[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 59, No. 2, pp. 129~134, 1985]

茶葉カテキン類の抗酸化作用について

松崎 妙子, 原 征彦
(三井農林株式会社食品総合研究所)

昭和 59 年 6 月 25 日 受理

Antioxidative Activity of Tea Leaf Catechins

Taeko MATSUZAKI and Yukihiko HARA

Food Research Laboratories, Mitsui Norin Co., Fujieda, Shizuoka 426

Instant green tea was extracted with chloroform and ethyl acetate to obtain a crude catechin mixture. The four main tea catechin components (–)-epicatechin (EC), (–)-epigallocatechin (EGC), (–)-epicatechin gallate (ECg) and (–)-epigallocatechin gallate (EGCg) were isolated from the crude catechin by HPLC and purified. The antioxidative effects of the four catechins were tested by the active oxygen method (AOM) at 97.8°C on lard. The antioxidative activity increased in molarity in the following order: EC < ECg < EGC < EGCg. This implies that their activities were related to their structural formula.

The synergism of EGCg with 19 amino acids, several organic acids and tocopherol was tested on lard by AOM at 97.8°C or 60°C. Among amino acids tested only L-methionine showed slight synergism, whereas most of the others showed accelerated oxidation. Tocopherol and several organic acids including L-ascorbic acid showed a remarkable synergistic effect. EGCg also acted as an antioxidant in the linoleic acid system but its activity was milder than in the lard system. In addition, the antioxidative activity of EGCg was demonstrated in a system where linoleic acid was solubilized in a large amount of water. EGCg had an antioxidative activity in both the oil and aqueous system. The crude catechin mixture showed a similar antioxidative effect as EGCg in the lard system and was also effective in commercial salad oil. (Received June 25, 1984)

緒 言

近年、天然物の抗酸化作用に関する研究が数多く報告されており茶葉の抗酸化作用についても梶本⁽¹⁾、戸田⁽²⁾による報告がなされている。また茶葉ポリフェノール成分であるカテキン類の分析に関しては広瀬⁽³⁾および西條⁽⁴⁾により、高速液体クロマトグラフィーによる分析が報告されている。筆者らは茶葉より(–)-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 (ECg) および (–)-エピガロカテキンガレート (EGCg) を分取用高速液体クロマトグラフィーにより分離して、十分量の純品を得たので、これらの物質につきさらに詳細な抗酸化実験を行い、茶葉カテキン類の抗酸化剤としての有用性につき検討した。

すなわち、EC, EGC, ECg および EGCg の4種のカ

テキンについて、ラードに対するそれらの抗酸化力を比較するとともに、シネルギストとしてアミノ酸、有機酸およびトコフェロールが EGCg に及ぼす効果を調べた。あわせて EGCg のリノール酸に対する抗酸化作用を試験した。また水混合リノール酸に対する EGCg の抗酸化試験を行い、油系のみでなく水系における作用についても検討した。

また、カテキン類分離精製前のカテキン混合物についてラードおよび市販サラダ油に対する効果を調べたのでその結果をもあわせて報告する。

実 験

1. カテキン類の分離および精製 材料としては茶葉を熱水抽出した液を噴霧乾燥することにより得られたインスタント緑茶を用いた。分離方法は Fig.1 に示し

たように、まずインスタント緑茶を温水に溶解した後、等量のクロロホルムで抽出し、その水層部を酢酸エチルにて抽出した。その酢酸エチル層を濃縮し、濃厚水溶液となして後、凍結乾燥することによりカテキン混合物粉末を得た。このカテキン混合物を分取用液体クロマトグラフィーにて分画した。これより Fig. 2 に示したように4つのピークが得られ、各ピーク部位の溶出液を分取した。この溶出液を濃縮し水溶液とした後、凍結乾燥す

Fig. 1. Separation of Tea Leaf Catechins.

Fig. 2. High Performance Liquid Chromatogram (HPLC) of Tea Catechins. Instrument, Waters Prep LC/System 500A; detector, RID; column, Waters Prep PAC-500/C 18 (5 cm ϕ $\times$ 30cm); mobile phase, tetrahydrofuran/acetone/ H_2O (10/12/78); flow rate, 150 ml/min.

