(-)-エピガロカテキンガレートによる クロロフィル a の光退色抑制作用

尾崎 加奈^{*1}・安田みどり^{*2}・水流美智子^{*2}・太田 英明^{*1}

Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on discoloration of chlorophyll-a by light irradiation

OZAKI Kana^{*1}, YASUDA Midori^{*2},
TSURU Michiko^{*2} and OHTA Hideaki^{*1}

* 1 Graduate School of Health and Nutrition Sciences Nakamura Gakuen University
5-7-1 Befu, Jonan-ku, Fukuoka 814-0198

* 2 Department of Health and Nutrition Sciences, Faculty of Health and Social Welfare Science, Nishikyushu University
4490-9, Ozaki, Kanzaki-machi, Kanzaki-shi, Saga 842-8585

The consumption of green tea in colorless and transparent pet bottles has increased recently. However, there is a problem of the discoloration of the green pigment (chlorophyll) in green tea by light. This study was carried out to investigate the effect of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) on the discoloration of chlorophyll-a (Chl-a) by light irradiation. EGCG inhibited the discoloration of Chl-a when its concentration was 10 times greater the Chl-a concentration. Moreover, the simultaneous addition of EGCG and ascorbic acid resulted in a synergistic inhibitory effect on discoloration of Chl-a by light irradiation. All Chl-a in the green tea ethanol solution was decomposed by light irradiation for 4 hours. In spite of the addition of EGCG (1mM) to the green tea solution, the inhibition of the discoloration of Chl-a was not as strong as that predicted in this study. The concentration of catechins in the green tea solution decreased slightly during light irradiation. Therefore, although the inhibitory effect of EGCG on the discoloration of Chl-a was noted, it was not clearly observed in the green tea solution.

(Received Apr. 10, 2006 ; Accepted Aug. 24, 2006)

全国清涼飲料工業会の調査によれば、平成16年の緑茶ペットボトルの年間消費量は201万klとソフトドリンクの中ではトップで、しかも年々増え続けている。ペットボトルは、軽くて丈夫であること、蓋があることで飲み残しを防げることなどの利点があるため、ビンや缶ドリンクよりも消費者に好まれている。緑茶のペットボトルは、緑茶のイメージ、光による劣化防止を目的として、緑色のものがほとんどであった。しかし、着色容器はリサイクルシステムの障害となることから、現在では透明容器がほとんどである。また、消費者側からも、中身食品の安全性が確認でき、好みを選択できることなどから、透明容器の需要が高くなってきている。そのため、ペットボトル入り緑茶飲料の光による嗜好性および品質の低下が問題となっている。

クロロフィルは、緑茶の緑色色素であり、低いpHあるいは酵素により、フェオフィチンやフェオホルバイド

に分解し、黄褐色化が起こることが知られている¹⁾。茶葉におけるクロロフィルからフェオフィチンへの変化は、茶葉の品質、増しては価格に影響するため、多くの研究がなされている^{2)~3)}。しかしながら、これらの研究は、茶葉中のクロロフィルの変化に関する研究がほとんどで、緑茶溶液中のそれに関する文献はほとんどない。

光によるクロロフィルの退色反応に関する基礎研究は、古くからなされている^{4)~5)}。クロロフィルの退色現象は、食品の嗜好性を低下させるだけでなく、退色反応の過程で一重項酸素を発生する⁶⁾ため、食品中の脂質を容易に酸化し、結果として食品の劣化を招いてしまう。

緑茶中には抗酸化性をもつカテキン類が多く含まれている。カテキン類の中で最も高い抗酸化性を示すのは(-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) で、これは緑茶中に比較的多く含まれるカテキンである⁷⁾。そこで、本研究では、光照射に伴う緑茶溶液中のクロロフィル類

* 1 中村学園大学大学院栄養科学研究科 (〒814-0198 福岡県福岡市城南区別府 5-7-1)
E-mail: 尾崎加奈; s04d103@nakamura-u.ac.jp, 太田英明; hohta@cc.nakamura-u.ac.jp

