緑茶の熱水抽出物に含まれる降圧成分について¹⁾

谷口 繁,^{*,a} 宮下善亘,^a 植山民男,^a 土師 要,^a 平瀬襄二,^a
竹本常松,^b 在原重信,^b 吉川和子^b

新日本薬品株式会社研究所,^a 徳島文理大学薬学部^b

A Hypotensive Constituent in Hot Water Extracts of Green Tea¹⁾

SHIGERU TANIGUCHI,^{*,a} YOSHINOBU MIYASHITA,^a TAMIO UHEYAMA,^a
KANAME HAZE,^a JOJI HIRASE,^a TSUNEMATSU TAKEMOTO,^b
SHIGENOBU ARIHARA,^b and KAZUKO YOSHIKAWA^b

Research Laboratory, Shinnippon Yakuhin Co., Ltd.,^a 370, Mita-cho, Kishiwada,
Osaka, 596, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima-
Bunri University,^b 180, Yamashiro-cho, Tokushima, 770, Japan

(Received July 21, 1987)

Hot water extracts of green tea showed a prolonged hypotensive effect in anesthetized rabbits. The major active principle was purified by chromatography on Polyamide C-200 and Sephadex LH-20, and identified as (—)-gallo catechin gallate ((—)-GCG).

(—)-GCG at a dose of 0.1 mg/kg (i.v.) effectively reduced blood pressure in anesthetized rabbits and at 0.5 mg/kg lowered it by 20—40 mmHg for an extended period of time.

This compound seems to be an artifact by epimerization of (—)-epigallocatechin gallate during heating extraction.

Keywords—green tea; hypotensive constituent; (—)-gallo catechin gallate; (—)-gallo catechin; (—)-epigallocatechin gallate; blood pressure; anesthetized rabbit

さきに、著者らはマツグミ *Loranthus kaempferi* MAXIM (Loranthaceae) の降圧成分はシュウ酸マンガンであり、その活性の本体はマンガンにあることを報告した。²⁾ その後、食品である緑茶にも大量のマンガンが含まれている³⁾ ことを知ったので、マツグミの場合と同じように、緑茶をヘキサン、ベンゼン、エーテル、クロロホルム、アセトン、エタノール、水で順次加熱抽出し、各抽出エキスの降圧活性を調べた。その結果、マツグミと同じように、緑茶についても水で加熱抽出した画分に血圧降下作用が認められたが、その活性の強さは、抽出エキに含まれるマンガンの血圧降下作用よりもはるかに強く、マンガン以外の降圧成分の存在が予想された。そこで、今回、その降圧成分の検索を行い、緑茶の熱水抽出物の降圧成分は、(—)-gallo catechin gallate であることを明らかにすることができたので、その結果を報告する。

前述のように、緑茶を通常の系統的抽出法で抽出した場合、降圧作用は、極性の低い溶媒で抽出した画分には認められず、極性の高い溶媒で抽出した画分に認められたので、市販の緑茶を Chart 1 に示すように、冷エタノール、冷水、熱水の順に抽出し、各抽出エキスの降圧活性を、静脈内投与によるウサギの頸動脈圧を指標として調べた。その結果、冷エタノール抽出画分 (Fr. I) 及び冷水抽出画分 (Fr. II) には降圧活性は認められなかったが、熱水抽出画分 (Fr. III) は強い持続性の降圧活性を示した。そこで、Fr. III を更に polyamide C で分画し、各画分の降圧活性を調べた。その結果、25% (v/v) メタノール溶出画分 (Fr. V) 及び 50% (v/v) メタノール溶出画分 (Fr. VI) には降圧活性が認められなかったが、水溶出画分 (Fr. IV)、80% (v/v) メタノール溶出画分 (Fr. VII) 及びメタノール溶出画分 (Fr. VIII) にそれぞれ降圧活性が認められた。Fr. IV については、5 mg/kg の用量で 5—10 mmHg の一過性の血圧降下作用が認められたが、この画分については、それを灰化して投与してもその作用に変わりはなく、また原子吸光法で定量したマンガン濃度 (1800 ppm) から、前述の用量に含まれるマンガン量 (9 µg/kg) を算出し、それを塩化マンガンで投与したが、その血圧降下作用はこの画分のそれとよく一致した。したがって、Fr. IV の血圧降下作用はマンガンによるものであると断定された。Fr. VII 及び Fr. VIII については、

Chart 1

a, b, e, f) No hypotensive response (5.0 mg/kg; $n=3$). c) Prolonged hypotensive response (5.0 mg/kg, 10—20 mmHg; $n=3$). d) Temporary hypotensive response (5.0 mg/kg, 5—10 mmHg; $n=3$). g) Prolonged hypotensive response (2.0 mg/kg, 10—20 mmHg; $n=3$). h) Prolonged hypotensive response (0.5 mg/kg, 10—20 mmHg; $n=3$). i) No hypotensive response (1.0 mg/kg; $n=3$). j) No hypotensive response (0.3 mg/kg; $n=3$). k) Prolonged hypotensive response (0.2 mg/kg, 10—20 mmHg; $n=3$).

