraction method of ‘benifuuki’ green tea containing *O*-methylated catechins having anti-allergic action, the extraction rate of *O*-methylated catechins was examined under various extraction conditions.

To elute more than 60% of *O*-methylated catechins from ‘benifuuki’ green tea leaf, the extraction more than 5 minutes in boiling water was necessary. The elution rates were approximately 30% after extraction in hot water for five minutes, and only 14% after overnight in a cold water. So, to consume 34mg (efficient amount for the symptom improvement of the perennial nasal inflammation) of epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)-gallate a day, we should consider the quantity of tea leaf and extraction time.

The concentration of pheophorbide-*a* (PBa; that is responsible for photosensitivity dermatitis) in tea leaves was measured after soaking ‘benifuuki’ green tea powder, a common selling form, in warm water for a long time. PBa of 80mg/100g was produced after incubation of green tea (first crop season, younger shoot, 30 seconds steamed) in warm water of 40℃ for three hours. The production of PBa in second crop tea was very few. It was suggested that it is better to avoid to soaking ‘benifuuki’ green tea powder in warm water for a long time.

Key words: ‘Benifuuki’ green tea, Pheophorbide-*a*, *O*-methylated catechin, suitable extraction

1 緒 言

‘べにふうき’ (茶農林44号) は、抗アレルギー作用をもつメチル化カテキンが多く含まれる品種で、機能性が注目されていることから、栽培面積も急増している。現在まで、抗アレルギー作用機作^{1,2)}、葉位・熟度・茶期によるメチル化カテキンの変動³⁾、飲料製造工程中の抽出法によるメチル化カテキン含量の変動⁴⁾等が調べられてきた。しかし、どのような抽出法によりメチル化カテキンを多く抽出できるのかははっきりしていない。

また、ペットボトル入り飲料以外では、‘べにふうき’ 緑茶はその多くが粉末茶の形態で流通しており、粉末茶をペットボトルなどの容器に入れ、お湯を注いで長時間持ち歩く飲用法も見受けられる。緑茶葉とお湯を長時間接触させておくと、光過敏皮膚炎を引き起こすフェオホルビド (PB) がクロロフィルから生成することが報告されている⁵⁾。PBは脂溶性なのでお湯に溶け出してこないが、粉末茶として全てを摂取するような場合は、注意を要する。

今後、リーフ茶の形態での流通も増加してくると予想されるため、最適な抽出条件を明らかにするために蒸熱時間を変えて製造した‘べにふうき’ 緑茶の抽出条件の違いによる、メチル化カテキン類の抽出量の変動、及び粉末茶飲用時の安全性を明らかにするため緑茶葉PBAの生成量の変動について検討したので報告する。

2 実験方法

2. 1 材料

野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点の圃場 (静岡県島田市) で‘べにふうき’ (慣行施肥栽培) を2007年4/30 (一番茶若芽：出開度6.7%, 百芽重34.9g), 5/11 (一番茶硬葉：出開度82.0%, 百芽重84.8g), 6/25 (二番茶：出開度67.4%, 百芽重85.3g) に機械摘み

し、送带式蒸し機で一番茶若芽と二番茶は30, 45, 60, 90, 120秒、一番茶硬葉は30, 45, 60, 90, 120, 180秒蒸熱した後、2 kg少量製茶機で製造した緑茶を供試材料とした。

2. 2 抽出条件とメチル化カテキン類の分析法

カテキン類の抽出は、緑茶をよく混和して広げ、異なる四カ所から適量採取して500mgを秤量し50mLの沸騰した蒸留水に入れてそのまま湯浴内で1分、5分、10分、30分沸騰させ続けた後、濾紙 (ADVANTEC社, No. 2) で濾過した試料を調製し、0.22 μ mのメンブレンフィルタを通した試料、500mgの茶葉を50mLの沸騰させた蒸留水に入れて室温で1分、3分、5分間静置しながら抽出した。また、500mgの茶葉を50mLの蒸留水に入れて4℃で16時間静置抽出した試料を調製し、以下の条件による高速液体クロマトグラフ法で分析した⁶⁾。

抽出効率を求めるため、多検体細胞破碎機 (安井器械マルチビーズショッカー) で粉碎した緑茶粉末250mgを2%リン酸：エタノール (1:1, v/v) 20mlで30℃, 60分間抽出し、蒸留水で25mLにフィルアップした後、ろ過した上清中のカテキン類の含量を液体クロマトグラフ法で測定した。

