

調査報告

市販茶系飲料の示すフリーラジカル消去活性

中川 一夫, 仲村 明子, 松永 博絵

Free radical scavenging activities of tea drinks on the market

Kazuo Nakagawa, Akiko Nakamura and Hiroe Matsunaga

Tea drinks, prepared from the tea plant classified as *Camellia sinensis*, contain antioxidative phenolic compounds, like catechins and flavonols. We evaluated the free radical scavenging activities of tea drinks on the market by measuring luminol-amplified chemiluminescence stimulated by the free radical initiator 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, and the absorption of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation at 734 nm. Black tea drinks and green tea drinks mostly showed high free radical scavenging activities in either assay, followed in order by oolong tea drinks and blend tea drinks that contain extracts from plants other than the tea plant. Total phenol contents in tea drinks highly correlated with their free radical scavenging activities, indicating polyphenols in tea drinks are the major components contributing to the free radical scavenging activities of tea drinks.

I. はじめに

全国清涼飲料工業会の統計資料¹⁾によると、非アルコール系飲料である清涼飲料のなかで茶系飲料の2001年における生産量は482万8千キロリットルと最も多く、酒類や牛乳・乳飲料を除く飲料に占めるシェアは30.4%になっている(図1)。最近数年間の生産量増加率も大きく、2001年における清涼飲料全体の生産量は1997年の113.6%であるのに対して、茶系飲料の生産量は124.6%になっている。その要因として、茶(茶樹 *Camellia sinensis* の葉を原料とする飲料)を利用する歴史が長いうえで、自動販売機の普及やコンビニエンスストアの増加で手軽にのめる飲料となったこと、後口が良いこと、健康に良いと思われていることなど様々な理由が考えられる。

茶樹からつくられる茶の製法は、茶樹の品種や産地、伝播経路、民族的背景の違いなどにより多種多様に分化しているが、茶はふつう不発酵茶(煎茶や玉露などの緑茶)、半発酵茶(ウーロン茶など)、発

酵茶(紅茶)、および後発酵茶(黒茶など)に大別される。1981年に缶入りウーロン茶が発売されて以来多くのメーカーから各種容器入りの茶飲料が生産され、2001年ではその数は800種類以上に及んでいる。これは先に見た生産量の推移と同様に、消費者の期待する利便性や健康志向に合致する飲料として受け入れられていることを示す数値であろう。

茶葉に含まれる成分のうちカフェインの中枢神経興奮作用はよく知られているところであるが、最近ではカテキン類の示す様々な生体機能に対する作用が注目されている。カテキン類の生体作用としては、抗酸化作用、抗腫瘍作用、抗菌作用、血糖上昇抑制作用など多くの生理機能への影響が報告されている²⁻⁵⁾。しかし茶の生体機能成分およびその含有量は茶の種類によって大きく異なる。

本報告ではカテキン類の抗酸化性、特にフリーラジカル消去作用に着目して市販茶飲料を評価することを目的とした。茶飲料は緑茶飲料、紅茶飲料、ウーロン茶飲料、および茶葉以外の植物も原料として製造される茶飲料(ブレンド茶飲料)に分けて検討し、容器の種類は特に考慮していない。結果として相対的には緑茶や紅茶のラジカル消去作用は強く、ウー