いずれも持続性の血圧降下作用が認められたが、Fr. VII 2 mg/kg と Fr. VIII 0.5 mg/kg の作用の強さはほぼ同等で、Fr. VIII は Fr. VII に対して約 4 倍の降圧活性を示した。そこで、次に Fr. VIII の分画を検討したが、本画分は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のパターンからみて、なお 4 種の化合物の混合物であることが予測されたので、Fr. VIII を HPLC でモニターしながら Sephadex LH-20 で分画した。Fr. IX は HPLC における保持時間が 3 分及び 5 分の、また Fr. X 及び Fr. XI は保持時間がそれぞれ 10 分、14 分の画分である。そして、各画分の降圧活性を調べた結果、Fr. IX 及び Fr. X には活性が認められなかったが、Fr. XI に活性が認められた。そこで、Fr. XI を更に水から再結晶し、compound A を単離した。

Compound A は HPLC 及び薄層クロマトグラフィー (TLC) で単一のピーク又はスポットを示し、塩化第二鉄反応陽性、組成 $C_{22}H_{18}O_{11}$ の白色結晶、融点 212—215°C で、その ^{13}C -核磁気共鳴 (^{13}C -NMR) スペクトルの所見及び比旋光度、赤外吸収 (IR), ^1H -核磁気共鳴 (^1H -NMR), 紫外吸収 (UV) 並びに円二色性 (CD) スペクトルの文献値⁴⁾ との比較により、(-)-gallocatechin gallate と推定された。更に、compound A をタンナーゼで処理すると compound B 及び compound C を生じ、compound B は融点 239—241°C で、混融、HPLC, TLC 及び IR スペクトルから没食子酸と同定した。また、compound C は組成 $C_{15}H_{14}O_7 \cdot 3/2H_2O$ の白色結晶、融点 187—189°C で、その比旋光度、IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, UV 並びに CD スペクトルの所見から (-)-gallo-catechin⁵⁾ と同定した。以上の結果から、compound A は (-)-gallocatechin gallate ((-)-GCG) と同定された。

(-)-GCG は静脈内投与で 0.1 mg/kg の用量からウサギの頸動脈圧を低下させ、0.5 mg/kg の用量では 20—40 mmHg の低下が認められ、その作用は持続的であった (Fig. 1)。

一方、HPLC 法により測定した Fr. I—VIII の (-)-GCG 含有量は Table I に示したとおりであり、polyamide C 分画の 80% (v/v) メタノール溶出画分 (Fr. VII) にも、2 mg/kg の用量で 10—20 mmHg の持続性の血圧降下作用が認められたが、このものの (-)-GCG 含有量は 7.04% で、Fr. VII 2 mg 中には 0.14 mg の (-)-GCG が含まれることになり、その血圧降下作用は (-)-GCG によるものであると考えられる。

(-)-GCG については、既に緑茶の熱水抽出エキスを単離され、チャ (*Camellia sinensis* L.) の主タンニンで

Fig. 1. Effect of (-)-GCG and (-)-EGCG on Blood Pressure in an Anesthetized Rabbit

a) (-)-GCG 0.1 mg/kg, i.v. b, e) Saline 0.5 ml/kg, i.v. c) (-)-GCG 0.5 mg/kg, i.v. d) (-)-EGCG 0.5 mg/kg, i.v. f) (-)-EGCG 2.5 mg/kg, i.v.

ある (-)-epigallocatechin gallate ((-)-EGCG) の加熱処理によって容易に生成する artifact であることが報告されており,^{4,8)} 今回, 著者らが緑茶の熱水抽出物の降圧成分として単離した (-)-GCG についても抽出過程における加熱処理によって (-)-EGCG のエピマー化が起こり生成したものと考えられる. (-)-EGCG は 2.5 mg/kg の用量では降圧作用を示さなかった (Fig. 1) が, (-)-EGCG にアンギオテンシン変換酵素阻害活性が認められたという Uchida らの報告⁷⁾は (-)-GCG の作用機序を考えるうえで極めて有意義な示唆を与えるものである.