ることにより白色粉末が得られた。これらをさらに水からの再結晶を繰り返すことにより精製し、おのおのの IR スペクトル測定、UV スペクトル測定および元素分析を行い、中川らの測定データ⁽⁵⁻⁷⁾と比較し、一致したことより、それぞれを最初のピークから EGC, EC, EGCg, ECg であることを確認した。

2. 試料の調製 EC, EGC, ECG および EGCg はエタノール溶液としてから適量を油脂に混合した。アミノ酸はその結晶粉末をさらに乳鉢にて微粉末としてから油脂に分散させた。有機酸はエタノール溶液としてから油脂に混合した。

3. 実験方法

(1) 4 種のカテキンの抗酸化力の比較 EC が 50 ppm, EGC が 20 ppm, ECG が 50 ppm, および EGCg が 20 ppm になるように無添加ラードに添加し、AOM⁽⁸⁾ (97.8°C $\pm$ 0.1°C) で酸化曲線を求めた。対照物として *dl*- α -トコフェロール 200 ppm および BHA 50 ppm 添加物の酸化曲線を求めた。

(2) EGCg のシネルギスト **a. アミノ酸との相乗効果**：アミノ酸として、L-メチオニン、L-ヒスチジン、L-リジン塩酸塩、L-アルギニン、L-チロシン、L-バリン、L-シスチン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-オキシプロリン、L-アラニン、L-フェニルアラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン塩酸塩、L-システイン、L-システイン酸、L-スレオニンの 19 種類を用いた。EGCg の 10 ppm 添加ラードを調製した後、これらアミノ酸のおおの 100 ppm をさらに添加し、AOM (97.8°C) で酸化曲線を求めた。

b. 有機酸との相乗効果：有機酸として、リンゴ酸、クエン酸および酒石酸を用いた。EGCg の 10 ppm 添加ラードにリンゴ酸、クエン酸および酒石酸をおおの 50 ppm になるよう添加し、AOM (97.8°C) で酸化曲線を求めた。

c. L-アスコルビン酸との相乗効果：L-アスコルビン酸を EGCg 5 ppm 添加ラードに 5 ppm および 50 ppm 添加し、AOM (60°C) で酸化曲線を求めた。クエン酸、リンゴ酸も同様におおの 50 ppm 添加し、比較対照物とした。

d. トコフェロール Mix との相乗効果：実験に用いたトコフェロール Mix (甘糟化学産業製) は、天然トコフェロールを 60% 含有しており、 α -トコフェロールが 30%、その他のトコフェロール (β -, γ -, δ -) が

30% 含まれている。トコフェロール Mix 100 ppm と EGCg 5 ppm 添加ラードおよびトコフェロール Mix 200 ppm 添加ラードを作製し、AOM (97.8°C) で酸化曲線を求めた。

(3) EGCg のリノール酸に対する抗酸化作用

a. リノール酸に対する作用：リノール酸(和光試薬)に EGCg 10 ppm および 100 ppm を添加した試料および *dl*- α -トコフェロール 100 ppm を添加した試料をおのおの 200 ml のコニカルビーカーに 10 ml ずつ 5 個に分注し、30°C 恒温室内に保存し、経時サンプリングを行い、過氧化物価 (POV) を測定し、酸化曲線を求めた。

b. 水混合リノール酸に対する作用：水混合リノール酸、すなわち 100 mg のリノール酸を 10 ml のエタノールに溶解し、10 ml の 0.2 M リン酸緩衝液および 1 ml の試料液を加えた後、水にて全量を 25 ml とした溶液 (リノール酸 0.4% 含有水溶液) を作製し、30°C に保ち、これに対する抗酸化作用をチオバルビツール酸法 (TBA 法)⁽⁹⁾ にて調べた。試料としては EGCg を上記の方法により調製した水混合リノール酸液に対して 0.4 ppm (純リノール酸量に対して 100 ppm となる)、および 4 ppm (純リノール酸量に対して 1000 ppm となる) を添加したものと *dl*- α -トコフェロール 4 ppm (同じく 1000 ppm) を添加したものをを用いた。

(4) カテキン混合物のラードおよび市販サラダ油に対する抗酸化作用 a. ラードに対する作用：カテキン混合物のエタノール溶液をラードに対し、10 ppm, 20 ppm および 50 ppm になるように添加し、AOM (97.8°C) で酸化曲線を求めた。

b. 市販サラダ油に対する作用：同様にカテキン混合物を市販サラダ油に対し、50 ppm, 200 ppm および対照物として、*dl*- α -トコフェロール 200 ppm および BHA 200 ppm を添加し、AOM (97.8°C) で酸化曲線を求めた。