カラムは、Wakopak Navi C18-5 (和光純薬製, i.d. 4.6*100mm, 粒子径5 μ m), (ガードカラム：Wakopak Navi C18-5 (i.d. 4.6*10mm, 5 μ m)), カラム温度は40℃, 検出波長は272nm, 注入量は20 μ l, 流速は1ml/minで、移動相Aは、蒸留水：アセトニトリル：リン酸 (H_3PO_4) (400:10:1, v/v), 移動相Bは、メタノール：移動相A (1:2, v/v) を表1の条件でグラジエントを行った。

茶葉の水分含量は常法にて求め、茶葉中の各成分値は、水分含量を換算して乾物重%で表示した。また、抽出液中の各成分値は抽出液100mL中のmg数で表示した。

表1 HPLCによるカテキン分析のためのグラジエント条件

	移動相 A	移動相 B	
0～2分	80%	20%	リニアグラジエント
2～27分	20%	80%	
27～37分			上記条件を保つ
37.01～45分	80%	20%	

2. 3 総PB量の分析法

総PB量はもともとの茶葉中に含まれているPB量とクロロフィラーゼの作用により新たに生成するPB量の総和である。茶葉の総PB量を検討するため、前述のようにマルチビーズショッカードで粉碎した緑茶250mgを50mLコニカルチューブに精秤し、25mLの蒸留水を添加して、40℃の湯浴中で、3分、10分、60分、180分、360分インキュベートした後、遠心分離（800g，5分）を行った沈殿部に、約13mLの99%アセトンを添加し、超音波破砕機（トミー精工UD-201）で2分間ホモジェネートした。これを遠心分離してその上清を50mLメスフラスコに傾注した後、再び沈殿部に85%アセトンを15mL添加して前述と同様ホモジェネートして上清をメスフラスコに傾注した。これをもう一度繰り返し、最終的に85%アセトンで50mLにフィルアップし、0.22 μ mメンブレンフィルタ（ADVANTEC社：DISMIC-13HP, PTFE）を通した後、以下の条件で分析した⁵⁾。

カラムは、TSKgel ODS-80Ts（東ソー製，i.d. 4.6*150mm, 粒子径 5 μ m），カラム温度は40℃，検出波長は405nm，注入量は20 μ L，流速は0.4mL/minで，移動相Aは，0.005MNaCl含有95%エタノール，移動相Bは，0.005MNaCl含有80%エタノールを表2の条件でグラジエントを行った。

PBa（和光純薬）標準液は1 mg/ml（85%

アセトン）に調整して使用した。

3 結果と考察

3. 1 抽出条件の違いによるメチル化カテキン抽出量への影響

供試した‘べにふうき’緑茶のカテキン類量を表3に示した。後述の抽出率はこの成分値を基に算出した。

まず、熱水に茶葉を浸せきし、沸騰させて抽出した場合のメチル化カテキン（epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)-gallate (EGCG3"Me)，gallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)-gallate (GCG3"Me)，epicatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)-gallate (ECG3"Meの総量)の抽出量を図1，2に示す。深蒸しにするほど抽出量は増えるものと予想していたが、各茶試料とも抽出量の蒸熱時間の違いによる差異は少なく、一番茶若芽を除いて、抽出時間が長くなるほど抽出量は増加する傾向にあった。使用した‘べにふうき’原葉は葉が厚くしっかりとしており深蒸しでもほとんど形状がくずれれることはなかったため、蒸熱時間による抽出量での差異が出にくかったものと考ええる。各茶試料の抽出時間における抽出率の平均値（蒸熱時間の異なる茶葉からの抽出率の平均）を表4に示す。30分煮沸抽出では、一番茶若芽で、EGCG3"Meの茶葉からの抽出率は66%，一番茶硬葉で69%，二番茶で82%であった。熱異性体を含めた総メチル化カテ

表2 HPLCによるフェオホルビド分析のためのグラジエント条件

	移動相 A	移動相 B	
0～10分	5%	95%	リニアグラジエント
10～35分	95%	5%	上記条件を保つ

表3 供試原料「べにふうき」緑茶の化学成分値 (mg/100g乾物重)

