

## ブレンド健康茶およびその原料茶葉における 抗酸化活性および糖質分解酵素阻害活性の評価

Evaluation of anti-oxidant and carbohydrate-hydrolyzing enzyme inhibitory activities  
of a blended health tea and constituent its tea leaves.

三上 奈々, 藤野 加奈子, 繁田 真弓, 加藤 元士, 人見 英里\*

Nana Mikami, Kanako Fujino, Mayumi Shigeta, Motoshi Kato and Eri Hitomi\*

In this study, we evaluated the anti-oxidant activity of a blended health tea and its 8 constituent tea leaves including rooibos tea (*Aspalathus linearis*), black soybean tea, brown rice tea, *Salacia reticulata*, Pu-erh tea, Tu-chung tea (*Eucommia ulmoides*, Oliv), dandelion tea and Snow-tea (*Thamnomia vermicularis* Ach.) by measuring ORAC and DPPH radical scavenging assay and total polyphenol content. Pu-erh tea showed the highest anti-oxidant activity among all of the tea leaves in all three evaluation methods. Dandelion tea, Tu-chung tea, rooibos tea and the blended health tea also showed anti-oxidant activities.

We also measured the inhibition activities of the carbohydrate-hydrolyzing enzymes,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase (maltase and sucrase) demonstrated by the blended health tea and its 8 constituent tea leaves in vitro. Pu-erh tea, *Salacia reticulata* and the blended health tea tended to inhibit maltase. On the other hand, no tea leaves inhibited  $\alpha$ -amylase or sucrase.

キーワード：健康茶、抗酸化活性、糖質分解酵素阻害活性

Keywords: health tea, anti-oxidant activity, carbohydrate-hydrolyzing enzyme inhibitory activity

### 諸言

近年、我が国では様々な生活習慣病の増加が問題となっており、その予防や改善のために生体調節に資する機能性成分を含む食品に注目が集まっている。中でも、古くからの飲用歴がある健康茶の人気は高く、数多くの健康茶が市販されている。本研究で用いたブレンド茶（商品名Hygieia tea）はルイボス茶をベースとし、黒豆、玄米、サラシア・レティキュラータ、プーアル茶、杜仲茶、タンポポ茶、雪茶の8種の茶葉からなるブレンド茶である。原料として用いられている茶は以下のような特徴を持つ。

ルイボス (*Aspalathus linearis*) 茶は南アフリカのセダルバーグ山脈の高地に生育するマメ科植物から作られた発酵茶であり、浸出液が美しい赤色を呈するのが特徴である。南アフリカでは、一般的な茶として日常的に飲用されている<sup>1)</sup>。

黒豆は、黒大豆とも呼ばれ、種皮にアントシアニ

ン系の色素を含む。正月の煮豆に用いられるものである。

玄米は、一般的には緑茶と炒った玄米を混ぜて玄米茶として飲用されているが、本研究の原料は、玄米のみを用いている。

サラシア・レティキュラータ (*Salacia reticulata*) は、インドやスリランカに生育するニシキギ科の樹木でアーユルヴェーダの天然薬用植物として伝統的に糖尿病の薬として使用されてきた。強い $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を有することが報告されている<sup>2)</sup>。

プーアル茶は、緑茶をコウジカビで発酵させて作られる中国茶の一種であり、黒茶に分類されている。古くから中国の西北辺境の遊牧民にとっては不可欠な茶として飲用されてきた<sup>3)</sup>。

杜仲茶は、中国四川省原産の落葉喬木トチュウ (*Eucommia ulmoides*, Oliv) の葉を焙煎して作られた

茶であり、含まれるゲニポシド酸により血圧降下作用があることが知られている<sup>4)</sup>。

タンポポ茶は、タンポポの根を焙煎して作られる茶である。コーヒーの代用品として用いられる。

雪茶 (*Thamnoia vermicularis*(Ach). Asahina) とは雲南省や四川省の高地に自生するムシゴケ科の地衣植物を乾燥させたもので、中国では古くから茶として飲用されるほか、中国の伝統療法として高血圧等の治療薬としても使用されてきたものである<sup>5)</sup>。

