

香煎茶の糖または脂質消化酵素阻害成分(2) : 溶媒抽出と透析による成分分離

芳野恭士 *1・坂間秀剛 *2・後藤健太 *2・鈴木梓依菜 *1・
伊藤那都実 *1・水野幹大 *1

Inhibitory Components in Kosencha on Activities of Saccharide- or Lipid-Digestive Enzymes (2): Separation of Components by Solvent Extraction and Dialysis

YOSHINO Kyoji *1, SAKAMA Hidetake *2, GOTO Kenta *2, SUZUKI Shiena *1,
ITOH Natsumi *1, MIZUNO Mikihiro *1

Abstract: In this study, the components of Kosencha produced from Yabukita green tea were separated by solvent extraction and dialysis. The ethyl acetate extract and the n-butanol extract, which contain large amounts of flavanol-type polyphenols, showed strong inhibitory effects on maltase and lipase activities like green tea. Kosencha is considered to be an effective food material for preventing obesity as an easy-to-drink tea beverage with less astringency than green tea. The flavanol-type polyphenols contained in each fraction of Kosencha had estimated molecular weights up to the level of catechin dimers, suggesting that they would be polymers of catechins with partial decomposition of their structures.

Key Words: Kosencha, Tea, Maltase, Lipase, Polyphenol, Solvent extraction, Dialysis

1. はじめに

香煎茶は、一次加工茶の緑茶を飽和水蒸気下で高温、高圧処理することで製造される二次加工茶で、渋味が軽減され飲み易くした茶である[1]。香煎茶には肥満患者に対する痩身効果が認められており[2]、その作用機序の一つとしてマルターゼなどの α -グルコシダーゼやリパーゼの活性阻害作用による糖と脂質の吸収抑制作用[3-5]等が報告されている。香煎茶に含まれるカテキンは、その一部が重合または分解しているものと予想されるが[3,5]、その化学構造や効能等に関する情報は十分に得られていない。本研究では、香煎茶を極性の異なる数種の溶媒による段階抽出と透析によりいくつかの画分に分離し、それぞれの画分についてマルターゼおよびリパーゼの活性阻害作用を比較するとともに、その有効成分と予想されるポリフェノールおよびその主要成分と考えられるフラバノールの含量等の特

性について検討した。

2. 材料および方法

2. 1 茶の試料

サンダイヤ社製の香煎茶および原料のやぶきた緑茶を用いた。

2. 2 茶葉の溶媒抽出と透析による分離[6]

香煎茶または緑茶の葉 50 g に熱水 500 mL を加えて 10 分間抽出した後、定性ろ紙 No.2 でろ過して茶の浸出液を得た。この浸出液を、200 mL、100 mL、100 mL のクロロホルムで 3 回抽出した。残りの水層を 200 mL、100 mL、100 mL の酢酸エチルで 3 回抽出した。さらに残りの水層を凍結乾燥したものに水 40 mL を加え、40 mL、40 mL、40 mL の n-ブタノールで 3 回抽出した。残りの水層を凍結乾燥したものを 10 mL の水に溶解した後、500 mL の水を使って 24 時間の透析を 2 回行った。透析膜は、富士フィルム和光純薬社製のセルロース透析膜（排除分子量 12000-16000）を用いた。有機溶媒で抽出した液は、それぞれ合わせて溶媒を減圧留去した。透析内液と透析外液は、それぞれ凍結乾燥した。得られたそれぞれの画分について、

