

茶花 (チャ, *Camellia sinensis*, 花蕾部) の機能性サポニン: Floratheasaponin 類の胃保護作用と血糖値上昇抑制作用及び HPLC を用いた定性及び定量分析

吉川雅之,<sup>\*,a</sup> 王 涛,<sup>a</sup> 杉本幸子,<sup>a</sup> 中村誠宏,<sup>a</sup>  
長友暁史,<sup>a</sup> 松田久司,<sup>a</sup> 播磨章一<sup>b</sup>

**Functional Saponins in Tea Flower (Flower Buds of *Camellia sinensis*):  
Gastroprotective and Hypoglycemic Effects of Floratheasaponins and  
Qualitative and Quantitative Analysis Using HPLC**

Masayuki YOSHIKAWA,<sup>\*,a</sup> Tao WANG,<sup>a</sup> Sachiko SUGIMOTO,<sup>a</sup> Seikou NAKAMURA,<sup>a</sup>  
Akifumi NAGATOMO,<sup>a</sup> Hisashi MATSUDA,<sup>a</sup> and Shoichi HARIMA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Kyoto Pharmaceutical University, shityono-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan, and

<sup>b</sup>Harima-Kampo Co., Ltd., 4-1-45 Miyahara, Yodogawa-ku, Osaka 532-0003, Japan

(Received August 22, 2007; Accepted October 5, 2007)

As a part of our characterization studies on the bioactive saponin constituents of tea flowers (*Camellia sinensis*, flower buds), the methanolic extract and 1-butanol-soluble portion (the saponin fraction) from the flower buds were found to exhibit potent inhibitory effects on ethanol- and indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats and on serum glucose elevation in sucrose-loaded rats. Among the constituents of the 1-butanol-soluble portion, floratheasaponins A, B, and C showed gastroprotective and hypoglycemic activities. Furthermore, we have developed qualitative and quantitative methods using HPLC for the principle saponins, floratheasaponins A–F, in tea flowers, which were previously found to show antiallergic and antiobesity effects. Using those methods, the saponin composition of Indian tea flowers were found to be similar to those of Chinese (Anhui) but not of Japanese tea flowers. On the other hand, it was found that the floratheasaponin contents in tea flowers varied markedly during the blooming period, and they were abundant at half-bloom. Additionally, the contents of caffeine in the tea flowers were examined using HPLC.

**Key words**—tea flower; *Camellia sinensis*; floratheasaponins; quantitative HPLC analysis; gastroprotective effect; hypoglycemic effect

緒 言

チャは、ツバキ科 (Camelliaceae) に属する多年性の常緑樹で、中国の雲南省、四川省からミャンマーの北部にかけての地域が原産地とされている。チャは、樹高 3 m 程度になる灌木で耐寒性のある中国種 (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) と、喬木で葉も大きいアッサム種 (*C. sinensis* var. *assamica*) に大別される。中国種は、江蘇、浙江省などの中国東部から安徽、福建省などの東南部及び日本の暖地などで栽培されており、北インドへも移植されている。一方、アッサム種は、四川、雲南省などの中国西南部、インドやスリランカ、インドネシアなどの熱帯、亜熱帯地域で栽培されている。また、インド

シナ半島には両種の交雑種と考えられる種が存在すると言われている。

チャの葉部 (茶葉) を用いた喫茶の歴史は、少なくとも 2000 年以前にさかのぼり、当初は薬用が中心であったと考えられている。茶葉は薬物として多数の本草書に収蔵されており、中国明時代の「本草綱目」(1590 年) や江戸時代の「本草食鑑」(1697 年) などにもその薬効が記載されている。例えば、頭と目を清める、煩渴を除く、痰を化す、食を消す、利尿する、解毒するなどの効能があり、頭痛や目くらみ、多眠、激しい口渇を治し、去痰、消化、利尿効果があり、解毒作用があつて下痢や二日酔いを治療するなど薬効が記載されている。また、種子 (茶子) には、鎮咳、去痰作用、頭痛や呼吸器不善の治療効果が伝承されている。チャの葉部や種子にサポニンが含有されていることが古くから知られて

<sup>a</sup>京都薬科大学, <sup>b</sup>㈱ハリマ漢方製薬

\*e-mail: myoshika@mb.kyoto-phu.ac.jp

おり、<sup>2-4)</sup> また、アルコール吸収抑制活性、<sup>5)</sup> 抗菌作用及び抗炎症作用、<sup>6)</sup> 降圧作用<sup>7)</sup>などの生物活性が報告されている。筆者らは、日本産(中国種)やスリランカ産(アッサム種)のチャ種子や葉部のサポニン成分として theasaponin A<sub>1</sub>-A<sub>7</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>5</sub>, C<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>-E<sub>13</sub>, F<sub>1</sub>-F<sub>3</sub>, H<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>-G<sub>2</sub>, assamsaponin A-I, foliathesaponin I-V 及びフラボノイド配糖体 theaflavonoside I-IV の構造を明らかにするとともに、甘味抑制活性、胃保護作用、肝保護作用及び脱顆粒抑制作用のあることを見出した。<sup>8-16)</sup>

一方、チャの花蕾部(茶花)については、中国伝統医学やアーユル・ヴェーダ医学などのインド伝統医学において薬用とした記録は少なく、近縁植物のユチャ(アブラツバキ, *C. oleifera*)の花蕾部(茶子木花)に止血作用、やけどの治療効果及びツバキ(*C. japonica*)の花蕾部(山茶花)に止血作用、肝保護作用、抗炎症作用のほか、やけど、咳嗽の治療効果が伝承されているに過ぎない。しかし、日本においては古くからチャ花蕾部(茶花)が食用にされてきており、例えば、島根県では茶花を用いた“花番茶”とそれを点じて食する“ぼてぼて茶”というお茶漬のような料理が知られている。<sup>17,18)</sup>しかし、茶花の効能については明確に伝承されておらず、その含有成分や薬理活性についてもこれまで全く検討されていなかった。<sup>19,20)</sup>