以上の原料には、ポリフェノールを中心とした様々な機能性成分を含むことが予想されるが、さまざまな成分を含むブレンド茶の機能性の評価はこれまで行われていない。

そこで本研究では、ブレンド茶およびその原料茶葉における抗酸化活性および糖質分解酵素阻害活性を調べ、これらの健康機能性を探索することを目的として研究を実施した。

## 実験方法

### 1. 試料および試料液

ブレンド健康茶として(株)Owl&Owls社より供与されたHygieia teaおよびその原料であるルイボス茶、杜仲茶、黒豆茶、玄米茶、プーアル茶、雪茶、タンポポ茶、サラシア・レティキュラータの計9種類を茶試料とした。試料液は、蒸留水1Lに茶試料3gを加えて10分間沸騰後、室温まで冷却し、総量が1Lになるよう水分蒸発量を蒸留水で補正した。なお、上記の浸出濃度は、Hygieia teaの調製方法を参考として、通常飲用に供することを想定した濃度として決定した。雪茶とタンポポ茶は浮遊物が生じたため、0.45 μmメンブレンフィルターでろ過した。調製した試料液は、分析に用いるまで-30℃で保存し、抗酸化活性の測定に用いた。また、この試料液の濃度を3mg/mLとして、2倍希釈したもの(1.5mg/mL)とともに酵素阻害活性の測定に用いた。

### 2. ORAC法による抗酸化活性の測定

ORAC法による抗酸化活性の測定は、沖ら<sup>6)</sup>およびAntioxidant Unit研究会<sup>7)</sup>の方法を一部改変して行った。96 wellマイクロプレートに検量線用Trolox標準液(6.25~100 μM)または試料液を20 μLずつ分注した。Trolox溶液および試料液の希釈およびBlankには75 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。各ウェルに94.4 nM Fluorescein sodium

salt溶液200 μLを加え10秒間振とう攪拌後、37℃で15分加温した。次いで、31.1 mM AAPH溶液75 μLを加えて10秒間振とう攪拌し、蛍光マイクロプレートリーダー(SYNERGY Mx、Bio Tek社)にてEx 485 nm、Em 520 nmの蛍光強度を2分間隔で90分間測定した。ORAC値は、Trolox標準液の蛍光強度の曲線下面積(AUC:Area Under the Curve)と非存在下におけるBlankの曲線下面積の差(net AUC)に対する抗酸化物質存在下でのnet AUCの相対値を求め、Trolox当量(μmol TE/100g)として算出した。

### 3. DPPHラジカル消去活性

DPPHラジカル消去活性は、Matsuoら<sup>8)</sup>の方法で行った。蒸留水で適宜希釈した試料溶液または検量線用の0(蒸留水)~1.0 mM Trolox標準液0.3 mLに、0.1M 酢酸緩衝液(pH 5.5) 0.3 mL、0.2 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)-エタノール溶液0.3 mLを加えて攪拌し、60分間遮光して室温で反応させ、517 nmの吸光度(紫外可視分光光度計UV-1800、島津製作所)を測定した。

DPPHラジカル消去活性は、ブランクの吸光度と各濃度の試料液添加時の吸光度の差から試料溶液1 mLあたりの517nmにおける吸光度の減少値を求め、Trolox当量(μmol TE/100g)として算出した。

### 4. 総ポリフェノール量の定量

総ポリフェノール量はFolin-Denis法にて定量し、没食子酸相当量(mg GAE/100g)として算出した。蒸留水で適宜希釈した試料溶液または検量線用の0(蒸留水)~50 μg/ml没食子酸標準液0.5 mLに、2倍希釈したFolin試薬0.5 mLを加えて攪拌し、3分間放置した。10%(w/w)炭酸ナトリウム溶液0.5 mLを加えて攪拌し、室温で1時間反応後760 nmの吸光度(紫外可視分光光度計UV-1800、島津製作所)を測定した。