結果および考察

1. 4 種のカテキンの抗酸化力

EC, EGC, ECg, EGCg, *dl*- α -トコフェロールおよび BHA の AOM 酸化曲線を Fig. 3 に示した。これより各サンプルの等重量濃度におけるラードに対する抗酸化力の強さは、*dl*- α -トコフェロール < BHA < ECg < EC < EGCg < EGC の順になることがわかる。

一方、EC, EGC, ECg および EGCg について、等モ

Fig. 3. Antioxidative Activity of Four Catechins by AOM at 97.8°C on Lard. 200ppm of *dl*- α -tocopherol, 50 ppm of BHA, and 20 ppm or 50 ppm of four catechins were added to lard. ●, none; △, *dl*- α -toc. 200ppm; ▲, BHA 50ppm; ○, ECg 50 ppm; ■, EGCg 20 ppm; ◎, EC 50 ppm; □, EGC 20 ppm.

Fig. 4. Structural Formula of Four Catechins.

ル濃度において抗酸化力の強さを検討してみた。すなわち、Fig. 3 のグラフより POV が 20 meq/kg に達するに要した時間を読みとり、その値をモル濃度換算し、EC を 1 とした場合の相対比を計算すると Table I のようになる。これより、等モル濃度における抗酸化力の強さは、EC < ECg < EGC < EGCg の順であることがわかる。

これらを Fig. 4 に示した構造式でみると、5' の位置に水酸基がついている EGC および EGCg、いわゆるピロガロール型カテキンは、5' 位に水酸基のない EC および ECg、いわゆるカテコール型カテキンに比べ、その抗酸化力は約 3 倍も強いことがわかる。また 3 位に没食子酸基のついているガレート類のほうが、没食子酸基

Table I. A Comparison of Antioxidative Activity of Four Catechins at Equal Molarity

Sample	Molecular weight	Relative antioxidative activity
(-)-Epicatechin(EC)	290	1.00
(-)-Epigallocatechin(EGC)	306	3.64
(-)-Epicatechin gallate(ECg)	442	1.36
(-)-Epigallocatechin gallate(EGCg)	458	3.73

Table II. The Synergism of (-)-Epigallocatechin Gallate with Amino Acids

EGCg (ppm)	Amino acid (100 ppm)	POV ^a (meq/kg)
10	—	68.0
10	L-Met	20.5
10	L-His	70.0
10	L-Lys·HCl	358.7
10	L-Arg	258.5
10	L-Tyr	202.6
10	L-Val	281.8
10	L-Cys	267.0
10	L-Leu	225.3
10	L-Ileu	261.5
10	L-Hypro	573.7
10	L-Ala	490.1
10	L-Phe	597.3
10	L-Asp	472.0
10	L-Glu	69.2
10	L-Gly	559.8
10	L-His·HCl	623.7
10	L-CySH	45.0
10	L-CySO ₃ H	267.0
10	L-Thr	400.2

^a The peroxide value after 24 hr by AOM at 97.8°C on lard.

のないものよりもわずかながら抗酸化力が強い。

これらの事実は、この抗酸化力の強さは水酸基の数の多いほうが強いという傾向があることとともに、それ以上に 5' 位の水酸基が抗酸化作用発現に関与していることを推測させる。

以後の実験は、茶葉ポリフェノールの主成分であり、最も大量に純品化できる EGCg を用いて行った。

2. EGCg のシネルギスト

(1) アミノ酸との相乗効果 19 種アミノ酸について EGCg との相乗効果を調べた結果を Table II に示した。この実験条件においては EGCg とアミノ酸を

Table III. The Synergism of (-)-Epigallocatechin Gallate with Organic Acids

EGCg (ppm)	Organic acid (ppm)	POV ^a (meq/kg)
10	—	186
10	Malic acid 50	32
10	Citric acid 50	21
10	Tartaric acid 50	25

^a The peroxide value after 20 hr by AOM at 97.8°C on lard.

Table IV. The Synergism of (-)-Epigallocatechin Gallate with L-Ascorbic Acid

EGCg (ppm)	Sample (ppm)	Days ^a
—	—	7.1
5	—	12.1
—	L-Asc. acid 50	10.9
5	L-Asc. acid 5	13.7
5	L-Asc. acid 50	16.9
5	Citric acid 50	13.8
5	Malic acid 50	14.1

^a The days until peroxide value reached 20 meq/kg by AOM at 60°C on lard.

