

香煎茶の糖または脂質消化酵素阻害成分(1) : ゲルろ過 クロマトグラフィーによる成分分離

芳野恭士 *1・坂間秀剛 *2・萩倉深月 *1・高須麗奈 *1・石川安美 *1

Inhibitory Components in Kosencha on Activities of Saccharide- or Lipid-Digestive Enzymes (1): Separation of Components by Gel Filtration Chromatography

YOSHINO Kyoji *1, SAKAMA Hidetake *2, HAGIKURA Mitsuki *1,
TAKASU Rena *1, ISHIKAWA Ami *1

Abstract: Kosencha is a secondary fabricated tea product which is made from green tea by a treatment with high temperature and high pressure. Kosencha has been reported to have a weight-reducing effect on obese patients and an improvement effect on cardiovascular function. To determine specific components contained in Kosencha, two fractions were fractionated by Size-Exclusion Chromatography. The resulting Fr. A and Fr. B had absorption at 280 nm and 460 nm, and were expected to include brown components with polyphenol structures. Fr. A of Kosencha, in particular, contained more brown components than that of green tea. Their estimated molecular weights were about 710 and 590, respectively, and the polymerization degrees of catechins were thought to be about 2.0 and 1.7. Fr. A and Fr. B of Kosencha contained catechin structures, but known tea catechin monomers and dimers, nor gallic acid were not detected. Fr. B might contain caffeine and flavonols, but Fr. A does not seem to contain these components. In addition, these fractions had the inhibitory effect on the activity of maltase, a sugar-digesting enzyme, and it was speculated that the contained polyphenol components contribute to this effect. Therefore, it is expected that the components contained in these fractions are partly responsible for the effect of slowing the absorption of sugar.

Key Words: Kosencha, Tea, Polyphenol, Gel filtration, Maltase

1. はじめに

香煎茶は、チャ (*Camellia sinensis* L.) の葉から作られる一次加工茶である緑茶を飽和水蒸気下で高温 (160~200°C)、高圧処理することで、カテキン類の没食子酸エステルの一部を分解して渋みを軽減するとともに、香ばしさを高め、飲み易さを向上させた二次加工茶である[1,2]。香煎茶には、肥満患者に対する瘦身効果と心血管機能の改善効果が報告されており[3]、その作用機序の一つとして、マルターゼ等の α -グルコシダーゼ活性阻害作用による糖吸収抑制作用が考えられる[2]。

香煎茶葉中の総ポリフェノール量は8.29%(w/w)で、原料緑茶中の量の約89%を保持している[2]。一方で、カテキンモノマーの総量は4.40%(w/w)と緑茶に比較して半減しているが、残存しているカテキンモノマーは、その糖吸収抑制作用に寄与しているものと考えられる[4]。残りの半分に当たるポリフェノール類の化学構造は不明であるが、同じ二次加工茶の一つで、緑茶を加熱処理することで製造されるほうじ茶ではカテキンのポリマーや分解物が含まれると考えられることから[5,6]、我々は香煎茶にも同様にカテキンのポリマーや分解物が含まれるものと予想している。

本研究では、カテキンよりも大きな分子量を持つポリフェノール画分をゲルろ過カラムクロマトグラフィー (SEC) により分取し、その化学構造の特性と糖消化酵素活性に対する阻害作用について検討した。

*1 物質工学科

Department of Chemistry & Biochemistry

*2 専攻科総合システム工学専攻

Advanced Course, Multidisciplinary Engineering
Course

2. 材料および方法

2. 1 茶のエキスの調製

サンダイヤ社製の香煎茶および原料のやぶきた緑茶のエキスは、それぞれの茶葉 8.0 g に熱水 1 L を加えて 10 分間抽出し、定性ろ紙 No.2 でろ過して得られたろ液を凍結乾燥させることで調製した。葉からの各エキスの収量は、25.5%および 17.8%であった。

2. 2 茶エキスの SEC による分離

SEC カラムとして TOSOH 社製 TSKgel G3000 SWXL カラム (7.8 x 300 mm) を、溶出溶媒として水を用い、カラム温度室温、流速 1.0 mL/分の条件で香煎茶および緑茶のエキスの分離を行った。成分の検出は、カテキンなどのポリフェノール等の成分について 280 nm の吸光度を、また、カテキンの酸化重合物のような褐色成分について 460 nm の吸光度を測定した。