筆者らは、メディシナルフラワー(薬用花)の生体機能性成分の探索研究として、これまでに菊花(シマカンギク花部)、<sup>21-23)</sup> マリゴールド花部、<sup>24,25)</sup> 菩提樹(リンデン花部)、<sup>26)</sup> 白梅花(ウメ花部)、<sup>27,28)</sup> 三七花(サンシチニンジン花部)、<sup>29)</sup> 山人参花(ヒュウガトウキ花部)、<sup>30)</sup> 山茶花(ツバキ花部)、<sup>31,32)</sup> 人参花(オタネニンジン花部)、<sup>33-35)</sup> サトウヤシ花部<sup>36)</sup>などの含有成分の化学構造を明らかにするとともに、アルドース還元酵素阻害作用、糖負荷後の血糖値上昇抑制作用、胃排出能抑制作用、胃保護作用、肝保護作用、抗酸化作用、脱顆粒抑制作用、血小板凝集作用などの薬理活性を見出ししてきた。茶花の抽出エキスについても生体機能を検討したところ、1) 抗肥満作用(オリーブ油負荷における血中中性脂肪上昇の抑制活性)、<sup>19,20,37)</sup> 2) 抗アレルギー作用[ラット好塩基球白血病(RBL-2H3)細胞における脱顆粒抑制作用]、<sup>19,20,38)</sup> 3) 抗酸化作用(DPPH ラジカル、スーパーオキシド消去活

性)<sup>19,20)</sup>を見出した。そこで、日本産を始め、安徽省、四川省、福建省などの中国各地の茶花について含有成分を探索したところ、caffeine, フラボノール(kaempferol, quercetin, myricetin など)及びフラボノール配糖体、カテキン類[(-)-epigallocatechin 3-O-gallate, (-)-epicatechin 3-O-gallate, (-)-epigallocatechin など]、フェネチル配糖体(shimaurinoside, primeveroside など)及び assamsaponin E を単離同定するとともに、花蕾部に特有の12種の新規サポニン floratheasaponin A-I<sup>36,37)</sup>及び floraltheaponin I-III、<sup>39)</sup> floraltheaflavonoside A<sup>39)</sup>を得て構造を明らかにした。Floratheasaponin 類には抗肥満作用、抗アレルギー作用などの茶花エキスで認められた薬理作用が認められ、茶花の主薬効成分であることが判明した。<sup>19,20,37-39)</sup>また、これまでのチャのサポニン成分の比較検討の結果、チャにおいては、葉部、種子及び花蕾部などの部位の違いによって、それぞれに特有のサポニンが存在することが判明した。

今回、筆者らは、日本産(中国種)茶花のメタノール抽出エキス及びサポニン分画である1-ブタノール移行部にエタノール及びインドメタシン誘発胃粘膜損傷に対する抑制作用及びシヨ糖負荷後の血糖値上昇抑制作用を認め、日本産茶花の主サポニンである floratheasaponin A (1), B (2), C (3) に顕著な胃保護作用と血糖値上昇抑制作用のあることを明らかにした。さらに、日本及び中国安徽省産茶花の主サポニンである floratheasaponin A-F を指標物質とした HPLC による定性、定量法を開発した。この定量法を応用して、産地別と開花時期による floratheasaponin 類の含量の差異を明らかにした。また、茶花に含有される caffeine を定量したので報告する(Chart 1)。

## 実験の部

### 1. 薬理試験

**1-1. 茶花エキス及び floratheasaponin 類の抽出、単離** 滋賀県産チャ花蕾部(1.1 kg, 2003年1月採集)をメタノール(10 l)で3時間加熱還流後(計3回繰り返した)、得られた抽出液を減圧下濃縮してメタノール抽出エキス(375 g)を得た。メタノール抽出エキス(300 g)を水(500 ml)に懸濁したのち、酢酸エチル(300 ml)で抽出し(計

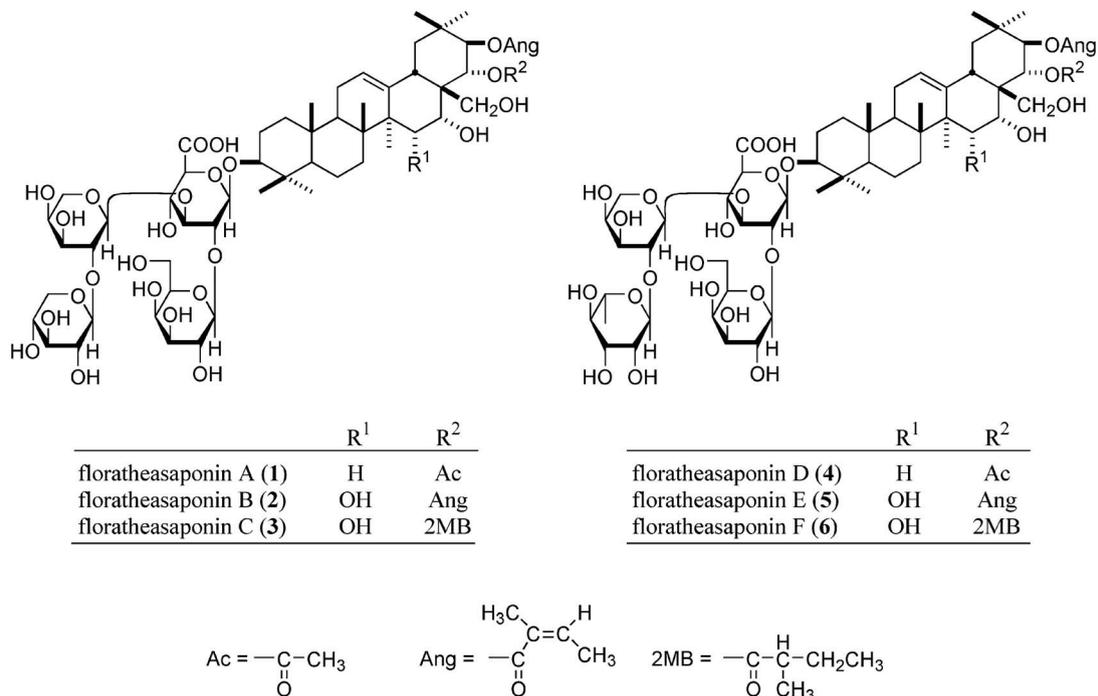


Chart 1. Structures of Floratheasaponins A-F (1-6) from Tea Flower

3 回繰り返した), 抽出液を減圧下濃縮して酢酸エチル移行部エキス (43.7 g) を得た. 水層を1-ブタノール (300 ml) で抽出後 (計 3 回繰り返した), 減圧下濃縮して1-ブタノール移行部エキス (139.2 g) と水移行部エキス (117.1 g) を得た. 1-ブタノール移行部エキスを文献<sup>37)</sup>記載の方法で分離精製して floratheasaponin A (1, 171 mg), B (2, 211 mg), 及び C (3, 121 mg) を得た.

