

茶カテキンの物理化学的性質とシクロデキストリンの添加効果

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 奥村, 寿子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/26946

氏名	奥村 寿子
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第 1091 号
学位授与の日付	平成 21 年 3 月 23 日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	茶カテキンの物理化学的性質とシクロデキストリンの添加効果
論文審査委員(主査)	国本 浩喜(理工研究域・教授)
論文審査委員(副査)	上田 一正(理工研究域・教授), 清水 宣明(環日本海域研究センター・教授), 松郷 誠一(理工研究域・教授), 長谷川 浩(理工研究域・准教授)

Abstract

The beneficial effects of green tea are attributed to catechins which make up as much as 10-20 % of the dry weight of green tea leaves. In this thesis, I have studied the relationship between the chemical structure of catechins and their physicochemical properties using various analytical techniques, and examined the effects of cyclodextrins (CDx) on the reactivity of catechins.

Results of my work are summarized as follows,

1. Degradation of catechins in aqueous solution was inhibited and their stabilities increased in addition of CDx.
2. In the presence of β -CDx, the apparent ratio of heat-epimerization of catechins was increased, which attributed to the decrease a products originating from reactions other than the epimerization.
3. Tea cream was revealed to form as a result of the staking and hydrogen bonding interactions between caffeine and the galloyl moiety of catechins. The amount of tea cream was depressed by adding CDx.
4. The scavenging ability of catechin on the DPPH radical was improved due to the nucleophilic attack of cysteine or alcohol on the pyrogallol moiety of catechins.
5. The A ring and a portion of the C ring of catechins were included in the CDx cavity, and the cavity size of β -CDx is the most suitable for a snug fit of the catechin molecules.

[1] 緒言

お茶は、ツバキ科カメリア属の常緑樹であるチャノキの葉を加工して作られる飲料である。お茶には多くの健康に有効な成分が含まれているが、その中でもカテキン類などのタンニンは、茶葉の乾燥重量の 20%程度を占めている。カテキンはフラボノイドの一種であり、2つのフェニル環(A, B)が3つの炭素を介して結合した Flavan-3-ol を基本骨格とする。カテキンは、B環に結合した OH 基の数、C環の 2位と 3位の立体配置、C環の 3位に没食子酸がエステル結合したガレート型か、あるいは遊離型であるかであるかによって数十種類に分類できる。その中で、緑茶に含まれる主要なカテキンは、(-)-エピカテキン [(-)-epicatechin] ((-)-EC), (-)-エピカテキンガレート [(-)-epicatechin-3-O-gallate] ((-)-ECg),

(-)-エピガロカテキン[(-)-epigallocatechin] ((-)-EGC), (-)-エピガロカテキンガレート[(-)-epigallocatechin-3-O-gallate] ((-)-EGCg) である(Fig. 1). さらにこの4種類のうち、茶葉に最も多く存在するのは(-)-EGCgであり、総緑茶カテキン量の54-59%を占める。

近年、緑茶の健康効果に関する研究が進み、抗酸化作用など茶カテキンの持つ生理活性に関する発現機構が明らかにされつつある。一方、茶カテキンの物理化学的な性質と分子構造との相関に関する研究は、茶カテキンの工業的な応用に際しての基礎的なデータを提供するが、いまだ十分な知見は得られていない。カテキン類の研究における問題点は、カテキン類の反応性が非常に高く、水溶液中で不安定であり、異性化、加水分解や酸化重合など多数の反応が同時に進行することである。反応が複雑であることにより、個々の反応について分析することが困難となり、茶カテキンの反応や他物質との相互作用などに関するメカニズムの十分な理解が妨げられている。本研究では、これらカテキンの示す物理化学的な性質と分子構造との相関について、主に分光法や分析化学的な手法を用いて検討し、反応メカニズムを計算化学により解析した。