茶期・製造条件	EGCG3"Me	ECG3"Me	EGCG3"Me +ECG3"Me
一番茶 若芽30秒蒸し (4/30)	0.89	0.37	1.26
一番茶 若芽45秒蒸し	0.91	0.38	1.29
一番茶 若芽60秒蒸し	0.89	0.35	1.24
一番茶 若芽90秒蒸し	0.87	0.36	1.22
一番茶 若芽120秒蒸し	0.86	0.36	1.22
一番茶 硬葉30秒蒸し (5/11)	1.42	0.33	1.75
一番茶 硬葉45秒蒸し	1.47	0.34	1.81
一番茶 硬葉60秒蒸し	1.43	0.34	1.77
一番茶 硬葉90秒蒸し	1.37	0.32	1.69
一番茶 硬葉120秒蒸し	1.29	0.30	1.58
一番茶 硬葉180秒蒸し	1.39	0.32	1.71
二番茶 30秒蒸し (6/25)	1.66	0.54	2.20
二番茶 45秒蒸し	1.65	0.53	2.18
二番茶 60秒蒸し	1.86	0.61	2.47
二番茶 90秒蒸し	1.69	0.55	2.24
二番茶 120秒蒸し	1.78	0.58	2.36

図1 一番茶、二番茶「べにふうき」緑茶の煮沸抽出時間によるEGCG3"Me抽出量の変動

図2 一番茶、二番茶「べにふうき」緑茶の煮沸抽出時間による総メチル化カテキン抽出量の変動
総メチル化カテキンとは、EGCG3"Me、GCG3"Me、ECG3"Meの総和を表す

キンでは、86%，91%，98%と上昇し，茶葉を30分煮出すことによって，メチル化カテキンはほとんど抽出されていた。

比較として，熱水に茶葉を浸せきし，そのまま静置して抽出した場合のメチル化カテキンの抽出量を各90秒蒸熱試料について図3，4に，冷蔵庫で抽出する水出し煎茶を想定した4℃で16時間抽出した場合について蒸熱時

間の異なる試料についての結果を図5に示す。熱水抽出では，EGCG3"Meも総メチル化カテキンも抽出量に各茶期で大きな差はなく，抽出時間に応じて抽出量が増加した。5分抽出では，二番茶の抽出量が多かった。水出し煎茶では，蒸熱時間には関係なく，原葉が持っているメチル化カテキン量に応じて抽出された。表4に示したように，熱水5分抽

表4 各抽出条件による「べにふうき」緑茶からのメチル化カテキンの抽出率

茶期・抽出条件	EGCG3"Me抽出率	SD	総メチル化カテキン抽出率	SD
一番茶若芽 煮沸抽出 1分	25.06	7.55	25.90	7.19
一番茶若芽 煮沸抽出 5分	68.28	4.75	72.16	3.80
一番茶若芽 煮沸抽出10分	76.80	9.87	84.18	8.29
一番茶若芽 煮沸抽出30分	65.57	11.11	86.30	15.22
一番茶硬葉 煮沸抽出 1分	25.14	12.42	25.32	13.45
一番茶硬葉 煮沸抽出 5分	57.85	10.59	61.53	11.30
一番茶硬葉 煮沸抽出10分	65.31	6.14	73.57	5.55
一番茶硬葉 煮沸抽出30分	69.44	2.77	91.30	5.57
二番茶 煮沸抽出 1分	27.53	10.56	27.58	10.21
二番茶 煮沸抽出 5分	57.57	9.73	60.45	10.27
二番茶 煮沸抽出10分	76.69	9.38	82.50	9.32
二番茶 煮沸抽出30分	81.63	7.43	98.62	7.51
一番茶若芽 熱水静置抽出 1分	19.68	9.10	21.36	10.84
一番茶若芽 熱水静置抽出 3分	42.26	13.41	42.45	13.02
一番茶若芽 熱水静置抽出 5分	49.62	6.05	49.88	5.69
一番茶硬葉 熱水静置抽出 1分	12.25	5.14	13.36	5.09
一番茶硬葉 熱水静置抽出 3分	25.33	10.07	24.91	0.19
一番茶硬葉 熱水静置抽出 5分	32.77	14.36	32.43	15.06
二番茶 熱水静置抽出 1分	7.68	3.33	9.65	2.91
二番茶 熱水静置抽出 3分	34.44	10.78	33.98	10.92
二番茶 熱水静置抽出 5分	32.74	12.22	31.99	11.86
一番茶若芽 4℃16時間抽出	13.97	1.86	13.76	1.80
一番茶硬葉 4℃16時間抽出	13.43	1.50	13.48	1.62
二番茶 4℃16時間抽出	19.79	1.11	14.61	3.56