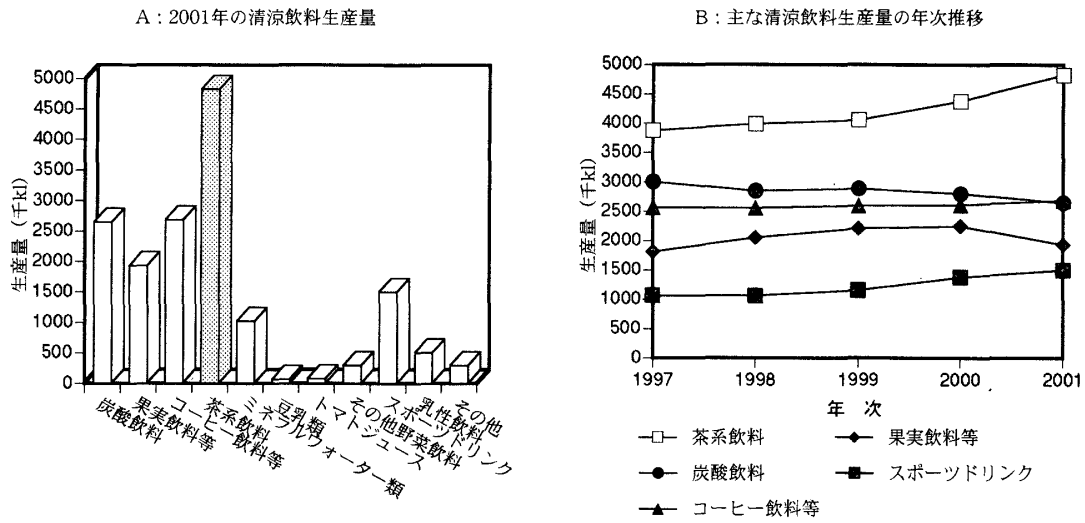


図1 清涼飲料の生産量とその年次推移

Aは2001年における各種清涼飲料の生産量を示す。Bは1997～2001年における主要な清涼飲料の生産量の推移を示す。(社団法人全国清涼飲料工業会編：清涼飲料関係統計資料から作成)

ロン茶の作用強度は両者に次ぎ、ブレンド茶のフリーラジカル消去作用は弱かった。また、茶飲料のフリーラジカル消去作用の強度には、ポリフェノール含量が大きく寄与することが判明した。

II. 実験方法

1. 試薬

ルミノール、2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) および2,2'-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS) は和光純薬工業(大阪)から購入し、Folin-Ciocalteu (FC) 試薬と 3-cyclohexylaminopropane sulfonic acid (CAPS) はナカライテスク(京都)から購入した。その他の試薬は特級試薬を用いた。検体の茶系飲料は京都市内の不特定の販売店で購入した。

2. 化学発光法によるフリーラジカル消去活性の測定法

ルミノールはアルカリ性溶液中で活性酸素種により過酸化中間体を形成するが窒素を放出して分解し、励起状態を経てアミノフタル酸になるとともに強く発光する。我々はすでにAAPHをラジカル発生剤として用いてルミノール発光を測定し、フラボノイド類のラジカル消去活性を測定する方法を報告している⁶⁾。今回はこの方法により茶系飲料の希釈液を検体に用いてラジカル消去活性を測定した。反応液(600 μ l)は0.1M CAPS 緩衝液(pH10.0)、50mM ルミノール液、10mM AAPH液、および検体(30 μ l)から成る。化学発光の測定にはBerthold社製Lumat LB 9507を用い、ルミノール液とAAPH液は自

動注入した。反応開始15分後に発光量を10秒間自動計測した。没食子酸をポリフェノール化合物の標準品に用いて発光抑制率に関する検量線を作成し、茶系飲料のラジカル消去活性を没食子酸量に換算した没食子酸等価濃度(GEC)として表した。なお、没食子酸が発光量を50%抑制する濃度(IC₅₀)は約1.5 μ Mであった。茶系飲料は、発光抑制率がおよそ20～80%の範囲に入るように蒸留水で希釈して用いた。

3. ABTS ラジカルカチオンを用いたフリーラジカル消去活性の測定法

ABTS ラジカルカチオンは734nmに吸収を示す比較的安定なラジカルであるので、吸光度法⁷⁾により検体のラジカル消去活性を測定した。測定前日に7mM ABTS水溶液(5ml)と14.7mM potassium persulfate(1ml)を混和し、測定直前に蒸留水で希釈して用いた。このABTS水溶液2mlに検体20 μ lを混ぜ、5分後に吸光度を測定した。化学発光法と同様に没食子酸を標準物質に用いて検量線を作成し、茶系飲料のフリーラジカル消去活性を没食子酸等価濃度(GEC)で表した。なお、この方法による没食子酸のIC₅₀値は約5 μ Mであった。