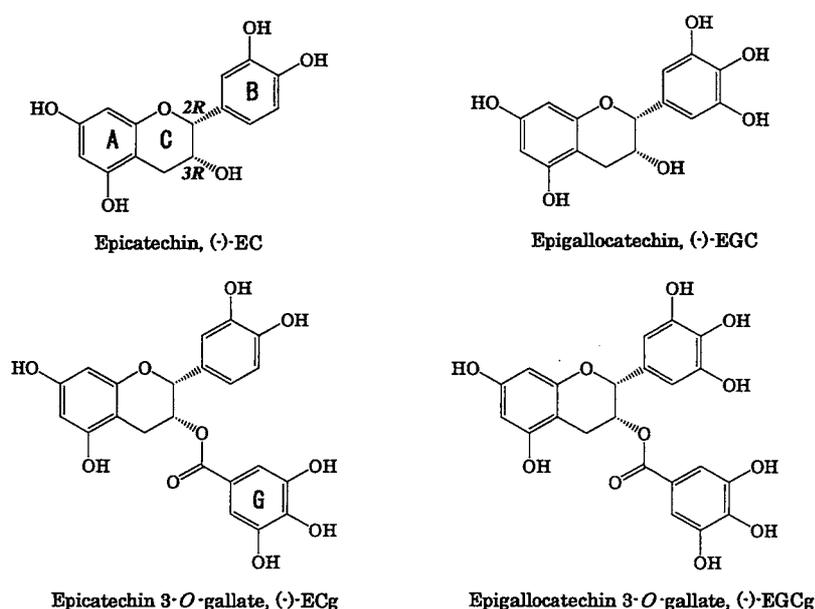


Fig. 1 Structure of green tea catechins

[2] 茶カテキンの安定性およびシクロデキストリンの添加効果

4種類の緑茶カテキンは、C環の2位がR配置のエピ体であるが、その化学的安定性については、数多くのデータが報告されており、一般的な安定性は、(-)-EC > (-)-ECg > (-)-EGCg > (-)-EGCの順に低くなる。一方で、これらの緑茶カテキンには、2位がS配置のエピマーが存在し、それらの化学的安定性についての報告はない。そこで、(-)-EGCgおよびそのエピマーである(-)-ガロカテキンガレート[(-)-gallocatechin-3-O-gallate] ((-)-GCg)を用いて、水溶液中でのpH安定性を比較した。その結果、茶カテキン類の安定性はpHに依存し、pHの上昇とともに安定性が低下した。(-)-EGCgと(-)-GCgの安定性を比較すると、いずれのpHにおいても(-)-EGCgの方が低かった。(-)-EGCgと(-)-GCgは、ともにエステル部位を有したガレート型カテキンであり、加水分解も安定性の低下の一因と考えら

れる。そこで、エタノール中での安定性を測定し、水溶液の場合と比較した。その結果、エタノール溶液では、溶液の調製後 200 時間における残存率が、水溶液の場合よりも約 10%高かった。また、カテキン水溶液にシクロデキストリン類を添加すると、茶カテキンの安定性が向上し、pH2.7 の場合と同様の安定性を示した。

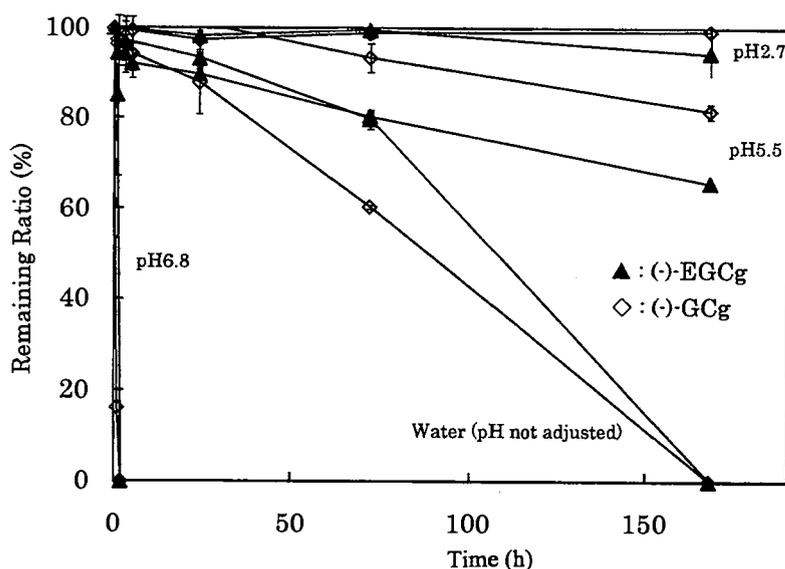


Fig. 2 Influence of pH on the stability of (-)-EGCg and (-)-GCg.