## 1-2. 胃保護作用

**1-2-1. エタノール誘発胃粘膜損傷モデル<sup>40,41)</sup>** 18-24 時間絶食させた Sprague-Dawley (SD) 系雌性ラット (体重 240-260 g) に被験薬物を経口投与し, 1 時間後に 99.5% エタノールを 1.5 ml/rat の割合で経口投与した. 1 時間後に胃を摘出し, 胃内に 1.5% ホルマリン溶液 (10 ml) を注入して固定したのち, 胃を大彎に沿って切り開き, 胃体部粘膜に発生した線状出血性病変の長さ (mm) を測定し, 損傷係数とした.

**1-2-2. インドメタシン誘発胃粘膜損傷モデル<sup>40,41)</sup>** 18-24 時間絶食させた SD 系雌性ラット (体重 240-260 g) に被験薬物を経口投与し, 1 時間後にインドメタシンを 20 mg/kg の用量で経口投与した. インドメタシンは少量の 5% 炭酸水素ナトリウムで溶解後, 蒸留水, 0.2 M 塩酸 (HCl) を用い

中和, 調製した. インドメタシン投与 4 時間後に胃を摘出し, 胃内に 1.5% ホルマリン溶液 (10 ml) を注入して固定したのち, 胃を大彎に沿って切り開き, 胃体部粘膜に発生した損傷の長さ (mm) を測定し, 損傷係数とした.

なお, 被験薬物は 5% アラビアゴム末溶液に懸濁して用いた (5 ml/kg).

## 1-3. 抗糖尿病作用

**1-3-1. アルドース還元酵素阻害活性<sup>42)</sup>** Wistar 系雄性ラットから採取したレンズを 10 mM 2-mercaptoethanol 含有 135 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中でホモジナイズし, 得られたホモジネートを遠心分離 (100000×g, 30 min, 4°C) した. その上清を酵素分画として用いた. 反応混合液は, 135 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 225 μl に 1.0 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 基質として 10 mM DL-glyceraldehyde をそれぞれ 50 μl と, 酵素分画 100 μl, サンプル溶液 (DMSO Soln.) 25 μl 加え予備加温 (3 min, 30°C) 後, 0.3 mM NADPH を 50 μl 添加し反応を開始 (30 min, 30°C) した. その後, 0.5 N HCl を 150 μl 加えて反応を停止した. この溶液中に 10 mM imidazole 含有 6 N NaOH 0.5 ml 加え (20 min, 60°C) し, NADP を蛍光物質に変換させた. 生成した蛍光物質を蛍光分光光度計 (PERKIN ELMER 製 LS 50B) を用いて測

定した(励起波長 360 nm, 測定波長 460 nm)した。

### 1-3-2. 小腸 $\alpha$ -グルコシダーゼ (sucrase 及び maltase) 阻害活性<sup>42)</sup>

a) 酵素液の調整 Wistar 系雄性ラット (体重約 200 g) の空腸から得られた刷子縁膜を粗酵素として用いた。刷子縁膜は 0.1 M マレイン酸緩衝液に (pH 6.0) に懸濁し, 25–50 nmol/ml/min の基質が加水分解する濃度に希釈して用いた。

b) 酵素活性の測定 基質 (maltose, sucrose, 74 mM) 100  $\mu$ l に被験物質溶液 50  $\mu$ l を加え, 37°C で 2–3 分間予備加温した。酵素液 50  $\mu$ l を加え 30 分間反応させ, 水 800  $\mu$ l を加え, 沸騰水浴中で 2 分間加熱し, 酵素を失活させた。別に, 各検体につき酵素液を加えたのち, 直ちに水を加えて沸騰水浴中で 2 分間加熱し, 酵素を失活させたものを盲検とした。生成したグルコースの量をグルコースオキシダーゼ法 (グルコース CII テストワコー) により測定した。基質及び被験物質は, 0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解して用いた。得られた値より 50% 阻害する濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めた。

1-3-3. ショ糖負荷ラットにおける血糖値上昇抑制作用<sup>36,42)</sup> Wistar 系雄性ラット (体重約 130–170 g) を 20–24 時間絶食させたのち, 被験物質を経口投与し, その 30 分後に 20% ショ糖溶液を 5 ml/kg の用量で同時に経口投与した。その 0.5, 1, 2 時間後にエーテル麻酔下 (採血時のみ) にて眼下静脈より約 0.4 ml ずつ採血を行い, 遠心分離により血清を分離し, グルコースオキシダーゼ法 (グルコース CII テストワコー) を用いて血糖値を測定した。なお, 被験薬物は 5% アラビアゴム末溶液に懸濁して用いた (5 ml/kg)。

1-3-4. 統計処理 数値は平均値  $\pm$  標準誤差 (S.E.) で表し, 有意差検定には Dunnett の多重比較検定法を用いた。

## 2. 定性, 定量分析

2-1. 標品 Floratheasaponin A–F (1–6) は, 日本産及び中国安徽省産茶花から単離し, 構造決定したものをを用いた。<sup>37,38)</sup> Caffeine 標準品は Nakalai Tesque より購入した。

2-2. 試料 日本 (滋賀県, 2003 年 1 月), 中国 (安徽省, 2005 年, 2006 年 9 月), インド (West Bengal 州, 2005 年 1 月) にて栽培されていた中国種チャの花蕾部を採集した。別に第 15 改正日本薬

局方生薬試験法の乾燥減量の項に従って乾燥減量を求め, 換算した生薬の乾燥物に対して各成分含量を算出した。

## 2-3. 試料溶液の調製

2-3-1. Floratheasaponin 類の定性, 定量試料 サンプルを減圧下で 40°C, 3 時間乾燥させたのち, 粉末とし, 約 1 g を精密に量り, 50 ml のメタノールを加え 30 分間加熱還流し, 冷後, ろ紙ろ過した。残渣に 50 ml メタノールを加え, 同様操作を 2 回繰り返した。得られた抽出液を合わせ, 40°C 以下で減圧濃縮した。濃縮液にメタノールを加えて正確に 5 ml とし, これをメンブランフィルター (0.45  $\mu$ m) でろ過したものを試料溶液とした。

