

蓮を用いた茶のポリフェノール含量と DPPHラジカル消去能について

荒木裕子、篠原尚子、渡邊 悟

Polyphenol contents and DPPH-radical scavenging activities of Teas from Hasu (*Nelumbo nucifera Gaertn.*)

HIROKO ARAKI, NAOKO SHINOHARA and SATORU WATANABE

We investigated polyphenol contents and DPPH-radical scavenging activities for teas from Hasu (*Nelumbo nucifera Gaertn.*), which had not been reported yet. The amount of polyphenol for Renshincha was a little, however, those for Renkacha and Hasucha were more than that for Shizuoka sencha. Renkacha and Hasucha had also higher DPPH-radical scavenging activities, which had a positive relationship with their polyphenol contents. Total amounts of catechin compounds for Uroncha and Shizuoka sencha were more than those for Renkacha and Hasucha. Therefore, another compounds except catechin ones, which also contributed to DPPH-radical scavenging activities, were estimated to be chlorogenic acid related ones by HPLC technique.

近年、天然物の抗酸化作用に関する研究が数多く報告されるようになり、茶葉の抗酸化作用は¹⁾周知の事実となっている。抗酸化能に寄与する各種茶葉のカテキン類の定量²⁾も多くなされ、ポリフェノール量と抗酸化能の間に正相関があることが茶以外の食用花卉³⁾やハーブ⁴⁾でも明らかになっている。中国茶については、多くの種類についてケミルネッセンス法により抗酸化能を測定した報告⁵⁾がある。しかし、中国やベトナムで飲用されている蓮を用いた茶についてはポリフェノール含量と抗酸化能ともに報告例がない。

そこで我々は、蓮を用いた茶について緑茶などと比較して、ポリフェノール含量とDPPHラジカル消去能を測定し、それらの相関について調べ、またポリフェノール成分の主であるカテキン類の定量を行ない新しい知見を得たので、ここに報告する。

Keywords: Polyphenol, DPPH-radical scavenging activity, Hasu

材料と方法

1. 試料

用いた試料は表1に示すとおりで、いずれも市販品を購入した。カテキン類 (epigallocatechin (EGC), epicatechin (EC), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG)) とDPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) は和光純薬社製のものを使用した。

他のすべての試薬は市販品特級またはこれに準ずるものを使用した。

表1 試料

製品名	原材料名	原産国
蓮芯茶	蓮の種子の胚芽	中国
蓮花茶 (A社)	茶葉、蓮の花	ベトナム
蓮花茶 (B社)	茶葉、蓮の花	ベトナム
蓮茶 (C社)	茶葉、蓮の花、香料	ベトナム
蓮茶 (D社)	茶葉、蓮の花、香料	ベトナム
ウーロン茶	茶葉	台湾
紅茶	茶葉	日本
ジャスミン茶	茶葉、ジャスミンの花	中国
八女煎茶	茶葉	日本
静岡煎茶	茶葉	日本

2. 抽出方法

飲用を想定して熱水抽出を行なった。つまり、茶葉試料を粉砕機で粉砕後、約1gを精秤し熱水 (90~95℃) 80mLを加え5分静置後、ろ紙 (Toyo Roshi No.2) で濾過し得られたろ液と、残渣を熱水で洗浄したものとを合わせて100mLに定容したものを抽出試料とした。

3. ポリフェノール量の定量

熱水抽出試料中のポリフェノール量の定量はフォーリン・デニス法⁶⁾で行なった。すなわち3.2mLの蒸留水を入れた試験管に適宜希釈した試料200 μ Lを加えて混合後、フォーリン・デニス試薬200 μ Lを加え混合し、さらに飽和炭酸ナトリウム400 μ Lを加えて混合した。室温で正確に30分放置後、760nmにおける吸光度を測定した。標準物質にEGCGを使用して検量線を作成し、EGCG相当量としてポリフェノール量を示した。

4. DPPHラジカル消去能の測定⁷⁾

8mgのDPPHをエタノール50mLに溶解し、これを蒸留水で100mLに定容しDPPH溶液とした。このDPPH溶液3.6mLに適宜希釈した試料400 μ Lを加えて混合し、室温で正確に30分放置後、517nmの吸光度を測定した。試料の色が測定に影響があるので、DPPH試薬の代わりに蒸留水を加えたものを試料色ブランクとした。コントロールは試料の代わりに蒸留水を加えて、混合直後 (0分) と30分後の吸光度を測定した。ラジカル消去能の算出は下記の式によって算出した。なお、合成の抗酸化剤であるブチルヒドロキシアニソール (BHA) のラジカル消去能も同様にして求めた。

$$\frac{(\text{コントロール0分の吸光度}) - (\text{試料30分後の吸光度}) - (\text{試料色ブランクの吸光度})}{\text{コントロール30分後の吸光度}} \times 100$$

