

国産紅茶の DPPH ラジカル消去能とポリフェノール成分について(その1)

荒木裕子*、山内なつき**、篠原尚子***、渡邊 悟****

DPPH-radical Scavenging Activities and Polyphenol Components for Domestic Black Teas (Part I)

Hiroko ARAKI*, Natsuki YAMAUCHI**, Naoko SHINOHARA*** and Satoru WATANABE****

We measured DPPH-radical scavenging activities, and determined the amounts of polyphenol, catechins and theaflavins for the domestic teas (10 kinds), compared with Indian ones (darjeelin and assam) and Japanese green one.

Polyphenol contents (PCs) for ten domestic teas were almost the same amounts as Indian ones. These DPPH-radical scavenging activities were positively related with PCs, furthermore, between PCs and amounts of total catechins were also positive relationship.

Amounts of caffeine did not show the remarkable differences among samples. However, amounts of total catechins showed some differences among samples, which were similar tendency with PCs. And total theaflavin contents were different from each other. In particular, the order of amounts for six samples were shown as TF33'G > TF3 > TF > TF3'. The positive relationship between PCs and amounts of total both catechins and theaflavins (50% acetone extraction) were also shown.

緒言

茶は製造法の違いにより、緑茶、ウーロン茶、紅茶、その他に分類される。我が国では緑茶が主流であるが、世界的にみると、茶の生産量の約8割は紅茶であり、様々な種類や利用法を伴って紅茶は世界各地で愛飲されている¹⁾。

近年では、食品の成分について、健康の維持増進を目的とした三次機能に関する研究が非常に盛んになっており、国内では緑茶の機能についての研究が多くなされている。これに対して、紅茶については製造過程で消失する成分や新たに生ずる成分が多くあるため、その研究はやや遅れているのが現状である^{2, 3)}。

そこで本研究では、産地別という観点から、国産紅茶10種に加えて、比較用として国産煎茶1種、外国産紅茶2種を用い、国内で採取・製造された国産の紅茶について DPPH ラジカル消去能とポリフェノール成分の比較を行ったので、報告する。

実験方法

1. 材料

実験に供した各種茶試料は次の通りである。また、産地と種類を表1に示した。

なお、試料は全て平成22年度産の茶を用いた。

(1) 産地が明確な茶

Keywords: DPPH-radical scavenging activity, Polyphenol content, Domestic black tea

*東京聖栄大学健康栄養学部食品学科、**東京聖栄大学健康栄養学部食品学科3期卒業生、***前東京聖栄大学健康栄養学部管理栄養学科、****東京聖栄大学健康栄養学部管理栄養学科

鹿児島県産べにひかり、べにふうき、奈良県産べにひかり、べにほまれ、さやまかおり、さやまみどり、大分県産べにひかり、べにふうき、宮崎県産ブレンド(やぶきた、おくむさし、在来種)紅茶
 ※全て、紅茶専門店 紅葉にて購入

(2) 同一原料から製造した茶

埼玉県産ふくみどり(煎茶、紅茶)

※埼玉県 吉野園にて購入

(3) 比較用試料としての外国産茶

インド産ダージリン、アッサム

※紅茶専門店 紅葉にて購入

表1 各試料の産地、種類

試料番号	産地	種類
1	インド	ダージリン
2	インド	アッサム
3	鹿児島県 根占	べにひかり
4	鹿児島県 根占	べにふうき
5	奈良県 月ヶ瀬	べにひかり
6	奈良県 月ヶ瀬	べにほまれ
7	奈良県 月ヶ瀬	さやまかおり
8	奈良県 月ヶ瀬	さやまみどり
9	埼玉県 日高	ふくみどり(煎茶)
10	埼玉県 日高	ふくみどり(紅茶)
11	大分県 杵築	べにひかり
12	大分県 杵築	べにふうき
13	宮崎県 美郷	多品種ブレンド※

※やぶきた、おくむさし、在来種のブレンド茶

2. 試料抽出液の調製

試料を粉砕機(ジューサーミキサー、象印マホービン株式会社)で粉砕した後、篩(OPENING:1.18 m/m、DIAMETER:0.63)で大きさを揃えた。それを1.00 g採取し、90~95℃の熱水80 mLを加えて5分間抽出をした。抽出後はろ紙(No.2)を用いてろ過を行い、残渣等は常温の水で洗いこみをし、100 mLに定容したものを、試料抽出液とした。