* 2 西九州大学健康福祉学部健康栄養学科 (〒842-8585 佐賀県神埼市神埼町尾崎4490-9)
E-mail: 安田みどり; midori@nisikyu-u.ac.jp

の変化について調べ、EGCGが光によるクロロフィルの退色反応にどのような影響を与えるかについて調べた。今回使用したクロロフィルは、クロロフィルbよりも食品中の含有量が多く、光分解を受けやすいクロロフィルa⁴⁾ (Chl-a) を用いた。

実験方法

1. 試 薬

Chl-aは、スピルナ製(生化学用)を用い、その分解物の標品としてフェオフィチンa (Phy-a, クロレラ製, 生化学用), フェオホルバイドa (PB-a, クロレラ製, 生化学用)を用いた。AsA, DL- α -トコフェロール (α -Toc), β -カロテンは、和光純薬工業株式会社製のものを用いた。カテキン類 (EGCG, (-)-エピカテキン (EC), (-)-エピガロカテキン (EGC), (-)-エピカテキンガレート (EGC), (-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) は、純度98%以上のもの(栗田工業(株)製)を用いた。これらの試薬はすべてエタノールに溶解した。光による分解を防ぐため、クロロフィル類および β -カロテンは暗所にて調製を行った。

2. 緑茶溶液の調製

緑茶の茶葉は佐賀県嬉野産釜炒り茶を用いた。粉碎した茶葉0.1gを精秤し、10ml容メスフラスコに入れ、エタノール8mlを添加し、超音波バスにて30分間室温抽出を行った。その後、エタノールにて定容し、メンブランフィルター(0.45 μ m)にてろ過を行った。なお、これらの実験は光の影響をなくすためにすべて暗所にて行った。

3. 光照射操作

光源は、FUNA UVライト(フナコシ(株)製)を使用し、短波長(254nm)と長波長(366nm)の紫外線および白色光を用いて光照射を行った。照度は、照度計(LM-332, アズワン(株))にて測定し、ライトの向きや高さを変えることで、試料地点の照度を4klxに調整した。

4. クロロフィル類の分析

クロロフィル類の分析はHPLC法⁹⁾によって行った。HPLC装置はWaters製600Eマルチソルベントシステム, UV検出器はWaters製2487デュアル λ UV/VIS検出器を用いた。分析カラムは東ソー製TSKgel ODS-80TM (6.0 $\times$ 150mm)を用いた。移動相はエタノール95% (v/v) (I液) および80% (v/v) 水溶液 (II液)を用い、分析に際しリニアグラジエントをかけた(0 $\rightarrow$ 10min: 5 $\rightarrow$ 95% I液, 10 $\rightarrow$ 30min: 95% I液)。HPLC分析条件は、流速0.8ml/min, 試料注入量10 μ l, カラム温度40 $^{\circ}$ C, UV/VIS検出器(410nm)とした。

5. カテキン類の分析

カテキン類の定量は、既報⁹⁾に従って行った。分析カラムには資生堂製CAPCELLPAK C₁₈UG120 (4.6 $\times$ 250mm)を用いた。HPLC条件は、移動相0.1Mリン酸水溶液(1 $\times$ 10⁻⁴MのEDTA $\cdot$ 2Naを含む), アセトニトリル, 酢酸エチル=84:12:4 (v/v, %), 流速1ml/min,

試料注入量10 μ l, カラム温度40 $^{\circ}$ C, 電気化学検出器の加電圧750mVとした。

結果および考察

1. Chl-aの光退色作用に及ぼす抗酸化物質の影響

光照射に伴うChl-aの変化およびEGCG添加後のChl-aの変化を調べるために、光照射直前と照射後30分毎にサンプリングを行い、HPLCによるChl-aの分析を行った。なお、比較として、緑茶に含まれるほかの抗酸化物質についても同様の実験を行った。このときChl-aの濃度は、1 $\times$ 10⁻⁵Mとし、抗酸化物質(EGCG, AsA, α -Toc, β -カロテン)の濃度は、いずれも1 $\times$ 10⁻³Mとした。Fig. 1は、実験開始直前のChl-aの濃度(C)およびそれぞれの加熱時間後のChl-aの濃度(S)より求めたChl-aの残存率(100S/C, %)を光照射時間に対してプロットしたものである。その結果、Chl-a溶液は、光照射時間とともに徐々に退色し、4時間後にはChl-aはほとんど存在しなくなり、無色透明となった。この退色反応は、クロロフィルが光照射によって低分子化合物に分解されるためであるといわれている¹⁰⁾。