### 5. 糖質分解酵素阻害活性の測定

#### (1) 粗酵素液の抽出

ラット腸管アセトン粉末1gを量りとり、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0) 20 mLを加え、10分間、氷中で超音波装置処理した。その後、12,000 rpm、20分、4℃で遠心分離し、得られた上清を粗酵素液としてマルターゼ・スクラーゼ阻害活性測定に用いた。

(2)  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性

測定は齋藤ら<sup>9)</sup>の方法を改変して行った。すなわち、基質として0.5% (w/w) デンプン-0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.7) 625 $\mu$ L、0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.7) 50  $\mu$ L、1% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液 125  $\mu$ Lを1.5 mLマイクロチューブに入れ、これに阻害剤として各抽出液 50  $\mu$ Lを加えて混合した。

37°Cで10分間加温した後、30  $\mu$ g/mL  $\alpha$ -アミラーゼ水溶液 50  $\mu$ Lを加えて混合し、37°Cで20分間反応させた。その後、2 mol/L水酸化ナトリウム水溶液 125  $\mu$ Lを加えて反応を停止させ、1% (w/v) 3,5-ジニトロサリチル酸水溶液 125  $\mu$ Lを加えて混合し、沸騰水中で10分間加熱した。反応した溶液を190  $\mu$ Lずつマイクロプレートに分注し、マイクロプレートリーダーを用いて540 nmの吸光値から還元糖 (D-グルコース相当量) を測定した。また、個々の反応ごとにブランク (粗酵素液の代わりに、粗酵素液を95°Cで5分間加熱処理した加熱失活粗酵素液を添加) を置いた。

阻害率に関しては、検体 (抽出液を含まない) のグルコース相当値からブランクのグルコース相当値を減じた値をもとに、以下の式により阻害活性を算出した。

## (3) マルターゼ阻害活性

測定は出口ら<sup>10)</sup>の方法を改変して行った。すなわち、基質として2%マルトース溶液 150  $\mu$ L、阻害剤として各抽出液150  $\mu$ Lを1.5 mLマイクロチューブに入れ、混合した。37°Cで5分間プレインキュベートした後、上記の粗酵素液を5倍希釈したものを150  $\mu$ L 加え、混合した。37°Cで30分間反応させた後、95°Cで5分間煮沸し、反応を停止させた。5,000 rpm、室温で5分間遠心分離した上清 5  $\mu$ Lを1.5 mLマイクロチューブに分注し、グルコースCII-テストワコー (和光純薬株式会社) 発色試液を200  $\mu$ L加え、37°Cで5分間反応させた。発色した試液を190  $\mu$ Lずつマイクロプレートに分注し、マイクロプレートリーダーを用いて505 nmの吸光度を測定した。また、個々の反応ごとにブランク (粗酵素液の代わりに、粗酵素液を95°Cで5分間加熱処理した加熱失活粗酵素液を添加) を置いた。

阻害率に関しては、 $\alpha$ -アミラーゼの方法と同様に算出した。

## (4) スクララーゼ阻害活性

測定は出口ら<sup>10)</sup>の方法を改変して行った。すなわち、基質として2%スクロース溶液 150  $\mu$ L、阻害剤として各抽出液 150  $\mu$ Lを1.5 mLマイクロチューブに入れ、混合した。37°Cで5分間プレインキュベートした後、上記の粗酵素液を2倍希釈したものを150 $\mu$ L加え、混合した。37°Cで60分間反応させた後、95°Cで5分間煮沸し、反応を停止させた。5,000 rpm、室温で5分間遠心分離した上清 5  $\mu$ Lを1.5 mLマイクロチューブに分注し、グルコースCII-テストワコー (和光純薬株式会社) 発色試液を200  $\mu$ L加え、37°Cで5分間反応させた。発色した試液を190  $\mu$ Lずつマイクロプレートに分注し、マイクロプレートリーダーを用いて505 nmの吸光度を測定した。また、個々の反応ごとにブランク (粗酵素液の代わりに、粗酵素液を95°Cで5分間加熱処理した加熱失活粗酵素液を添加) を置いた。