3. 総ポリフェノールの定量⁴⁾

総ポリフェノールの定量は、フォーリン・デニス法で行った。始めに、10倍希釈した試料溶液0.2 mLに、純水3.2 mLとフォーリン・デニス試薬0.2 mLを加えて攪拌をした。その後、飽和炭酸ナトリウム溶液0.4

mLを加え攪拌したものを30分放置し、760 nmで吸光度を測定した。なお、測定は3連で行いその平均値を用いた。

また当実験では、エピガロカテキンガレート(EGCG)を標準物質として用い、検量線を作成した後、その相当量として試料の総ポリフェノール量を算出した。

4. DPPH ラジカル消去能の測定⁴⁾

DPPH 8 mgを50 mLのエタノール(特級)に溶解し、蒸留水で100 mLに定容したものをDPPH溶液とした。このDPPH溶液3.6 mLに希釈した試料抽出液0.4 mLを加え、攪拌し30分放置したものを517 nmの吸光度で測定した。この時の試料の希釈は10倍、20倍、50倍、100倍のものを用い、希釈をしない原液も測定用試料抽出液として用いた。

また、試料抽出液の色が測定結果に与える影響を考慮して、DPPH溶液の代わりに50%エタノールを加えて、30分放置したものの吸光度をブランクとし、コントロールは、試料抽出液の代わりに蒸留水を加え、直後の吸光度と30分後の吸光度を測定した。測定においては3連で行い、その平均値を結果として用いた。

DPPH ラジカル消去能は以下の式の通りである。

$$\text{DPPH ラジカル消去能}(\%) = (A - B / C) \times 100$$

A : コントロール0分の吸光度

B : 各試料30分後の吸光度

C : コントロール30分後の吸光度

5. HPLCによるカテキン類、テアフラビン類の定量

(1) 試料調製

水抽出液 : 上記の試料抽出液の調製で述べた通りの方法で抽出を行った。ただし、蒸留水はミリQ水を用いた。

溶媒抽出液 : 水抽出液でも用いたメッシュをそろえた試料を1.00 g採取し、脱気した50%アセトニトリル溶液80 mLを加えて、スターラーで30分攪拌、抽出を行う。その後水抽出と同様、No.2のろ紙でろ過を行い、残渣洗いこみをして100 mLに定容した。

(2) 各抽出液の定量内容

水抽出液 : カテキン類の定量

溶媒抽出液 : カテキン類、テアフラビン類の定量

(3) 標準溶液調製

カテキン類標準物質は、エピカテキン (EC)、エピカテキンガラート (ECG)、エピガロカテキン (EGC)、エピガロカテキンガラート (EGCG) の4種を用いた。標準溶液は、水抽出液の場合はミリQ水、溶媒抽出液の場合は50%アセトニトリル溶液でそれぞれ標準物質を溶かしたものをを用いた。

一方、テアフラビン類標準物質は、テアフラビン (TF)、テアフラビン-3 ガラート (TF3G)、テアフラビン-3-⁺ ガラート (TF3⁺G)、テアフラビン-3, 3⁺ ジガラート (TF33⁺G) の4種を用いた。

標準溶液は溶媒抽出液用として、50%アセトニトリル溶液で各標準物質を溶かしたものを使用した。

(4) HPLC の条件

高速液体クロマトグラフは、日立ハイテクノロジーズL-6200 システムを用い、以下の操作条件で測定を行った。

【操作条件】

1) カテキン類の定量⁵⁾

カラム：野村化学株式会社 Develosil ODS-HG-5 (4.6 mmI. D×150 mm)

移動層：A液…水：アセトニトリル：85%リン酸 (95.45：4.50：0.05, v/v/v)

B液…水：アセトニトリル：85%リン酸 (49.95：50.00：0.05, v/v/v)

流速：1 mL/min

カラム温度：40℃

検出器：UV 検出器 231 nm

注入量：10 μL

グラジエント プログラム：以下のグラジエントで測定を行った。

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

2) テアフラビン類の定量⁶⁾

カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18

(4.6 mmI. D×250 mm)