2-3-2. Caffeine の定量試料<sup>43)</sup> サンプルを減圧下で 40°C, 3 時間乾燥させたのち, 粉末とし, 約 0.5 g を精密に量り, 精製水 75 ml を加え, 1 時間加熱還流した。ろ紙ろ過後, 濾液を正確に 100 ml とした。これをメンブランフィルター (0.45  $\mu$ m) でろ過したものを試料溶液とした。

2-3-3. 注入量及び計算方法 試料溶液又は標準溶液 10  $\mu$ l を正確に注入し, ピークの面積法により計算した。

## 2-4. 装置及び測定条件

2-4-1. HPLC 条件 HPLC 装置: LC10AD vp Shimadzu, 検出器: SPD-10A UV-VIS detector, Shimadzu, カラムオーブン: CTO-10AC vp column oven, Shimadzu, カラム: GL Science Inc. Inertsil ODS-3.5 mm, 4.6  $\times$  250 mm, Develosil C-30-UG-5, 4.6  $\times$  250 mm, データ処理用ソフト: Shimadzu Class vp バージョン 5.032。

2-4-2. 測定条件 1) Floratheasaponin 類の定性分析: Develosil C-30-UG-5 カラム, 紫外吸光度計波長 230 nm を用い, カラム温度は 40°C, 溶離液に acetonitrile-10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.3) (40 : 60 v/v) を用い, 流量は 1 ml/min とした。2) Floratheasaponin 類の定量分析: GL Science Inc. Inertsil ODS-3.5 mm カラム, 紫外吸光度計波長 230 nm を用い, カラム温度は 40°C, 溶離液に MeOH-10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.3) (75 : 25 v/v) を用い, 流量は 1 ml/min とした。3) Caffeine の定量分析: GL Science Inc. Inertsil ODS-3.5 mm カラム, 紫外吸光度計波長 270 nm を用い, カラム温度は 40°C, 溶離液に MeOH-2% 酢酸溶液 (30 : 70

v/v) を用い、流量は 1 ml/min とした。

## 2-5. 検量線の作成

**2-5-1. Floratheasaponin 類** ODS カラムを用いて、MeOH-10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.3) (70 : 30 v/v) で floratheasaponin D (4), E (5), F (6) の検量線を検討した。Floratheasaponin D-F (4-6) をそれぞれ 0.1-1.0 mg/ml となるように段階的に希釈し、上記の分析条件で各標準液について HPLC 分析を行った結果、クロマトグラフのピークと注入量の間良好な直線関係 ( $r=0.9992-1.0000$ ) が得られた。回帰方程式、相関係数及び保持時間は次の通りであった。

Floratheasaponin D (4):  $Y=336162X-9326.3$ ;  
 $r=0.9994$ ; 保持時間 13.5 min.

Floratheasaponin E (5):  $Y=636186X+10341$ ;  
 $r=1.0000$ ; 保持時間 22.4 min.

Floratheasaponin F (6):  $Y=442186X-80470$ ;  
 $r=0.9992$ ; 保持時間 24.7 min.

なお、Y はピーク面積、X は標準品の絶対注入量 ( $\mu\text{g}$ ) を表した。

**2-5-2. Caffeine<sup>43)</sup>** Caffeine を精密に秤取して、メタノールで 10 ml に定容したものを 0.1-1.5 mg/ml となるように段階的に一定濃度の標品溶液を希釈調製し検量線を作成した。上記条件で各標品溶液を HPLC 分析を行った結果、いずれの caffeine のクロマトグラフのピーク面積と絶対注入量の間良好な直線関係が得られた。回帰方程式、相関係数及び保持時間は次の通りであった。

Caffeine:  $Y=293010X-3791.5$ ;  $r=1.0000$ ; 保持時間 8.4 min.

なお、Y はピーク面積、X は標準品の絶対注入量 ( $\mu\text{g}$ ) を表した。

## 結果及び考察

### 1. 茶花エキス及び floratheasaponin A (1), B (2), C (3) の薬理作用

**1-1. 胃粘膜保護作用** 筆者らは、日本産中国種チャ種子及びスリランカ産アッサム種チャ種子のサポニン分画及び theasaponin E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, assamsaponin C にエタノール誘発胃粘膜損傷の抑制作用のあることを報告した。<sup>11)</sup> 日本産茶花メタノール抽出エキスにも胃粘膜保護作用が期待されたことから検討した結果、日本産茶花メタノール抽出エキスにエタノール

誘発胃粘膜損傷に対する保護作用が認められた。胃保護活性はサポニン分画である 1-ブタノール移行部エキスに集約し、酢酸エチル移行部や水移行部には活性は認められなかった。次に、茶花メタノール抽出エキスについて、発症機序の異なるインドメタシン誘発胃粘膜損傷に対する作用を検討したところ、エタノールの場合と同様に強い活性が認められ、1-ブタノール移行部エキスに活性が集約した。しかし、酢酸エチルや水移行部には活性は認められなかった (Tables 1 and 2)。

日本産茶花の 1-ブタノール移行部エキスの主要成分である floratheasaponin A (1), B (2), C (3) についてエタノール誘発胃粘膜損傷の抑制活性を検討したところ、比較対照薬である cetroxate hydrochloride よりも強い保護作用のあることが判明した (Table 3)。

**1-2. 抗糖尿病作用** チャ葉部のポリフェノール成分に糖吸収抑制作用が報告されていることから、葉部と共通するポリフェノールを含有する茶花メタノール抽出エキスにも糖吸収抑制活性が期待された。そこで、ラットレンズ由来アルドース還元酵素及び  $\alpha$ -glucosidase 阻害作用を検討した結果、いずれの酵素に対する阻害作用は弱いものであった (Table 4)。しかし、茶花メタノール抽出エキスは、ショ糖負荷での血糖値上昇を有意に抑制し (Table 5)、ポリフェノールが主成分である酢酸エチル移行部エキスと floratheasaponin 類が主成分である 1-ブタノール移行部に活性が認められた。茶ポリフェノール類の糖吸収抑制作用については既に知られていることから、茶花特有成分である floratheasaponin (1-3) について検討したところ、いずれの化合物にも強い抑制活性が認められた (Table 6)。

