緑茶の硬水浸出液に生じる白色沈殿

堀江秀樹*・山内雄二*・木幡勝則*

A Study on White Precipitate of Green Tea Extract Infused with Hard Water

Hideki HORIE*, Yuji YAMAUCHI*, Katsunori KOHATA*

*National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea
2769 Kanaya, Shizuoka 428-8501*

It is known that a white precipitate is formed in the green tea extract infused with hard water. The ^{13}C -NMR spectrum of the precipitate agreed with that of calcium oxalate. The oxalic acid concentration, analyzed by using a newly developed capillary electrophoresis method, in the green tea extract infused with hard water was lower than that with distilled water. These results show that the precipitate is calcium oxalate. The effect of oxalate on tea taste was also discussed.

(Received, Jan. 7, 1998 ; Accepted, Feb. 26, 1998)

近年、おいしい水に関する関心が高まり、水を購入して飲用に用いることが一般化しつつある。従来より緑茶の浸出には軟水がよいとされてきたが¹⁾、輸入された硬水系のミネラルウォーターも容易に入手できるようになり、このような硬水を茶の浸出に用いる場面も想定される。硬水で浸出した場合、味がマイルドになり、白色の沈殿がみられる。この沈殿は緑茶のカテキン類がカルシウムと結合したものであると考えられてきた²⁾が、本報では核磁気共鳴法を用いて、白色沈殿をシュウ酸カルシウムと同定した。

さらにこのことを確認するために、硬水で浸出した場合の茶浸出液中のシュウ酸濃度が、蒸留水で浸出した場合のシュウ酸濃度と比べて減少することを示す必要があると考え、キャピラリー電気泳動法を用いて茶浸出液中のシュウ酸を分析した。キャピラリー電気泳動法による陰イオン分析においては、酸化性の高いクロム酸を泳動液として用い、アルカリ側で分離する方法^{3)~6)}が汎用されるが、このような条件では茶浸出液中のカテキン類が酸化重合し、不溶性の沈殿を生じやすい。そこで、中性条件でクロム酸を用いずにシュウ酸を分離するキャピラリー電気泳動条件を開発し、この方法を用いて茶浸出液中のシュウ酸濃度を定量した。

さらに、緑茶浸出液のシュウ酸濃度の低下が、飲用し

たときのマイルド感への影響についても考察を加えた。

実験方法

1. 実験材料と浸出方法

HPLCの標品として4種の茶の主要カテキン類(エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート)はフナコシより購入し、茶由来のカテキン類の粗抽出物としてポリフェノール100も同社より購入した。他の試薬類は特級品を用い、HPLCの移動相及びキャピラリー電気泳動の泳動液は、ミリQ水を用いて調製した。

緑茶試料として、当試験場で生産した一番茶(煎茶)の荒茶、紅茶試料としては市販の紅茶ティーバッグより取り出した茶葉を用いた。硬水として、市販のevian(pH 7.2, カルシウム, マグネシウム, ナトリウム, カリウム, 重炭酸塩, 硫酸塩, 塩化物, 硝酸塩をそれぞれ, 78, 24, 5, 1, 357, 10, 4.5, 3.8 mg/l 含むと表示)を用いた。

浸出方法は、3gの茶を180mlの沸騰直後の蒸留水または硬水で3分間浸出し、すみやかに2号ろ紙(アドバンテック東洋)でろ過し、ろ液を試料として用いた。

2. 核磁気共鳴法による白色沈殿の同定

緑茶の硬水浸出液400mlを遠心分離し、得られた

* 農水省野菜・茶業試験場(〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷 2769)

沈殿を蒸留水で洗浄後乾燥し、白色沈殿 10 mg を得た。この沈殿を濃塩酸に溶解し、ロックのため重水を少量加えて NMR 測定用試料とした。

核磁気共鳴の測定は、5 mmφ オートチューナブルプローブを装着した日本電子 JMN-LA 500 により、 ^{13}C -NMR 測定を行った。対照として、10 mg のシュウ酸カルシウム（市販特級品）を同様に溶解し測定した。化学シフトの基準として、アセトン水溶液のカルボニル基に由来するシグナルを 206 ppm として記載した。

