
研究報文

緑茶中のビタミン B₁₂ 濃度に与える アスコルビン酸の影響

橘高 (桂) 博美

The Effect of Ascorbic Acid on Vitamin B₁₂ Concentration in Green Tea

Hiromi Kittaka-Katsura

The vitamin B₁₂ concentration in the green tea extract poured out from the teapot was measured to be 849±35 pg/100 ml. The average concentration of 5 different green tea beverages from the markets was 280±45 pg/100 ml. The lower content of vitamin B₁₂ in the tea beverages may be due to the supplemented ascorbic acid added in the process of manufacture since the content of vitamin B₁₂ in the solution was reported to decrease in coexistence with ascorbic acid. In fact the concentration of ascorbic acid in the tea beverages, 35.22±8.27 mg/100 ml in average, was six times higher than that of the poured tea, 5.87±0.66 mg/100 ml. Then we examined the effect of ascorbic acid added during the tea extraction on the vitamin B₁₂ concentration. However, the addition of ascorbic acid at the same concentration of the tea beverages decreased only 7% of the vitamin B₁₂ concentration in the poured tea compared to 67% decrease observed in the tea beverages. Moreover, the effect of heating at 120°C under pressure after the addition of ascorbic acid was examined and no difference was observed by heating. The result indicated that the green tea poured out from the teapot, though in a small quantity, was a better source for vitamin B₁₂ than the tea beverages on markets.

(Received August 2, 2006)

1. はじめに

ビタミン B₁₂ は、微生物によって合成されるため、動物組織中や発酵食品に多く存在する。しかし、一部の藻類には動物組織と比較しても劣らない程度のビタミン B₁₂ が含まれることが報告されている¹⁾。藻類においては、ビタミン B₁₂ が補酵素としての生理機能を有する可能性を示唆する報告もなされており²⁾、植物におけるビタミン B₁₂ の役割についても興味を持たれている。また、種々の茶および野菜中にも微量のビタミン B₁₂ が含まれていることを我々はこれまで報告しており、これらは、土壌中の微生物

によって合成されたもの、あるいは土壌に肥料としてまかれた有機物由来であると考えられている³⁻⁶⁾。

茶には、緑茶、烏龍茶 (中国名: 青茶)、紅茶、プーアル茶 (中国名: 黒茶) などがあるが、原料となる茶葉⁷⁾は同じであり、ツバキ科に属する常緑の低木で、学名は *Camellia sinensis* という。茶の種類は、その製造工程によって分類されており、茶葉の自家酵素であるポリフェノール酸化酵素等の反応時間 (程度) により不発酵茶・微発酵茶・半発酵茶・完全発酵茶に大きく分類されている⁷⁾。また、黒茶のように外来の微生物の作用を利用して発酵させた後発酵茶もある。これらの茶には、文献 4) で既に報告したとおり、ビタミン B₁₂ が含まれるが、発酵の程度によりその含有量が異なっており、最も多量にビ

タミン B₁₂ を含んでいた茶は、緑茶 (IF-ケミルミ法で 0.046–0.263 µg/100 g dry weight, 微生物法で 0.125–0.535 µg/100 g dry weight) と黒茶 (IF-ケミルミ法で 0.104–0.859 µg/100 g dry weight, 微生物法で 0.305–1.20 µg/100 g dry weight) であった。その理由としては、緑茶は、栽培中に施肥された有機肥料由来のビタミン B₁₂ を吸収し、変化を受けずに乾燥茶葉中に残存させたものであり、黒茶は、さらに後から添加された微生物によって合成されたビタミン B₁₂ が測定された可能性が考えられた。

現在の日本においては、黒茶はほとんど飲用されていない。国産の黒茶の産地も、富山県 (バタバタ茶)、高知県 (碁石茶) など限られており、生産量も消費量もごく僅かである⁸⁾。一方の緑茶は、日本全国で幅広く消費されており、近年の健康ブームやペットボトルなどの販売により消費量を増加させている。そこで、茶の飲用によるビタミン B₁₂ の補給効果が期待できないかと考えた。しかしながら、ビタミン B₁₂ は共存するアスコルビン酸の酸化によって破壊されるという報告がある⁹⁾。アスコルビン酸は、酸素や微量の遷移金属イオンによって容易に酸化され、デヒドロアスコルビン酸となる。この際にラジカルが産生し、そのラジカルによってビタミン B₁₂ の破壊が引き起こされると考えられている。茶葉に含まれるビタミン C 量は、茶葉自身に含まれる酵素 (主として酸化酵素) による発酵 (自己消化による成分変化) が進むほど減少する⁸⁾。そのため不発酵茶である緑茶にはビタミン C が最も多く、発酵の進んだ紅茶にはほとんど含まれない⁷⁾。5 訂日本標準食品成分表によれば、ビタミン C は、乾燥緑茶茶葉 100 g 中に 110 mg, 乾燥紅茶茶葉 100 g 中に 0 mg 含まれるとされている。