4. ポリフェノール量の測定法

茶系飲料に含まれるポリフェノール量は、Singleton V.L.らの方法⁸⁾を改変したKondo Y.らの方法⁹⁾により測定した。検体1mlにFC試薬を5ml加えてよく混和し、50 $^{\circ}$ Cで5分間保温した。冷却後4mlの10%Na₂CO₃液を加え、時々混ぜながら1時間放置した後、吸光度を765nmで測定した。没食子酸を標

表 1 茶系飲料のポリフェノール量とフリーラジカル消去活性

茶系飲料製品	ポリフェノール量 GEC (mM ± SD)	フリーラジカル消去活性		
		CL 法 GEC (mM ± SD)	ABTS 法 GEC (mM ± SD)	
緑茶飲料 (GT)	GT-1	5.4 ± 0.6	6.6 ± 0.0	4.1 ± 0.0
	GT-2	4.0 ± 0.7	8.8 ± 2.6	3.1 ± 0.2
	GT-3	3.7 ± 0.3	9.6 ± 2.0	3.1 ± 0.1
	GT-4	6.0 ± 0.2	14.4 ± 1.8	5.1 ± 0.4
	GT-5	3.6 ± 0.1	8.6 ± 1.7	3.3 ± 0.1
	GT-6	5.1 ± 0.1	10.2 ± 4.7	3.6 ± 0.1
	GT-7	3.6 ± 0.1	8.3 ± 2.2	2.5 ± 0.2
紅茶飲料 (BT)	BT-1	4.1 ± 0.1	12.5 ± 4.1	3.1 ± 0.1
	BT-2	5.3 ± 0.1	10.0 ± 1.0	3.0 ± 0.1
	BT-3	5.1 ± 0.1	11.3 ± 4.7	2.7 ± 0.1
	BT-4	5.9 ± 0.1	10.6 ± 3.4	3.6 ± 0.1
	BT-5	2.0 ± 0.1	2.9 ± 0.6	1.1 ± 0.1
	BT-6	5.2 ± 0.1	11.1 ± 1.3	2.5 ± 0.3
	BT-7	6.6 ± 0.4	12.4 ± 2.6	3.6 ± 0.2
ウーロン茶飲料 (OT)	OT-1	3.7 ± 0.1	5.0 ± 1.0	1.5 ± 0.0
	OT-2	2.1 ± 0.2	4.7 ± 1.3	1.1 ± 0.1
	OT-3	3.0 ± 0.1	4.1 ± 2.2	2.2 ± 0.1
ブレンド茶飲料 (BIT)	BIT-1	0.8 ± 0.1	1.6 ± 0.4	0.6 ± 0.1
	BIT-2	1.1 ± 0.3	1.8 ± 1.1	0.7 ± 0.0
	BIT-3	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.3	0.4 ± 0.0
	BIT-4	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.1
	BIT-5	1.4 ± 0.1	2.7 ± 1.5	2.4 ± 0.1

フリーラジカル消去活性は化学発光法 (CL 法) と ABTS ラジカルカチオンの吸光度測定法 (ABTS 法) により測定し、没食子酸等価濃度 (GEC) で表した (n=3)。ポリフェノール量は没食子酸等価濃度 (GEC) で表した (n=3)。緑茶飲料 (GT) 7 製品, 紅茶飲料 (BT) 7 製品, ウーロン茶飲料 (OT) 3 製品, およびブレンド茶飲料 (BIT) 5 製品についての測定結果を示す。

準物質に用いて検量線を作成し、検体中のポリフェノール量は没食子酸等価濃度 (GEC) で表した。

III. 実験結果および考察

市販茶系飲料を緑茶飲料, 紅茶飲料, ウーロン茶飲料, および緑茶以外の植物成分を含むブレンド茶飲料に分け, それらに含まれるポリフェノール量を測定した。また, フリーラジカル消去活性を化学発光法 (CL 法) と ABTS ラジカルカチオンを用いた吸光度法 (ABTS 法) により測定した。各茶飲料ごとに測定した結果を表 1 に示した。