移動層=水：アセトニトリル：85%リン酸 (76：23：1, v/v/v) ※全てHPLC 用

流速：1 mL/min

カラム温度：40℃

検出器：UV 検出器 231 nm

注入量：10 μL

実験結果および考察

1. 各試料のポリフェノール含量およびDPPH ラジカル消去能

国産紅茶10種、国産煎茶1種と外国産紅茶2種の試料抽出液について、総ポリフェノール量、DPPH ラジカル消去能の結果を表2に示した。

測定結果から、各試料総ポリフェノール量は34.6~67.3 mg/100 mL (煎茶は除く) となっており、各々の試料によってポリフェノール量が異なることが顕著であった。国産の紅茶を比較してみると、高含量のものは大分県産べにふうき (67.3 mg/100 mL) べにひかり (52.6 mg/100 mL) であった。ポリフェノール含量の違いは、品種による違いの他、発酵法などの製法の違いなど、さまざまな要因によるものと考えられる。紅茶のポリフェノールには、重合過程での未酸化のカテキン類や酸化重合で生成されたテアフラビン類や、テアルビジン類が含有されており、ポリフェノール含量とカテキン含量、テアフラビン含量との相関も重要であると考えられる。本研究ではポリフェノール含量とカテキン含量には相関を有する傾向が見られ、両者含量の相関係数は0.9475と高かった。

なお、同じ茶葉から製造された埼玉県産のふくみどり (煎茶、紅茶) については、煎茶は総ポリフェノール含量が高く 76.5 mg/100 mL であり、紅茶は総ポリフェノール含量が36.6 mg/100 mL であった。同原料でも、緑茶と紅茶では製造法が違うわけで、紅茶では緑茶に比べてポリフェノール含量は40 mg も製造工程中に減少した。また外国産と国産を比較してみると、インド産ダーズリンが63.4 mg/100 mL と高いポリフェノール含有量であったが、大分県産のべにふうきが67.3 mg/100 mL とインドダーズリンに匹敵する高い値を示した。

一方、DPPH ラジカル消去能について調べた結果、抽出試料原液では全試料で83.1~95.2%と高いラジカル消去能を有していることが確認された。また試料

溶液 20 倍希釈の紅茶においても 24.7~64.5% のラジカル消去能があると示され、各試料の傾向は総ポリフェノール量の傾向と同等のものであった。なお、各試料の総ポリフェノール量と DPPH ラジカル消去能について比較した結果 (図 1)、その相関係数は約 0.92 (図 2) と高い相関があると認められた。この総ポリフェ

ノール量と DPPH ラジカル消去能の相関については、立山ら⁷⁾ が食用花卉、藤江ら⁸⁾ が新鮮ハーブで相関があったとして発表しているため、本実験においても DPPH ラジカル消去能に寄与する主成分はポリフェノール成分であると示唆された。

表2 各試料の総ポリフェノール量と各希釈倍率での DPPH ラジカル消去能

試料番号	総ポリフェノール量 (mg/100 ml)	DPPH ラジカル消去能 (%)				
		100 倍希釈	50 倍希釈	20 倍希釈	10 倍希釈	原液
1	63.4	13.0	26.3	55.2	81.2	83.1
2	48.0	10.4	18.4	39.3	64.7	93.0
3	45.4	8.9	17.0	36.1	61.3	93.1
4	45.8	17.7	25.0	44.4	65.7	95.2
5	45.8	11.8	20.0	41.1	67.1	88.3
6	45.8	10.6	18.3	38.8	63.4	91.2
7	35.5	8.1	13.2	27.3	46.3	90.5
8	38.4	8.8	12.6	24.7	42.6	87.5
9	76.5	18.6	29.6	65.5	85.1	86.1
10	36.6	8.1	11.8	24.7	44.7	89.7
11	52.6	14.0	22.3	46.5	73.7	92.7
12	67.3	18.5	31.9	64.5	90.0	93.0
13	34.6	9.9	15.4	32.4	53.5	93.1

試料番号は表 1 に一致する。

(%, mg/100ml)