そこで、本研究では、急須から注いだ緑茶中のビタミン B₁₂ 濃度を測定し、さらに緑茶抽出液中に含まれるビタミン B₁₂ への共存するアスコルビン酸の影響を調べ、緑茶飲用によるビタミン B₁₂ の補給効果について検討した。さらに、缶およびペットボトル入り緑茶には、酸化防止を目的としてアスコルビン酸が添加されているため、これらについてもその飲用効果などを検討した。

II. 方 法

1. 材料・試薬

緑茶は、川根 (奈仁和園, 静岡) を使用した。日本国内で市販されている缶入り緑茶あるいはペットボトル入りの緑茶として大手飲料メーカー社製の 5

種を使用した。

一般的な試薬はナカライテスク株式会社 (京都) のものを用いた。また、試料の濃縮に用いた簡易カラムは、Sep-Pak Vac C₁₈ Cartridges (Waters, U.S.A.) を使用した。

2. 緑茶抽出液およびビタミン B₁₂ 定量用試料の調製

緑茶抽出条件は、5 訂日本標準食品成分表に記されている規準に基づいて行った。実際は、乾燥茶葉 10 g に蒸留水 (430 ml, 90°C) を加え静置して 1 分間抽出し、3 重のガーゼをのせたロートでろ過した。以後、これを緑茶抽出液とする。

緑茶抽出液は、上記の操作後、直ちに酢酸緩衝液 (143 ml, 0.25 mol/l, pH 4.9) および KCN (0.3 g) を添加して沸騰水浴中で 10 分加熱した。また、缶およびペットボトル入りの緑茶は、開封後直ちに 86 ml 量り取り、酢酸緩衝液 (28.6 ml, 0.25 mol/l, pH 4.9) および KCN (60 mg) を加えて沸騰水浴中で 10 分加熱した。これらの操作は、ビタミン B₁₂ を化学的に安定なシアノ型 (シアノコバラミン) に変換させるために行った。

シアノ化操作を行った試料は、ビタミン B₁₂ の定量実験に用いるためにはビタミン B₁₂ の濃度が薄すぎるため、簡易カラム (C₁₈ カートリッジ) を用いて濃縮した。予め蒸留水で平衡化しておいたカラムにシアノ化操作後の試料を供し、溶出には 25% エタノール 20 ml で溶出させた。この溶出液を 1 ml になるまで減圧遠心濃縮し、ビタミン B₁₂ の定量用試料とした。

3. ビタミン B₁₂ およびアスコルビン酸の定量方法

ビタミン B₁₂ の定量は、文献 10) に沿って行った。具体的には、ブタ由来の内因子を固層に吸着させたプレートへのアクリジウムエステル修飾したビタミン B₁₂ と試料中のビタミン B₁₂ の競合反応を利用して測定する。測定する試料は、測定基準範囲 (233 ~ 914 pg/ml) に納まるように蒸留水を用いて適宜希釈し、また、アルコールも測定に影響を及ぼすため残留しないように注意し、測定は臨床検査の受託会社に依頼した。

一方、抽出直後の緑茶抽出液あるいは開封直後の缶またはペットボトル入りの緑茶飲料を用いて、インドフェノール法によってアスコルビン酸 (還元型) を定量した。

4. 緑茶抽出液へのアスコルビン酸の添加および加熱方法

アスコルビン酸が緑茶抽出液中に含まれるビタミン B₁₂ への影響を調べる目的で、アスコルビン酸を

表 1 緑茶抽出液および缶・ペットボトル入り緑茶飲料に含まれるビタミン B₁₂ 濃度およびアスコルビン酸濃度

		ビタミン B ₁₂ 濃度 (pg/100ml)	アスコルビン酸濃度 (mg/100ml)
緑茶抽出液 (川根, 静岡)		849±35	5.87±0.66
市販の 緑茶飲料	U 茶 (A 社)	217±9	41.66±0.59
	M 茶 (C 社)	307±12	27.54±7.66
	O 茶 (I 社)	251±8	29.04±1.66
	N 茶 (K 社)	280±13	29.55±2.17
	H 茶 (D 社)	347±9	48.32±13.12
平均		280±45	35.22±8.27