2. 3 SEC による分子量の推定

分子量既知のポリフェノール類を 2. 2 の測定条件の SEC にかき、その保持時間と分子量の関係式を求めた。得られた関係式と、香煎茶エキスの画分 A および画分 B のピークの保持時間から、これらの画分に含まれる主要な成分の分子量を推定した。ポリフェノール類としては、(-)-エピガロカテキンガレート (EGCG: 分子量 458.37)、テアフラビン (TF: 分子量 564.5)、プロシアニジン B2 (PCB2: 分子量 578.5)、テアフラビン-3 ガレート (TF-3G: 分子量 716.6)、テアフラビン-3' ガレート (TF-3'G: 分子量 716.6)、テアフラビン-3,3' ジガレート (TF-3,3'DG: 分子量 868.7) の 6 種を用いた。

2. 4 茶葉既知成分の測定

香煎茶エキスの画分 A および画分 B に含まれる可能性のある成分について、以下の測定を行った。

フォーリン-チオカルト法[7]により、総ポリフェノール量を測定した。値は 3 回の測定の平均値±標準偏差とし、没食子酸エチル相当量で表記した。

220~600 nm における吸光スペクトルを測定し、含まれる成分の示す特異な吸収を確認した。

カテキン骨格に特有の励起波長 280 nm、ケイ光波長 310 nm 付近のケイ光スペクトルを測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法[8]を用いて、茶葉の既知のカテキン類およびそのダイマー、没食子酸、カフェインの測定を行った。

2. 5 ラット小腸マルターゼ活性阻害作用の測定

香煎茶エキスの画分 A および画分 B について、ラット小腸マルターゼ活性に対する阻害作用を、in vitro の系[9]を用いて測定した。

さらに、画分 A と画分 B について、固相抽出 (SPE) 法を用いて複数の画分に分画した。SPE は、Sep-pak Plus C18 ミニカラム (Waters 社製) を用いて次のように行った。SEC で得られた画分 A または画分 B の 20 mL をミニカラムに通し、カラムから溶出された画分を A-1、B-1 とした。次に 8 mL の水、5 mL の 20%(v/v)メタノール、5 mL の 40%(v/v)メタノール、5 mL のメタノールを順次通し、溶出されたそれぞれの画分を A-2~5、B-2~5 とした。これらの操作を 20 回繰り返し、得られたそれぞれの画分を適宜減圧濃縮して水溶液として、総ポリフェノール量の測定およびマルターゼ活性阻害作用の測定に用いた。

3. 結果および考察

3. 1 香煎茶および原料緑茶の SEC による分離

香煎茶と原料緑茶のエキスの SEC におけるクロマトグラムを、図 1 に示す。280 nm の吸収を測定した結果、約 8 分に小さなピークが、また、約 14.5 分に大きなピークが見られた。一方、460 nm の吸収では、約 9 分に大きなピークが、また、約 13 分に小さなピークがそれぞれ見られた。そこで、保持時間 4 分から 11.5 分の溶出液を回収したものを画分 A、保持時間 11.5 分から 20 分の溶出液を回収したものを画分 B として採取した。香煎茶と緑茶について、それぞれの画分のピーク面積を比較したものを図 2 に示す。どちらの波長においても、画分 A、画分 B ともに香煎茶の方が緑茶よりも量が多く、特に香煎茶における画分 B の量が緑茶に比較して多いことがわかった。従って、これらの画分には香煎茶加工により生成した特異成分が含まれているものと推測される。なお、1 回の分取において十分な分離が得られる茶エキスの量が約 0.1 mg と微量であったため、分取を 60 回行ったが画分 A および画分 B の収量は確認できなかった。

3. 2 香煎茶エキスの画分 A と画分 B の分子量

SEC における既知のポリフェノール類の保持時間と分子量の関係を図 3 に示す。これを用いて、香煎茶の画分 A と画分 B のピークの保持時間からそれぞれの推定分子量を求めたところ、画分 A は約 710、画分 B は約 590 となった。いずれの値も、茶のカテキンモノマーとしては最も大きい EGCG の分子量 458.37 よりも高いことから、カテキンの酸化ポリマーの可能性が考えられた。これらの画分