5. HPLCによる分析⁸⁾

粉砕した試料約500mgを100mL容のメスフラスコに量りとり、アセトニトリルと蒸留水の等量混合液約80mLを加え、室温下で緩やかに振とう抽出した。

40分間振とう後、同じ液で100mLに定容し、良く混合した。しばらく静置した後、上清2mLをフィルター (DISMIC-25JP、アドバンテック東洋、東京) で濾過したものを抽出液とした。抽出液は、分析まで4℃で保管し、HPLCによる分析の直前に水で5倍に希釈した。カテキン標準品 (EC、EGC、ECG、EGCG) は各々、蒸留水・アセトニトリル (9:1、v/v) に溶解、混合、希釈して用いた。蒸留水とアセトニトリルはHPLC用を用いた。

HPLCは日立製作所製のL-6200システムを用い、カラムは野村化学 (株) のDevelosil ODS-HG-5 (4.6mm i. d.×150mm) を使用した。流速は1.0mL/minでカラムオープンの温度は40℃で行なった。検出は280nmで追跡し、カテキン類以外の成分は東ソー (株) の多波長検出器PD-8020を使用した。溶離液はA液: 水・アセトニトリル・85%リン酸 (95.45:4.5:0.05, v/v/v) とB液: 水・アセ

トニトリル・85%リン酸 (49.95 : 50.0 : 0.05, v/v/v) を用い、以下のグラジエントプログラムにしたがって流した。

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0	90	10
5	90	10
8	70	30
10	70	30
15	20	80
20	20	80

結果と考察

1. ポリフェノール含量について

表1に示した試料を熱水抽出し、それらに含まれるポリフェノール量をEGCG相当量として示したのが、図1である。これで見られるように、蓮芯茶を除く蓮を用いた茶のポリフェノール含量が、他の茶より多かった。蓮花茶 (A社) では223.0mg/100 mL、蓮花茶 (B社) は206.5mg/100mL、蓮茶 (C社) は211.2mg/100mL、蓮茶 (D社) は207.7mg/100mLであった。蓮芯茶は48.4mg/100mLであり、蓮の種子の胚芽にポリフェノールが少ないことが推察できる。

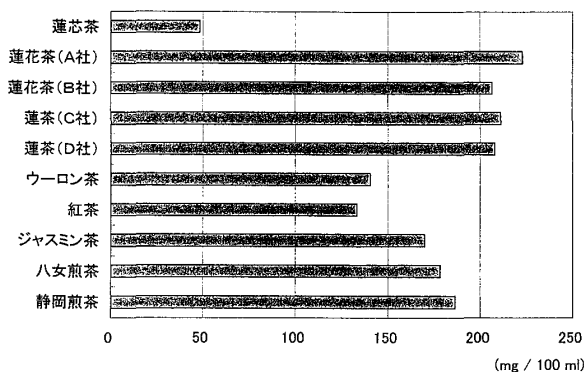


図1 熱水抽出試料のポリフェノール含量 (EGCG相当量)

一方、緑茶である静岡煎茶 (186.4mg/100 mL) と八女煎茶 (178.2mg/100mL) はジャスミン茶 (169.9mg/100mL) と同等であった。また、半発酵茶であるウーロン茶は140.4mg/100mL、発酵茶である紅茶は133.3

mg/100mLと不発酵茶である緑茶より少なかった。これは、発酵過程でポリフェノールが少なくなるという報告²⁾に合致する。

蓮を用いた茶のポリフェノール含量の報告は初めてであり、一般に多いとされる緑茶よりも蓮花茶と蓮茶が多いことは注目に値する。

なお、本データは熱水抽出のものであり、抽出方法によりポリフェノール量が異なる³⁾ことが知られている。メタノールによる抽出の方が水抽出よりポリフェノールの抽出率が高まることがわかっている (データ未掲載)。

2. DPPHラジカル消去能について

各種の茶の熱水抽出試料の希釈倍を変えてDPPHラジカル消去能 (%) を測定した結果が図-2である。なお、比較として合成の抗酸化剤であるBHAの濃度を変えてDPPHラジカル消去能も測定した。

試料名	DPPHラジカル消去能 (%)				
	試料の希釈倍				
	100	50	20	10	1
蓮芯茶	ND	ND	9.4	13.3	82.7
蓮花茶(A社)	24.3	43.2	79.1	92.8	93.6
蓮花茶(B社)	25.1	41.9	78.1	91.6	92.2
蓮茶(C社)	23.1	42.0	78.4	91.8	91.8
蓮茶(D社)	26.0	41.9	75.9	91.9	91.2
ウーロン茶	15.7	25.2	48.8	76.5	84.5
紅茶	24.9	30.4	32.1	53.1	80.3
ジャスミン茶	21.7	33.1	61.1	78.4	78.9
八女煎茶	13.9	25.2	53.9	81.4	79.5
静岡煎茶	19.9	32.1	61.0	82.9	79.8