Table V. The Synergism of (-)-Epigallocatechin Gallate with Tocopherol Mix

EGCg (ppm)	Toc. mix ^a (ppm)	Time ^b (hr)
—	—	8.0
5	—	14.8
5	100	29.0
—	200	20.0

^a Toc. mix; consists of 60% of natural tocopherol(30% of α -toc. and 30% of the others).

^b The time until peroxide value reached 20 meq/kg by AOM at 97.8°C on lard.

加えたラードは EGCg のみのものに比べると、むしろ POV を上げるもののほうが多く、L-メチオニンのみがわずかながら相乗作用を示したにすぎなかった。アミノ酸の抗酸化作用については多くの研究^(10,11)が行われており、アミノ酸の添加濃度、pH、無機塩等が影響して反応条件によっては酸化促進的に作用することが知られている。よって条件を変えることで抗酸化作用も変わる可能性を否定することはできない。

(2) 有機酸との相乗効果 リンゴ酸、クエン酸および酒石酸と EGCg とを併用させた場合のラードによる AOM (97.8°C) 酸化曲線を求め、20 時間後の POV

を Table III に示した。これより EGCg はこれら 3 種の有機酸と相乗作用を示すことがわかる。

(3) **L-アスコルビン酸との相乗効果** L-アスコルビン酸と EGCg を併用させた場合のラードにおける AOM (60°C) 酸化曲線を求め、それより POV が 20 に達するまでの日数を読みとり、Table IV に示した。

Fig. 5. Antioxidative Activity of EGCg at 30°C on Linoleic Acid. 100 ppm of *dl*- α -tocopherol, 10 ppm of EGCg, and 100 ppm of EGCg were added to linoleic acid. ○, none; △, *dl*- α -toc. 100 ppm; ▲, EGCg 10 ppm; ●, EGCg 100 ppm.

Fig. 6. Antioxidative Activity of EGCg at 30°C on Linoleic Acid Solubilized in Water. 4 ppm of *dl*- α -tocopherol, 0.4 ppm of EGCg and 4 ppm of EGCg were added to 0.4% linoleic acid solubilized in water. ○, none; ●, *dl*- α -toc. 4 ppm; △, EGCg 0.4 ppm; ▲, EGCg 4 ppm.

比較対照物としてクエン酸およびリンゴ酸も同様に求めてみた。これより L-アスコルビン酸はクエン酸やリンゴ酸よりも強い相乗作用を示すことがわかる。

(4) **トコフェロール Mix との相乗効果** トコフェロール Mix と EGCg を併用させた場合のラードにおける AOM (97.8°C) 酸化曲線を求め、それより POV が 20 に達する時間を読みとり、Table V に示した。これより明らかなように EGCg はトコフェロールとの併用で優れた相乗作用を示す。

3. EGCg のリノール酸に対する抗酸化作用

(1) **リノール酸に対する作用** リノール酸における EGCg の 30°C 保存試験の結果を Fig. 5 に示す。これより EGCg はリノール酸に対しても抗酸化作用を示すことがわかる。しかしながらこの効果はラードに対する場合よりも弱い。

しかし、リノール酸に対して抗酸化作用を示す事実はリノール酸が植物性油脂に多く含まれているものであることと、トコフェロールとの相乗効果の結果も含め EGCg が各種植物性油脂に対しても優れた抗酸化作用を示す可能性を示唆するものと思われる。

(2) **水混合リノール酸に対する作用** 水混合リノール酸に対する EGCg の抗酸化作用を TBA 法にて調べた結果を Fig. 6 に示す。これより EGCg は水混合リノール酸に対しても抗酸化作用を示し、その効果は *dl*- α -トコフェロールよりも多少劣る。

しかしながら、油系のみでなく水系においても抗酸化作用を示す事実は抗酸化剤として幅広い利用ができることを物語っていると思われる。

4. カテキン混合物の抗酸化効果

(1) **ラードに対する作用** カテキン混合物のラードに対する抗酸化曲線を Fig. 7 に示す。これよりカテキン混合物は *dl*- α -トコフェロールや BHA に比べ、はるかに強い抗酸化作用を示し、その効力は Fig. 3 を参照すると EGCg 単独のものにはほぼ相当する強さであることがわかる。