Chl-a溶液にEGCGを添加した場合には、光照射によるChl-aの減少を著しく抑制した。AsAおよび α -Tocについても強い抑制作用がみられたが、 α -Tocを用いた場合は3時間後にChl-aの残存率の急激な減少が認められた。

クロロフィルに酸素の存在下で光を照射すると、活性酸素の一つであるヒドロキシルラジカルの生成が認められたという報告があり¹¹⁾、クロロフィルの光分解には、ヒドロキシルラジカルが重要な役割を演じていると考え

Fig. 1 Effects of antioxidants on discoloration of Chl-a by light irradiation

The concentrations of Chl-a and antioxidants were 1 $\times$ 10⁻⁵ M and 1 $\times$ 10⁻³ M before light irradiation. Symbols stand for the absence of antioxidant (○), and the presence of antioxidants (EGCG (●), AsA (△), α -Toc (▲) and β -carotene (□)).

られる。

EGCGは、ヒドロキシルラジカルの消去能があることが報告されており¹²⁾、これがChl-aの光退色を抑制した要因であると思われる。EGCGは茶に含まれるほかの抗酸化物質の中で最も強いChl-aの光退色抑制剤と考えられるが、これまではこのような報告はほとんどなく、非常に興味深い結果である。AsAおよび α -Tocは、強い抗酸化性を示すことが知られ、ヒドロキシルラジカル消去能があることが報告されている¹³⁾。このことから、AsAや α -TocもChl-aの光分解の初期段階において生じたヒドロキシルラジカルを消去し、退色作用を抑えたということが推察された。また、光照射に伴う葉緑素の損傷を保護したという報告がすでにあり^{14)~15)}、私たちの結果を支持している。 α -Tocの3時間以降におけるChl-aの残存率の急激な減少の理由については明らかになっていないが、酸素吸収法にて脂質の過酸化反応を行った際に、 α -Tocを添加することで脂質の酸化速度を顕著に低下したが、 α -Tocが完全に消費されると脂質の酸化反応が急に進行したという報告がある¹⁶⁾。このことから、本実験においても α -Tocが3時間で消費され、その後急激なChl-aの減少を招いたと推察される。

一方、 β -カロテンを添加した場合は、コントロールの場合と同様の挙動を示した。これは、 β -カロテンがヒドロキシルラジカルをほとんど消去しないため¹⁷⁾、また、クロロフィル同様に光による退色を起こしやすいためであると考えられる¹⁸⁾。一方、 β -カロテンは、クロロフィル類が光照射によって生じた一重項酸素を消去する働きが知られ¹⁹⁾、食品の酸化的劣化を防ぐことができるが、退色反応に対する明白な効果は認められなかった。

2. Chl-aの光退色作用に及ぼすEGCGの濃度の影響

種々の濃度 ($1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ M}$) のEGCGによるChl-a ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) の光退色抑制効果について調べた。その結果をFig. 2に示す。Chl-aと同じ濃度のEGCGでは光照射によるChl-aの退色抑制効果がほとんどみられなかったが、Chl-aに対して10倍 ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$) の濃度から効果がみられ、さらに、50倍 ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$) では強い退色抑制効果が認められた。したがって、光によるChl-aの退色を防ぐためには、Chl-aの10倍以上の濃度のEGCGを添加する必要がある。さらに、50倍の濃度のEGCGの添加により、その効果は増すと思われる。また、EGCGの濃度がChl-aの50倍の場合と100倍の場合との結果がほぼ同様であったことから、最大の効果を示すのはChl-aの約50倍の濃度のEGCGを添加した場合であることが示唆された。