3. キャピラリー電気泳動法による茶浸出液中のシュウ酸濃度の定量

キャピラリー電気泳動装置として、ベックマン P/ACE 5000 を使い、254 nm のインダイレクト吸光度法で検出した。キャピラリーは内径 75 μm 、長さ 57 cm（有効長 50 cm）を用い、キャピラリー温度を 30°C に設定し、-10 kV 印加し分離した。電気泳動液として、20 mM のリン酸カリウム緩衝液（pH 6.5）に 5 mM のフタル酸水素カリウム及び 0.5 mM の臭化テトラデシルトリメチルアンモニウムを添加したものを用い、各分析の間には、水、0.1 N 塩酸、水、0.1 N 水酸化ナトリウム、泳動液の順にキャピラリーを洗浄した。

茶浸出液のろ液 4.5 ml と内部標準として 0.1% ギ酸 0.5 ml とを混合した後、0.45 μm のメンブレンフィルタを通したものをキャピラリー電気泳動分析の試料とし、試料は加圧法で 5 秒間注入した。検量線は、同様にギ酸を内部標準とし、シュウ酸ナトリウムを用いて作成した。

4. HPLC による茶浸出液中のカテキン類及びカフェインの定量

茶浸出ろ液を 20 倍に水で希釈し、0.45 μm のメンブレンフィルターを通した後、直ちに島津 LC-6 システムにマニュアルインジェクタより注入した。HPLC 条件は既報⁷⁾に従いイソクラティック条件で分離した。

実験結果

1. 白色沈殿の同定

緑茶浸出液を遠心分離して収集した白色の沈殿は、濃塩酸に溶解した。そこで、この溶液について ^{13}C -NMR スペクトルを測定した（図 1-b）。その結果、カルボン酸由来と推定されるピークが 1 本だけ観察された。この化学シフトは、シュウ酸カルシウムの塩酸溶液と一致した（図 1-a）。

2. キャピラリー電気泳動法によるシュウ酸の分析

キャピラリー電気泳動法による緑茶浸出液のエレクト

図 1 シュウ酸カルシウム溶液 (a), および緑茶を硬水浸出したときの白色沈殿塩酸溶液 (b) の ^{13}C -NMR スペクトル

ロフエログラムを図 2 に示す。シュウ酸イオンは、硫酸イオン、硝酸イオン及び他の有機酸イオンから完全に分離された。ギ酸イオンのピークは、5.5 分付近に出現するが、茶浸出液においては検出されなかった。内部標準として 0.01% のギ酸を試料及び検量線作成用の標準物質に添加して分析を行った。

緑茶及び紅茶の浸出液に既知量のシュウ酸を添加した場合、ほぼ 100% の回収率が得られた（表 1）。また、得られた値はすでに報告されている値^{9)~10)}と類似であることから、本法を茶浸出液中のシュウ酸の定量に適応できると判断した。この方法では、試料の前処理としてろ過以外の操作を必要とせず、12 分毎に 1 試料分析できる迅速さを有する。さらに、200 回以上の分析を繰り返した後も、ピークの分離能の低下は認められなかった。

図2 キャピラリー電気泳動法による緑茶浸出液の
エレクトロフェログラム

1: 硫酸イオン, 硝酸イオン, 2: シュウ酸イオン,
3: リンゴ酸イオン, 4: クエン酸イオン

表1 キャピラリー電気泳動法でのシュウ酸の添加
回収試験

	濃度 mg/l	回収率 %
緑茶	96.5±1.1*	
+50 mg/l	145.0±1.1	97.0
紅茶	104.4±0.8	
+50 mg/l	154.1±2.7	99.4

* 平均値±標準偏差 (3反復)

表2 蒸留水及び硬水で浸出した緑茶浸出液のカテ
キン類, カフェイン及びシュウ酸濃度の比較

	濃度 (mg/l)	
	蒸留水	硬水
エピカテキン	146±29*	144±9
エピガロカテキン	429±48	429±35
エピカテキンガレート	85±8	82±9
エピガロカテキンガレート	496±53	484±27
カフェイン	296±25	301±24
シュウ酸	74±2	49±6

* 平均値±標準偏差 (3反復抽出した.)