阻害率に関しては、 $\alpha$ -アミラーゼの方法と同様に算出した。

## 結果及び考察

## 1. 各種茶試料液のORAC値

各種茶試料液のORAC値の測定結果を図1に示した。また、参考値としてUSDA (アメリカ合衆国農務省: United States Department of Agriculture) が公表している緑茶のORAC値<sup>11)</sup>を図1に併記した。今回試料に用いた茶試料中では、プーアル茶のORAC値が最も高く、次いでルイボス茶、杜仲茶、Hygieia teaのORAC値が175  $\mu$ mol TE/100 g程度の類似の値を示した。サラシア・レティキュラータ、黒豆茶、玄米茶、雪茶のORAC値は40  $\mu$ mol TE/100 g以下であった。また、いずれの茶試料のORAC値も緑茶より低値であった。

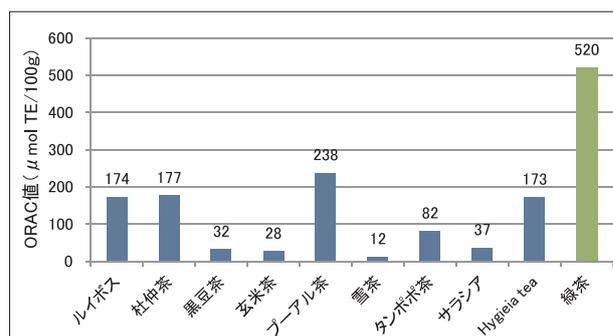


図1 各種茶試料液のORAC値

## 2. 各種茶試料液のDPPHラジカル消去活性

DPPHラジカル消去活性の測定結果を図2に示した。プーアル茶の値が最も高く、次いでタンポポ茶、杜仲茶、ルイボス茶、Hygieia teaの順に高かった。一方、黒豆茶、玄米茶、雪茶、サラシア・レティキュラータの値は8  $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ 以下であった。タンポポ茶を除いては、図1に示したORAC値とDPPHラジカル消去活性の高さが一致する傾向を示した。

## 3. 各種茶試料液の総ポリフェノール量

各種茶試料液の総ポリフェノール量の測定結果を図3に示した。

総ポリフェノール量はプーアル茶が最も多く、次いでHygieia tea、ルイボス茶、杜仲茶、タンポポ茶の順に多かった(図3)。サラシア・レティキュラータ、玄米茶、黒豆茶、雪茶試料液中の総ポリフェノール量は5 mg/100g以下と少量だった。

以上の結果より、プーアル茶の総ポリフェノール量が多かったのは、プーアル茶の原料が緑茶と同じツバキ科のチャノキの葉であることからカテキン類などを多く含んでいるためであると考えられ、