BHA濃度 (mg%)	0.5	2.5	5.0	10.0	25.0
DPPHラジカル消去能 (%)	5.6	23.5	47.4	77.7	91.9

図2 熱水抽出試料の抗酸化能 (DPPHラジカル消去能)

この結果から、蓮花茶と蓮茶のDPPHラジカル消去能が他の茶より強いことがわかる。希釈倍が大きくなるにつれて、いずれもDPPHラジカル消去能が低くなるが、その低くなり方が紅茶は他と違うことがわかる。蓮芯茶はこの中で最もDPPHラジカル消去能が低かった。

各種の茶の希釈倍が20倍時のDPPHラジカル消去能 (%) とBHA濃度10mg%時のそれをまとめて示したのが、図3である。蓮花茶と蓮茶のDPPHラジカル消去能が10 mg%のBHAのそれに匹敵することがわかる。

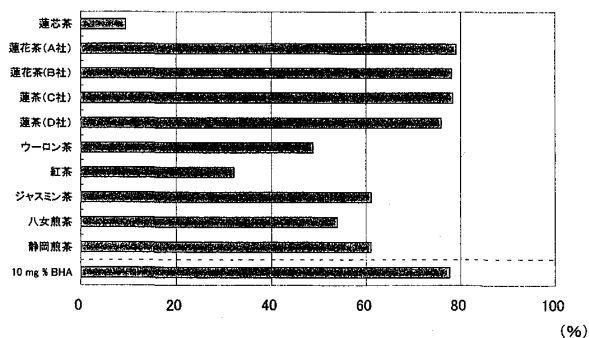


図3 DPPHラジカル消去能 (%)
(熱水抽出20倍希釈試料)

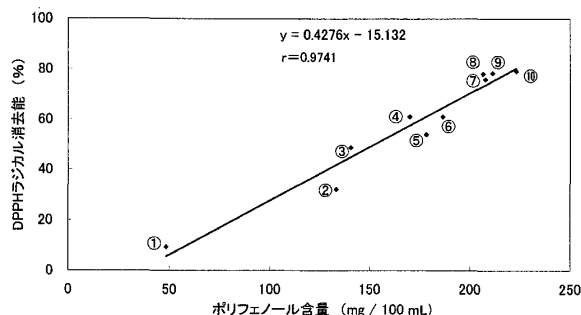


図4 ポリフェノール含量と
DPPHラジカル消去能との相関

図1と図3を比較すると、棒グラフの形が似ているが、ポリフェノール含量とDPPHラジカル消去能に相関があることが推測できる。

3. ポリフェノール含量とDPPHラジカル消去能との相関

図1と図3の結果から、ポリフェノール含量とDPPHラジカル消去能との相関を示したのが、図4である。最小自乗法より直線を描くと $y=0.4276x-15.132$ となり、相関係数は0.9741でポリフェノール含量とDPPHラ

表2 熱水抽出試料のカテキン量 (mg/100mL)

	EGC	EC	EGCG	ECG	総カテキン量
蓮芯茶	9.6	1.8	3.2	3.6	18.2
蓮花茶(A社)	40.3	19.5	52.3	30.6	142.7
蓮花茶(B社)	28.2	15.9	68.9	39.9	153.0
蓮茶(C社)	47.5	18.4	54.9	26.6	147.5
蓮茶(D社)	23.6	17.2	59.1	38.0	137.8
ウーロン茶	87.9	9.9	51.0	10.1	158.9
紅茶	14.2	6.2	48.2	35.0	103.6
ジャスミン茶	24.4	8.4	52.3	21.2	106.3
八女煎茶	45.5	9.2	59.1	11.6	125.4
静岡煎茶	65.4	11.7	66.3	15.3	158.7

ジカル消去能との間に有意な高い正相関があると判断できた。

4. カテキン類のHPLCによる分析

蓮を用いた茶に含まれるポリフェノール成分を調べるために、緑茶で一般に行なわれているカテキン類のHPLCによる分析⁸⁾を行なった。静岡煎茶と蓮花茶(A社)の典型的なHPLCパターンを図5に示す。EGC, EC, EGCG, ECGの量をそれぞれの標準から1点検量線法で定量し、他のカテキン類がほとんど見られなかったため、それら4つの量の総和を総カテキン量とした。蓮を用いた茶を含め、10種の試料すべてのカテキン量をまとめたのが表2である。