抽出率は、各条件抽出時メチル化カテキン含量の供試原料に含まれるメチル化カテキン量に対する比率で表した。値は同じ原葉で蒸熱時間を変えた供試原料からの抽出率の平均値及びSDで表した。

総メチル化カテキン=EGCG3"Me、GCG3"Me、ECG3"Meの総和

出での抽出率は、一番茶若芽で50%、一番茶硬葉で33%、二番茶で33%であり、総メチル化カテキン抽出率もほとんど同様であった。また、4℃で16時間抽出での抽出率は、13%~19%であった。

以上の結果から、メチル化カテキンの抽出率は、煮沸30分>煮沸10分>煮沸5分>熱水抽出5分>熱水抽出3分>煮沸1分>熱水抽出1分>水出しの順に多く、5分以上煎じれば、茶葉中のメチル化カテキンが概ね60%以上抽出されること、水出し抽出法は抽出率が低いことがわかった。堀江ら⁸⁾によると、'やぶきた'緑茶を用い主要カテキンである

epigallocatechin-3-O-gallate(EGCG)を90℃で抽出した場合、5分で80%以上抽出されるが、本試験でのメチル化カテキンの抽出率(5分後)は約60%であった。データには示していないが、本試験でメチル化カテキンと同時に測定したEGCGやECGの溶出特性はメチル化カテキンと同様の傾向であったので、メチル化カテキンの溶出が他のカテキンに比べて遅いのではなく、品種によるものと考えられた。

安江ら⁹⁾は、通年性アレルギー性鼻炎の症状改善に対する'べにふうき'緑茶の効果を検討したところ、EGCG3"Meを17mg含有した'べにふうき'緑茶飲料を1日に2回飲

‘べにふうき’ 緑茶抽出条件の違いによるメチル化カテキン含量及びフェオホルビド生成量の変動

図3 90秒蒸し各茶試料の熱水静置抽出時間によるEGCG3''Me抽出量の変動

図4 90秒蒸し各茶試料の熱水静置抽出時間による総メチル化カテキン抽出量の変動

図5 製造時蒸熱時間の異なる各茶試料の4℃16時間浸せきによるEGCG3''Me抽出量の変動

用した群で対照の‘やぶきた’緑茶飲用群に比べ有意な改善効果が見られ、その1/2量では効果は見られなかったと報告している。17mgのEGCG3''Meを摂取するためには、この試験で用いた二番茶の‘べにふうき’緑茶で5分煮沸抽出した場合、約1.7gの茶葉が必要であり、5分間熱水で静置抽出した場合には、3.0gの茶葉が必要となる。今後は、抽出率の違いをよく考慮して使用茶葉とその量、抽出時間等を考える必要がある。

3. 2 抽出時間の違いによるPBa生成量への影響

一番茶若芽、硬葉、二番茶 ‘べにふうき’ 緑茶粉末を40℃で3～360分間蒸留水中に浸

せきすると、一番茶若芽でPBaが最大80mg/100g生成した(図6)。二番茶 ‘べにふうき’ 緑茶ではほとんどPBaは生成せず、一番茶期であれば硬葉でも最大30mg/100mg生成した(図7, 8)。蒸熱時間が短いほどPBaの生成量が多いが、これは茶葉中のクロロフィラーゼ活性の残存量と関連していると考えられる。厚生労働省が定めているクロレラ等の総PB量は160mg/100g⁹⁾なので、得られた値はいずれも基準値以下ではあった。木幡ら⁵⁾は、上級玉露を蒸留水中で3時間インキュベートした時、60℃では約250mg/100g、40℃でも約150mg/100g生成したと報告している。また反応時間が長くなればなるほど、PBa生成量は増加することから、茶葉を温水中に長時間浸せきするのは避けなければなら

図6 蒸熱時間の異なる一番茶若芽を使用した‘べにふうき’緑茶の40℃における経時的総PBa量の変動

図7 蒸熱時間の異なる一番茶硬葉を使用した‘べにふうき’緑茶の40℃における経時的総PBa量の変動

ないと注意を促している。‘べにふうき’緑茶は蒸熱時間を比較的短くして製造されることが多いことからクロロフィル活性が残っていることが予想され、本幡らが指摘しているように、‘べにふうき’緑茶においても茶を温水中に長時間放置するのは避けなければならない。‘べにふうき’緑茶粉末は水などに溶いて即時に飲用するのはかまわないが、ペットボトル等の容器に入れ、気温の高い場所で長時間持ち歩くのは、光過敏毒性物質のPBaを多量に生成させる可能性がある。

