

## 香煎茶のポリフェノール成分における抗酸化作用

芳野恭士\*<sup>1</sup>、杉本奈央<sup>1</sup>、塩川阿子香<sup>1</sup>、芳野広起<sup>1</sup>、後藤健太<sup>1</sup>、清水 篤<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 沼津工業高等専門学校 物質工学科 (〒410-8501 沼津市大岡 3600)

<sup>2</sup> サンダイヤ株式会社 (〒103 - 0007 東京都中央区日本橋浜町 1-1-12)

\*k-yoshino@numazu-ct.ac.jp

## Antioxidant Activity of Polyphenolic Components in Kosencha

Kyoji YOSHINO<sup>1</sup>, Nao SUGIMOTO<sup>1</sup>, Asuka SHIOKAWA<sup>1</sup>, Hiroki YOSHINO<sup>1</sup>,  
Kenta GOTO<sup>1</sup>, Atsushi SHIMIZU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Numazu College of Technology (3600 Ooka, Numazu, Shizuoka 410-8501, Japan)

<sup>2</sup> Sundia Co., Ltd. (1-1-12 Hama-cho, Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo, 101-0032, Japan)

(Received July 10, 2018; Accepted August 16, 2018)

### Abstract

In this study, we investigated the amounts of total polyphenols and in vitro antioxidant activities of some aqueous extracts prepared from three kinds of green teas, one kind of oolong tea, and two kinds of black teas and their corresponding Kosenchas, which are produced by treatment with high pressure and high temperature. Only the yields of Kosencha from green teas were higher than those of their original teas. The amounts of total polyphenols tended to be decreased in all kinds of Kosencha as compared to their original teas. In addition, the scavenging activities of Kosencha against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals also tended to be lower than those of their original teas. In green teas, however, the amounts of total polyphenols and antioxidant activities on DPPH radicals were thought to be higher than their original teas when the infusions were prepared by using the same amounts of tea leaves. In another case, the scavenging activities of Kosencha against superoxide anion radicals tended to be increased as compared to those of their original teas. These results suggest that the antioxidant activities of Kosencha from green teas were not decreased as compared to their original teas and that the polyphenol components, such as catechins and their polymers, would contribute to the antioxidant activities.

**Key words:** *Camellia sinensis*, Tea, Kosencha, Polyphenol, Antioxidant

### 1. 緒言

茶(*Camellia sinensis* L.)は世界的に摂取されている飲料である。日本でも従来の飲茶の習慣に加え、1990年代にこれら1次加工茶の缶入りやペットボトル入りの茶飲料が製造、販売されるようになってからその生産量は高く維持されている[1]。通常、

茶の生葉は1次加工されて緑茶、烏龍茶および紅茶として飲用される。緑茶葉には、抗酸化作用など様々な保健作用があることで知られるカテキン類が豊富に含まれている[2]。しかし、代表的な茶カテキンである(-)-エピガロカテキンガレート(EGCG)や(-)-エピカテキンガレートは、没食子酸

エステルは化学構造を持っており、茶の渋みの原因となっている[3]。このことは、茶を多量に摂取するのを困難にしている。そこで、1次加工茶を原料として圧力容器内で飽和水蒸気を吹き込みながら125°Cで30分間加熱処理することで、カテキン類の没食子酸エステルを分解するとともにカテキン類を重合しその渋味を軽減させたものが製造されており[4]、これを香煎茶と呼んでいる。

香煎茶加工は、従来の焙煎加工と異なり天候や季節の影響を受け難く、高品質での再現が可能である。また、高温で処理を行っているため熱耐性菌は死滅し、高い安全性を示す。緑茶や烏龍茶の香煎茶には、肥満患者に対する瘦身効果と抗メタボリックシンドローム作用が期待できることが報告されている[5-8]。しかし、茶の基礎的な保健作用の1つである抗酸化作用については、香煎茶加工による変化の様子は検討されていない。そこで、本研究では3種の緑茶、1種の烏龍茶および2種の紅茶について、香煎茶加工前後の抗酸化作用を測定し比較した。また、植物の抗酸化作用に関与しているポリフェノールの総含量の変化についても検討した。