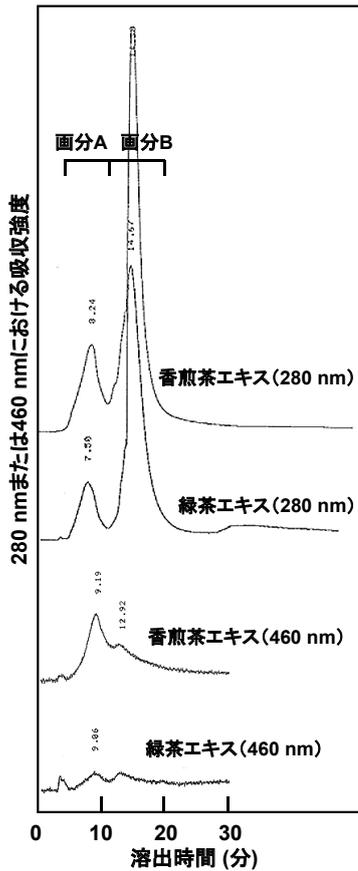


図1 香煎茶と緑茶のエキスのSECクロマトグラム

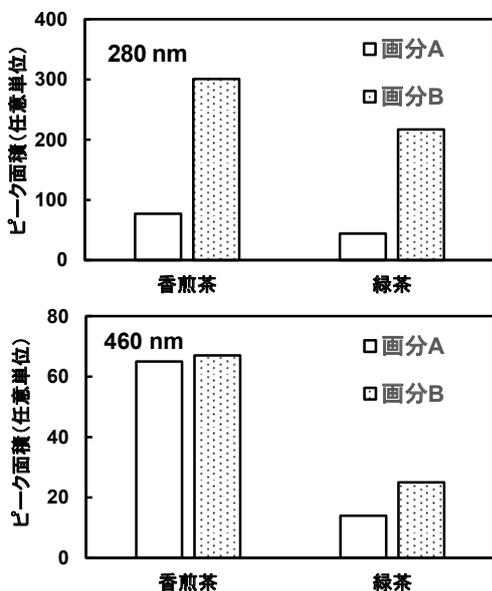


図2 香煎茶と緑茶のエキスから分取した画分Aと画分BのSECクロマトグラムのピーク面積

がカテキンのポリマーを含むと仮定した場合、緑茶から香煎茶を製造する際の代表的なカテキンモノマー4種とそのエピマー4種の減少量[2]から、減少した分のカテキンの平均分子量を353.2と算出すると、画分Aは重合度約2.0、

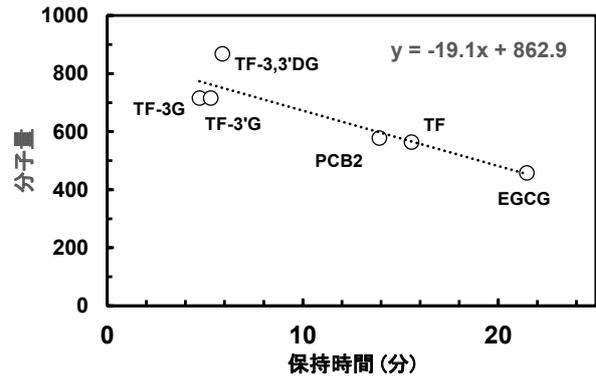


図3 ポリフェノール標品におけるSECの保持時間と分子量の関係

画分Bは重合度約1.7と推定される。

3. 3 香煎茶エキスの画分Aと画分B中の既知成分の確認

香煎茶エキスの画分Aと画分Bの総ポリフェノール量は、それぞれエキス重量の1.78±0.002%(w/w)と2.69±0.002%(w/w)であった。香煎茶エキス中の総ポリフェノール量は、エキス重量の38.4%(w/w)である[2]。その中で代表的な4種のカテキンモノマーは14.0%(w/w)、そのエピマーが5.6%(w/w)であるため、残りのポリフェノールは18.8%(w/w)となり、画分Aと画分B以外に14.3%(w/w)の不明のポリフェノールが含まれることになる。香煎茶加工により増加するポリフェノールとして知られているものに、カテキンの分解物である没食子酸があるが、その増加量は失われたカテキンモノマーの約2%であり、これはエキス重量の0.38%(w/w)にすぎない。従って、香煎茶加工で生成するポリフェノールとしては、カテキンからの他の分解物や酸化重合体などが予想される。