(2) **市販サラダ油に対する作用** カテキン混合物の市販サラダ油に対する抗酸化曲線を Fig. 8 に示す。通常の植物油には原料由来のトコフェロールが含まれている⁽¹²⁾。実験に用いた市販サラダ油は、大豆油、菜種油の混合油で、 α -トコフェロールが 128 ppm、 β -トコフェロールが 6 ppm、 γ -トコフェロールが 400 ppm、 δ -トコフェロールが 64 ppm で、合計で約 600 ppm の天然ト

Fig. 7. Antioxidative Activity of Crude Catechin Mixture by AOM at 97.8°C on Lard. 200 ppm of *dl*- α -tocopherol, 50 ppm of BHA and 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm of crude catechin mixture were added to lard. ○, none; ●, *dl*- α -toc. 200 ppm; ▲, BHA 50 ppm; △, crude catechin mixture 10 ppm; ⊙, crude catechin mixture 20 ppm; ○, crude catechin mixture 50 ppm.

コフェロールが含まれている。これらのカテキン類はフェノール性化合物であるにもかかわらず、BHA 等の従来のフェノール性酸化防止剤と異なり、トコフェロール含有の植物油に対しても抗酸化作用を有するという事実、カテキン類の抗酸化剤としての有用性を示すものと思う。

要 約

(1) (–)-エピカテキン (EC), (–)-エピガロカテキン (EGC), (–)-エピカテキンガラート (ECg), (–)-エピガロカテキンガラート (EGCg) のラードにおける抗酸化作用を調べた。ラードにおける抗酸化力は等重量濃度で比べた場合、 $ECg < EC < EGCg < EGC$ となり、BHA および *dl*- α -トコフェロールよりも強い抗酸化作用を示した。また等モル濃度で比べた場合は $EC < ECg < EGC < EGCg$ となり、構造式との相関関係があるように思われる。

(2) EGCg とアミノ酸を併用したラードは EGCg のみのものに比べると、むしろ POV を上げるもののほうが多く、19 種アミノ酸のうち L-メチオニンのみがわずかに相乗作用を示した。リンゴ酸、酒石酸およびクエン酸が相乗作用を示した。また L-アスコルビン酸およびトコフェロールも EGCg と強い相乗作用を示した。

(3) リノール酸に対しても EGCg は抗酸化作用を示したが、その強さはラードにおけるそれよりも弱かった。また水添加リノール酸に対しても抗酸化作用を示

Fig. 8. Antioxidative Activity of Crude Catechin Mixture by AOM at 97.8°C on Commercial Salad Oil. 200 ppm of *dl*- α -tocopherol, 200 ppm of BHA, 50 ppm of crude catechin mixture, and 200 ppm of crude catechin mixture were added to commercial salad oil. ○, none; △, *dl*- α -toc. 200 ppm; ●, BHA 200 ppm; ⊙, crude catechin mixture 50 ppm; ▲, crude catechin mixture 200 ppm.

し、油系のみならず、水系においても抗酸化作用を発現することがわかった。

(4) カテキン混合物 (総カテキン含量約 72%) は、ラードにおいては EGCg 単独の抗酸化力と同等の効力を示した。またこれはトコフェロール含有の市販サラダ油に対しても顕著な抗酸化作用を発揮することが明らかになった。

抗酸化実験を行うにあたり、抗酸化剤無添加のラードを提供していただいた日本リーバ株式会社、清水工場に謝意を表します。

- (1) 梶本五郎：日食工誌，**10**，365 (1963)。
- (2) 戸田静男，佐塚泰之，谷澤久之，滝野吉雄，谷山登志男，林 輝明：日本薬学会第 102 年会講演要旨集，1982，p. 224。
- (3) 広瀬真一，玉田重吉：茶業研究報告，**50**，51 (1979)。
- (4) 西條了康：茶技研，**61**，28 (1981)。
- (5) 中川致之，鳥井秀一：茶技研，**29**，67 (1964)。
- (6) 中川致之，坂本 裕：茶技研，**34**，72 (1967)。
- (7) 中川致之：茶試研報，**6**，150 (1970)。
- (8) 太田静行：「油脂食品の劣化とその防止」，幸書房，1977，p. 237。
- (9) A. Ottolenghi：Arch. Biochem. Biophys., **79**，355 (1959)。
- (10) R. Marcuse：Nature，**186**，886 (1960)。
- (11) 松下雪郎：食糧科学研究所報告，**29**，49 (1966)。
- (12) 兼松 弘，牛草寿昭，丸山武紀，新谷 助，麓大三，豊田 健，川口良成，松本太郎：油化学，**32**，122 (1983)。