*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

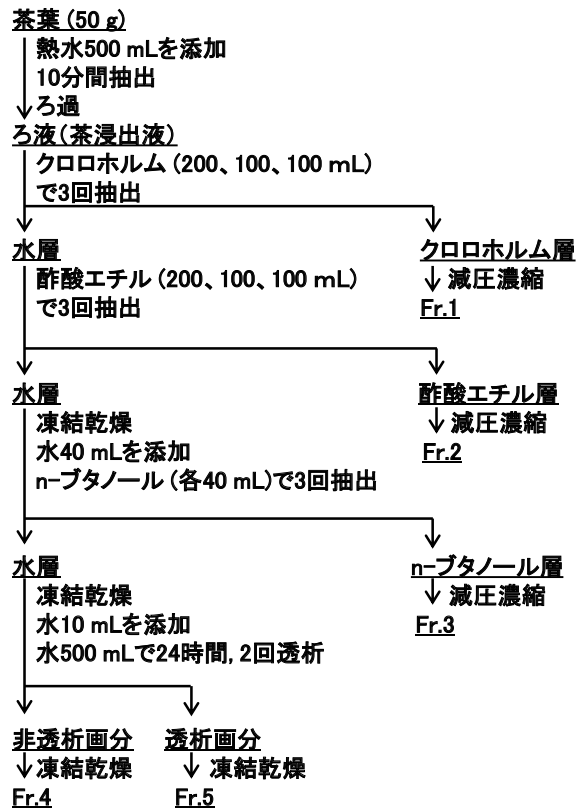


図 1 香煎茶と緑茶の溶媒抽出と透析による分画方法

クロロホルム画分を Fr. 1、酢酸エチル画分を Fr. 2、n-ブタノール画分を Fr. 3、透析内液（水溶性の高分子画分）を Fr. 4、透析外液（水溶性の低分子画分）を Fr. 5 と表記する（図 1）。

2. 3 in vitro でのマルターゼ活性阻害作用の測定

香煎茶および緑茶から調製した各画分について、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[7]を用いて測定した。各画分の最終濃度は、0.015%(w/v)を用いた。値は、3回の実験の平均値±標準偏差で示した。

2. 4 in vitro でのリパーゼ活性阻害作用の測定

香煎茶および緑茶から調製した各画分について、ブタ膵臓リパーゼ活性に対する阻害作用を、in vitro の系[4]を用いて測定した。各画分の最終濃度は、0.0154%(w/v)を用いた。値は、3回の実験の平均値±標準偏差で示した。

2. 5 ポリフェノール成分の定量

香煎茶および緑茶から調製した各画分について、フォーリン-チオカルトール法[8]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。また、バニリン-硫酸法[9]により総フラバ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、(+)-カテキン相当量で表記した。なお、それぞれの画分の値は、葉からの収量を勘案して、それぞれの分画に含まれる成分の量を葉に含まれる値に換算して示した。

3. 結果および考察

3. 1 香煎茶および緑茶から溶媒抽出と透析により得られた画分の収量

香煎茶および緑茶から溶媒抽出と透析により得られた各画分の収量を表 1 に示す。それぞれの分画に含まれる茶葉の成分としては、Fr. 1 のクロロホルム画分にはカフェイン等の疎水性成分が、Fr. 2 の酢酸エチル画分にはカテキンモノマーが、Fr. 3 の n-ブタノール画分にはフラボノール等のポリフェノールが、Fr. 4 の透析内液には水溶性高分子成分が、また、Fr. 5 の透析外液にはアスコルビン酸等の水溶性低分子成分がそれぞれ含まれるものと考えられる[6,10]。Fr. 4 については、紅茶から調製された同画分に抗プロモーション作用があることが報告されているが[11]、その成分は十分には解明されておらず、部分分解物等の分析から糖、カテキン骨格を持ったポリフェノール、フラボノール、没食子酸、キナ酸等を含む複雑な構造を持つタンニン複合体であると予想されている[12]。

香煎茶、緑茶ともに、Fr. 5 の収量が同程度に最も高かった。緑茶では、次いで Fr. 2~4 の収量が同程度に高かったのに対し、香煎茶では Fr. 3 で緑茶と同程度の収量が得られたほか Fr. 1、Fr. 2、Fr. 4 とともに緑茶に比較してその収量が低かった。