近年, タンニンの生理活性が注目を浴び, ある種のタンニンについて抗潰瘍作用,⁸⁾ BUN 低下作用,⁹⁾ 脂質過酸化抑制作用,¹⁰⁾ 脂質代謝に及ぼす影響,¹¹⁾ 抗糖尿病作用,¹²⁾ 肝障害抑制作用,¹³⁾ 抗ヘルペスウィルス作用,¹⁴⁾ 血圧降下作用¹⁵⁾等が報告されている. 今回, 著者らは緑茶の熱水抽出物の降圧成分として (-)-GCG を単離したが, (-)-GCG のようなカテキンの誘導体に降圧活性が見出されたことは薬物開発の見地からも興味もたれる.

TABLE I. Content of (-)-GCG in Fractions from Green Tea

Fraction	(-)-GCG, %
I	0.10
II	0.05
III	2.79
IV	Not detected
V	Not detected
VI	0.10
VII	7.04
VIII	20.56

実 験 の 部

融点は柳本微量融点測定装置により測定し、未補正である。IR スペクトルは島津 IR-408 型を用い KBr 錠剤法で、比旋光度は日本分光 DIP-140 型で、UV スペクトルは島津 UV-260 型で、CD スペクトルは日本分光 J-500 型で測定した。 $^1\text{H-NMR}$ 並びに $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは日本電子 JNM-GX400 型を用い、両者共に TMS を内部標準として測定し、化学シフトは ppm で、結合定数は Hz で表した。略号: s; 一重線, d; 二重線。HPLC は島津 LC-6A 型でカラムは Unisilpack 5C-18 (4.6×150 mm, ガスクロ工業製) を用い、移動相は $\text{H}_2\text{O-MeOH-AcOH-CH}_3\text{CN}$ (85.5:2:0.5:12, v/v) の混液 (HPLC-1), $\text{H}_2\text{O-MeOH-AcOH}$ (85.5:2:0.5, v/v) 混液に CH_3CN を加え、その混液中の CH_3CN 濃度を、保持時間 0—40 分は 4% (v/v) から 8% (v/v) まで、40—60 分は 8% (v/v) から 12% (v/v) まで、それぞれ直線的に増加させる条件 (HPLC-2) で、流速 1.0 ml/min として、検出波長 280 nm で測定した。TLC は Cellulose MN 300 (0.1 mm, Macherey-Nagel) を用い、8% (v/v) AcOH を展開溶媒とし、フェリシアン化カリウム・塩化第二鉄試薬 (フェリシアン化カリウム 150 mg 及び塩化第二鉄 3 g を水 30 ml に溶かす) を噴霧、発色した。原子吸光分析は島津 AA-630 型を用い、炎には空気-アセチレン炎を、光源には浜松ホトニクス社のマンガン中空陰極ランプを使用し、波長 279.5 nm で分析を行った。

降圧活性試験 体重 2.0—2.5 kg の日本白色種雄性家兎をウレタン麻酔 (1 g/kg, 皮下投与) し、頸動脈に動脈カニューレを連結、水銀マンオメーターを介してキモグラフィオン上にその動脈圧の変化を描画させた。同時に気管にも気管カニューレを連結し、タンブールを介して呼吸の変化を描画させた。薬物は生理食塩水に溶解、又は 5% アラビアゴムを含む生理食塩水に懸濁し、投与量を 0.5 ml/kg として耳静脈内投与した。

(一)-GCG の定量

Fr. I 100 mg, Fr. V 10 mg, Fr. VI 10 mg, Fr. VII 0.2 mg, Fr. VIII 0.2 mg をそれぞれ MeOH 1 ml ずつに、Fr. II 100 mg, Fr. III 10 mg, Fr. IV 10 mg をそれぞれ水 1 ml ずつに溶かした液を試料液とし、HPLC-2 の条件で分析を行い、(一)-GCG 標品とのピーク面積の比較により、各画分の (一)-GCG 含有量を測定した。

マンガンの定量

試料 100 mg を 550°C で 5 h 加熱したのち、得られた炭化物に 10% HCl 3 ml を加え、更に 550°C で加熱して完全に灰化した。灰化物に 1% HCl 25 ml を加えてろ過し、ろ液 10 ml を 1% HCl で希釈して 100 ml とした。この液を試料液として原子吸光分析を行い、原子吸光分析用マンガン標準液 (1000 ppm, 和光純薬) を用いて作成した検量線から、試料中のマンガン含有量を算出した。