総カテキン量が最も多かったのはウーロン茶であった(158.9mg/100mL)。静岡煎茶はそれに匹敵し(158.7mg/100mL)、カテキンの中で抗酸化能が強いEGCG量が66.3mg/100mLとウーロン茶のそれ(51.0

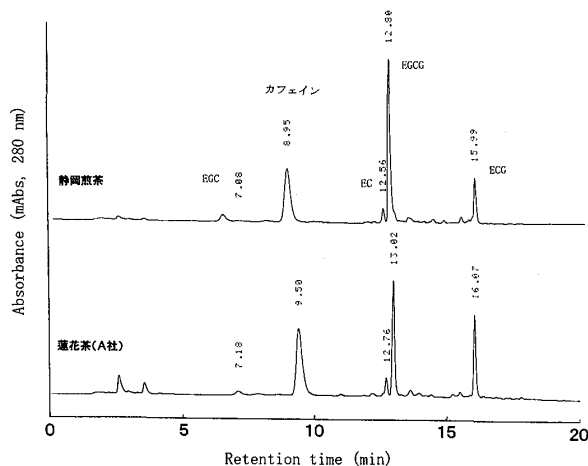


図5 カテキン類のHPLCパターン
数字は保持時間 (min) を示す

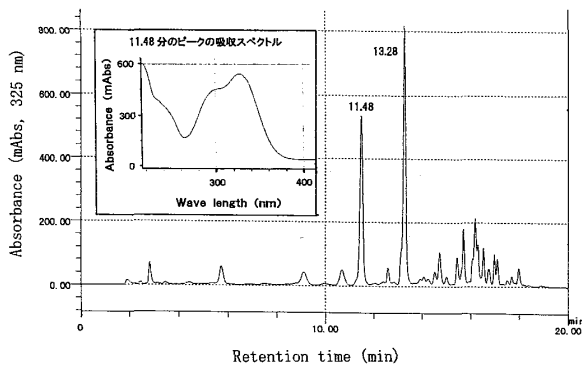


図6 蓮茶 (D社) の多波長検出器を用いたHPLC分析

mg/100mL) より多かった。蓮花茶と蓮茶は静岡煎茶よりポリフェノール量が多かったが、総カテキン量は静岡煎茶より若干であるが少なかった。しかし、DPPHラジカル消去能は蓮花茶と蓮茶の方が静岡煎茶より強かったので、カテキン類以外のポリフェノールがDPPHラジカル消去能に寄与していることが推察された。

そこで、蓮花茶と蓮茶について、多波長検出器を用いたHPLC分析によるカテキン類以外のポリフェノール成分の存在を調べた。その結果、蓮花茶と蓮茶ともに4-カフェオイルキナ酸 (4-CQA) と保持時間と吸収スペクトルが一致するピーク (11.48分) と、未知のピーク (13.28分) の2つが特に見られた (図6)。4-CQAはクロロゲン酸 (5-CQA) の異性体で、抗酸化能がクロロゲン酸と同程度ある。¹⁰⁾

今後、特にこの2つのピークの物質を同定し、蓮花茶と蓮茶に特有の成分かどうか、抗酸化能があるかなど追及する必要がある。

要約

蓮を用いた茶についてのポリフェノール

含量や抗酸化能についての報告例がないので、それらについて調べた。

1. 蓮芯茶のポリフェノール量は少なかったが、蓮花茶と蓮茶のそれは静岡煎茶のそれよりも多かった。
2. DPPHラジカル消去能は、蓮花茶と蓮茶が高く、ポリフェノール含量との間に正の相関があった。
3. 総カテキン量は、蓮花茶や蓮茶よりウーロン茶や静岡煎茶の方が多かった。
4. 蓮花茶や蓮茶には、DPPHラジカル消去能に寄与するカテキン類以外の成分の関与が推察され、その1つにクロロゲン酸類の存在が指摘された。

文献

- 1) 松崎妙子、原征彦：日農化誌、**59** (2), 129 (1985)
- 2) 寺田志保子ら：日食工誌、**34** (1), 20 (1987)
- 3) 立山千草ら：食科工、**44** (4), 290 (1997)
- 4) 藤江歩巳ら：日本調理科学会誌、**34** (4), 380 (2001)
- 5) 安藤真美、原田和樹、田村良行：食品工業、**30** (3), 39 (2002)
- 6) 篠原和毅ら編著：食品機能研究法、光琳、2001、p318
- 7) 戸高大介、竹中陽子、竹中哲夫：食科工、**46** (1), 34 (1999)
- 8) 後藤哲久ら：茶研報、**83**, 21 (1996)
- 9) 岩本嗣、田崎弘之：2004年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p89
- 10) HAYASE, F. and KATO, H.: J. Nutr. Sci. Vitaminol., **30**, 37 (1984)