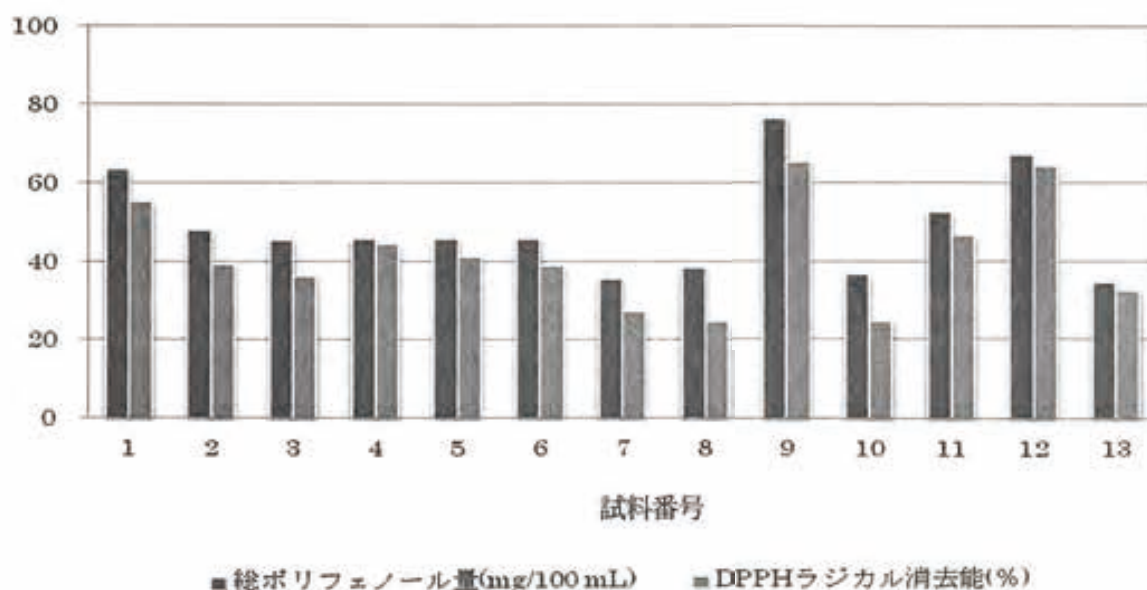


図1 各試料の総ポリフェノール量と DPPH ラジカル消去能 (20 倍希釈) の比較

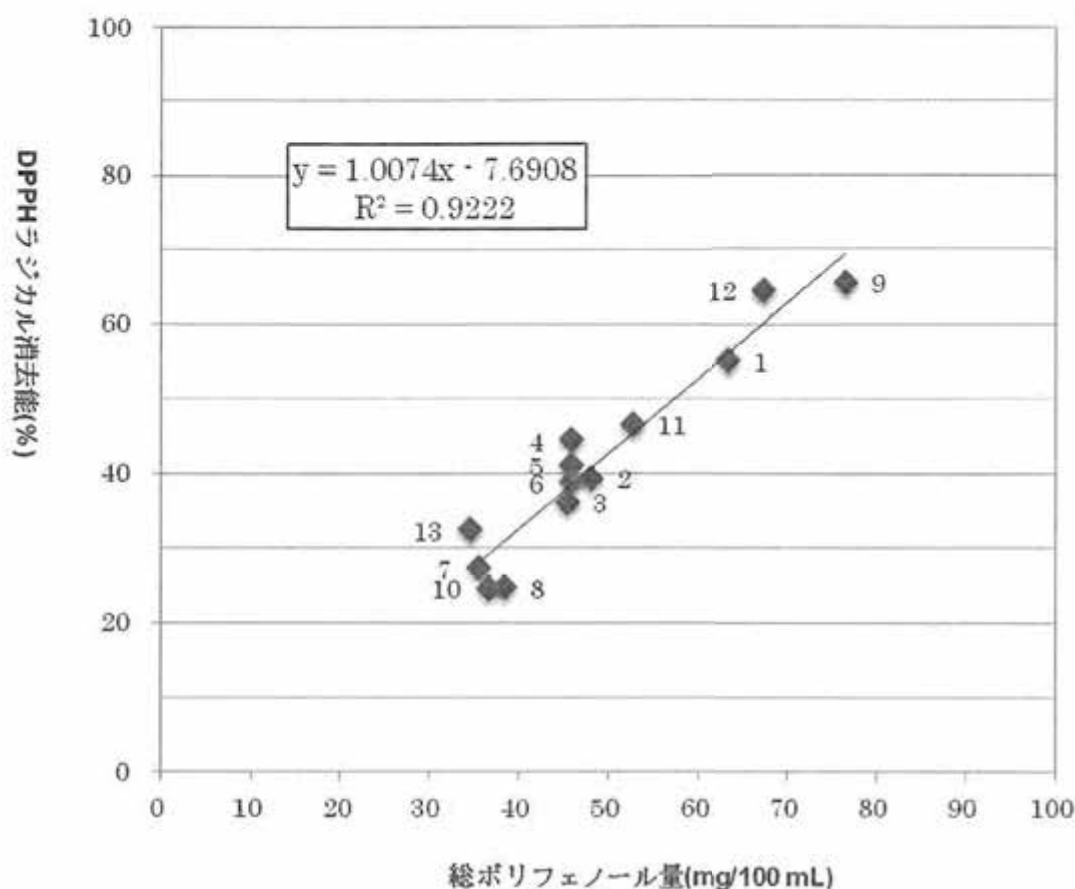


図2 各試料の総ポリフェノール量とラジカル消去能 (20 倍希釈) の相関
試料番号は表 1 に一致する。

2. 各試料のポリフェノール成分

各試料の DPPH ラジカル消去能に寄与するポリフェノール成分を検討するため、カテキン類を HPLC により分析したところ、表 3、4 の結果が得られた。

定量を行ったのはカフェイン、EGC、EC、EGCG、ECG で、総カテキン量は各カテキンの総和とした。これらの結果から、カフェイン濃度については、各試料間には大きな差が見られなかったが、総カテキン量は試料により差が見られた。水抽出時の総カテキン量では、大分県産べにひかりが 12.23 mg/100 mL、べにふうきが 25.92 mg/100 mL と他の国産紅茶と比較して高くなっており、総ポリフェノール量の結果と傾向が似ていた。また、同一原料から製造したふくみどりの煎茶と紅茶のカテキン含量を水抽出試料で比較してみると、

ふくみどり (煎茶) では総カテキン含量は 72.74 mg/100 mL と高い値を示したが、製造工程中に酸化重合で減少すると思われるふくみどり (紅茶) では 4.88 mg/100 mL であった。寺田ら⁹⁾ もカテキン類含量も発酵が進むほど、減少傾向があると報告している。本研究においても、製造工程中の発酵操作により相対的に減少が見られ、特に EGCG、EGC が著しく減少した。

また、図 3 で示すように試料抽出法の違いによる総カテキン量の比較を行ったところ、相関は図 4 のようになり、相関係数が約 0.95 であることから抽出方法による傾向の差は見られないと判断出来た。

一方、テアフラビン類の定量については表 5 の結果が得られた。紅茶特有の色調は酸化重合した結果生成されたテアルビジンとテアフラビンによるものであ

る。テアルビジンはテラフラビンよりもさらに高重合で構造が多様であり、標準物質の入手が困難であるこ

とから、本研究では分析可能なテアフラビンの定量を試みた。その結果、テアフラビン含量が高い値を示し

表3 水抽出による各試料のカフェイン量とカテキン量(mg/100 mL)