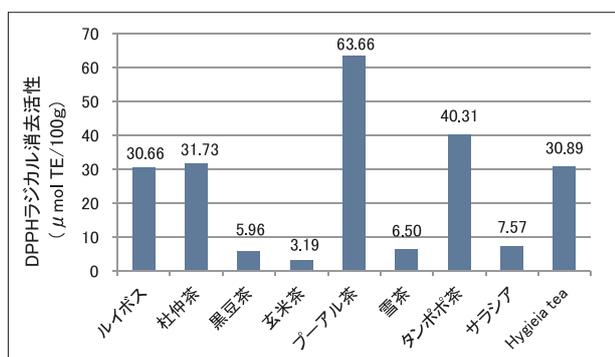


図2 各種茶試料液のDPPHラジカル消去活性

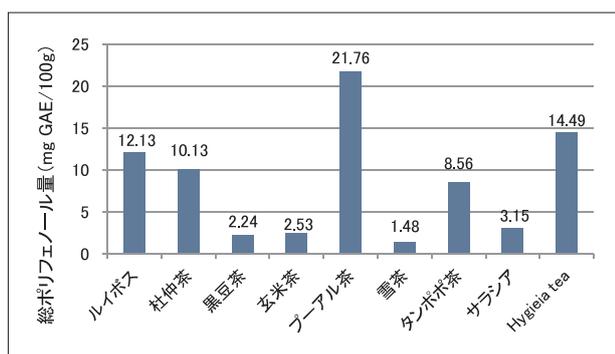


図3 各種茶試料液の総ポリフェノール量

ORAC値やDPPHラジカル消去活性にポリフェノールの含有量が寄与したものと考えられる。

プーアル茶を除くチャノキ以外の植物を原料とする茶試料(茶外茶)は、総ポリフェノール量が少なく抗酸化活性が低い傾向がみられたが、ルイボス茶はケルセチンなどフラボノイド類<sup>1,12)</sup>を、杜仲茶はルテオニンやケルセチンなどを含む<sup>4)</sup>ことが報告されており、これらの成分の存在により他の茶外茶よりも比較的高い値を示したと考えられる。

また、ブレンド茶(Hygieia tea)の総ポリフェノール量および抗酸化活性がルイボス茶と同程度であったのは、ルイボス茶の配合比率が他の茶に比べて高いことによるものと考えられる。

これら茶の抗酸化活性は、緑茶には劣るものの、ポリフェノール等の抗酸化物質を摂取する給源としてルイボス茶、杜仲茶、プーアル茶及びブレンド茶(Hygieia tea)は有効であると考えられた。

## 4. 各種茶試料液の糖質分解酵素阻害活性

Hygieia teaおよび8種類の茶葉抽出液の $\alpha$ -アミラーゼ、マルターゼ、スクラーゼに対する阻害率の測定結果を図4~6に示した(茶葉の浸出に用いた蒸留水(0 mg/mL)を阻害率0%として比較した)。

### (1) $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性

$\alpha$ -アミラーゼに関しては、プーアル茶で3 mg/mLの濃度における阻害率が19.1%であった以外、ブレンド茶(Hygieia tea)をはじめとするほとんどの茶葉において阻害が見られなかった。

### (2) マルターゼ阻害活性

マルターゼの阻害率に関しては、ブレンド茶(Hygieia tea)の1.5 mg/mLの濃度で21.6%、3 mg/mLの濃度で29.3%であった。また、プーアル茶やサラシア・レティキュラータにおいては3 mg/mLの濃度でそれぞれ38.5%、45.2%であった。それ以外の茶葉については、3 mg/mLにおいても弱い阻害が見られたのみであった。

### (3) スクラーゼ阻害活性

スクラーゼの阻害率に関しては、ブレンド茶(Hygieia tea) 1.5 mg/mLの濃度では見られなかったが、3 mg/mLの濃度では12.4%であった。8種の茶葉に関しては、ほとんどの茶葉で阻害が見られなかったのに対し、サラシア・レティキュラータは1.5