## 2. 実験

### 2.1 茶の試料

緑茶としては、緑茶の主な栽培品種であるヤブキタを用いた緑茶、本来は紅茶品種であるが抗アレルギー作用が報告されているメチル化カテキンを含有するベニフウキの緑茶[9]、抹茶の原料となる碾茶品種であるオクミドリを用いた緑茶（碾茶は玉露と同様に被覆栽培した緑茶の一種）の3種を用いた。烏龍茶としては、中国製烏龍茶1種を用いた。紅茶としては、ベニフウキの紅茶およびセイロン紅茶の2種を用いた。これらの茶葉とそれぞれの香煎茶は、サンダイヤ株式会社が供与した。

### 2.2 茶エキスの調製

各茶葉8gに、100°Cの熱水を1L加え10分間静置して抽出を行った。抽出液をろ過し、ろ液を凍結乾燥することで各茶エキスを得た。これを適当な濃度で溶解した水溶液を、試料水溶液として用いた。

### 2.3 フォーリン-チオカルトー法による総ポリフェノール量の測定

各茶エキス中のポリフェノール量を、フォーリン-チオカルトー法[10]により測定した。0.01%試料水溶液0.5mLに、フォーリン-チオカルトー試薬0.5mLを加えて混和後、3分間室温放置した。10%炭酸ナトリウム水溶液0.5mLを加えて混合し、さらに1時間室温放置した。この反応液中でフェノール化合物の銅錯体がリンタンングステン酸、モリブデン酸を還元して生じた青色について、700nmにおける吸光度を測定した。試料中のポリフェノール量は、没食子酸エチル相当量で表記した。本法は、烏龍茶や紅茶のポリフェノール量を測定するためのISOの公定法とされている(ISO14502-1:2005)。

### 2.4 酒石酸鉄法による総ポリフェノール量の測定

各茶エキス中のポリフェノール量を、酒石酸鉄法[11]で測定した。0.01%試料水溶液1.0mLに0.05Mリン酸緩衝液(pH7.5)0.5mLと酒石酸鉄水溶液0.5mLを加えて混合した。この反応液中でフェノール化合物が鉄と錯体を作ることで生じた青色について、540nmにおける吸光度を測定した。試料中のポリフェノール量は、没食子酸エチル相当量で算出した。本法は、緑茶のタンニン量を測定するための分析法として日本食品標準成分表に掲載されている。緑茶中の総ポリフェノール量を求める際には、没食子酸エチル相当量として得られた値を2倍するが、今回は烏龍茶および紅茶についても測定したため、値を2倍にする計算は行わなかった。

### 2.5 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジルラ

## ジカル消去作用の測定

各茶エキスの1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去作用を測定した[12]。0.3 mg/mL 試料水溶液 50  $\mu$ L に 0.04 M リン酸緩衝液 (pH7.4) 850  $\mu$ L を加えて混和した。0.5 mM DPPH エタノール溶液 100  $\mu$ L を加えて攪拌した後、直ちに遮光して 20 分間室温放置した。この反応液中の DPPH が示す紫色について、525 nm における吸光度を測定した。対照は、試料水溶液の代わりに水を加えて行った。下式を用いて DPPH ラジカル消去率を算出した。

$$\text{DPPH消去率(\%)} = \left( 1 - \frac{OD_B}{OD_A} \right) \times 100$$

$OD_A$  : 対照での吸光度

$OD_B$  ; 茶エキスでの吸光度

また、各茶葉 1g から得られる量のエキスを 1 mL の水に溶解し、それを 1000 倍に希釈したものをを用いて同様の測定を行った。

## 2. 6 スーパーオキシドアニオンラジカル消去作用の測定

各茶エキスのスーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) 消去作用を測定した[13]。0.05 mg/mL 試料水溶液 0.5 mL に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4) 0.5 mL を加えて混和し、測定まで氷冷した。この溶液を 30°C で 5 分間インキュベートした後、氷冷