試料番号	カフェイン	カテキン				総カテキン量
		EGC	EC	EGCG	ECG	
1	14.51	3.18	0.99	7.50	3.22	14.89
2	16.19	2.26	1.35	1.96	1.66	7.23
3	11.90	1.61	0.42	1.92	1.95	5.90
4	6.91	0.81	0.51	0.54	0.15	2.01
5	13.50	1.26	1.42	1.71	2.39	6.78
6	12.99	1.64	0.79	0.99	0.86	4.28
7	10.88	1.36	0.67	0.92	0.39	3.34
8	11.33	1.26	1.13	0.68	0.55	3.62
9	22.00	29.60	7.51	30.03	5.60	72.74
10	16.53	1.71	1.21	1.23	0.73	4.88
11	19.30	2.73	3.25	2.59	3.66	12.23
12	18.73	3.05	6.03	7.86	8.98	25.92
13	16.33	1.80	1.34	1.51	0.42	5.07

試料番号は表1に一致する。

表4 溶媒抽出による各試料のカフェイン量とカテキン量(mg/100 mL)

試料番号	カフェイン	カテキン				総カテキン量
		EGC	EC	EGCG	ECG	
1	36.72	3.42	4.65	27.73	16.18	51.98
2	32.70	3.66	1.92	5.14	7.37	18.09
3	21.76	2.10	1.91	3.26	2.50	9.77
4	14.38	1.36	2.59	1.40	3.31	8.66
5	27.77	2.23	4.44	6.01	10.04	22.72
6	27.39	3.19	4.18	4.29	4.93	16.59
7	16.78	2.22	2.34	2.27	2.27	9.10
8	20.10	2.17	1.96	3.33	3.54	11.00
9	28.23	36.43	9.48	59.31	14.62	119.84
10	24.73	2.16	1.26	4.62	2.80	10.84
11	29.72	4.69	4.72	5.58	11.40	26.39
12	34.58	6.49	9.47	18.35	21.46	55.77
13	23.72	2.24	2.53	3.58	2.28	11.03