3. Chl-aの光退色抑制作用に対するEGCGとAsAの相乗効果

抗酸化性に対するカテキンとAsAの相乗効果がすでに報告されている²⁰⁾。そこで、EGCGとAsAの同時添加が、Chl-aの光退色反応にどのような影響を及ぼすのかについて調べた。その結果をFig. 3に示した。Chl-aの光

Fig. 2 Effect of concentration of EGCG on discoloration of Chl-a by light irradiation

The concentration of Chl-a was $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ before light irradiation. The concentrations of EGCG were 0 ($\circ$), 1×10^{-5} ($\bullet$), 1×10^{-4} ($\triangle$), 5×10^{-4} ($\blacktriangle$), and 1×10^{-3} ($\square$) M.

Fig. 3 Effect of simultaneous addition of EGCG and AsA on discoloration of Chl-a by light irradiation

The concentrations of Chl-a, EGCG and AsA were $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ each before light irradiation. Symbols stand for control ($\circ$), and after addition of EGCG ($\bullet$), AsA ($\triangle$), EGCG+AsA ($\blacktriangle$).

退色反応は、EGCG ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) またはAsA ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) の単独ではAsAのほうがわずかに高い光退色抑制効果がみられたが、いずれも強い抑制効果とはいえなかった。一方、EGCGとAsAの共存によって高いChl-aの退色抑制効果、つまり、相乗効果が認められた。これは、EGCGはみずからが酸化することで、Chl-aの光分解に伴って生じたフリーラジカルを消去するが、AsAの存在によりEGCGが還元され、修復されるという反応機構に

よって、Chl-aの退色効果を高めたと考えられる。

カテキンは渋み成分であり、高濃度のカテキンの添加は味を損なう要因となりうる。しかしながら、AsAの共存によりカテキンの低濃度でのChl-aの退色抑制の相乗効果が認められたことから、加工食品への応用が期待される。

4. 光照射に伴う緑茶溶液中のクロロフィル類の退色作用およびEGCG添加の影響

緑茶溶液中には、クロロフィル類とともにEGCGをはじめとする多くの抗酸化物質が含まれている。そこで、実際に緑茶溶液を用いて、光照射によってクロロフィルがどのように変化するかについて検討を行った。Fig. 4に光照射に伴うクロロフィル類(Chl-a, Phy-a, PB-a)の濃度の変化を示した。光照射によって緑茶溶液中のChl-aは時間とともに減少し、3時間後にはほとんどすべてが分解された。一方、Phy-aはほとんど変化がみられなかったが、PB-aは時間とともに多少の増加が認められた。

以前の実験において、EGCGの濃度がChl-aよりも50倍以上の場合に強い光退色抑制作用が認められたが、今回の緑茶溶液中のEGCGの濃度はChl-aの約25倍であったことから、さらにEGCGを添加して約50倍となるようにし、同様の実験を行った。その結果をFig. 4に示す。緑茶溶液へのEGCGの添加により、光照射前のChl-aの濃度が高まり、分解を抑制したと考えられる。また、光照射後の濃度についても、EGCGを添加していない場合と比較し、わずかではあるがChl-aの分解を抑えることが明らかに

なった。Phy-aについては、EGCGを添加した場合でも、光照射時間に伴う変化はほとんどみられなかった。また、PB-aの濃度は、EGCGの添加により増加し、光照射2時間後からさらに増加した。フェオフィチンやフェオホルバイドは、クロロフィルに比べ、光に対して比較的安定であることが報告^{4)~5)}されており、Phy-aの結果は理解できるが、PB-aの光照射によって増加する要因は不明である。なお、Phy-aやPB-aは、緑茶の製造工程中に生じたもの、つまり、元々緑茶に含まれていたと考えられる³⁾が、フェオホルバイドはヒトに対して光過敏毒性を示すことが知られている²⁾ため光照射によりPB-aが増加したことは注意すべきことであると思われる。