しておいた 15  $\mu$ M フェナジンメトスルファート (PMS) 水溶液、200  $\mu$ M ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 水溶液、750  $\mu$ M 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) 水溶液をそれぞれ 0.5 mL ずつ加えて混合した。この反応液について、直ちに 560 nm における吸光度の変化を 10 分間測定した。本法は、PMS、NADH と酸素の反応で生じた  $O_2^{\cdot-}$  の量を、NBT の還元反応で生じるジホルマザンの青色で測定するものである。対照は、試料水溶液の代わりに水を加えて行った。下式を用いて  $O_2^{\cdot-}$  消去率を算出した。

$$O_2^{\cdot-} \text{ 消去率(\%)} = \left( 1 - \frac{\Delta OD_B}{\Delta OD_A} \right) \times 100$$

$\Delta OD_A$  : 対照での吸光度の変化量

$\Delta OD_B$  ; 茶エキスでの吸光度の変化量

## 2. 7 統計処理

実験データは、それぞれ 3 回の実験における平均土標準偏差で表した。

## 3. 結果および考察

### 3. 1 茶エキスの収量

ヤブキタ緑茶、ベニフウキ緑茶、オクミドリ碾茶、中国烏龍茶、ベニフウキ紅茶、セイロン紅茶とそれぞれの香煎茶について、茶葉の熱水抽出によるエキス収量を図 1 に示す。ヤブキタ緑茶、ベ

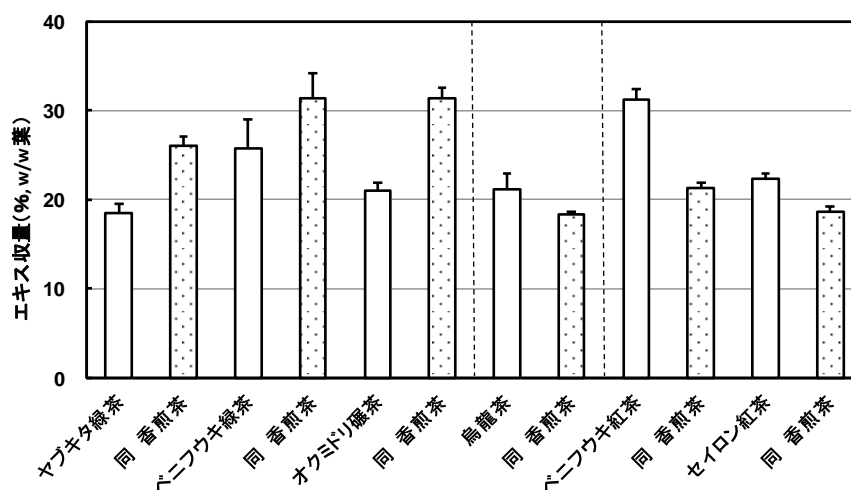


図1 香煎茶およびその原料茶の熱水エキスの葉からの収量

ニフウキ緑茶、オクミドリ碾茶の3種の緑茶では、原料茶に比較して香煎茶から得られるエキス量が多かった。逆に、中国烏龍茶およびベニフウキ紅茶、セイロン紅茶の2種の紅茶では、原料茶に比較して香煎茶のエキス収量は少なかった。

不発酵茶の緑茶では、大部分のカテキンは単量体で存在している。それに対して、半発酵茶の烏龍茶と全発酵茶の紅茶では、カテキンの酵素的重合反応が起こっている。烏龍茶には、カテキン2量体のテアシネンシン[14]や3量体から5量体のウーロンホモビスフラバン[15]が含まれている。紅茶には、カテキン2量体のテアフラビン[16]に加え高重合体のテアルビジンやテアブロウニン[16,17]も含まれている。しかし、烏龍茶や紅茶でも緑茶に含まれるカテキン単量体の40%程度に当たる量は、単量体のまま残存している[18]。従って、香煎茶加工を行うことにより緑茶では初め

てカテキンの酸化重合が起こるのに対し、烏龍茶と紅茶ではすでに含まれる重合カテキンや未重合で残ったカテキンの重合反応が起こるものと考えられる。また、香煎茶加工ではカテキンの没食子酸エステルの加水分解も起こる。こうした成分の変化が香煎茶のエキス収量に影響するものと考えられるが、詳細な成分の変化については今後の検討が必要である。

なお、各香煎茶のエキスの色はいずれも褐色であったが、緑茶と烏龍茶では原料茶のエキスよりも濃い色になったのに対し、紅茶では原料茶のエキスよりも薄い色になった。

### 3. 2 茶エキスの総ポリフェノール量

茶の保健作用に関連する成分として、カテキンを含むポリフェノール類がある。そこで、6種の原料茶とその香煎茶から得られたエキスの総ポリフェノール量について、フォーリン-チオカル