【3】茶カテキンの熱異性化反応

茶カテキンの熱異性化反応は、茶飲料の製造工程における 120℃のオートクレーブ処理の際に、C 環 2 位の立体配置が反転する反応であり、市販の茶飲料には、(-)-EGCg のエピマーである(-)-GCg が比較的多く含まれている。茶カテキンの熱異性化反応は、pH 5.5, 80℃以上で顕著に観測されることが知られているが、この熱異性化反応に対するシクロデキストリン(CD_x)の添加効果およびそのメカニズムを検討した。2mM の(-)-EGCg 水溶液を 120℃の恒温槽で加熱したところ、加熱時間 10 分において生成した(-)-GCg は最大の 40%となった。また、そのときの(-)-EGCg の残存率は約 40%であり、(-)-EGCg と(-)-GCg を足し合わせると約 80%であった。したがって、約 20%のカテキンは副生成物になることが明らかとなった。そこで、水溶液にシクロデキストリン類を添加し、熱異性化反応に対する効果を検討した。その結果、特に β-シクロデキストリンおよびその誘導体を添加した場合には、副生成物の割合が数%に減少し、(-)-GCg への熱異性化率が約 20~30%増加した(Table 1)。したがって、β-シクロデキストリンには、茶カテキンの熱異性化反応の副反応を抑制し、熱異性化率を向上させる効果があることが明らかとなった。

Table 1. Effect of CD_x derivatives on epimerization of (-)-EGCg (2.0 mM) at 120°C, pH 5.5.

CD _x	Conc. (mM)	Converted* (%)	Unconverted* (%)	Other products (%)
none	--	38.2	42.2	19.6
β-CD _x	1.0	55.8	37.2	7.0
	2.0	67.4	30.6	2.0
	20.0	68.9	26.7	4.4
α-CD _x	2.0	38.2	38.4	23.4
γ-CD _x	2.0	40.4	39.1	20.5
Me-β-CD _x	2.0	73.3	26.7	< 0.1
HP-β-CD _x	2.0	67.9	32.1	< 0.1

* Unconverted" and "converted" represent (-)-EGCg and its epimer, (-)-GCg, respectively.

[4] 茶カテキンのクリームダウン現象

クリームダウン現象とは、茶に含まれるカフェイン(caf)とカテキンなどのポリフェノールの複合体が冷却により沈殿し、水溶液が白濁する現象である。このクリーム生成に関するメカニズムを検討するため、カテキンとカフェインとの複合体を調製し、HPLCを用いて化学組成と沈殿量を分析した。カフェインおよび各カテキンをそれぞれ 15mM の濃度で溶解させた水溶液を 4℃で 15 時間冷却した結果、ガレート型カテキンは遊離型カテキンと比較してクリームの生成能力が高く、約 80%のカフェインおよびカテキンが沈殿した。クリームに含まれるカテキン

とカフェインの比率は 1:1 であり、カテキンとカフェインは 1:1 で相互作用していることが示唆された。また、乾燥させた複合体を FT-IR, FT-Raman により解析した結果、クリームの生成には、水素結合が寄与していることが確認された。さらに計算化学による結果から、水素結合は、カテキンの OH 基とカフェインのカルボニル基および 9 位の