3. 2 香煎茶と緑茶から調製した各画分のマルターゼ活性阻害作用

香煎茶と緑茶のエキスのマルターゼ活性阻害作用における 50%阻害濃度は、香煎茶エキスで 135.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であるのに対し、緑茶エキスは 84.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、香煎茶の方が少し効果が弱い[3]。香煎茶と緑茶から調製した各画分のマルターゼ活性阻害率を比較した結果を図 2 に示す。香煎茶、緑茶ともに Fr. 2 と Fr. 3 で強いマルターゼ活性阻害

表 1 茶葉の溶媒抽出と透析により得られた画分の収量

画分	香煎茶	緑茶
Fr. 1	0.91	1.31
Fr. 2	1.31	3.17
Fr. 3	3.06	3.06
Fr. 4	0.88	2.84
Fr. 5	3.84	3.95

単位: % (w/w 葉).

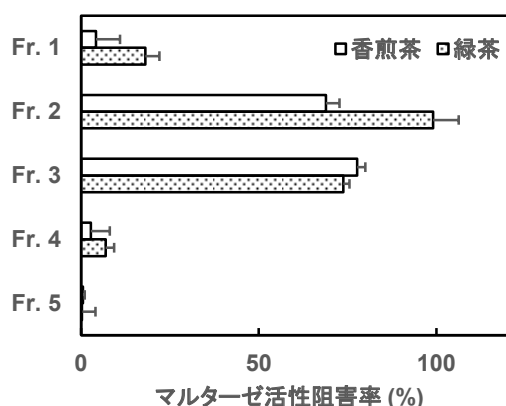


図2 香煎茶と緑茶から調製した各画分の in vitro におけるマルターゼ活性阻害作用

作用が見られた。このうち、香煎茶の Fr. 3 および緑茶の Fr. 2 と Fr. 3 はいずれも葉からの収量が約 3%(w/w) と多かったため、これらの画分に含まれる成分が主要な有効成分と考えられる。香煎茶の Fr. 2 も葉からの収量が 1.3%(w/w) であったことから、その作用の一部に寄与しているものと考えられる。香煎茶では Fr. 2 と Fr. 3 の作用はほぼ同じで、わずかに Fr. 3 の方が強かったのに対し、緑茶では Fr. 2 の作用の方が Fr. 3 よりも強かった。香煎茶の Fr. 2 の作用は緑茶の 70%程度であったが、Fr.3 の作用は緑茶よりもわずかに強かった。

3. 3 香煎茶と緑茶から調製した各画分のリパーゼ活性阻害作用

香煎茶と緑茶のエキスのリパーゼ活性阻害作用における 50%阻害濃度は、香煎茶エキスで 131.1 $\mu\text{g/mL}$ であるのに対し、緑茶エキスは 79.6 $\mu\text{g/mL}$ であり、マルターゼの場合と同様に香煎茶の方が少し効果が弱い[5]。香煎茶と緑茶から調製した各画分のリパーゼ活性阻害率を比較した結果を図3に示す。マルターゼ活性阻害作用の場合と同様に、香煎茶、緑茶ともに Fr. 2 と Fr. 3 で強いリパーゼ活性阻害作用が見られた。このうち、香煎茶の Fr. 3 および緑茶の Fr. 2 と Fr. 3 はいずれも葉からの収量が多かったため、これらの画分に含まれる成分が主要な有効成分と考えられる。香煎茶の Fr. 2 も、その作用の一部に寄与しているものと考えられる。また、香煎茶、緑茶ともに Fr. 2 より Fr. 3 の作用の方がわずかに強く、いずれの画分においても、香煎茶の方が緑茶よりわずかに作用が強かった。