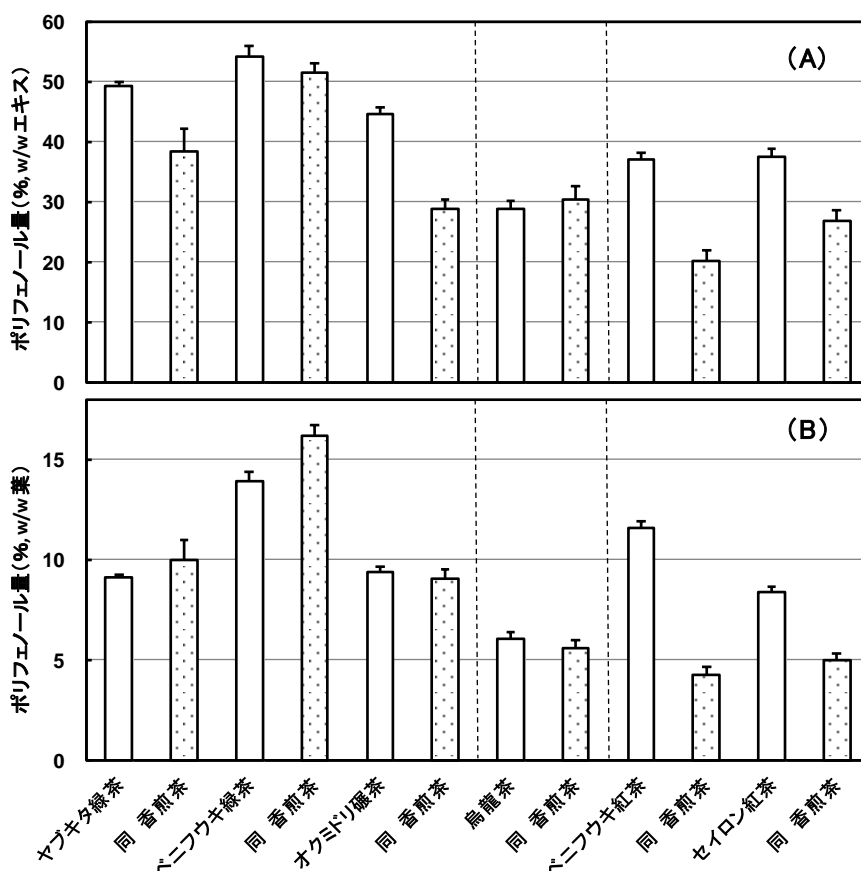


図2 香煎茶およびその原料茶の熱水エキスの総ポリフェノール量 (フォーリン-チオカルトー法) A, エキス当たり; B, 葉当たり.