光照射に伴う緑茶溶液中のカテキン類の濃度の変化をFig. 5 (a) に示す。ほとんどのカテキン (EC, EGC, ECG, EGCG) に緩やかな減少が認められた。1 mMのEGCGを添加した溶液でも同様の傾向であった (Fig. 5 (b))。これは、カテキン類が光照射によって生じたヒドロキシルラジカルなどのフリーラジカルを消去したためではないかと推察される。

緑茶溶液にはChl-aの約32倍、1 mMのEGCGを添加した緑茶溶液には約54倍ものEGCGが含まれており、先に行ったEGCGの濃度の影響の結果から、非常に強いChl-aの光退色抑制作用が予想されたが、実際はあまり効果がみられなかった。また、緑茶にはEGCG以外のカテキン類やビタミン類などの抗酸化物質が豊富に含まれているが、光照射によるChl-aの分解を抑制することは難しいことが明らかになった。この要因として、緑茶中に含ま

Fig. 4 Changes in chlorophylls by light irradiation in green tea solution before and after addition of EGCG

Green tea solution was prepared by homogenizing 0.1 g of tea leaves 10 ml of ethanol, and adding EGCG (1 mM) to the solution. For detailed procedure see the experimental section. Symbols stand for Chl-a (○), Phy-a (△) and PB-a (□) in green tea solution, and Chl-a (●), Phy-a (▲) and PB-a (■) in green tea solution after addition of EGCG (1 mM).

Fig. 5 (a) Decomposition of catechins by light irradiation in green tea solution before addition of EGCG

Green tea solution was prepared by homogenizing 0.1 g of tea leaves 10 ml of ethanol. For detailed procedure see the experimental section. Symbols stand for EC (○), EGC (●), ECG (△) and EGCG (▲).

Fig. 5 (b) Decomposition of catechins by light irradiation in green tea solution after addition of EGCG

Green tea solution was prepared by homogenizing 0.1 g of tea leaves 10ml of ethanol, and adding EGCG (1mM) to the solution. For detailed procedure see the experimental section. Symbols stand for EC (○), EGC (●), ECG (△) and EGCG (▲).

れているクロロフィラーゼの影響³⁾などがあげられ、今後の検討課題としたい。また、今回は、クロロフィル類が水に溶けにくいこと、水によるクロロフィルの分解を考慮しないことから、エタノール溶液にて実験を行ったが、実際には水溶液にて飲用することから、今後、水による影響などを考慮し、水溶液中にて実験を行う必要があると思われる。

本研究では、茶葉中に含まれるEGCGが光照射によるChl-aの退色反応を抑制することを明らかにした。しかしながら、短期的な抑制であり、ペットボトルなどの長期的な保存に対する効果は期待できない。緑茶の緑色の長期的な保持には、やはり光の遮断が必要であると思われる。しかし、今回の結果、すなわち、カテキンがクロロフィルの緑色の保持を助長するという生理機能は、初めての報告となる。クロロフィルの光分解に伴い、フリーラジカルが生成することから、カテキンがクロロフィルを含んだ食品の劣化を防ぐことが考えられる。つまり、カテキンは食品の2次および3次機能を高める優れた物質であると考えられる。

要 約

近年、無色透明のペットボトル入りの茶飲料の消費量が增大しているが、光による緑茶の緑色色素（クロロフィル）の退色が問題となってきた。そこで、本研究ではクロロフィルa (Chl-a) の光照射に伴う退色反応に対する (-) -エピガロカテキンガレート (EGCG) の影響について調べた。Chl-aの光退色反応は、EGCGの添加によって抑制されることが明らかになった。これは、EGCGの濃度がChl-aの約10倍以上のときにみられ、アス

コルビン酸との同時添加により、相乗効果も認められた。緑茶溶液中のChl-aは、光照射4時間後にはほとんどすべてが分解されたが、さらなるEGCGの添加により、この反応が幾分抑えられた。しかしながら、本研究で予想していたものほど高い抑制作用を示さなかった。また、緑茶溶液中のカテキン類の濃度は、光照射時間に伴って緩やかに減少した。以上のことから、クロロフィルの緑色の保持にカテキンが寄与することが示唆されたが、緑茶溶液の長時間の保持には期待できないことが明らかになった。