3. 4 香煎茶と緑茶から調製した各画分中のポリフェノール含量

香煎茶と緑茶のエキス中の総ポリフェノール含量は、香

煎茶エキスで 38.4%(w/w)であるのに対し、緑茶エキスは 49.3%(w/w)であり、香煎茶の方が少ない[13]。香煎茶と緑茶から調製した各画分中の総ポリフェノール量を比較した結果を図4に示す。また、それぞれの画分中の総ポリフェノール量を、葉の重量に対する%(w/w)で算出したものを表2に示す。香煎茶では Fr. 3 の総ポリフェノール量が最も多く、次に Fr. 2 と Fr. 5 で多かった。緑茶では、Fr. 2 で最も多く、次に Fr. 3 で多かった。Fr. 2、Fr. 3 とともに、香煎茶より緑茶の含量が多かった。

緑茶に含まれるカテキン類は、フラバノール骨格を有す

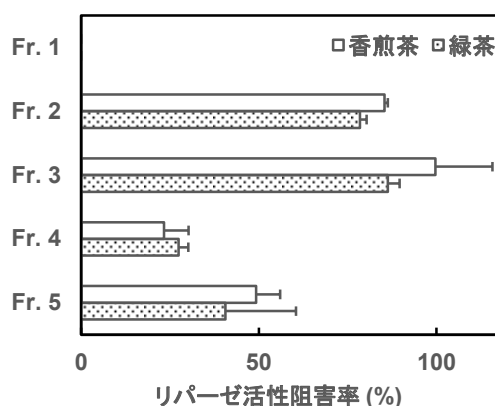


図3 香煎茶と緑茶から調製した各画分の in vitro におけるリパーゼ活性阻害作用

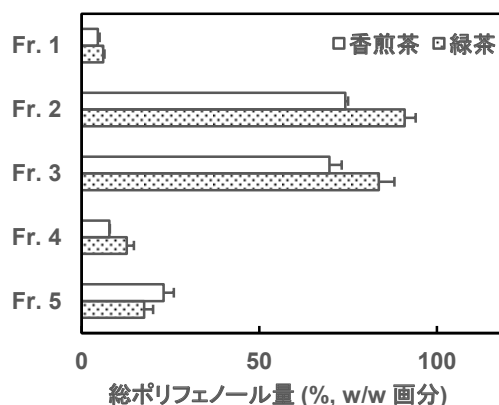


図4 香煎茶と緑茶から調製した各画分中の総ポリフェノール含量

表2 香煎茶と緑茶から調製した各画分中の葉重量に対する総ポリフェノール含量

画分	香煎茶	緑茶
Fr. 1	0.04 ± 0.91	0.08 ± 0.01
Fr. 2	0.97 ± 0.01	2.88 ± 0.10
Fr. 3	2.13 ± 0.11	2.56 ± 0.14
Fr. 4	0.07 ± 0.01	0.36 ± 0.06
Fr. 5	0.89 ± 0.11	0.70 ± 0.10

単位: %(w/w 葉).

る。そこで、香煎茶と緑茶から調製した各画分中の総フラバノール量を比較した結果を図 5 に示す。また、それぞれの画分中の総フラバノール量を、葉の重量に対する%(w/w)で算出したものを表 3 に示す。総ポリフェノールの場合と同様、香煎茶では Fr. 3 の総フラバノール量が最も多く、次に Fr. 2 で多かった。緑茶では、Fr. 2 で最も多く、次に Fr. 3 で多かった。Fr. 2、Fr. 3 とともに、香煎茶より緑茶の含量が多かった。図 4 と図 5 の値から、それぞれの総ポリフェノール量に占める総フラバノール量の割合を計算したものを表 4 に示す。

以上の結果から、香煎茶と緑茶の Fr. 2 と Fr. 3 に含まれるフラバノール骨格を有するポリフェノール類は、これらの画分が示すマルターゼ活性阻害作用やリパーゼ活性阻害作用に関与していることが予想された。緑茶に含まれる