ポリフェノールの標準品に用いた没食子酸のフリーラジカル消去活性を 50% 消去濃度である IC₅₀ 値でみると, CL 法での IC₅₀ 値は 1.5 μM であるのに対して ABTS 法では 5 μM となった。CL 法では AAPH の解裂に伴って生じるペルオキシラジカルが主に反応に関係している。両測定法における消去有効濃度

の差は, 測定に用いたラジカルとの反応性の差に由来すると考えられる。IC₅₀ 値の比較からわかるように CL 法は ABTS 法よりも高感度でフリーラジカル消去活性の測定ができる。したがって CL 法により測定するときには茶系飲料を高倍率で希釈して用いるので, 本法は検体の着色や濁りなどをほとんど気にすることなく測定できる利点をもつ。

今回測定した茶系飲料はわが国で生産されている製品の一部にしか過ぎないが, 茶系飲料の種類によりフリーラジカル消去活性に違いが見られた。同じ製茶方法の製品間で比較した消去活性の違いよりも製茶方法の異なる製品間の消去活性の違いの方が大きく, 茶緑茶飲料や紅茶飲料にフリーラジカル消去活性の高いものが多かったが, ウーロン茶飲料のラジカル消去活性は弱く, ブレンド茶飲料はさらに弱かった。この傾向は 2 つのラジカル消去測定法においてほぼ一致し, 両測定法による GEC 値は比較的

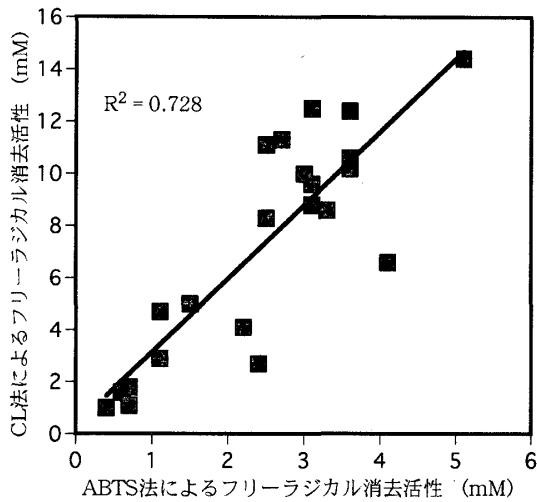


図 2 化学発光法 (CL 法) によるフリーラジカル消去活性と ABTS ラジカルカチオン吸光度法 (ABTS 法) によるフリーラジカル消去活性の相関性
フリーラジカル消去活性は没食子酸等価濃度 (GEC) で表した。

よい相関性を示し、決定係数は $R^2=0.728$ となった (図 2)。

茶系飲料の示すフリーラジカル消去作用に寄与する成分は、すでに抗酸化性に関して多くの報告があるポリフェノール類が主要なものであると予想できる。緑茶中には代表的な一次ポリフェノールである (-)-エピガロカテキンガレートをはじめとする多種類のフラバン-3-オール類やケルセチンなどのフラボノール類が多い。また発酵茶の紅茶は、製茶工程中に一次ポリフェノールが酸化重合してできるテア

フラビン類やテアルビジン類などの二次ポリフェノールを多く含んでいる。今回我々が用いた FC 試薬によるポリフェノール定量法は、茶飲料中に含まれるこれらポリフェノールの総量を示すものである。当然のことながら個々のポリフェノールの示すフリーラジカル消去効果には違いがあり、製品のポリフェノール組成により抗酸化作用も異なる¹⁰⁾ と考えられるが、図 3 に示すように、フリーラジカル消去活性と総ポリフェノール量との間には、今回用いたいずれの測定法においても高い相関性が見られ、茶飲料のフリーラジカル消去活性にフェノール化合物が大きく寄与していると考えられる。フラバン-3-オール類が多く含まれる緑茶や二次ポリフェノールの多い紅茶から製造される茶系飲料のフリーラジカル消去活性は高かったのであるが、紅茶飲料であっても製品 BT-5 に見られるようにポリフェノール量が低い製品はフリーラジカル消去活性も低かった。一方、健康志向を反映して様々な保健機能を有するとされる植物抽出物を配合したブレンド茶飲料が販売されているが、それらはポリフェノール量が少なく、フリーラジカル消去効果も小さかった。