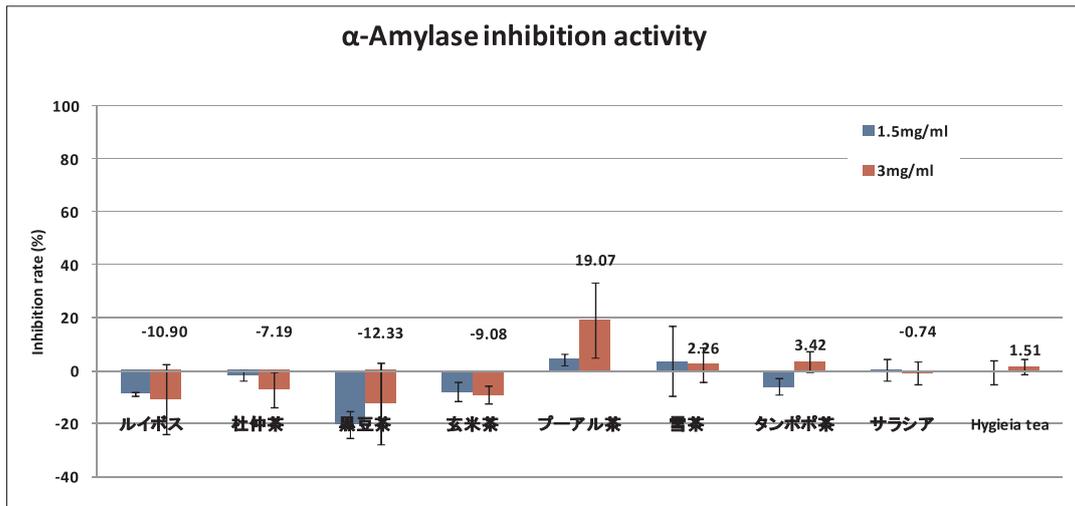


図4 各種茶試料液のα-アミラーゼ阻害活性

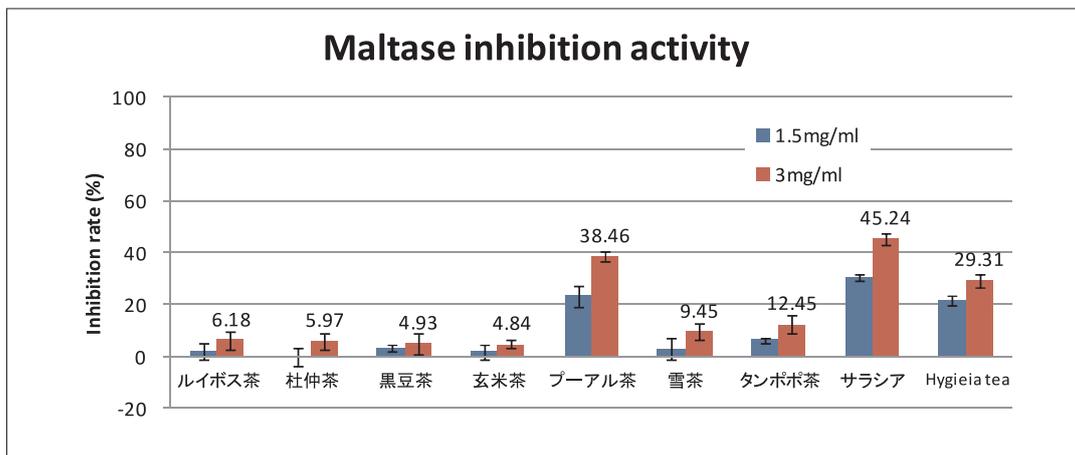


図5 各種茶試料液のマルターゼ阻害活性

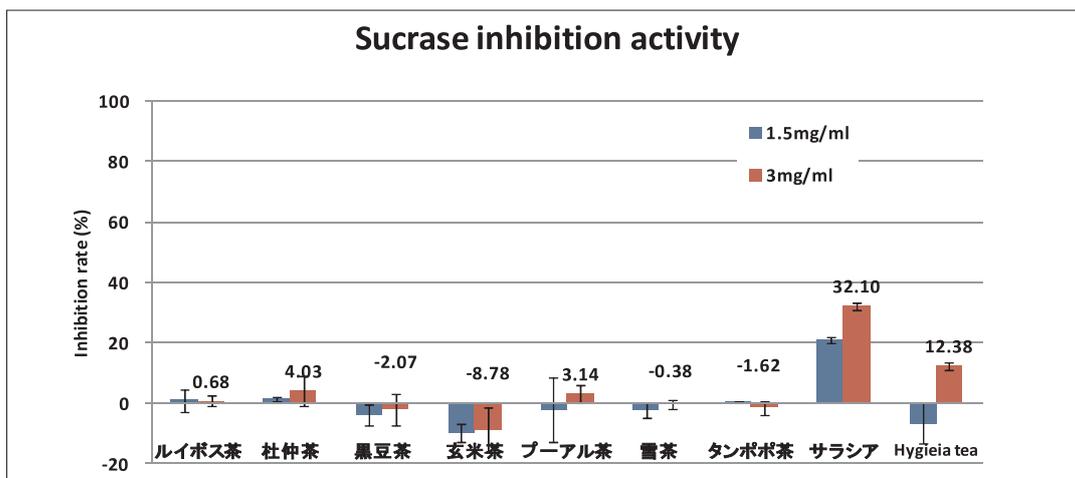


図6 各種茶試料液のスクラーゼ阻害活性

mg/mLでは20.7%、3 mg/mLでは32.1%と他の茶葉に比べ高かった。

#### (4) 考察

ブレンド茶（商品名Hygieia tea）およびそれに含まれる8種の茶葉における $\alpha$ -アミラーゼ、マルターゼ、スクラーゼに対する阻害作用について検討した。

ブレンド茶の阻害効果に関しては、マルターゼに対する作用が3種の酵素の中で最も強いものであった。また、8種のどの茶葉においても同様の傾向がみられたため、これらの茶葉に含まれる成分はマルターゼに対して阻害活性を示しやすいと推察された。

サラシア・レティキュラータではマルターゼやスクラーゼに対し、他の茶葉と比較すると高い阻害活性がみられた。サラシア・レティキュラータ (*Salacia reticulata*) に関しては、salacinolやkotalanolをはじめとする様々な成分が小腸でのマルターゼやスクラーゼを阻害することが知られている<sup>13)</sup>。本研究で用いたサラシア・レティキュラータの抽出液は、日常的に飲用することを想定した濃度であるために低濃度であるが、少なからず上記のような成分も含まれていたため、阻害効果が見られたと考えられる。