添加し、ビタミン B₁₂ 濃度の経時的变化 (抽出直後から 0, 10, 20, 60 分後) を測定した。その際、アスコルビン酸の添加量は、緑茶抽出液中のアスコルビン酸濃度と缶およびペットボトル入り緑茶飲料の濃度との差に匹敵する量として算出した。算出結果は、乾燥茶葉 10g に対してアスコルビン酸 125mg と見積もられた。

缶およびペットボトル入りの緑茶は容器に注入される際、あるいはされた後に滅菌のため高温で加熱される。よってこの工程でビタミン B₁₂ が破壊されている可能性を考え、アスコルビン酸添加抽出液を加熱した場合のビタミン B₁₂ 量を定量した。実際には、アスコルビン酸添加抽出後、0 分および 60 分放置した後、予め 100°C に加温しておいたオートクレーブで、120°C で 10 分間加圧加熱した。これらの試料についても前述のシアノ化操作および濃縮を行った後ビタミン B₁₂ を定量した。

III. 結果および考察

1. 緑茶抽出液とペットボトル入り緑茶中のビタミン B₁₂ 濃度およびアスコルビン酸濃度

表 1 に示したとおり、急須を用いて乾燥茶葉から抽出された緑茶抽出液に含まれるビタミン B₁₂ 濃度は、849±35pg/100ml であった。一方、缶入りおよびペットボトル入り緑茶飲料 5 種のビタミン B₁₂ 濃度は平均 280±45pg/100ml であり、5 種の間大きな差が見られなかった。缶およびペットボトル入りの緑茶飲料に含まれるビタミン B₁₂ 濃度は、急須を用いて抽出された緑茶抽出液の約 1/3 量であった。一方、アスコルビン酸濃度については、緑茶抽出液が 5.87±0.66mg/100ml であり、缶入りおよびペットボトル入り緑茶飲料 5 種の平均濃度が 35.22±8.27mg/

100ml であった。アスコルビン酸についてもビタミン B₁₂ と同様に 5 種の緑茶飲料間に大きな差は見られなかった。しかし、缶およびペットボトル入りの緑茶飲料に含まれるアスコルビン酸濃度は、急須を用いて抽出された緑茶抽出液の 6 倍の値であった。これは、急須で抽出された緑茶抽出液に含まれるアスコルビン酸が 100% 茶葉由来のものであるのに対し、缶やペットボトルに入れられて市販されている緑茶飲料では、その全てに酸化防止などを目的として積極的にアスコルビン酸が添加されているからである。そして、アスコルビン酸が共存する場合にビタミン B₁₂ が分解するという報告⁹⁾ がなされているように、アスコルビン酸が添加されている市販緑茶飲料においてビタミン B₁₂ が低値であった。そこで、急須を用いて抽出する緑茶にアスコルビン酸を添加し、共存するビタミン B₁₂ の測定値が減少するかどうかを次に検討した。

2. アスコルビン酸添加による緑茶中ビタミン B₁₂ 濃度およびアスコルビン酸濃度の経時的变化

アスコルビン酸によるビタミン B₁₂ への影響を検討するため、急須を用いて乾燥茶葉から緑茶抽出液を抽出する際にアスコルビン酸を添加した。添加量は、缶およびペットボトル入り緑茶飲料に含まれていたアスコルビン酸の平均値 (約 35mg/100ml) に近づけるため乾燥茶葉 10g を用いた 1 回の抽出に対し 125mg とした。経時的变化を調べるため緑茶抽出後 0, 10, 20, 60 分後にビタミン B₁₂ 濃度およびアスコルビン酸濃度を測定した。その結果を図 1 に示した。ビタミン B₁₂ の変動は図 1A に示したとおり、アスコルビン酸を添加した場合は、10 分以内に 27% 程度の急激な減少が見られた。しかしその後は大きな変化を示さなかった。一方、アスコルビン酸を添