緑茶の系統的抽出と抽出エキスの血圧降下作用 緑茶 (市販の煎茶, 京都府綴喜郡 5 月摘採) 100 g を hexane 500 ml で 2 h ずつ 3 回還流加熱し、得られた抽出液を減圧下に濃縮し、hexane 抽出エキス 0.8 g を得た。残留物を benzene, ether, CHCl_3 , acetone, EtOH, H_2O の順に hexane と同じように操作して、benzene 抽出エキス 0.8 g, ether 抽出エキス 0.4 g, CHCl_3 抽出エキス 0.3 g, acetone 抽出エキス 1.6 g, EtOH 抽出エキス 15.5 g, H_2O 抽出エキス 26.8 g を得た。Hexane 抽出エキス, benzene 抽出エキス, ether 抽出エキス, CHCl_3 抽出エキス, acetone 抽出エキス及び EtOH 抽出エキスについては、それぞれ 5 mg/kg の投与で、いずれも血圧に変化はみられなかったが、 H_2O 抽出エキスの場合、2.5 mg/kg の用量から血圧の下降が認められた。なお、この H_2O 抽出エキスのマンガン濃度は 500 ppm で、投与した H_2O 抽出エキス 2.5 mg に含まれるマンガン量は 1.25 μg である。また、マンガンの血圧降下作用の最小用量は 10 $\mu\text{g/kg}$ (MnCl_2 として 22.9 $\mu\text{g/kg}$) である。

Compound A の分離 緑茶 (市販の煎茶, 京都府綴喜郡 5 月摘採) 1 kg を冷 EtOH (20°C) 10 l で 24 h ずつ 2 回抽出し、ろ過して得た抽出液を減圧下に濃縮し、冷 EtOH 抽出画分 (Fr. I) 62 g を得た。残留物を冷水 (20°C) で同じように操作して、冷水抽出画分 (Fr. II) 270 g を得た。更に、残留物を H_2O 5 l で 30 分間加熱抽出 (90°C) し、ろ過して得た抽出液を減圧下に濃縮し、熱水抽出画分 (Fr. III) 33 g を得た。Fr. III 31.8 g を polyamide C カラムクロマトグラフィー (Polyamide C-200, 和光純薬) に付し、 H_2O , 25% (v/v) MeOH, 50% (v/v) MeOH, 80% (v/v) MeOH 及び MeOH それぞれ 13 l ずつで順次、溶出し、溶出液を減圧下に濃縮し、 H_2O 溶出画分 (Fr. IV) 20.1 g, 25% (v/v) MeOH 溶出画分 (Fr. V) 0.17 g, 50% (v/v) MeOH 溶出画分 (Fr. VI) 1.72 g, 80% (v/v) MeOH 溶出画分 (Fr. VII) 6.79 g 及び MeOH 溶出画分 (Fr. VIII) 0.82 g を得た。Fr. VIII 750 mg を更に Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (Pharmacia Fine Chemicals) に付し、HPLC-1 でモニターしながら 80% (v/v) MeOH で溶出し、溶出液を減圧下に濃縮して、Fr. IX 145 mg, Fr. X 30 mg 及び Fr. XI 200 mg を得た。Fr. XI を更に H_2O から再結晶し、白色結晶として compound A 102 mg を得た。

Compound A 白色結晶, mp 212—215°C (dec.). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ : 23.7 (C-4), 71.1 (C-3), 79.2 (C-2), 95.6 (C-6), 96.4 (C-8), 99.6 (C-10), 106.3 (C-2', C-6'), 110.2 (C-2'', C-6''), 121.4 (C-1'), 131.0 (C-1'), 133.9 (C-4'), 139.9 (C-4''), 146.3 (C-3'', C-5''), 146.9 (C-3', C-5'), 156.4 (C-5), 157.6 (C-9), 158.0 (C-7), 167.7 (—COO—). 本

品の $[\alpha]_D$, IR, UV, $^1\text{H-NMR}$ 及び CD は文献⁴⁾ 記載の (–)-gallocatechin gallate のそれらに一致した。

Compound A の酵素加水分解 Compound A 60 mg を H_2O 5 ml に溶かし, タンナーゼ (三共) 35 mg を加えて, 室温下に 2 時間反応させた。反応液を減圧下に濃縮したのち, EtOH 5 ml を加えて遠心分離し, その上澄液を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに付した。HPLC-1 でモニターしながら EtOH で溶出, 分画し, 溶出液を減圧下に濃縮して, compound B 19 mg 及び compound C 35 mg を得た。

Compound B 白色微細結晶, mp 239–241°C (dec.). HPLC-1: t_R (min.) 2.1. TLC: R_f 0.45. 本品は没食子酸標品と混融しても融点降下せず, IR スペクトルも一致した。