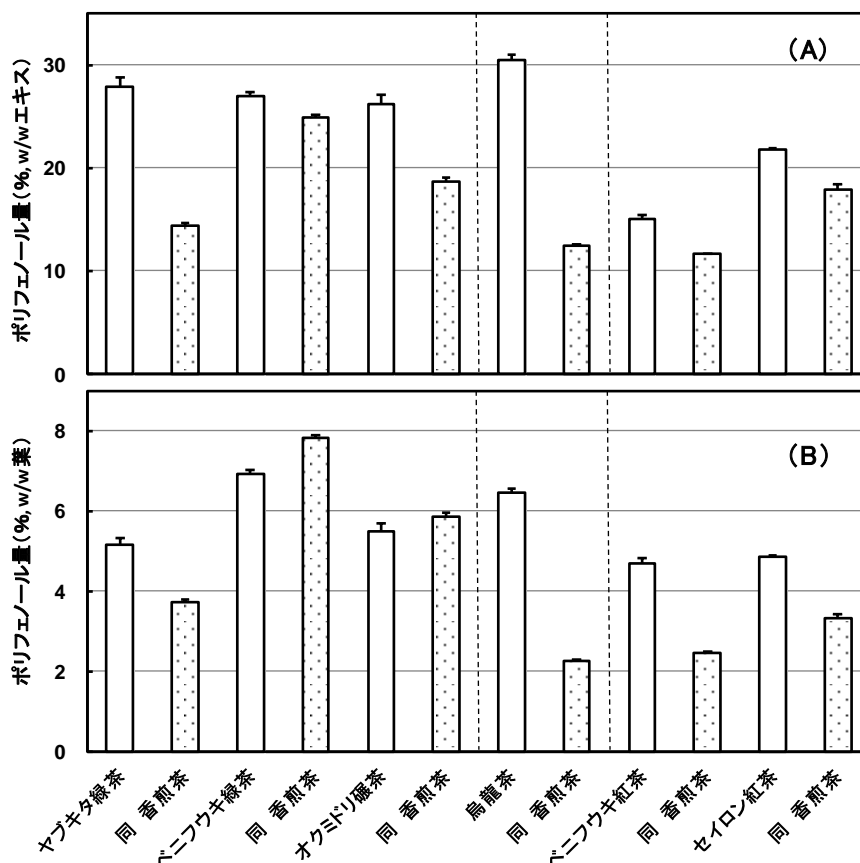


図3 香煎茶およびその原料茶の熱水エキスの総ポリフェノール量 (酒石酸鉄法) A, エキス当たり; B, 葉当たり.

ト一法で測定した結果を図 2(A)に、酒石酸鉄法で測定した結果を図 3(A)にそれぞれ示す。いずれの測定法を用いても、3 種の緑茶および 2 種の紅茶では、香煎茶の総ポリフェノール量は原料茶に比較して低下する傾向が見られた。これらのうち、ヤブキタ緑茶、ベニフウキ緑茶、セイロン紅茶については、すでに同様の結果を報告している[6,7]。烏龍茶については、フォーリン-チオカルト一法では総ポリフェノール量の香煎茶加工による明確な変化が見られなかったのに対し、酒石酸鉄法では他の茶と同様に香煎茶加工でその量が低下した。これらの結果は、香煎茶加工により茶葉中のポリフェノール成分が一部分解されることを示唆している。

次に、同じ重量の茶葉から得られるエキス中の総ポリフェノール量の推定値を、各茶エキスの収量と総ポリフェノール含有量の積として計算し

て得られた結果を図 2(B)および図 3(B)に示す。緑茶では茶葉からのエキス収量が香煎茶加工で増加することから、フォーリン-チオカルト一法による測定ではヤブキタ緑茶とベニフウキ緑茶で、また、酒石酸鉄法による測定ではベニフウキ緑茶とオクミドリ碾茶で、それぞれ総ポリフェノール量の増加が見られた。このような傾向は、烏龍茶と紅茶には見られなかった。従って、同じ重量の茶葉を使用して茶を煎れた場合、緑茶では香煎茶でも原料茶と同程度かそれ以上の量のポリフェノールを摂取することが可能と考えられる。

### 3. 3 茶エキスの in vitro での抗酸化作用

6 種の原料茶とその香煎茶から得られたエキスの in vitro における抗酸化作用について検討した。まず、各茶エキスの DPPH ラジカル消去作用について測定した結果を図 4 に示す。DPPH ラジカルは生体内には存在しない合成のラジカル化合物