## 2. Floratheasaponin 類の定性、定量分析

**2-1. Floratheasaponin 類の定性分析** 分離条件を種々検討したが、floratheasaponin A-F (1-6) の 6 成分を完全に分離する HPLC 条件を見出すことはできなかった。その中で最もよい分離を示した分析条件 2-4-2 項の 1) で日本、中国、インド産茶花の floratheasaponin 類を分析した結果を Fig. 1 に示した。この分析条件は定量分析に適用することは困難であったが、各 floratheasaponin (1-6) の存在が確認できることが明らかになった。本 HPLC 条

Table 1. Effects of the MeOH Ext. and Its Fractions on Gastric Lesions Induced by Ethanol in Rats

Sample	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i> )	<i>n</i>	Gastric Lesions	
			Length (mm)	Inhibition (%)
Control	—	7	115.7±13.9	—
MeOH ext.	50	6	66.6±15.9*	42.5
	100	6	48.9±13.3**	57.7
	200	6	13.5±5.9**	88.4
Control (10% Tween 80)	—	4	96.7±24.3	—
EtOAc-soluble fraction	100	2	111.0±45.0	-14.8
	200	3	128.4±39.0	-32.8
Control	—	8	111.2±11.8	—
1-BuOH-soluble fraction	25	6	55.9±6.3**	49.7
	50	6	41.2±9.1**	62.9
	100	6	12.9±8.4**	88.3
	200	6	4.1±1.9**	96.2
H <sub>2</sub> O-soluble fraction	200	3	112.3±9.9	0.0
Control	—	6	148.4±9.8	—
Cetraxate hydrochloride <sup>32)</sup>	75	6	87.2±7.4**	41.2
	150	6	51.0±4.0**	65.6
	300	6	30.5±8.3**	79.4

Values represent the means±S.E. Significantly different from the control group, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ .

Table 2. Effects of the MeOH Ext. and Its Fractions on Gastric Lesions Induced by Indomethacin in Rats

Samples	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i> )	<i>n</i>	Gastric Lesions	
			Length (mm)	Inhibition (%)
Control	—	6	112.6±21.0	—
MeOH ext.	50	6	50.1±7.8**	55.5
	100	6	36.2±9.2**	67.9
	200	6	33.8±6.6**	70.0
Control (10% Tween 80)	—	4	71.2±12.1	—
EtOAc-soluble fraction	200	4	75.9±8.9	-8.9
Control	—	6	93.6±12.3	—
1-BuOH-soluble fraction	25	6	75.9±8.9	18.9
	50	6	41.2±7.2**	56.0
	100	6	26.2±3.8**	72.0
	200	6	19.2±5.7**	79.5
H <sub>2</sub> O-soluble fraction	200	3	105.2±24.8	-11.0
Control	—	6	81.3±6.7	—
Cetraxate hydrochloride <sup>32)</sup>	75	6	58.7±7.5*	27.8
	150	6	13.4±3.2**	83.5
	300	6	1.4±0.5**	98.3

Values represent the means±S.E. Significantly different from the control group, \*  $p<0.05$  \*\*  $p<0.01$ .

件を用いて、1-6の6成分がいずれの産地の茶花にも含有されていることが判明した。保持時間は次の通りであった。

Floratheasaponin A (1): 29.3 min, B (2): 72.4 min, C (3): 78.4 min, D (4): 28.5 min, E (5): 70.3

min, F (6): 76.8 min.

また、不完全な分離であったが、ピーク高さを比較して、1と4、2と5、3と6の含量比率を求めると、中国とインド産茶花のそれぞれの比率はいずれも約1対1であったが、日本産茶花のみいずれも約

Table 3. Inhibitory Effects of Floratheasaponins A (1), B (2), and C (3) on Gastric Lesions Induced by Ethanol in Rats

Sample	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i> )	<i>n</i>	Gastric Lesions	
			Length (mm)	Inhibition (%)
Control	—	9	157.0±15.5	—
Floratheasaponin A	5	6	80.2±14.7	48.9
	10	6	72.9±11.1**	57.7
	20	6	24.2±10.2**	88.4
	50	6	0.0±0.0**	100.0
Floratheasaponin B	5	6	92.8±24.2	40.9
	10	6	55.4±12.2**	64.7
	20	6	24.9±10.5**	84.1
	50	6	11.5±7.7**	92.7
Control	—	12	163.3±10.3	—
Floratheasaponin C	5	6	38.0±7.1**	76.7
	10	6	22.3±6.8**	86.3
	20	6	18.5±7.2**	88.7
	50	6	0.0±0.0	100.0

Values represent the means±S.E. Significantly different from the control group, \*\*  $p<0.01$ .

Table 4. Inhibitory Effects of the MeOH Ext. on Aldose Reductase Activity and Rat Intestinal  $\alpha$ -Glucosidase Activity

Sample	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)		
	Aldose reductase	Rat intestinal	$\alpha$ -glucosidase <sup>a)</sup>
		Sucrase	Maltase
MeOH ext.	72	>400 (31.1%)	>400 (48.8%)

a) Value in parentheses indicates inhibition (%) at 400  $\mu$ g/ml.

2対1であった (Table 7). この結果は茶花の産地の鑑別に応用可能と考えられる.