Compound C 白色結晶, mp 187–189°C (dec.). $[\alpha]_D^{20} -17.0^\circ$ ($c=0.9$, 50% (v/v) acetone). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 2.51 (1H, dd, $J=7.3$, 16.1, $\text{C}_4\text{-H}$), 2.81 (1H, dd, $J=5.1$, 16.1, $\text{C}_4\text{-H}$), 3.97 (1H, ddd, $J=7.3$, 7.3, 5.1, $\text{C}_8\text{-H}$), 4.54 (1H, d, $J=7.3$, $\text{C}_2\text{-H}$), 5.87 (1H, d, $J=2.2$, $\text{C}_6\text{-H}$ or $\text{C}_8\text{-H}$), 5.93 (1H, d, $J=2.2$, $\text{C}_6\text{-H}$ or $\text{C}_8\text{-H}$), 6.41 (2H, s, $\text{C}_{2',6'}\text{-H}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ : 28.0 (C-4), 68.7 (C-3), 82.8 (C-2), 95.5 (C-6), 96.3 (C-8), 100.7 (C-10), 107.2 (C-2' , C-6'), 131.6 (C-1'), 134.0 (C-4'), 146.8 (C-3' , C-5'), 156.8 (C-5), 157.5 (C-9), 157.8 (C-7). CD ($c=0.913$, MeOH) $[\theta]^{20}$ (nm): +2740 (280.5). 本品の IR 及び UV は文献⁵⁾ 記載の (±)-gallocatechin のそれらに一致した。

謝辞 本研究にあたり, 貴重な (–)-epigallocatechin gallate の標品を御恵与頂いた岡山大学薬学部 奥田拓男教授に深謝致します。

引用文献及び注

- 1) 谷口 繁, 宮下善亘, 植山民男, 土師 要, 平瀬襄二, 竹本常松, 在原重信, 吉川和子, 第 36 回日本薬学会近畿支部大会, 大阪, 1986 年 11 月.
- 2) 谷口 繁, 大垣寿美子, 竹本常松, 草野源次郎, 日本薬学会第 95 年々会, 西宮, 1975 年 4 月.
- 3) 池辺克彦, 田中之雄, 田中涼一, 国田信治, 食衛誌, **18**, 62 (1977).
- 4) C. K. Wilkins, J. de Bruijn, O. Korver, D. J. Frost, K. Weinges, *J. Sci. Fd. Agric.*, **22**, 480 (1971).
- 5) A. E. Bradfield, M. Penney, *J. Chem. Soc.*, **1948**, 2249; G. Nonaka, M. Muta, I. Nishioka, *Phytochemistry*, **22**, 237 (1983).
- 6) E. A. H. Roberts, D. J. Wood, *Biochem. J.*, **53**, 332 (1953); M. Nakagawa, *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1283 (1967).
- 7) S. Uchida, N. Ikari, H. Ohta, M. Niwa, G. Nonaka, I. Nishioka, M. Ozaki, *Jpn. J. Pharmacol.*, **43**, 242 (1987).
- 8) 谷 覚, 薬誌, **96**, 648 (1976); 谷 覚, 桜井裕二, 近藤嘉和, 薬誌, **106**, 347 (1986).
- 9) S. Shibutani, T. Nagasawa, H. Oura, G. Nonaka, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2378 (1983).
- 10) T. Okuda, Y. Kimura, T. Yoshida, T. Hatano, H. Okuda, S. Arichi, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1625 (1983).
- 11) Y. Kimura, H. Okuda, T. Okuda, T. Yoshida, T. Hatano, S. Arichi, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2497 (1983); Y. Kimura, H. Okuda, T. Okuda, T. Yoshida, T. Hatano, S. Arichi, *ibid.*, **31**, 2501 (1983).
- 12) 円山八州彦, 松田秀秋, 松田玲子, 久保道德, 波多野 力, 奥田拓男, 生薬, **39**, 261 (1985).
- 13) H. Hikino, Y. Kiso, T. Hatano, T. Yoshida, T. Okuda, *J. Ethnopharmacol.*, **14**, 19 (1985) [*Chem. Abstr.*, **104**, 70 (1986)].
- 14) M. Takechi, Y. Tanaka, M. Takehara, G. Nonaka, I. Nishioka, *Phytochemistry*, **24**, 2245 (1985).
- 15) J. Inokuchi, H. Okabe, T. Yamauchi, A. Nagamatsu, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3615 (1984); J. Inokuchi, H. Okabe, T. Yamauchi, A. Nagamatsu, G. Nonaka, I. Nishioka, *ibid.*, **33**, 264 (1985); J. Inokuchi, H. Okabe, T. Yamauchi, A. Nagamatsu, G. Nonaka, I. Nishioka, *Life Sciences*, **38**, 1375 (1986).