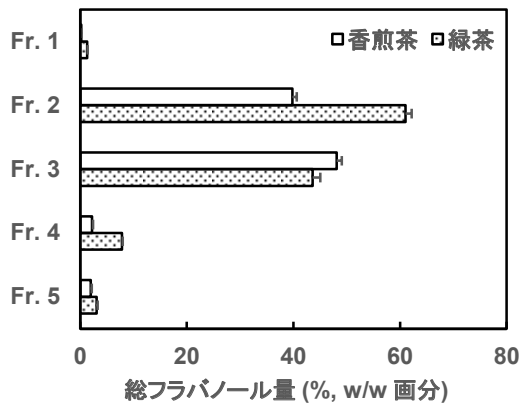


図 5 香煎茶と緑茶から調製した各画分中の総フラバノール含量

表 3 香煎茶と緑茶から調製した各画分中の葉重量に対する総フラバノール含量

画分	香煎茶	緑茶
Fr. 1	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Fr. 2	0.52 ± 0.01	1.93 ± 0.04
Fr. 3	1.47 ± 0.03	1.33 ± 0.04
Fr. 4	0.02 ± 0.01	0.22 ± 0.01
Fr. 5	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01

単位:%(w/w 葉).

表 4 香煎茶と緑茶から調製した各画分の総ポリフェノールに占める総フラバノールの割合

画分	香煎茶	緑茶
Fr. 1	4.5 ± 0.6	20.9 ± 1.0
Fr. 2	74.9 ± 1.7	76.6 ± 2.4
Fr. 3	77.9 ± 7.2	59.6 ± 5.7
Fr. 4	28.6 ± 3.0	37.4 ± 5.3
Fr. 5	6.8 ± 0.8	14.3 ± 2.2

単位:%(w/w). 値:(+)-カテキン相当量での比.

ポリフェノールはその 86.1%がカテキンモノマーである[3]。従って、これらカテキンモノマーは、Fr. 2 と Fr. 3 に分画されたものと考えられる。カテキン類は酢酸エチルでよく抽出されることから、Fr. 2 の含量が Fr. 3 に比較してわずかに多かった。これに対し、香煎茶では Fr. 2 のポリフェノール成分の減少が著しく、一方でより極性の高い Fr. 3 に多くのポリフェノール成分が移行しており、その成分はフラバノール骨格を持っていることがわかる。このことから、緑茶が香煎茶加工されるとカテキン類の一部がフラバノールの骨格を保持したままより極性の高い成分に変化するものと考えられ、それらもまた、元のカテキンと同様に糖や脂質の消化酵素の活性を阻害する効果を持つことがわかる。

ところで、フラバノール型のポリフェノール類では、同一の濃度の溶液についてフォーリン-デニス法[14]とバニリン-硫酸法による測定を行った際の吸光度の比である F/V 値が、その分子量と一定の関係を示すことが報告されている[15]。そこで、フォーリン-デニス法と同様の測定原理であるフォーリン-チオカルトール法とバニリン-硫酸法を用いて分子量既知の種々のフラバノール型ポリフェノールの F/V 値と分子量の関係性を求めた。フラバノール型ポリフェノール類として、(+)-カテキン (MW290)、(-)-エピガロカテキンガレート (MW458)、プロシアニジン B2 (MW578.5)、テアフラビン (MW564.49)、テアフラビン-3'-ガレート (MW716.6)、テアフラビン-3'-ジガレート (MW716.6)、テアフラビン-3,3'-ジガレート (MW 868.7)、シナムタンニン A2 (MW1160) の 8 種を用いた。これらの化合物の F/V 値と分子量の間には、図 6 に示すように一定の関係が見られたため、この関係式を用いて香煎茶と緑茶の各画分の成分の分子量を推定した結果を表 5 に示す。香煎茶の Fr. 1 と Fr. 5、緑茶の Fr. 1 で高い値となったが、これらの画分にはフラバノール型ポリフェノール類がほとんど含まれておらず、この方法での分子量の推定が困難であるためと考えられる。香煎茶と緑茶でフラバノール含量が高く、マルターゼ活性阻害作用やリパーゼ活性阻害作用が強かった Fr. 2 と Fr. 3 についてみると、緑茶の場合、Fr. 2 では代表的なカテキンである(-)-エピガロカテキンガレートの分子量である 458 よりわずかに高めであるものの、ほぼ近い推定値が得られた。緑茶の Fr. 3 では、Fr. 2 の 1.7 倍ほどの値となった。一方、香煎茶では Fr. 2、Fr. 3 とともにカテキンモノマーよりも高い分子量の推定値となり、それぞれ緑茶 Fr. 2 の 1.6 倍と 1.2 倍ほどの推定値となった。我々は、香煎茶のエキスからゲルろ過クロマトグラフィーにより 2 つの画分を分離し、それぞれの分子量をカテキンモノマーの 1.7~2 倍程度であると推定した[16]。