**2-2. Floratheasaponin 類の定量分析** 前述のように種々分離条件を検討したが、これまでのところ floratheasaponin A (1) と D (4), B (2) と E (5) 及び C (3) と F (6) の完全に分離可能な条件が見い出せず、floratheasaponin A-F (1-6) の一斉分析は困難であった。今回は、floratheasaponin A (1) と D (4), B (2) と E (5), C (3) と F (6) がそれぞれ完全に1ピークとなる HPLC 条件 2-4-2 項の 2) を用いて、1 と 4, 2 と 5, 3 と 6 の3ピークについて定量分析した。検量線は floratheasaponin D (4), E (5), F (6) を用いて、1 と 4, 2 と 5, 3 と 6 の含量を算出した。

本法を日本産及び中国 (安徽省) 産茶花中の各サポニン含量を求めたところ、Table 8 に示すように

約 1-2% 含有されていることが判明した。なお、floratheasaponin D-F (4-6) の変動係数 ( $v=5$ ) はもそれぞれ、1.25%, 1.94%, 1.84% であった。

次に、中国産茶花の開花時期による含量の変化について分析した。茶花の蕾から花弁が落ちるまでの期間は約 1 週間であるため、蕾が膨らみ始めた 1 日目から 3 日目までの茶花を 30% 咲きとし、4 日目から 5 日目までの開花直前の茶花を 50% 咲きとし、全開した花を 100% と表した。開花時期による floratheasaponin 類の含量変化は Fig. 2 と Table 8 に示した。本分析条件で、分析時間は 30 分以内に抑え、定量が可能になった。蕾期に含有される floratheasaponin 類の含量は少ないが、30% 咲きになると蕾期に比べ floratheasaponin 類の含量が約 2 倍まで増加した。また、floratheasaponin 類は雌ずい (めしべ) に多く含まれていることが明らかとなった。同じ株から得た茶葉には上記 6 成分を始め、floratheasaponin 類も検出することはできず、floratheasaponin 類は茶花の特有成分であることとともに、茶葉におけるサポニン含量も茶花に比べて非常に少ないことが確認された。

**2-3. Caffeine の定量分析** 茶に含まれる特徴成分である caffeine についても合わせて分析した。中国産の開花時期別茶花サンプル及び同じ株で得た茶葉の caffeine 含量を分析したところ、いずれの開

Table 5. Effects of the MeOH Ext. on Increase in Serum Glucose Levels in Sucrose-Loaded Rats

	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i> )	<i>n</i>	Serum glucose level (mg/dl)		
			0.5 h	1.0 h	2.0 h
Normal	—	7	80.3±2.8**	80.0±2.4**	83.0±2.6**
Control	—	7	169.3±3.2	133.1±2.1	121.0±3.2
MeOH ext.	250	6	147.7±3.2**	137.3±3.9	122.6±4.1
	500	6	130.7±3.0**	120.3±2.0**	123.8±1.6
	1000	6	124.3±5.0**	119.5±3.9**	128.3±2.3
Normal	—	5	85.6±3.6**	88.9±4.1**	87.1±2.9**
Control	—	6	159.6±7.0	145.0±6.9	110.9±5.4
Metformin hydrochloride <sup>28)</sup>	125	5	134.8±4.3*	136.0±5.1	115.5±4.7
	250	5	124.1±5.5**	116.3±5.5**	126.4±1.9

Significantly different from the control, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Table 6. Inhibitory Effects of Floratheasaponins A (1), B (2), and C (3) on Serum Glucose Elevation in Sucrose-Loaded Rats

	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i> )	<i>n</i>	Serum glucose level (mg/dl)		
			0.5 h	1.0 h	2.0 h
Normal	—	15	80.3±2.7**	100.2±3.3**	90.1±3.1**
Control	—	14	147.6±3.0	138.1±2.8	107.6±3.4
1-BuOH soluble-fr.	200	4	131.4±8.1	138.4±11.2	111.4±4.3
	500	5	127.1±4.9**	133.7±4.2	107.7±8.0
Floratheasaponin A	50	5	122.5±8.8	130.5±5.7	118.6±3.5
	100	5	107.3±3.6**	130.9±5.7	100.5±6.1
Floratheasaponin B	50	5	120.3±10.5	135.0±5.9	123.0±4.1**
	100	5	98.4±7.2**	105.9±7.1**	92.9±7.4
Floratheasaponin C	50	5	119.8±7.9**	132.5±6.3	109.4±4.6
	100	7	87.7±5.5**	114.9±4.9*	106.4±6.4

Values represent the means±S.E. Significantly different from the control group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

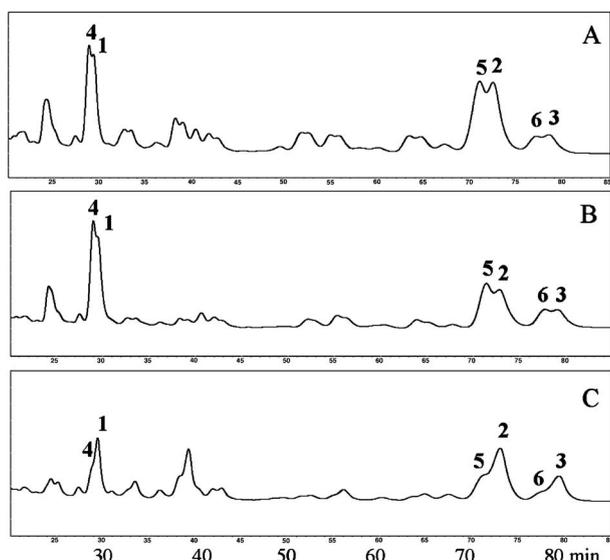


Fig. 1. HPLC Chromatograms of Floratheasaponins A-F (1-6) of Chinese, Indian and Japanese Tea Flower  
A: Chinese, B: Indian, C: Japanese.

Table 7. The Ratio of Chromatographic Peak Height of Floratheasaponin A-F (1-6) in Chinese, Indian, and Japanese Tea Flower

	1, 4	2, 5	3, 6
Chinese	1 : 1.1	1 : 1.0	1 : 0.9
Indian	1 : 1.2	1 : 1.2	1 : 1.1
Japanese	1 : 0.6	1 : 0.5	1 : 0.4

花時期の茶花サンプルもほぼ同程度の caffeine を含んでいたが、葉と比べ、その含量は半分以下であった (Fig. 3) (Table 9).