試料番号は表1に一致する。

mg/100 mL

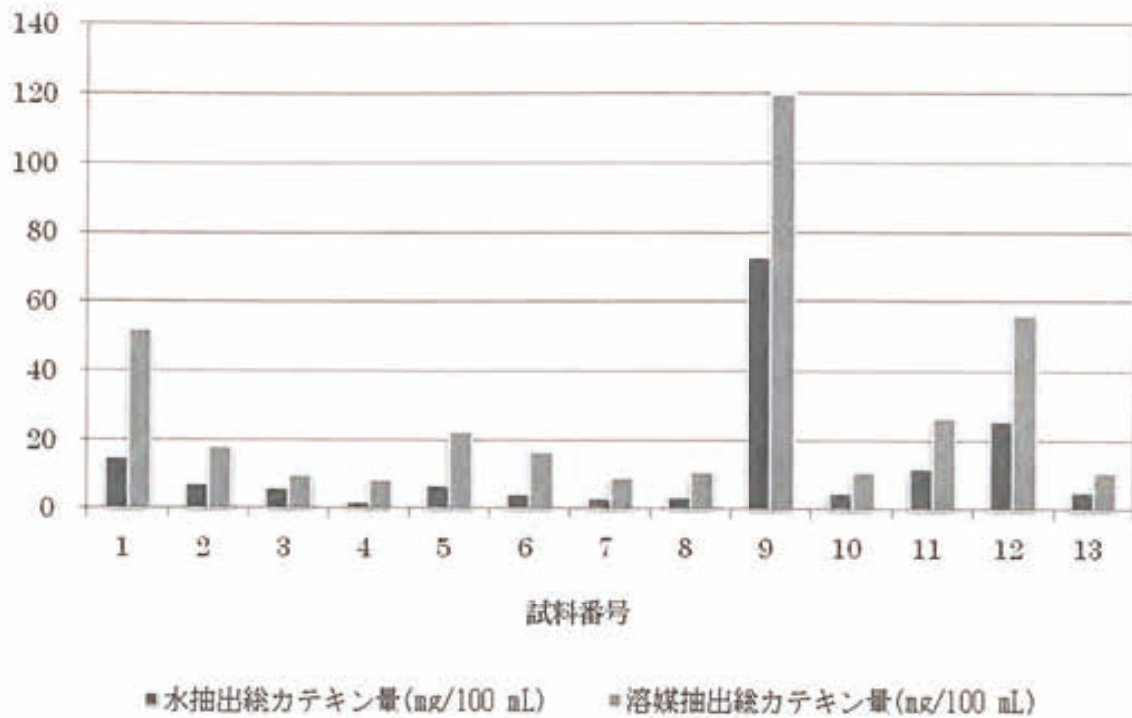
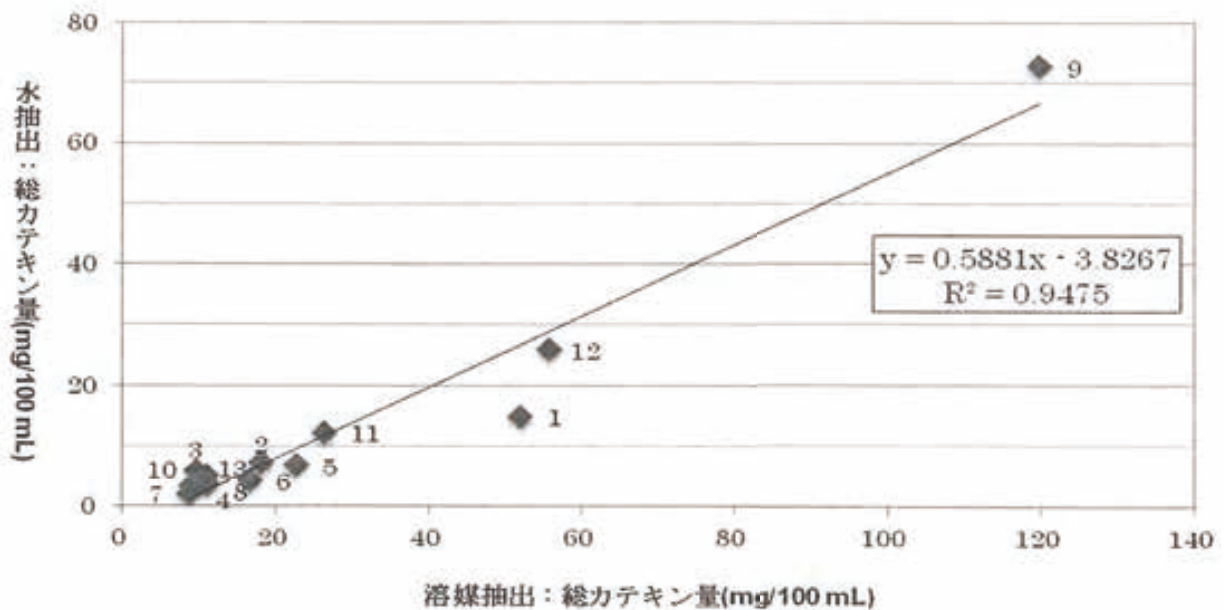