総合的に考えると、ブレンド茶に関しては配合比の約8割がルイボス茶である（販売会社からの私信による）ことから、ルイボスとほぼ同等の阻害率を示すことが予想されたが、3 mg/mLの抽出液ではどの酵素においてもブレンド茶の方が高い阻害率を示した。その理由としては、サラシア・レティキュラータやプーアル茶など8種類の中でも作用の強かった茶葉が含まれていることや、単独の茶葉では阻害作用がみられない成分であっても茶葉をブレンドすることによって複数の成分による相加的あるいは相乗的な作用が発揮された可能性が考えられる。

しかし、ブレンド茶で最も高い阻害率を示したマルターゼに対しても、3 mg/mLの濃度で29.3%であり、通常、糖質分解酵素阻害活性の強さの指標となるIC<sub>50</sub>値（50%阻害するために必要な試料の濃度）の算出ができなかった。

これらのことより、本研究で用いたブレンド茶は、通常飲用に供する濃度では、特定保健用食品（トクホ）として販売されている糖質分解酵素阻害活性を持つような食品<sup>10)</sup>と比較すると、その効果は弱いものであることが明らかになった。しかし、健康茶

は日常的な飲料として子供から高齢者までが1日に複数回飲用することも想定され、明らかな糖類分解酵素阻害活性を示さないことは、誰もが安心して飲用できることにもつながると考えられる。