ところで、市販茶飲料の大多数には、抗酸化剤としてアスコルビン酸が添加されている。FC 試薬によるポリフェノール定量ではアスコルビン酸が反応陽性物質となるが、還元型アスコルビン酸量は定量していないので、ポリフェノール量およびフリーラジカル消去活性にアスコルビン酸がどの程度寄与しているかは不明である。しかし、ブレンド茶飲料にもアスコルビン酸は添加されているにもかかわらず

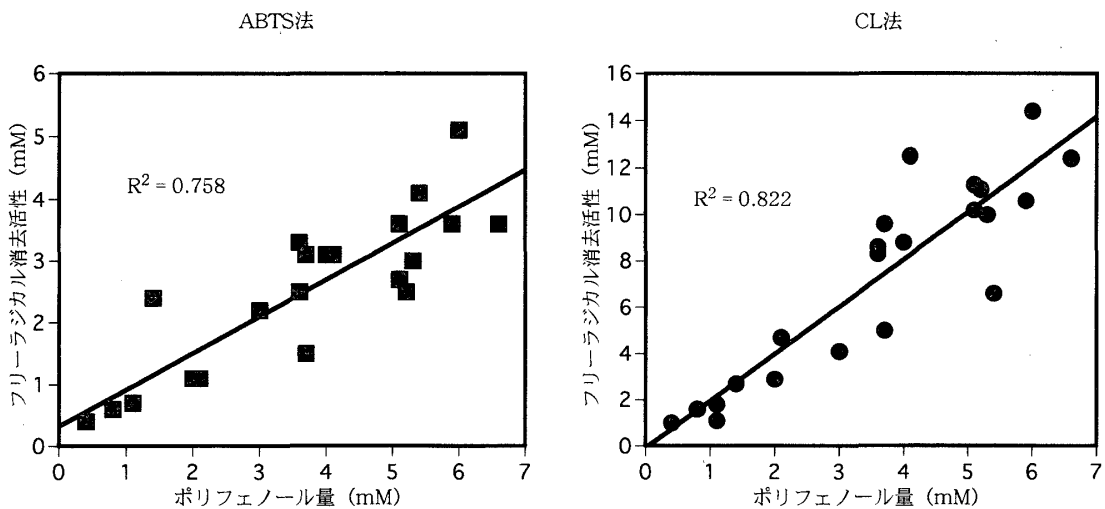


図 3 茶系飲料のフリーラジカル消去活性とポリフェノール量との相関性
左図は ABTS ラジカルカチオン吸光度法 (ABTS 法) によるフリーラジカル消去活性とポリフェノール量との相関性を示し、右図は化学発光法 (CL 法) によるフリーラジカル消去活性とポリフェノール量との相関性を示す。フリーラジカル消去活性は没食子酸等価濃度 (GEC) で表した。

フリーラジカル消去活性が低かったことから、茶系飲料に含まれるアスコルビン酸のポリフェノール量やフリーラジカル消去効果への寄与は、それほど大きなものではないと推察される。FC 試薬を用いた本法はポリフェノール化合物に対する特異性に少し欠けるところがあるが、簡便な定量法であり、茶系飲料においてはフリーラジカル消去活性とともにその抗酸化性の間接的な指標になると考えられる。また、本報告で用いた化学発光法は、従来からフリーラジカル消去効果の測定に用いられている ABTS 法とよく相関し、食品の示すフリーラジカル消去活性の測定に利用可能な高感度測定法であることが示された。

カテキン類やフラボノイド類は腸管吸収過程ですでに抱合体形成を受けることが知られており^{11, 12)}, *in vitro*でのフリーラジカル消去効果が生体内でそのままあらわれるとは限らない。しかし緑茶の摂取がヒト生体内での抗酸化性を高めるとの報告¹³⁻¹⁵⁾があるので、茶系飲料などフリーラジカル消去活性の高い食品の調査は、食品成分の保健機能を理解するうえで必要な資料となろう。