図3 試料抽出法の違いによる総カテキン量の比較



グラフ内の番号は表1の試料番号に一致する。

図4 試料溶液抽出法の違いによる総カテキン量の相関

表5 溶媒抽出による各試料のテアフラビン量 (mg/100 mL)

試料番号	TF	TF3	TF3'	TF33' G	総テアフラビン
1	0.82	0.75	0.39	1.41	3.37
2	1.04	2.87	2.04	6.48	12.43
3	0.33	1.29	0.63	2.18	4.43
4	1.08	1.23	1.00	1.31	4.62
5	1.17	1.38	0.43	1.20	4.18
6	1.79	2.62	1.20	2.70	8.31
7	1.35	2.22	0.90	1.93	6.40
8	0.89	1.81	0.63	2.34	5.67
9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.97	1.75	0.65	1.88	5.25
11	0.97	2.18	1.26	3.34	7.75
12	1.51	2.17	1.34	3.55	8.57
13	0.81	1.58	0.58	1.60	4.57

試料番号は表1に一致する。

たものは大分県産べにふうき 8.57 mg/100 mL、奈良県産べにほまれ 8.31 mg/100 mL であった。テアフラビン類は紅茶の色素成分でもあり、紅茶の色調と品質に影響する重要な因子とされ、Hiltonら¹⁰⁾はテアフラビン含量と紅茶価格の変動との関係性を報告している。また坂本ら¹¹⁾は、12 銘柄の紅茶抽出液の色調を分光測色計により測定し、テアフラビン含量と明度 L 値と赤色の彩度 a 値との関係を調べ、テアフラビン含量と表色値との間には高い相関があると報告している。さらに坂本ら¹¹⁾は、紅茶 12 銘柄のテアフラビン類の含量は、TF33' G が最も高く、次いで TF3、TF、TF3' であったと報告しており、著者らの分析結果では、国産紅茶 10 種類のうち 6 銘柄 (試料番号 4, 6, 8, 10, 12, 13) が、坂本ら¹¹⁾の報告したテアフラビン含量パターンと同一パターンを示した。

各試料の総ポリフェノール量と溶媒抽出した総カテキン、テアフラビン量の相関 (図5) を調べたところ、相関係数は約 0.85 となり、高い相関が得られた。試みた国産紅茶のうち、大分県産の DPPH ラジカル消去能が高く、ポリフェノール量が多かった要因は、大分県産の試料のみが自然発酵による製造方法をとっていることが考えられる。製造工程段階でポリフェノール量が減少していくが、自然発酵という方法が温和であるため、ポリフェノール量の減少が抑制されたのではないかと推察した。

しかし、茶葉の品種はもちろん、発酵度合い、茶葉を収穫した季節、茶樹の生育環境など様々な要因が紅茶成分の増減に深く関与しているため、本実験のみで上記の考察を十分に支持出来ないと思われる。したがって、今後も他の視点からも研究を重ね、紅茶成分の増減の要因を考究することが必要であろう。