次に、香煎茶エキスとその画分Aおよび画分Bについて、220～600 nmの吸光スペクトルを測定した結果を図4に示す。香煎茶エキスでは、270～280 nmと350～360 nmに吸収ピークが見られた。これらの吸収は緑茶エキスにも見られるが、270～280 nmの吸収ピークは緑茶に比較して低く、350～360 nmの吸収ピークは同程度であった。270～280 nmの吸収ピークはポリフェノールやカフェインなどに由来し[10]、350～360 nmのピークはケルセチンなどのフラボノール配糖体などに由来するものと予想される[11]。香煎茶エキスの画分Bの吸光スペクトルはそのエキスのもので類似していたが、350～360 nmのピークがわずかに高かった。一方、画分Aでは350～360 nmにピークは見られず、270～280 nmのみにピークが見られた。

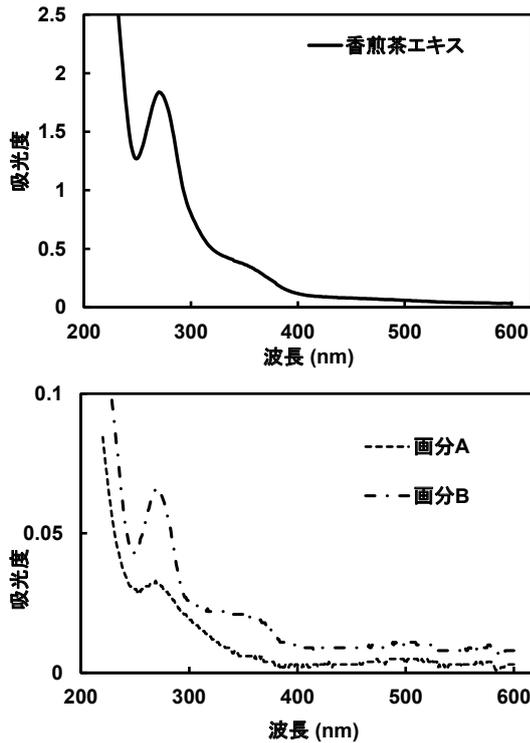


図 4 香煎茶エキスと画分 A、画分 B の吸光スペクトル

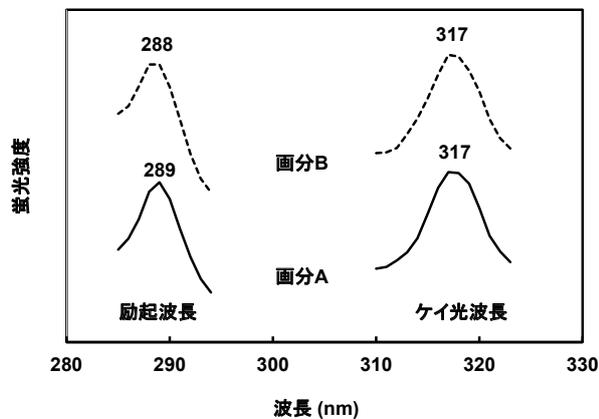


図 5 香煎茶エキスの画分 A、画分 B のケイ光スペクトル

(+) - カテキンのようなカテキンモノマーには励起波長 280 nm、ケイ光波長 310 nm のケイ光があることが知られている[12]。また、カテキンのポリマーであるプロシアニジン型オリゴマーにも、同様のケイ光が見られる[13]。そこで、香煎茶エキスの画分 A と画分 B のケイ光スペクトルを測定した結果を図 5 に示す。いずれにおいても、カテキンと同様に励起波長 288~289 nm、ケイ光波長 317 nm のケイ光が認められ、画分 A と画分 B のポリフェノール成分にはカテキン骨格を保持した化学構造が含まれることが推測された。