文 献

- 1) SCHWARTZ, S. J. and LORENZO, T. V.: Chlorophylls in foods, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **29**, 1 ~ 17 (1990)
- 2) 木幡勝則・山下陽市・山内雄二・堀江秀樹：クロロフィルおよびその誘導体含有量から見た市販緑茶の品質と特質, 茶業研究報告, **87**, 13~19 (1999)
- 3) 木幡勝則・原口隆文・辻 正樹・氏原ともみ・堀江秀樹：碾茶製造工程におけるクロロフィル色素類含有量およびクロロフィラーゼ活性の変化, 日食科工, **48**, 744~750 (2001)
- 4) 守 康則・縄田尚子・池田由美子・松本苗美：クロロフィルおよびクロロフィル誘導体の光分解に関する研究, 栄養と食糧, **22**, 115~121 (1969)
- 5) 石谷孝佑・木村 進：クロロフィルおよびクロロフィル誘導体の光分解について, 日食工誌, **24**, 448~452 (1977)
- 6) ENDO, Y., USUKI, R. and KANEDA, T.: Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 781~784 (1984)
- 7) KUMAMOTO, M. and SONDA, T.: Evaluation of the antioxidative activity of tea by an oxygen electrode method, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 175~177 (1998)
- 8) KOHATA, K., HANADA, K. and HORIE, H.: High performance liquid chromatographic determination of pheophorbide-a and its related chlorophyll derivatives in tea leaves, *Food Sci. Technol. Int. Tokyo.*, **4**, 80~84 (1998)
- 9) KUMAMOTO, M., SONDA, T., TAKEDOMI, K. and TABATA, M.: Enhanced separation and elution of catechins in HPLC using mixed-solvents of water, acetonitrile and ethyl acetate as the mobile phase, *Anal. Sci.*, **16**, 139~144 (2000)
- 10) LLEWELLYN, C. A., MANTOURA, R. F. C. and BRERETON, R. G.: Products of chlorophyll photodegradation- 2. Structural identification, *Photochem. Photobiol.*, **52**, 1043~1047 (1990)

- 11) HARBOUR, J. R. and BOLTON, J. R.: The involvement of the hydroxyl radical in the destructive photooxidation of chlorophylls in vivo and in vitro, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 231~234 (1978)
 - 12) KASHIMA, M.: Effects of catechins on superoxide and hydroxyl radical, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 279~283 (1999)
 - 13) SOARES, D. G., ANDREAZZA, A. C. and SALVADOR, M.: Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1077~1080 (2003)
 - 14) HALLIWELL, B.: Ascorbic acid and the illuminated chloroplast, *Adv. Chem. Ser.*, 263~274 (1982)
 - 15) BUECH, G. W. and BERGER, R. G.: Degradation of chlorophyll in model preparations, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, **94**, 109~112 (1998)
 - 16) 二木鋭雄: ビタミンEの抗酸化作用, ビタミン, **62**, 601~619 (1988)
 - 17) WANG, S. Y. and JIAO, H.: Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5677~5684 (2000)
 - 18) MINNGUEZ-MOSQUERA, M. I. and JAREN-GALAN, M.: Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments, *J. Sci. Food Agric.*, **67**, 153~161 (1995)
 - 19) LEE, S. H. and MIN, D. B.: Effects, quenching mechanisms, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1630~1634 (1990)
 - 20) SAUCIER, C. T. and WATERHOUSE, A. L.: Synergetic activity of catechin and other antioxidants, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4491~4494 (1999)
 - 21) 三木和保・田島 修・松浦栄一・山田幸二・富金原孝: クロレラ中の光過敏症原因物質の分離, 同定, 農化, **54**, 721~726 (1980)
(平成18年4月10日受付, 平成18年8月24日受理)
-