#### 要約

健康茶として市販されているブレンド茶（商品名Hygieia tea）およびその原料であるルイボス茶、黒豆、玄米、サラシア・レティキュラータ、プーアル茶、杜仲茶、タンポポ茶、雪茶を用いて、通常飲用に供する濃度で浸出を行い抗酸化活性及び糖質分解酵素阻害活性を評価した。抗酸化活性はORAC法、DPPHラジカル消去法、及び総ポリフェノール量から評価した。また、糖質分解酵素阻害活性はラット腸管アセトン粉末から抽出した粗酵素液を用いて、 $\alpha$ -アミラーゼ、マルターゼ、スクラーゼ阻害活性を評価した。その結果、抗酸化活性では、いずれの指標においてもプーアル茶の値が最も高く、茶外茶であるタンポポ茶、杜仲茶、ルイボス茶、ブレンド茶も抗酸化活性を示した。一方、糖質分解酵素阻害活性については、マルターゼについてプーアル茶、サラシア・レティキュラータ、ブレンド茶が弱い阻害作用を示したが、 $\alpha$ -アミラーゼ、スクラーゼについては、いずれの茶でも、ほとんど阻害作用は認められなかった。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、Hygieia teaおよびその原料茶葉をご提供いただきました（株）Owl&Owls社に感謝申し上げます。また、研究の実施のためにご協力いただきました山口県立大学看護栄養学部栄養学科学生、佐藤あゆみさんと若林舞さんに感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 人見英里、田村聡美、鶴本祐子、津田孝範、中野昌俊：ルイボス茶 (*Aspalathus linearis*) の抗酸化性、日本食品科学工学会誌、46 (12)、779-785 (1999)。
- 2) 下田博司、川守秀輔、河原有三：スリランカ有用植物サラシア・レティキュラータ (*Salacia reticulata*) 水抽出物のラットおよびヒトの食後過血糖に及ぼす作用、日本栄養・食糧学会誌、51 (5)、279-287 (1998)。

- 3) 郭 雯飛、呂 毅、駱 少君、坂田完三：黒茶－微生物発酵を取り入れた茶、日本食品科学工学会誌、51 (7)、323-331 (2004).
- 4) 角橋明美、神田知子、安藤真美、桑守正範、人見英里：杜仲茶の抗酸化性、山口県立大学大学院論集、第9号、113-119 (2008).
- 5) 川原信夫、安食菜穂子、合田幸広：各種雪茶製品の含有成分並びにHPLCプロファイル分析に関する研究、日本食品化学学会誌、14 (2)、63-69 (2007).
- 6) 沖智之、竹林純、山崎光司：食品機能性評価マニュアル集 第Ⅱ集. (社) 日本食品科学工学会、pp.79-86 (2008).
- 7) Antioxidant Unit研究会ホームページ、抗酸化力の分析法 ORAC (<http://www.antioxidant-unit.com/analysis/orac/index.htm>) 平成23年2月3日ダウンロード
- 8) M. Matsuo : Antioxidant Activity of Hydrophilic Compounds of Defatted Soybean Fermented with *Neurospora intermedia* (D-Ontjom). *Food Sci. Technol. Res.*, 8 (3), 235-238 (2002).
- 9) 齋藤優介、西 繁典、小疇 浩、弘中和憲、小嶋道之：豆類ポリフェノールの抗酸化活性ならびに $\alpha$ -アミラーゼおよび $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性、日本食品科学工学会誌、54 (12)、563-567 (2007).
- 10) 出口ヨリ子、長田邦子、内田和美、木村広子、芳川雅樹、工藤辰幸、保井久子、綿貫雅章：グアバ葉熱水抽出物のdb/dbマウスにおける抗糖尿病効果およびヒト飲用試験による食後血糖値上昇抑制効果、日本農芸化学会誌、72(8)、923-931、(1998).
- 11) USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2, p.36 (2010).
- 12) 梶本五郎、村上智嘉子：各種市販茶の抗酸化性とそれらの成分、日本栄養・食糧学会誌、52 (4)、209-218 (1999).
- 13) H. Matsuda, M. Yoshikawa., T. Morikawa., G. Tanabe., and O. Muraoka. Antidiabetogenic constituents from *Salacia* species. *J. Trad. Med.* 22 (Suppl.1), 145-153 (2005).