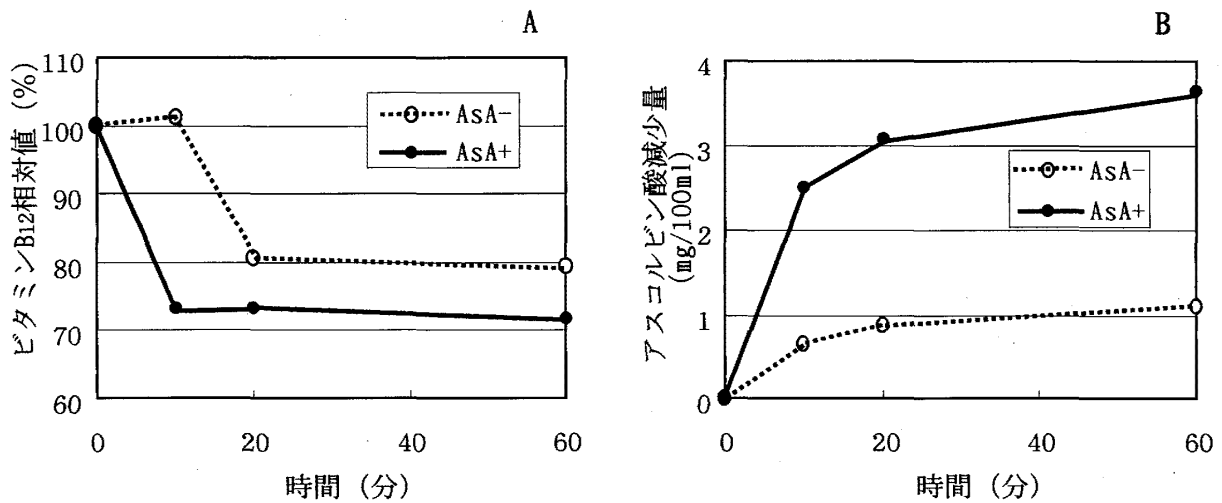


図1 アスコルビン酸 (AsA) 添加後の緑茶抽出液中ビタミン B₁₂ 濃度の変化およびアスコルビン酸減少量
乾燥緑茶茶葉 10g に 90°C の蒸留水 430ml を加えて 1 分間抽出した。A: 経時に伴うビタミン B₁₂ 濃度
の変化, B: 経時に伴うアスコルビン酸の減少量, AsA+: 抽出の際に 125mg のアスコルビン酸を添加,
AsA-: アスコルビン酸無添加

加しなかった場合は、10分後から20分後の間に20%程度減少していた。よってアスコルビン酸の添加によってビタミン B₁₂ 濃度の減少が早められたこと、および7%程度ビタミン B₁₂ の減少率が増加した。ビタミン B₁₂ の測定時に併せて、緑茶抽出液に含まれるアスコルビン酸の減少量を測定した結果は図1Bに示したが、アスコルビン酸を添加した場合は、添加しなかった場合より減少量が約3倍に増加した。よって、アスコルビン酸の酸化によってビタミン B₁₂ が分解されるという報告⁹⁾を支持するような結果を緑茶抽出液において得ることができた。しかしながら、缶およびペットボトル入りの緑茶飲料と同程度のアスコルビン酸を添加したにも関わらず、ビタミン B₁₂ の減少は、市販緑茶飲料の濃度まで減少しなかった。この原因の一つとして考えられることが、缶およびペットボトル入り緑茶飲料では容器に注入される前あるいは注入後に加圧加熱殺菌工程を含んでいるということである。そこで、次に加熱の影響を検討した。

3. アスコルビン酸添加後加熱操作による緑茶中ビタミンB₁₂含有量の変化

前述した方法に従ってアスコルビン酸を添加し、急須を用いて緑茶を抽出した後、0分および60分後にオートクレーブを用いて120°Cで10分間加圧加熱し、減圧放冷後にビタミン B₁₂ を測定した。その結果、予測に反してビタミン B₁₂ は減少しなかった。オートクレーブ加熱を行っていない場合を100%と

した相対値において、0分後の試料は100±9.0%であり、60分後の試料は73.1±15.3%となり、オートクレーブ加熱を行わなかった先の結果と同程度までの破壊しか起こらなかったことがわかった。よって、加圧加熱工程は、ビタミン B₁₂ の分解に影響を与えていなかった。文献9)においては、アスコルビン酸の酸化時におけるビタミン B₁₂ の分解について金属イオンの影響についても言及しており、市販の缶およびペットボトル入りの緑茶飲料のビタミン B₁₂ の分解には、工場内の金属製のライン(パイプなど)が影響しているのかもしれない。今回の研究では金属イオンの影響の検討までは行わなかった。