## 結 論

茶葉の栽培生産過程で大量の茶花が副生することが知られている。茶葉の生産において果実の生成は好ましいものではないことから一部を除き花蕾の時

期に除去されていた。地域や栽培条件によって異なるが、1ヘクタールの茶園に新鮮茶花約3tが採取できると報告されている。<sup>44)</sup>しかし、日本の一部の地域で食用とされるほかには未利用であり、また茶花の含有成分や薬理作用についてはこれまで全く研究されていない。筆者らは茶花の含有成分や薬理活性についても研究を行い、茶花の抽出エキスに脂質負荷マウスでの血中脂肪上昇の抑制作用<sup>37)</sup>や抗アレルギー作用<sup>37)</sup>などの生物活性を見出し、これらの活性はサポニン分画に集約されることが判明した。さらに、茶花抽出エキスのサポニン分画から6種の floratheasaponin 類 (1-6) を単離し、それらの化学

構造を明らかにするとともに、floratheasaponin 類に抗肥満作用や抗アレルギー作用が認められた。<sup>37,38)</sup>今回、日本産茶花のメタノール抽出エキスに弱い  $\alpha$ -glucosidase とアルドース還元酵素阻害作用が認められるとともに、エタノール及びインドメタシン誘発ラット胃粘膜損傷の抑制作用とショ糖負荷ラットにおける血糖値上昇抑制作用を見出した。そして、サポニン分画及び floratheasaponin A (1), B (2) 及び C (3) に胃保護作用と血糖値上昇抑制作用が認められ、日本産茶花エキスの活性本体であることが判明した。また、主要活性サポニン類 floratheasaponin 類 (1-6) について HPLC を用いた定性及び定量法を開発し、この定性分析法を日本、中国、インド産の茶花 (中国種) に適用した結果、産地により含有成分の種類はほぼ同じであるが、組成比が大きく異なることが判明し、本法はチャの産地の判別を目的に応用できると考えられる。また、定量分析法を応用して、茶花の floratheasa-

Table 8. Floratheasaponins A-F (1-6) Contents (%) in Tea Flower and Tea Leaf

	1, 4	2, 5	3, 6	total
Chinese Tea Flower Bud (2005, Oct)	0.291	0.328	0.244	0.863
30% Bloom (2005, Oct)	0.821	0.899	0.439	2.159
50% Bloom (2005, Oct)	0.747	0.690	0.515	1.952
50% Bloom (2006, Oct)	0.659	0.474	0.279	1.412
100% Bloom (2005, Oct)	0.518	0.526	0.294	1.338
Japanese Tea Flower (2004, Jan)	0.479	0.295	0.439	1.213
Pistil (2005, Oct)	0.946	0.855	0.423	2.224
Tea-Leaf (2005, Oct)	—	—	—	—

— : not detected

Table 9. Caffeine Contents (%) in Tea Flower and Tea Leaf

	Content
Leaf	2.27%
Bud	0.82%
Pistil	0.77%
30% Bloom	0.72%
50% Bloom	0.87%
100% Bloom	0.73%

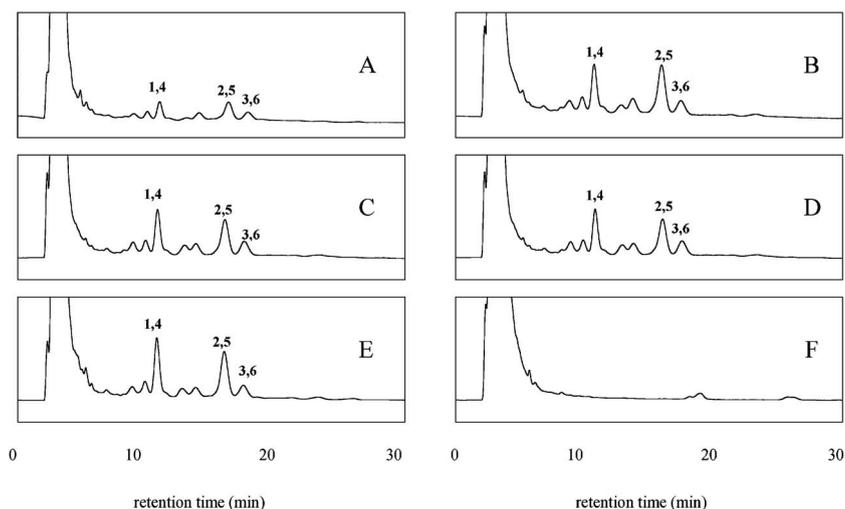


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Floratheasaponins A-F (1-6) from Chinese Tea Plant  
A: bud, B: 30% bloom, C: 50% bloom, D: 100% bloom, E: pistil, F: tea-leaf.

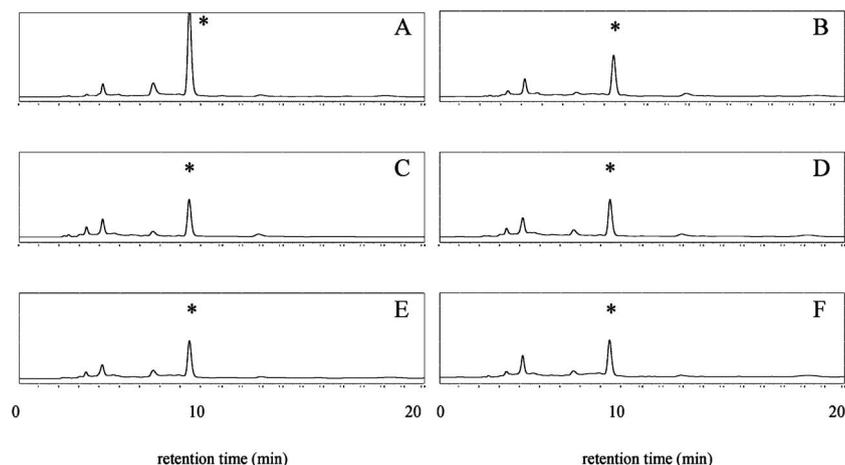


Fig. 3. HPLC Chromatograms of Caffeine from Chinese Tea Plant

A: tea leaf, B: bud, C: pistil, D: 30% bloom, E: 50% bloom, F: 100% bloom. \*Peak of Caffeine.

ponin 類含量を明らかにするとともに、茶花の florathesaponin 類含量は開花時期により変動し、中国産の 3–5 分咲の花において florathesaponin 含量が最も多いことが判明した。葉部、花蕾部との比較のもとに検討したところ、florathesaponin 類は葉部には認められず、花蕾部の雌ずい部に局在することが確認された。一方、チャの特徴成分である caffeine 含量を調べたところ、茶花の caffeine 含量は開花時期に係わらず、いずれの場合も葉部と比べて少なく、その 30% 程度含有されているに過ぎないことが判明した。