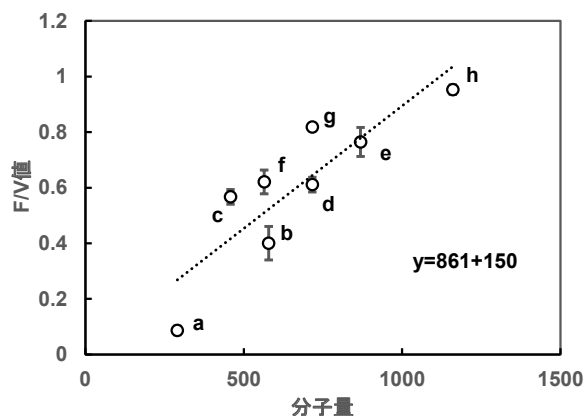


図6 8種のフラバノール型ポリフェノールのF/V値と分子量の関係

a, (+)-カテキン; b, (-)-エピガロカテキンガレート; c, プロシアニジン B2; d, テアフラビン; e, テアフラビン-3-ガレート; f, テアフラビン-3'-ガレート; g, テアフラビン-3,3'-ジガレート; h, シンナムタンニン A2.

表5 香煎茶と緑茶から調製した各画分のF/V値による推定分子量

画分	香煎茶	緑茶
Fr. 1	8645.1 ± 206.0	2140.7 ± 91.5
Fr. 2	801.1 ± 15.7	500.8 ± 21.1
Fr. 3	623.7 ± 11.7	832.4 ± 19.3
Fr. 4	777.9 ± 104.1	433.1 ± 21.4
Fr. 5	2373.7 ± 117.7	822.8 ± 35.2

これらの成分は、今回の実験では、その推定分子量から香煎茶のFr. 2に含まれる可能性があると考えられる。

香煎茶のFr. 2やFr. 3、あるいは緑茶のFr. 3には、まずはカテキンモノマーが含まれると考えられるが、分子量がカテキンモノマーより大きなものが多く含まれるものと予想され、それらもフォーリン-チオカルトール法に陽性であり、還元性のフェノール性水酸基を有することが考えられる[17]。また、バニリン-硫酸法にも陽性であり、フラバノール構造を有することが推測される。ただし、バニリン-硫酸法は、ベンゼン環に *m*-配位のジオールまたはトリオールの構造を持つ化合物が反応するとされており[18]、必ずしもフラバノール骨格を持っていなくても、ピロガロール、フロログルシノール、レゾルシノールなどは反応し、これらは図6の関係式にも合致した。フェノール、*m*-ヒドロキシ安息香酸、プロトカテキュ酸、ピロカテコール、没食子酸、タンニン酸といったバニリン-硫酸法での発色が弱いポリフェノール類は、図6の関係式には合致しなかった。バニリン-硫酸法に陽性の関連化合物としては、カテキンのテトラヒドロフラン環が開環することで生じ

る *m*-配向のトリオールを保持しているジヒドロカルコン類[19]、フラバノールのダイマーであるプロアントシアニジン、ポリマー内部のフラバノール[20,21]が知られている。以上のことから、香煎茶のFr. 2やFr. 3、あるいは緑茶のFr. 3に含まれると考えられる成分として、A環の2つの水酸基が残った状態でフラバン-3-オール骨格、あるいはフラバン-3-オール骨格が開環したジヒドロカルコンの構造といった化学構造を持つカテキンの重合物あるいは重合物の構造の一部が分解したものである可能性が考えられる。バニリン-硫酸法において擬陽性の原因となるものに、酸性下で赤色を呈するアントシアニンがあるが[19]、我々は藤かおり緑茶の香煎茶にシアニジン系アントシアニン様のpHによる色調の変化が見られず、この成分は含まれる可能性が低いことを確認している[22]。