IV. 要 約

茶樹の葉から製される茶にはカテキン類など、抗酸化性を示す成分が多数含まれている。茶は最近、自動販売機の普及などもあって清涼飲料に分類される茶系飲料としての利用が高まっているが、本報告では茶系飲料の抗酸化性をフリーラジカル消去活性の面から評価した。茶系飲料は原料茶葉の製法により、緑茶飲料、紅茶飲料、ウーロン茶飲料、および茶樹以外の植物成分を含むブレンド茶飲料に分類して検討した。フリーラジカル消去活性はルミノール発光を利用した化学発光法と、ABTS ラジカルカチオンを測定する吸光光度法により測定した。また、茶系飲料中のポリフェノール量は Folin-Ciocalteu 試薬を用いる吸光光度法により定量した。カテキン類など一次ポリフェノール量の多い緑茶飲料やポリフェノール類の酸化重合した二次ポリフェノール量の多い紅茶飲料は、フリーラジカル消去活性の高い製品が多かった。半発酵茶を原料とするウーロン茶飲料のポリフェノール量は緑茶飲料や紅茶飲料よりも少なく、フリーラジカル消去活性も低かった。ブレンド茶飲料のポリフェノール量とフリーラジカル消去活性はもっとも低かった。以上の結果から、茶系飲料のフリーラジカル消去活性にはフェノール化合物が寄与することは明らかであり、茶系飲料のフ

リーラジカル消去活性測定に用いた 2 つの測定法による消去活性の相関性は高く、化学発光法は食品の示すフリーラジカル消去活性の測定に有効な高感度測定法であることが示唆された。

謝辞：本研究の一部は平成 13 年度京都女子大学・京都女子短期大学研究助成の補助を受けたものである。

V. 引用文献

- 1) 社団法人全国清涼飲料工業会編：清涼飲料関係統計資料 (2002)
- 2) T. Yamamoto, L. R. Juneja, D.-C. Chu and M. Kim (Eds.): *Chemistry and Application of Green Tea*, CRC Press, New York (1997)
- 3) C. J. Dufresne and E. R. Farnworth: *J. Nutr. Biochem.*, **12**, 404-421 (2001)
- 4) 伊奈和夫, 坂田完三, 富田 勲, 伊勢村護 共編, 茶の化学成分と機能, 弘学出版 (2002)
- 5) 村松敬一郎編, 茶の機能, 学会出版センター (2002)
- 6) M. Kawagoe and K. Nakagawa: *Toxicol. Lett.*, **114**, 189-196 (2000)
- 7) R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans: *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1231-1237 (1999)
- 8) V. L. Singleton and J. A. Rossi: *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144-158 (1965)
- 9) Y. Kondo, M. Ohnishi and M. Kawaguchi: *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1781-1785 (1999)
- 10) T. G. Toschi, A. Bordoni, S. Hrelia, A. Bendini, G. Lercker and P. L. Biagi: *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3973-3978 (2000)
- 11) V. Crespy, C. Morand, C. Manach, C. Besson, C. Demigne and C. Remesy: *Am. J. Physiol.*, **277**, G120-G126 (1999)
- 12) J. B. Vaidyanathan and T. Walle: *Pharmaceut. Res.*, **18**, 1420-1425 (2001)
- 13) I. F. F. Benzie, Y. T. Szeto, J. J. Strain and B. Tomlinson: *Nutr. Cancer*, **34**, 83-87 (1999)
- 14) H. Sung, J. Nah, S. Chun, H. Park, S. E. Yang and W. K. Min: *Eur. J. Clin. Nutr.*, **54**, 527-529 (2000)
- 15) Y. Miura, T. Chiba, S. Miura, I. Tomita, K. Umegaki, M. Ikeda and T. Tomita: *J. Nutr. Biochem.*, **11**, 216-222 (2000)