#### REFERENCES AND NOTE

- 1) This paper is number XVIII in our series from medicinal flower studies. Medicinal Flower XVII: New Dammarane-Type Triterpene Glycosides from Flower Buds of American Ginseng, *Panax quinquefolium* L. Nakamura S., Sugimoto S., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1342–1348 (2007).
- 2) Yoshikawa M., *Shokuhin to Kagaku*, **43**, 40–42 (2001).
- 3) Yosioka I., Nishimura T., Matsuda A., Kitagawa I., *Tetrahedron Lett.*, 5973–5978 (1966).
- 4) Tschesche R., Weber A., Wulff G., *Justus Liebig's Ann. Chem.*, **721**, 209–219 (1969).
- 5) Tsukamoto S., Kanegae T., Nagoya T., Shimamura M., Kato T., Watanabe S., Kawaguchi M., *Alcohol Alcohol.*, **28**, 687–692 (1993).
- 6) Sagesaka Y., Uemura T., Suzuki Y., Sugiura T., Yoshida M., Yamaguchi K., Kyuki K., *Yakugaku Zasshi*, **116**, 238–243 (1996).
- 7) Sagesaka Y., Sugiura T., Miwa Y., Yamaguchi K., Kyuki K., *Yakugaku Zasshi*, **116**, 388–395 (1996).
- 8) Kitagawa I., Hori K., Motozawa T., Murakami T., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1901–1906 (1998).
- 9) Murakami T., Nakamura J., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1759–1764 (1999).
- 10) Murakami T., Nakamura J., Kageura T., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1720–1725 (2000).
- 11) Yoshikawa M., Morikawa T., Li N., Nagatomo A., Li X., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1559–1564 (2005).
- 12) Morikawa T., Matsuda H., Li N., Nakamura S., Li X., Yoshikawa M., *Heterocycles*, **68**, 1139–1148 (2006).
- 13) Morikawa T., Li N., Nagatomo A., Matsuda H., Li X., Yoshikawa M., *J. Nat. Prod.*, **69**, 185–190 (2006).
- 14) Yoshikawa M., Morikawa T., Nakamura S., Li N., Li X., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 57–63 (2007).
- 15) Li N., Morikawa T., Matsuda H., Ninomiya K., Li X., Yoshikawa M., *Heterocycles*, **71**, 1193–1201 (2007).
- 16) Morikawa T., Nakamura S., Kato Y., Muraoka O., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 293–298 (2007).

- 17) Shimada S., Nagasawa Y., Komatsubara N., Watanabe H., Ishii Y., "Nihon no Syokuseikatsu Zensyu 32, Hirakisho, Shimane no Shokuji," Nousangyosonbunkakyokai, Tokyo, 1991, pp. 327–328.
- 18) Higuchi K., Tanabe S., Watanabe H., "Supervised, Aji no Furusato 12, Shimane no Aji," Kadokawa Shoten, Tokyo, 1978, pp. 13, 31.
- 19) Yoshikawa M., *Shokuhin to Kagaku*, **49**, 25–28 (2007).
- 20) Yoshikawa M., "Supervised, Development of Medicinal Foods," CMC Publishers, Tokyo, 2007, pp. 103–109.
- 21) Yoshikawa M., Morikawa T., Murakami T., Toguchida I., Harima S., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 340–345 (1999).
- 22) Yoshikawa M., Morikawa T., Toguchida I., Harima S., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 651–656 (2000).
- 23) Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Harima S., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 972–975 (2002).
- 24) Yoshikawa M., Murakami T., Kishi A., Kageura T., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 863–870 (2001).
- 25) Murakami T., Kishi A., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 974–978 (2001).
- 26) Matsuda H., Ninomiya K., Shimoda H., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 707–712 (2002).
- 27) Yoshikawa M., Murakami T., Ishiwada T., Morikawa T., Kagawa M., Higashi Y., Matsuda H., *J. Nat. Prod.*, **65**, 1151–1155 (2002).
- 28) Matsuda H., Morikawa T., Ishiwada T., Managi H., Kagawa M., Higashi Y., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 440–443 (2003).
- 29) Yoshikawa M., Morikawa T., Kashima Y., Ninomiya K., Matsuda H., *J. Nat. Prod.*, **66**, 922–927 (2003).
- 30) Matsuda H., Morikawa T., Ohgushi T., Ishiwada T., Nishida N., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 387–392 (2005).
- 31) Yoshikawa M., Morikawa T., Fujiwara E., Ohgushi T., Asao Y., Matsuda H., *Heterocycles*, **55**, 1653–1658 (2001).
- 32) Yoshikawa M., Morikawa T., Asao Y., Fujiwara E., Nakamura S., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 606–612 (2007).
- 33) Yoshikawa M., Sugimoto S., Nakamura S., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 571–576 (2007).
- 34) Nakamura S., Sugimoto S., Matsuda H., Yoshikawa M., *Heterocycles*, **71**, 577–588 (2007).
- 35) Yoshikawa M., Sugimoto S., Nakamura S., Sakumae H., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1034–1038 (2007).
- 36) Yoshikawa M., Xu F., Morikawa T., Pongpiriyadacha Y., Nakamura S., Asao Y., Kumahara A., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 308–316 (2007).
- 37) Yoshikawa M., Morikawa T., Yamamoto K., Kato Y., Nagatomo A., Matsuda H., *J. Nat. Prod.*, **68**, 1360–1365 (2005).
- 38) Yoshikawa M., Nakamura S., Kato Y., Matsuhira K., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 598–605 (2007).
- 39) Yoshikawa M., Nakamura S., Sugimoto S., Kato Y., Wang T., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.* (to be published).
- 40) Matsuda H., Yutana P., Morikawa T., Kishi A., Kataoka S., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1101–1106 (2003).
- 41) Matsuda H., Ochi M., Nagatomo A., Yoshikawa M., *Eur. J. Pharmacol.*, **561**, 172–181 (2007).
- 42) Yoshikawa M., Pongpiriyadacha Y., Kishi A., Kageura T., Wang T., Morikawa T., Matsuda H., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 871–880 (2003).
- 43) Ding M., Yang H., Xiao S., *J. Chromatogr. A.*, **23**, 637–640 (1999).
- 44) Liang M., Pu S., Sun R., *Chin. Tea*, **24**, 16–17 (2002).