4 摘 要

抗アレルギー作用で注目されている‘べにふうき’緑茶を飲用する際の留意点及びメチル化カテキンを十分利用できる抽出条件を明らかにするため以下の試験を行った。まず、抽出条件を変えてメチル化カテキン類の抽出率を検討した。‘べにふうき’緑茶からメチル化カテキンを多量に抽出するためには、煮沸しながら5分以上煎じるのが良かった(60%以上抽出可能)。熱水を注いでそのまま5分静置した場合は約30%、1晩冷蔵庫で抽出した場合は約14%の抽出率に過ぎなかった。通年性鼻炎の症状改善に有効とされる1日34mgを摂取するためには、使用茶葉量、抽出時間等を考慮する必要がある。

次に現在、‘べにふうき’緑茶として多く

図8 蒸熱時間の異なる二番茶を使用した‘べにふうき’緑茶の40℃における経時的総PBa量の変動

販売されている緑茶粉末を長時間温水中に放置した場合のフェオホルビドa (PBa: 光過敏性皮膚炎原因物質)生成量を測定したところ、一番茶若芽で製造した緑茶(30秒蒸熱)を40℃の温水中で3時間インキュベートすると80mg/100gのPBaが生成した。二番茶では生成はほとんどなかったが、緑茶粉末を水に浸けて気温の高い状態で長時間持ち歩く飲用法は避けた方が良くと考えられる。

5 謝 辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただきました野菜茶業研究所・本幡勝則博士、製茶をお手伝いいただいた茶生産省力技術研究チームの皆様には厚く御礼申し上げます。

6 引 用 文 献

- 1) Maeda-Yamamoto M., N.Inagaki, J.Kitaura, T.Chikumoto, H.Kawahara, Y.Kawakami, M.Sano, T.Miyase, H.Tachibana, H.Nagai and T.Kawakami (2004): O-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells. J. Immunology, 172(7), 4486-4492.
- 2) Fujimura Y., H.Tachibana, M.Maeda-Yamamoto, T.Miyase, M.Sano and K.Yamada (2002): Antiallergic Tea Catechin: (-)- Epigallocatechin-3-O- (3-O-

- methyl)-gallate, Suppresses FcεRI Expression in Human Basophilic KU812 Cells. J Agric Food Chem., 50(20), 5729-5734
- 3) Maeda-Yamamoto M., H.Nagai, K. Asai, S. Moriawaki, H.Horie, K.Kohata, H.Tachibana, T.Miyase and M.Sano (2004): Changes in Epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate and Strictinin Contents of tea (*Camellia sinensis* L.) Cultivar ‘Benifuuki’ in Various Degree of Maturity and Leaf Order. Food Science and Technology Research, 10(2), 186-190.
- 4) Maeda-Yamamoto M., H.Nagai, Y.Suzuki, K.Ema, E.Kanda and H.Mitsuda (2005): Changes in *O*- methylated catechin and chemical component contents of ‘Benifuuki’ green tea (*Camellia sinensis* L.) beverage under various extraction conditions. Food Science and Technology Research, 11(3), 248-253.
- 5) 木幡勝則・山下陽一・山内雄二・堀江秀樹 (1999): 緑茶の蒸熱に伴うクロロフィラーゼ活性の変化とフェオホルビト a の生成. 食科工, 46, 725-730.
- 6) 山本(前田)万里・長屋行昭・三森孝・山口優一・堀江秀樹・江間かおり・鈴木昌文・山内英樹・藁科文雄・水上裕造・廣野久子・物部真奈美 (2007): 低カフェイン処理機を用いて製造した ‘べにふうき’ 緑茶の化学成分変動と抗アレルギー活性への影響. 日本食品工学会誌, 8(3), 109-116.
- 7) 堀江秀樹・氏原ともみ・木幡勝則 (2001): 茶主要成分の茶浸出液への溶出特性. 茶研報, 91, 29-33.
- 8) 安江正明・池田満雄・永井寛・佐藤克彦・光田博充・山本(前田)万里・薮根光晴・中川聡史・梶本佳孝・梶本修身 (2005): 通年性アレルギー性鼻炎患者を対象とした ‘べにふうき’ 緑茶の抗アレルギー作用並びに安全性評価. 日本臨床栄養学会誌, 27(1), 33-51.
- 9) フェオホルバイド等クロロフィル分解物を含有するクロレラによる衛生上の危害防止について (昭和56年5月8日付け環食第99号 厚生省環境衛生局長通知)