4. まとめ

やぶきた緑茶から製造された香煎茶の成分を溶媒抽出と透析により分離したところ、緑茶と同様にフラバノール型のポリフェノール類が多く含まれる酢酸エチル抽出画分と *n*-ブタノール抽出画分に強いマルターゼ活性阻害作用とリパーゼ活性阻害作用が認められた。香煎茶は、緑茶に比較して渋みの少ない飲み易い茶飲料として、肥満の防止に有効な食品素材であるものと考えられる。香煎茶のそれぞれの画分に含まれるフラバノール型ポリフェノール類は、カテキンダイマー程度までの推定分子量を示したことから、カテキンの重合物あるいはその構造の一部が分解したものであると推測される。今後、香煎茶に含まれる糖や脂質の消化酵素活性阻害成分の化学構造について、詳細に検討する必要がある。

参考文献

- [1] 鳴鳴茂治, 他 (2013): 特許出願 2012 17176, 特許公開 2013 34469.
- [2] Katanasaka, Y., Miyazaki, Y., *et al.* (2020): *Biol. Pharm. Bull.*, **43**, 675-681.
- [3] 芳野恭士, 清水康夫, 他 (2015): *New Food Industry*, **57**, 1-10.
- [4] 芳野恭士, 後藤健太, 他 (2022): 沼津高専研究報告, **56**, 25-28.
- [5] 芳野恭士, 真壁勇那, 他 (2022): *New Food Industry*, **64**, 441-446.
- [6] K. Yoshino, Nakamura, Y., *et al.* (1997): 沼津高専研究報告, **31**, 79-86.

- [7] K. Yoshino, Y. Miyauchi, *et al.* (2009) : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1096-1104.
- [8] Julkunen Tiitoo J. (1985) : *J. Agric. FoodChem.*, **33**, 213-217.
- [9] Swain, T., Hillis, W. E. (1959) : *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 63-68.
- [10] 芳野恭士 (2013) : *New Food Industry*, **55**, 18-28.
- [11] Nakamura, Y., Matsuda, *et al.* (1999) : *Plant Polyphenols 2*, ed. Gross, G. G., Hemingway, R. W., *et al.*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, pp.629-641.
- [12] 芳野恭士, 中村好志 (2009) : 沼津高専研究報告, **43**, 277-282.
- [13] 芳野恭士, 杉本奈央, 他 (2018) : 技術・教育研究論文誌, **25**, 37-45.
- [14] Folin, O., Denis, W. (1915) : *J. Biol. Chem*, **22**, 305-308.
- [15] Goldstein, J. L., Swain, T. (1963) : *Nature*, **198**, 587-588.
- [16] 芳野恭士, 坂間秀剛, 他 : 沼津高専研究報告, 投稿中.
- [17] Dressler, V. L., Machado, E. L., *et al.* (1995) : *Analyst*, **120**, 1185-1188.
- [18] Swain, T., Goldstein, J. L. (1964) : *Methods in Polyphenol Chemistry*, ed. Pridham, J. B., MacMillan, NY, pp.131-146.
- [19] Sarkar, S. K., Howarth, R. E. (1976) : *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 317-320.
- [20] McMurrough, I., McDowell, J. (1978) : *Anal. Biochem.*, **91**, 92-100.
- [21] Hagerman, A. E., Butler, L. G. (1994) : *Methods Enzymol.*, **234**, 429-437.
- [22] 芳野恭士, 吉崎 海, 他 (2022) : 沼津高専研究報告, **56**, 29-33.