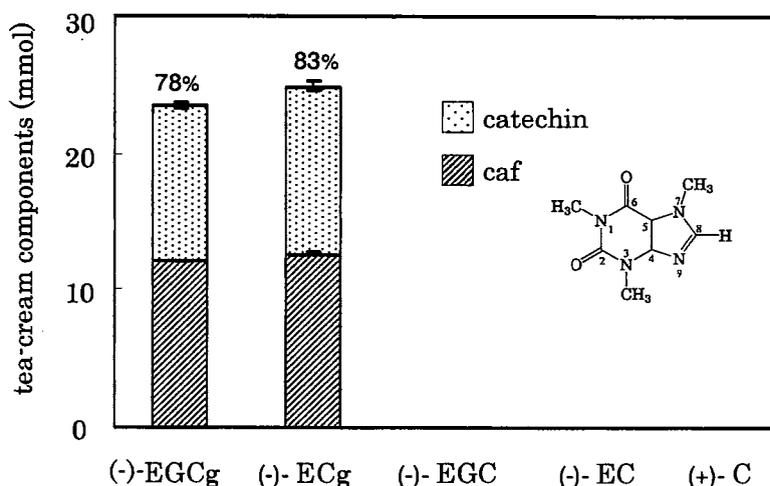


Fig. 3 Comparison of cream-down phenomenon of each tea catechins.
initial condition : total volume = 1 mL,
catechin = 15 mM, caf = 15 mM

N の間に形成されることが示唆された。以上の結果から、カテキンとカフェインの複合体は、上下方向に重なるスタッキングおよび平面方向の水素ネットワークによってサイズが大きくなり、水への溶解度が低下して沈殿すると考察した。また、クリームの生成抑制に対し、カテキンとカフェインの水素結合を阻害する化合物に添加効果が見られ、特にβ-シクロデキストリンは大きな抑制効果を示した。

[5] 茶カテキンのラジカル消去活性

緑茶には、抗酸化作用など様々な生理活性が認められており、それらの多くは、茶カテキンのラジカル消去活性に由来する。ラジカル消去活性の測定には、様々な方法が提案されているが、そのうち、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)を用いた方法により、茶カテキンのラジカル消去活性およびシステイン(Cys)の添加効果を測定し、そのメカニズムを検討した。その結果、ガレート型カテキンは、遊離型カテキンよりも高いラジカル消去活性を示し、水溶液にシステインを共存させると、さらにラジカル消去活性が増加した(Fig. 4)。また、アルコール系の溶媒を使用した場合にはその増加量が大きかった。反応溶液の HPLC クロマトグラムには、3 つの未知生成物が観測され、LC/MS/MS により、それらの構造を同定した。その結果、システインやアルコールが茶カテキンの B 環およびガロイル基に付

加した化合物であることが明らかとなった。茶カテキンのB環およびガロイル基は、DPPH ラジカルと反応して *o*-キノン型構造に変換されるが、システインなどが求核付加反応することによりピロガロール構造に還元され、さらに別のDPPH ラジカルとの反応が進行すると考えられる。

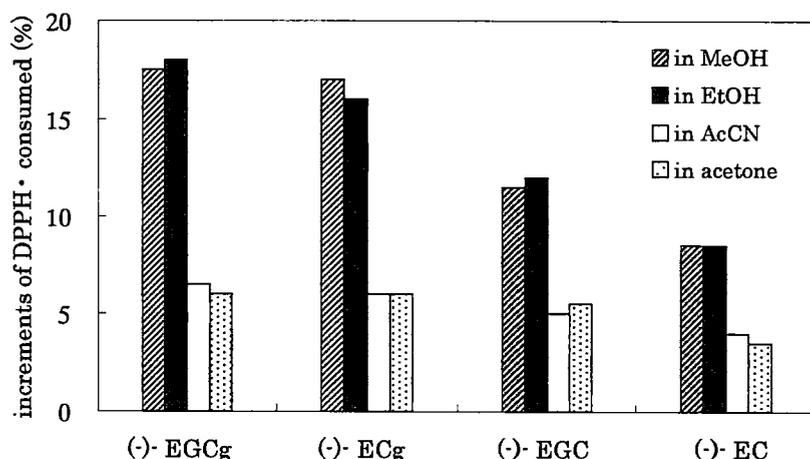


Fig. 4 Effect of Cys on DPPH• consumption by tea-catechins. Concentration of Cys : 60 μ M, catechin : 2 μ M, DPPH• : 200 μ M (in 50% organic solvent · pH 6.0 phosphate buffer)