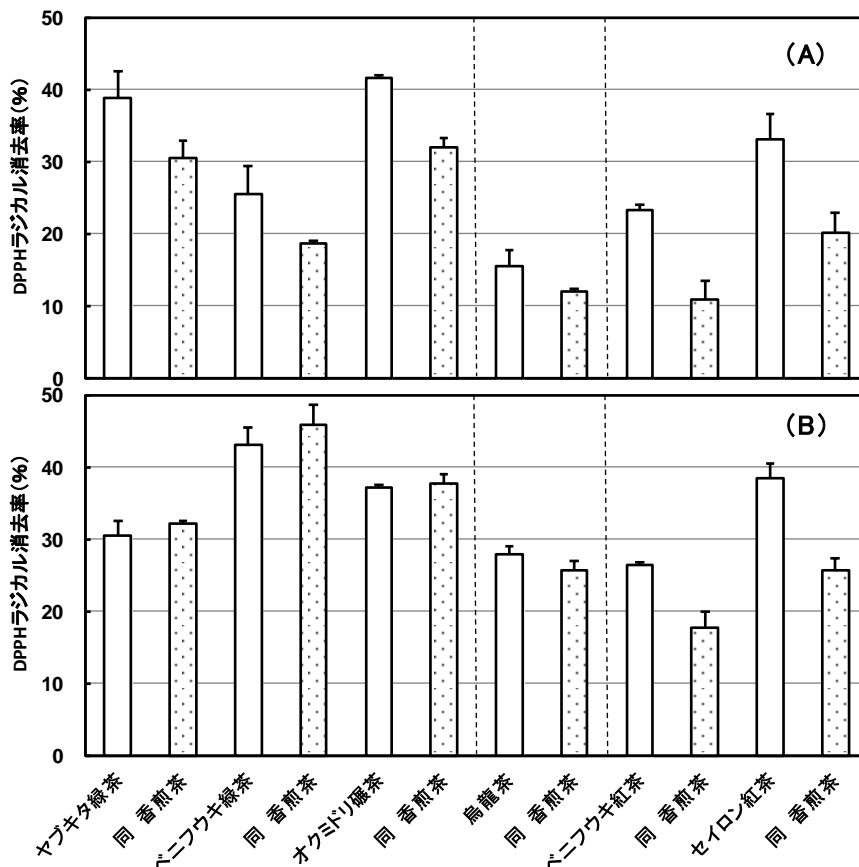


図4 香煎茶およびその原料茶の熱水エキスのDPPHラジカル消去作用 A, エキス当たり; B, 葉当たり.

であるが、安定なラジカルの示す吸光度を直接測定することで再現性の良いラジカル捕捉評価が可能であるため、天然物の同作用の測定等に多用されている。図 4(A)は、各茶エキスの終濃度が 0.015 mg/mL となるようにした場合の DPPH ラジカル消去作用である。6 種の茶エキスのいずれにおいても、香煎茶の DPPH ラジカル消去作用は原料茶に比較して低下することがわかった。その原因として、各茶エキス中の総ポリフェノール量が香煎茶加工で低下したことが関係しているものと考えられる。

次に、同じ重量の各茶葉から得られるエキス量を用いてその DPPH ラジカル消去作用を測定した結果を図 4(B)に示す。3 種の緑茶では、香煎茶の DPPH ラジカル消去作用は原料茶に比較して強くなる傾向が見られたが、それ以外の茶では低下した。緑茶の葉からのエキス収量は香煎茶加工によ

り増加するため、DPPH ラジカル消去作用が低下しなかったものと考えられる。従って、同重量の茶葉を用いて煎れた茶浸出液の場合、緑茶では香煎茶で強い抗酸化作用が期待できる。

もう 1 つの抗酸化作用の評価系として、PMS-NBT 法による  $O_2^{\cdot-}$  消去作用の測定法を用いた。 $O_2^{\cdot-}$  は、生体内で酸素から生成する活性酸素の 1 つであり、動脈硬化など種々の疾患に関わることが知られている [19]。各茶エキスの終濃度が 0.01 mg/mL となるようにした場合の  $O_2^{\cdot-}$  消去作用を測定した結果を図 5 に示す。緑茶を含む用いた 6 種すべての茶において、香煎茶エキスの  $O_2^{\cdot-}$  消去作用はその原料茶よりも強い傾向が見られた。各種香煎茶エキスの DPPH 消去作用は原料茶に比較して低下したので、これら 2 つの抗酸化作用を示す成分は同じではないことが予想される。