3. 緑茶の硬水浸出液と蒸留水浸出液の間でのシュウ 酸及びカテキン類濃度の比較

硬水で浸出すると茶中のカテキン類とカルシウムが沈殿を生成することが推定されてきた²⁾ので, 緑茶を蒸留水で浸出した場合と硬水で浸出した場合の間で, 浸出液中の4種の主要カテキン及び苦味物質として重要なカフェインの濃度を比較した(表2)。その結果, カテキン類の濃度, あるいは, カフェインの濃度に関しても差異

はなかった。

一方, 同様に調製した浸出液について, シュウ酸濃度を開発したキャピラリー電気泳動法により測定した結果, 硬水浸出の場合に蒸留水浸出に比べて3分の1程度の濃度低下がみられた(表2)。

味に関しては, 蒸留水で浸出した場合と比べて, 硬水浸出の場合に渋味が軽減され, マイルドに感じられた。

また, モデルとしてシュウ酸 100 mg/l, カルシウム 100 mg/l の混合液は白色沈殿を生じたが, カテキン混合物(ポリフェノン 100) 1000 mg/l, カルシウム 100 mg/l の混合液に沈殿生成は認められなかった。

考 察

茶は比較的多量にシュウ酸を含む食品⁹⁾¹¹⁾¹²⁾に属し, 浸出液中にも溶出されることが知られている⁸⁾¹⁰⁾。また, シュウ酸カルシウムは水には難溶性の物質で, 多量のカルシウムを加えてこの物質を沈殿させる方法がシュウ酸の定量法として用いられている¹³⁾。これらのことから, 硬水で茶を浸出した場合, シュウ酸カルシウムが沈殿することは容易に推察できる。そしてこのことは, キャピラリー電気泳動法及び¹³C-NMRの分析結果により, 茶の硬水浸出液ではシュウ酸濃度が低下すること, 沈殿中にシュウ酸が含まれることなどから確認された。

硬水浸出茶では渋味が軽減され味がマイルドになることから, 渋味物質であるカテキン類がカルシウムと結合して不溶化し減少しているのではないかとこれまで推定されてきた²⁾。今回の分析の結果, 蒸留水浸出の場合と各カテキンの濃度には差異はみられず, また, 緑茶浸出液に存在するカテキン類濃度では, カルシウムとの間で沈殿生成は認められなかったことから, カルシウムと茶カテキン類の沈殿生成による茶の渋味低減は考えにくい。

一方, シュウ酸は, 緑茶の渋味物質としてカテキン類に比較して注目されてこなかったが, 通常の茶浸出液に含まれる 100 mg/l 程度のシュウ酸濃度では十分強い刺激味が感じられる。従って, 硬水で浸出した場合感じられる味のマイルド感は, カテキン類の変化によるものではなく, シュウ酸カルシウムの沈殿生成によるシュウ酸濃度の低下に起因するものと推定される。

要 約

硬水で緑茶を浸出すると, 白色の沈殿を生成することが知られている。この白色沈殿の¹³C-NMRスペクトルは, シュウ酸カルシウムスペクトルと一致した。また,

新たに開発したキャピラリー電気泳動法により分析したところ、緑茶硬水浸出液のシュウ酸濃度は、蒸留水浸出液中のシュウ酸濃度より低かった。これらのことから、白色沈殿がシュウ酸カルシウムであることが判明した。さらに、シュウ酸が茶の渋味に寄与している可能性について考察した。

文 献

- 1) 鳥井秀一：新茶業全書，初版，静岡県茶業会議所編，静岡県茶業会議所，静岡，p.389 (1966)。
- 2) 桑原よし夫・竹尾忠一：東海近畿農試報茶業部，8, 163 (1961)。
- 3) WILDMAN, B.J., JACKSON, P.E., JONES, W.R. and ALDEN, P.G. : *J. Chromatogr.*, **546**, 459 (1991)。
- 4) JACKSON, P.E. : *J. Chromatogr. A*, **693**, 155 (1995)。
- 5) BORDEN, J., DARIUS, M. and BÄCHMANN, K : *J. Chromatogr. A*, **716**, 311 (1995)。
- 6) TREVASKIS, M. and TRENNERY, V.C. : *Food Chemistry*, **57**, 323 (1996)。
- 7) 堀江秀樹・双木良和・木幡勝則：茶業研究報告，85, 9 (1997)。
- 8) 中原経子：栄養と食糧，**27**, 36 (1974)。
- 9) LIBERT, B. and FRANCESCHI, V.R. : *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 926 (1987)。
- 10) 神谷智恵子・小川美江子・大川博徳：食衛誌，**32**, 291 (1991)。
- 11) 中原経子：栄養と食糧，**27**, 33 (1974)。
- 12) 山中英明・久能昌朗・塩見一雄・菊池武昭：食衛誌，**24**, 454 (1983)。
- 13) AOAC Official Methods of Analysis, 974. 24 (1990)。

(平成10年1月7日受付，平成10年2月26日受理)