[6] シクロデキストリンとカテキンの相互作用

茶カテキンの水溶液中での安定性の向上、熱異性化率の向上、クリームダウン現象の抑制に対し、シクロデキストリンに添加効果が観測されたことから、茶カテキンとシクロデキストリン間には特異的な相互作用が示唆された。そこで、シクロデキストリン結合型カラムを用いて茶カテキンの HPLC 分析を行い、その結果より相互作用エネルギーを見積もった。また、分子軌道計算と円二色性スペクトルの測定を行い、シクロデキストリンによるカテキンの包接部位や相互作用の大きさとカテキンやシクロデキストリンの化学構造との関連を検討した。その結果、カテキンは、A環およびC環部分がシクロデキストリンの空孔内に包接されており、特に β -シクロデキストリンの空孔径は、カテキンの包接に対して最適であることが判明した(Fig. 5)。茶カテキンの化学構造との関係性については、ガレート型カテキンが遊離型カテキンよりも強い相互作用を示し、2,3-トランス体の方が2,3-シス体よりも強い相互作用を示した。

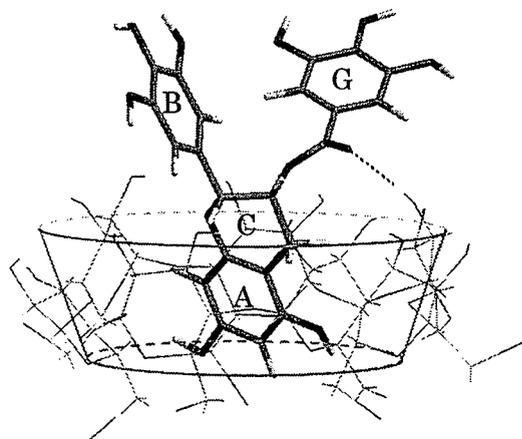


Fig. 5 β -CDx / (-)-EGCg inclusion complex model

学位論文審査結果の要旨

各審査員により個別に審査を行うとともに、平成21年2月6日に開催された公聴会の結果を踏まえ、同日開催の審査委員会において以下のとおり判定した。

緑茶には、官能基の種類と数、立体化学の異なる数種のカテキンが混合物として含まれており、異なる生理活性を示すことが知られている。本論文では、茶カテキン成分の安定性および反応性とシクロデキストリン (CD_x) の添加効果を HPLC、分光法および計算化学により、詳細に検討している。すなわち、茶カテキンは pH5.5 以上、温度 80°C 以上で C 環 2 位で熱異性化 (エピメリ化) を起こすが、β-CD_x の添加により副反応が抑制され、熱異性化率が向上することを見出した。つぎに、緑茶のクリームダウン現象が、茶カテキンとカフェイン間の水素結合および π-π スタッキングによる 1:1 錯体の形成に起因すること、CD_x 添加により効果的に抑制されることを明らかにした。また、茶カテキンのラジカル消去能について検討し、L-システインに相乗効果があることを突き止めた。さらに、CD_x 結合型カラムを用いた茶カテキンの HPLC 挙動と円二色性スペクトルの解析と分子モデリングに基づき、水溶液中で茶カテキンの A 環および C 環が CD_x に包接され、相互作用の大きさにキャビティサイズの依存性 (β-CD_x > γ-CD_x > α-CD_x) があることを明らかにした。

以上、本研究で得られた茶カテキンへの食品添加物 CD_x の添加効果に関する知見は、茶飲料製造に重要な指針を与えるのみならず、CD_x が関与する分子間相互作用に関して本質的な理解を与え、学術的にも重要である。従って、本論文は博士 (工学) の学位に値するものと判断する。