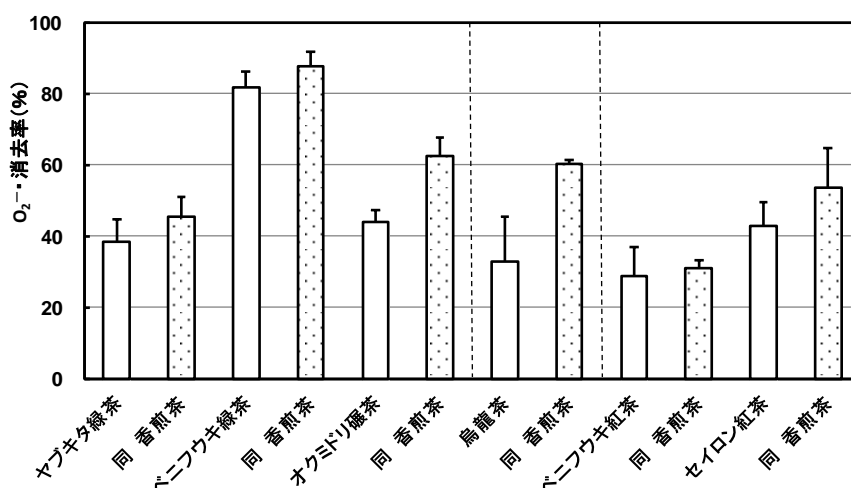


図5 香煎茶およびその原料茶の熱水エキスの $O_2\cdot^-$ 消去作用

茶葉の抗酸化成分としては、カテキン類やアスコルビン酸といった水溶性成分と $\beta$ -カロテンや $\alpha$ -トコフェロール、クロロフィルII関連化合物であるフェオフィチンといった不溶性成分が知られている[20]。茶の水エキスが示す抗酸化作用には、水溶性成分の中でも含有量の多いカテキン類が関与しているものと考えられる。烏龍茶や紅茶に含まれるカテキン類は重合しているものが多いが、これら重合カテキンであるテアシネンシン類、テアフラビン類、テアルビジン、ウーロンテアニン異性体の抗酸化作用は、カテキン単量体とほぼ差が見られない[21,22]。実際、緑茶、烏龍茶、紅茶の抗酸化作用に顕著な違いは認められていない[21,23]。香煎茶加工においても、カテキンの重合が起こる。ヤブキタ緑茶ではカテキン単量体の約30%が、また、ベニフウキ緑茶ではその約10%が、香煎茶加工により重合する[7]。こうしたカテキン類の重合体の化学構造については、テアシネンシン類やテアフラビン類等ごく一部の化合物で確認されているが、多くは不明のままである。香煎茶が示す抗酸化作用に關与する有効成分の化学構造についても、現在のところは明らかになっておらず、今後の検討が必要である。

#### 4. まとめ

本研究では、3種の緑茶、1種の烏龍茶、2種の紅茶とそれぞれの香煎茶の熱水エキスについて、その総ポリフェノール量と *in vitro* における抗酸化作用を検討した。緑茶の場合のみ、香煎茶から得られたエキスの収量は、原料茶よりも多かった。各茶エキスの総ポリフェノール量をフォーリン-チオカルトール法および酒石酸鉄法で測定したところ、いずれの茶でも香煎茶の総ポリフェノール量は原料茶に比較して同程度か低下する傾向が見られた。しかし、茶を煎れるのに同じ重量の葉を用いた場合には、緑茶では香煎茶の方が原料茶よりも多くのポリフェノールを摂取できるものと考えられた。香煎茶エキスの DPPH ラジカル消去作用は、その総ポリフェノール量と同様、原料茶に比較して低下した。また、DPPH ラジカル消去作用には、茶に含まれるすべてのポリフェノール成分が関与していることが推測される。茶を煎れるのに同じ重量の葉を用いた場合には、緑茶では香煎茶の方が原料茶よりも強い DPPH ラジカル消去作用が期待できるものと考えられた。一方、香煎茶エキスの  $O_2\cdot^-$  消去作用は、用いたすべての茶において原料茶よりも強い傾向が見られ、その有効成分は DPPH ラジカル消去作用を示す成分とは異なるものと予想された。以上の結果より、特に緑茶では、香煎茶加工により渋味の軽減と抗