香煎茶エキスの画分 A と画分 B について、既知の茶成

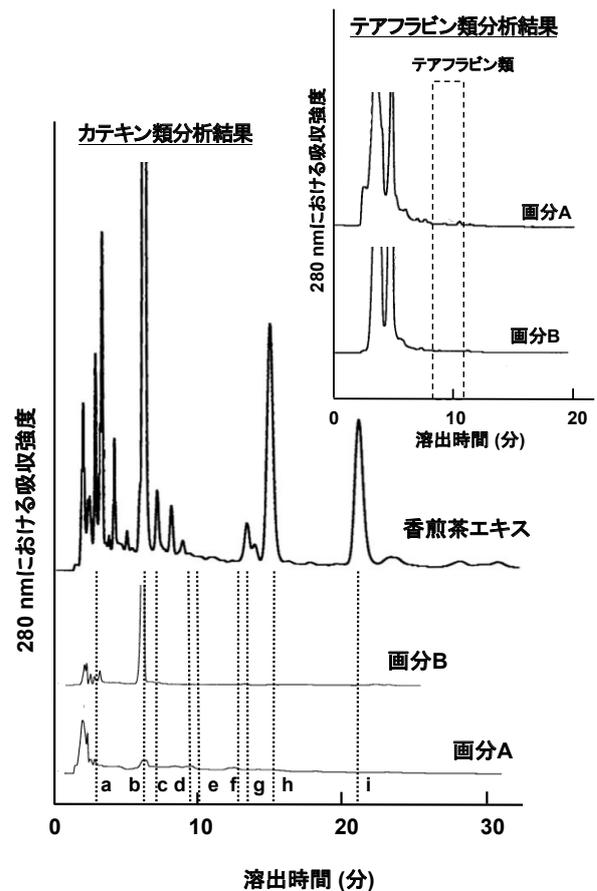


図 6 香煎茶エキスと画分 A、画分 B の HPLC クロマトグラム

成分標品の溶出位置 : a, 没食子酸 ; b, カフェイン ; c, (-)エピガロカテキン ; d, PCB2 ; e, テアシネンシン A ; f, テアシネンシン D ; g, (-)エピカテキン ; h, EGCG ; i, (-)エピカテキンガレート。

分の含有の有無を HPLC 法で確認した。まず、通常の茶カテキンモノマーを分析する条件での測定結果を、香煎茶エキスとともに図 6 に示す。香煎茶エキスでは緑茶エキスに含まれるものと同様の成分として、4 種のカテキンモノマーと没食子酸、カフェインが検出された。カテキンのダイマーである PCB2、テアシネンシン A、テアシネンシン D は検出されなかった。一方、画分 A と画分 B では、これらの成分のうちカフェインのみが検出され、特に画分 B にはエキス中のカフェインの約 57.4%(w/w)が含まれていた。さらに、画分 A と画分 B には、発酵茶に見られるカテキンダイマーである TF、TF-3G、TF-3'G、TF-3,3'DG の 4 種のテアフラビンは検出されなかった。

以上のことから、香煎茶エキスの画分 A と画分 B には、茶葉に含まれる既知のカテキンモノマーおよびダイマーは含まれないものの、そのポリフェノール成分としてカテキンの骨格を残したポリマーが含まれる可能性が示唆さ

れた。

3. 4 香煎茶エキスの画分 A および画分 B のラット小腸マルターゼ活性阻害作用

香煎茶の画分 A および画分 B の総ポリフェノール濃度とマルターゼ活性阻害率の関係を図 7 に示す。用いた濃度範囲では、画分 A の方が画分 B よりもその作用が強い傾向が見られた。ただし、それぞれの関係式を外挿して求めた 50%阻害濃度の試算値は、画分 A で 136.6 $\mu\text{g/mL}$ 、画分 B で 128.6 $\mu\text{g/mL}$ と同程度であった。

香煎茶エキスの画分 A と画分 B から SPE 法により得られた画分の総ポリフェノール量を測定したところ、エキスの重量に対する収量は、A-1 で 3.5%(w/w)、A-2 で 1.2%(w/w)、A-3 で 1.0%(w/w)、A-4 で 0.8%(w/w)、A-5 で 0.3%(w/w)、B-1 で 5.2%(w/w)、B-2 で 1.4%(w/w)、B-3 で 2.1%(w/w)、B-4 で 2.9%(w/w)、B-5 で 0.9%(w/w) となった。この SPE 条件では、茶のカテキンモノマーは疎水性の 20%(v/v)メタノール溶出画分、すなわち A-3 や B-3 に相当する画分に溶出されるため[14]、カテキンモノマー以上の疎水性を持つと考えられる A-3~5 と B-3~5 の 6 つの画分の濃縮液を用いて、ラット小腸マルターゼ活性に対する阻害作用を測定した。図 8 に示すように、6 つの画分の溶液の総ポリフェノール濃度とマルターゼ活性阻害率との間の相関係数は $\gamma = 0.96$ であり、F 検定において正の有意な相関が認められたことから、これらの画分が示すマルターゼ活性阻害作用に関して、含有されるポリフェノール成分が寄与しているものと考えられた。