本研究において、極めて微量ながらも緑茶からビタミン B₁₂ を摂取できる可能性が示された。また、その効果は市販の缶およびペットボトルよりは急須で抽出した方が高かった。ビタミン B₁₂ の1日の必要量は2.4μgとされている。今回用いた緑茶(川根)の場合、緑茶を入れてから10分以内に飲むことを条件として1日10杯程度飲んだとしても0.02μgしか摂取することができない。よって緑茶(川根)のみをビタミン B₁₂ の唯一の補給源とすることは不可能である。しかし、緑茶の中でもビタミン B₁₂ 含有量の高い品種を飲む、または、ビタミン B₁₂ 不足状態で吸収率が上昇することや食事中ビタミン B₁₂ 量が微量の場合には多量の場合と異なりそのほとんどが吸収されることなどを考え合わせれば補給効果がないとは言えない。

IV. 要 約

急須を用いて乾燥茶葉から抽出された緑茶抽出液中のビタミン B₁₂ 濃度は 849±35pg/100ml, 缶入りおよびペットボトル入り緑茶飲料 5 種の平均濃度は 280±45pg/100ml であり, 急須で入れた場合の方が 3 倍高い結果となった。ビタミン B₁₂ が後者で低かった理由として製造工程中にアスコルビン酸が添加されたためである可能性が考えられる。アスコルビン酸はビタミン B₁₂ と共存する場合にビタミン B₁₂ を分解することが既に報告されている。そこでアスコルビン酸を測定したところ, 急須による緑茶抽出液が 5.87±0.66mg/100ml, 缶入りおよびペットボトル入り緑茶飲料 5 種の平均濃度は 35.22±8.27mg/100ml であり, 後者が前者の 6 倍の値であった。アスコルビン酸の添加によってビタミン B₁₂ 濃度が影響を受けるのかを検討するために, 急須を用いた抽出の際にアスコルビン酸を添加し, ビタミン B₁₂ 濃度への影響を確認した。しかし, その影響は, 緑茶抽出液のビタミン B₁₂ 濃度の 7% の減少に留まっていた(緑茶飲料では 67% 減少していた)。さらにアスコルビン酸添加後の加圧加熱 (120°C) の影響も調べたが, 影響は見られなかった。これらの結果から, 極めて微量ながらも緑茶からビタミン B₁₂ が摂取できる可能性が示され, それは緑茶飲料より急須で乾燥茶葉から抽出した場合の方がより効率がよいことが示された。

V. 謝 辞

本研究は, 平成 13 年度県立広島女子大学 (現, 県立広島大学) の教員研究費によって行われた。また,

本研究にご協力くださった同大学加藤友絵さんに感謝の意を表す。

(平成 18. 8. 2. 受付)

引用文献

- 1) F. Watanabe, S. Takenaka, H. Kittaka-Katsura, S. Ebara and E. Miyamoto: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **48**, 325–331 (2002)
- 2) M. T. Croft, A. D. Lawrence, E. Raux-Deery, M. J. Warren and A. G. Smith: *Nature*, **438**, 90–93 (2005)
- 3) H. Kittaka-Katsura, S. Ebara, F. Watanabe and Y. Nakano: *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 909–911 (2004)
- 4) H. Kittaka-Katsura, F. Watanabe and Y. Nakano: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **50**, 438–440 (2004)
- 5) 宮本恵美, 橋高 (桂) 博美, 足達理子, 渡辺文雄: *ビタミン*, **79**, 329–332 (2005)
- 6) A. Mozafar: *Plant Soil*, **167**, 305–311 (1995)
- 7) 村松敬一郎, 大石貞男, 中村順行, 小西茂毅, 小泊重洋, 岩浅 潔, 南 廣子, 池ヶ谷賢次郎, 伊奈和夫, 中川致之, 西岡五夫, 原 征彦, 中村好志, 富田 勲, 小國伊太郎, 大森正司, 並木和子, 竹尾忠一: *茶の科学*, 朝倉書店 (1991)
- 8) 宮川金二郎, 大森正司, 加藤みゆき, 難波敦子: *日本の後発酵茶*, さんえい出版 (1994)
- 9) S. Takenaka, S. Sugiyama, F. Watanabe, K. Abe, Y. Tamura and Y. Nakano: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 2137–2139 (1997)
- 10) F. Watanabe, S. Takenaka, K. Abe, Y. Tamura and Y. Nakano: *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1433–1436 (1998)