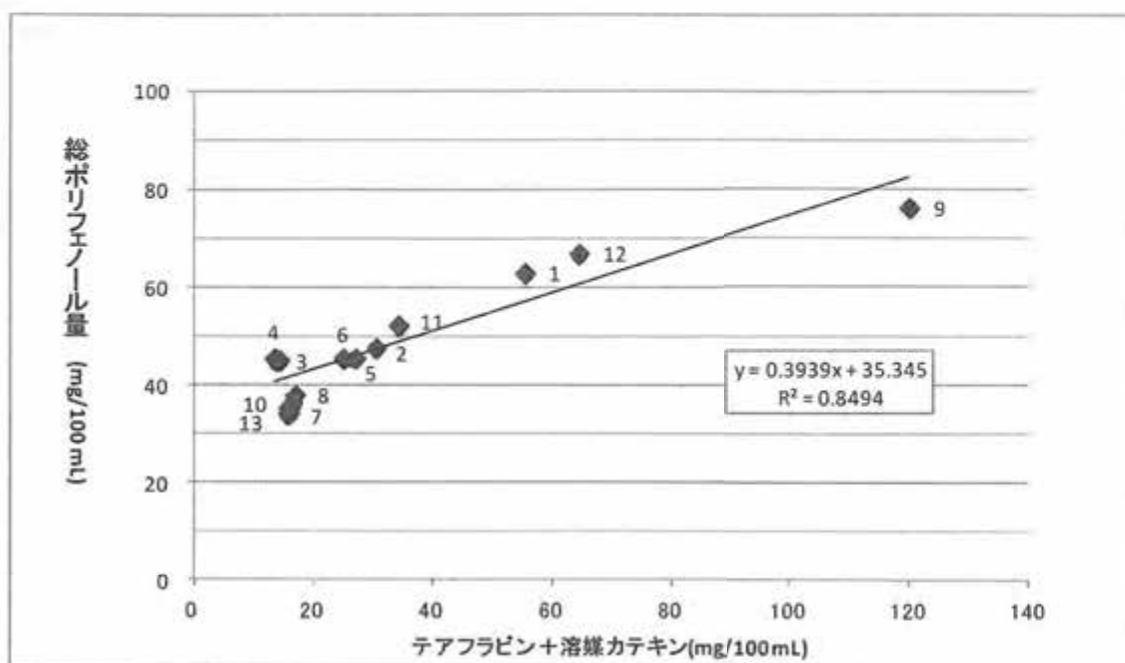


図5 各試料の総ポリフェノール量と、溶媒抽出した総カテキンとテアフラビン類の総量の相関
試料番号は表1に一致する。

要約

国産紅茶10種と比較試料として外国産紅茶2種、緑茶1種について、ポリフェノール含量、DPPHラジカル消去活性、ポリフェノール成分として、カテキン類とテアフラビン含量について調べ、比較した。

1) 国産紅茶10種のポリフェノール含量は、比較試料とした2種の外国産紅茶とほとんど同程度の含量であった。中でも大分産べにひかりがダーズリンより高値を示した。DPPHラジカル消去活性は、ポリフェノール含量と高い相関が見られた。また、ポリフェノール含量と総カテキン量との間にも高い相関が確認された。

2) カフェイン濃度は試料間で大きな差が見られなかったが、総カテキン含量は試料により差が見られ、ポリフェノール含量の結果と傾向が類似していた。

国産紅茶間では総テアフラビン含量に差が見られ、TF33'Gが最も量的に多く、次いでTF3、TF、TF3'の順を示すものが多く見られた。また、総ポリフェノール含量と溶媒抽出した総カテキン含量、総テアフラビン含量の相関を調べたところ、高い相関が得られた。

謝辞

本研究は、平成22年度東京聖栄大学共同研究費の助成を受けました。ここに謝意を表します。

文献

- 1) 佐藤満昭、斉藤由美編：紅茶の保健機能と文化、アイ・ケイ コーポレーション(2008)
- 2) 伊奈和夫、坂田完三、富田勲、伊勢村護編：茶の化学成分と機能、弘学出版(2002)
- 3) 松村敬一郎、小國伊太郎、伊勢村護、杉山公男、山本(前田)万里編：茶の機能 生体機能の新たな可能性、学会出版センター(2002)
- 4) 篠原和毅ら編集：食品機能研究法、光琳、318(2001)
- 5) 後藤哲久ら：市販緑茶の個別カテキン類とカフェインの分析、茶研報83、21~28(1996)
- 6) M. Nishimura, K. Ishiyama, A. Watanabe, S. Kawano, T. Miyase and M. Sano: *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7252-7257(2007)
- 7) 立山千草、本間伸夫、並木和子、内山武夫：食用

花卉に含まれるポリフェノール類含有量と抗酸化活性、日食工誌 44(4), 290~299 (1997)

8) 藤江歩巳、久保田真紀、梅村芳樹、大羽和子：新鮮ハーブのビタミンC、DPPH ラジカル補足活性、日本調理科学会誌 34(4), 380~389 (2001)

9) 寺田志保子、前田有美恵、増井俊夫、鈴木裕介、伊奈和夫：各種茶(緑茶、半発酵茶、紅茶)浸出液およびティードリンク中のカフェイン、カテキン組成、日食工誌 34(1), 20~27(1987)

10) Hilton, P. J. and Ellis, R. T., : Estimation of marker value of Central African tea by theaflavin analysis . *J. Sci. Food Agric.* , 23, 227-232 (1972)

11) 坂本彬、井上博之、中川致之：12 種類の紅茶の化学成分、日食工誌 59(7), 326~330(2012)