4. まとめ

香煎茶に含まれる特異成分を検索する目的で、緑茶よりも多く含まれる画分として 2 つの画分を、SEC で分画した。得られた画分 A と画分 B は、280 nm と 460 nm に吸収を持ち、ポリフェノール構造を持つ褐色の成分であると予想された。特に、画分 A は褐色が強く、また緑茶に比較して香煎茶に多く含まれていた。それぞれの推定分子量は約 710 と 590 であり、カテキンの重合度で考えると 2.0 および 1.7 程度であった。香煎茶の画分 A と画分 B についてその成分特性を検討したところ、それぞれカテキン骨格を含むが、既知の茶カテキンモノマーおよびダイマー、さらには没食子酸は検出されなかった。このうち、画分 B にはカフェインやフラボノール類が含まれる可能性があったが、画分 A にはこれらは含まれていないものと考えられた。また、これらの画分には糖消化酵素であるマルターゼの活性を阻害する効果があり、含有するポリフェノール成分が

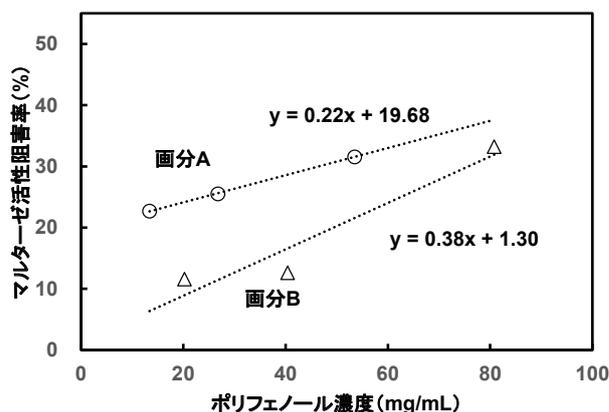


図 7 香煎茶エキスの画分 A および画分 B のラット小腸マルターゼ活性阻害作用

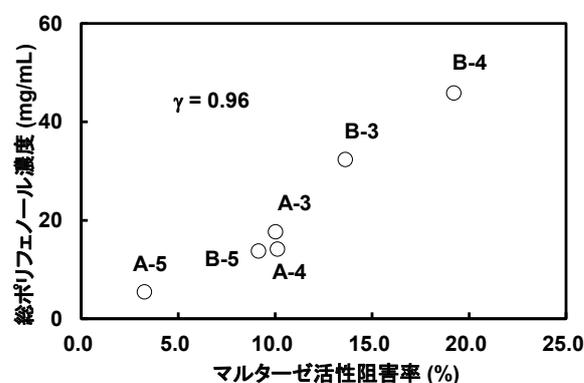


図 8 香煎茶エキスから SEC と SPE により得られた 6 画分のマルターゼ活性阻害作用

その作用に寄与しているものと推測された。従って、これらの画分に含まれる成分は、香煎茶の糖の吸収を穏やかにする効果の一部に関連しているものと考えられる。今後、画分 A や画分 B に含まれるポリフェノール成分の化学構造について、さらに検討する必要がある。

参考文献

- [1] 清水康夫 (2014): 交流, **53**, 20-21.
- [2] 芳野恭士, 清水康夫, 他 (2015): *New Food Industry*, **57**, 1-10.
- [3] Katanasaka, Y., Miyazaki, Y., et al. (2020): *Biol. Pharm. Bull.*, **43**, 675-681.
- [4] Honda, M., Hara, Y. (1993): *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 123-124.
- [5] Nakagawa, M. (1967): *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1283-1287.
- [6] 芳野恭士, 青木実苗, 他 (1995): 日本食品化学学会誌,

2, 9-13.

[7] Julkunen Tiittoo J. (1985) : *J. Agric. FoodChem.*, **33**, 213-217.

[8] 芳野恭士, 原 征彦 (1993): 沼津高専研究報告, **27**, 87-91.

[9] K. Yoshino, Y. Miyauchi, *et al.* (2009): *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1096-1104.

[10] 奥村寿子, 一谷正己, 他 (2007) : 日本食品化学学会誌, **14**, 128-133.

[11] Palma, M. S., Malaspin, O. (1999) : ミツバチ科学, **20**, 85-88.

[12] Carando, S., Teissedre, P.-L., *et al.* (1998) : *J. Chromatogr. B*, **707**, 195-201.

[13] Cho, D., Mattice W. L., *et al.* (1989) : *Polymer*, **30**, 1955-1958.

[14] 島田和子 (2003) : 日本家政学会誌, **54**, 957-962.