酸化作用の保持だけでなく、夏季に水で淹れるのに適した茶になるものと考えられる。

### 参考文献

- 1) 堀 紀夫, 清涼飲料水の製造技術(1)清涼飲料水の概論. 食品と容器, vol.49, pp.356-362 (2008).
- 2) 佐野満昭, 茶の機能[2]茶カテキン類の抗酸化作用. 食品と容器, vol.45, pp.676-683 (2004).
- 3) 西條了康, 茶の渋味に關与する新カテキン—既知カテキンと同レベルで渋味・苦味に關与か. 化学と生物, vol.21, pp.426-428 (1983).
- 4) 鳴嶋茂治, 清水康夫, 清水敏子, 茶の加工およびその製造法により作られた機能性のある茶及びその茶を使用した機能性食品. 特許出願 2012-17176, 特許公開 2013-34469.
- 5) 刀坂泰史, 砂川陽一, 鈴木秀敏, 井上達秀, 土井 修, 野々木 宏, 清水 篤, 鳴嶋茂治, 清水康夫, 和田啓道, 長谷川浩二, 森本達也, B-12 肥満患者に対する香煎茶の効果. 日本薬理学会部会(日本薬理学雑誌), vol.142, p.5 (2013).
- 6) 清水康夫, 磚茶と機能性の茶(べにふうき茶). 交流, vol.53, pp.20-21 (2014).
- 7) 芳野恭士, 清水康夫, 清水 篤, 香煎茶加工(茶の新しい二次加工法). New Food Industry, vol.57, pp.1-10 (2015).
- 8) 芳野恭士, 善養寺優香, 清水康夫, 清水 篤, 香煎茶加工した烏龍茶の糖吸収抑制作用. 沼津高専研究報告, No.50, pp.87-90 (2016).
- 9) 佐野満昭, 芳野恭士, べにふうき(茶)等に含まれるメチル化カテキンの効果. 内分泌・糖尿病・代謝内科, vol.36, pp.303-308 (2013).
- 10) R. Julkunen-Tiitoo, Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, vol.33, pp.213-217 (1985).
- 11) 岩浅 潔, 太田勇夫, 鳥井秀一, 茶の公定分析法の改良(第 3 報)タンニン定量法の検討. 茶業研究報告, No.33, pp.69-73 (1970).
- 12) 戸高大介, 竹中陽子, 竹中哲夫, DPPH ラジカル捕捉能を有するカラメルの調製法. 日食科工誌, vol.46, pp.34-36 (1999).
- 13) M. Nishikimi, N.A. Rao, K. Yagi, The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol.46, pp.849-854 (1972).
- 14) F. Hashimoto, G. Nonaka, I. Nishioka, Tannins and related compounds. LXIX. : Isolation and structure elucidation of B, B'-linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolongtheanine from oolong tea. (2). *Chem. Pharm. Bull.*, vol.36, pp.1676-1684 (1988).
- 15) 福井祐子, 岩下 孝, 浅見純生, 野中裕司, 前田 満, 橋本文雄, 木曾良信, 烏龍茶重合ポリフェノールの構造・生理活性と LC-MS/MS による定量. 天然有機化合物討論会講演要旨集, vol.50, pp.475-480 (2008).
- 16) 田中 隆, 松尾洋介, 渡海明郁, 河野 功, 紅茶に含まれるエピガロカテキン二量体テアシネンシン類の生成機構. 天然有機化合物討論会講演要旨集, vol.45, pp.299-304 (2003).
- 17) Z. Yang, Y. Tu, H. Xia, G. Jie, X. Chen, P. He, Suppression of free-radicals and protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in HPF-1 cell by oxidized phenolic compounds present in black tea. *Food Chem.*, vol.105, pp.1349-1356 (2007).
- 18) 芳野恭士, 原 征彦, 茶カテキン類およびテアフラビン類の高速液体クロマトグラフィーによる定量法. 沼津高専研究報告, No.27, pp.87-91 (1993).
- 19) 中村成夫, 活性酸素と抗酸化物質の化学. 日



- 医大医会誌, vol.9, pp.164-169 (2013).
- 20) K. Yoshino, Antioxidative activities of low-caffeine extract prepared from green tea leaves. *J. Technology and Education*, vol.17, pp.17-24 (2010).
- 21) K. Yoshino, Y. Hara, M. Sano, I. Tomita, Antioxidative effects of black tea theaflavins and thearubigin on lipid peroxidation of rat liver homogenates induced by *t*-butyl hydroperoxide. *Biol. Pharm. Bull.*, vol.17, pp.146-149 (1994).
- 22) K. Yoshino, M. Suzuki, K. Sasaki, T. Miyase, M. Sano, Formation of antioxidants from (-)-epi-gallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *J. Nutr. Biochem.*, vol.10, pp.223-229 (1999).
- 23) P.-D. Duh, W.-J. Yen, B.-S. Wang, L.-W. Chang, Effects of Pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging. *J. Agric. Food Chem.*, vol.52, pp.8169-8176 (2004).