

岡山産ぶどうに含まれるポリフェノールの分析

益岡典芳・黒田耕平*・岡田武彦**・橋本麻希・石原浩二

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

*岡山理科大学大学院理学研究科博士課程材質理学専攻

**岡山理科大学大学院理学研究科修士課程臨床生命科学専攻

(2010年9月27日受付、2010年11月9日受理)

1. 緒言

ぶどうにはポリフェノール（アントシアニン、フラボンなど）が多く含有されていることが知られている(1, 2). 我々は、そのポリフェノールの中のアントシアニンに注目し、ピオーネ(岡山特産ぶどう)の皮部からジュース作製した. ジュースはポリフェノールを豊富に含み抗酸化活性が高く、ヒトの飲用試験で健康に好影響を与えることを報告してきた(3). ぶどうの種類に限らず、ぶどうの皮と実にはポリフェノールが豊富であると推定され、日常的にブドウを食べることは健康に効果的であると思われる. しかし、ぶどうの種類(交配種)は多く、ポリフェノールが、どのくらい(濃度)含まれているか? どのようなポリフェノールが含まれているのか? 皮部と実部に違いがあるのか? などについては充分明らかにされていない. 本研究では、岡山県で栽培されているぶどうに含まれるポリフェノールと、その中に含まれているカテキン、レスベラトロールを分析した(図1). カテキンは緑茶に含まれて抗菌作用、抗癌性、抗酸化作用など(4, 5)で、レスベラトロールはピーナッツ、イタドリの根に含まれて抗炎症作用、抗癌性、寿命延長など(6, 7)で注目されている.

2. 材料と方法

2-1 材料と試薬

巨峰 (*Vitis labruscana* B. × *Vitis vinifera* L., tetraploid. の交配種, 黒ぶどう), ピオーネ [*Vitis labrusca* Bailey: 巨峰とカノンホールマスカット (*V. vinifera* Linn.) の交配種, 黒ぶどう], 桃太郎ぶどう [グザルカラ × ネオマスカット (*Vitis vinifera*) の交配種, 白ぶどう], マスカット オブ アレキサンドリア (白ぶどう, 以降マスカットと略す) は岡山市北区北方のマーケットから購入した. トランス-レスベラトロール (*trans-resveratrol*), トランス-ピセイド (*trans-piceid*, *trans-resveratrol-3-glucoside*), 没食子酸 (*gallic acid monohydrate*) は和光純薬工業株式会社から, カテキン [(+)-catechin hydrate], エピカテキン [(-)-epicatechin] はシグマ社から, 塩化シアニジン (*cyanidin chloride*) はフナコシ株式会社から購入した.

2-2 試料の調製

レスベラトロールは光で異性化するため、レスベラトロール測定用試料の調製は遮光して行った(6). 巨峰, ピオーネ, 桃太郎ぶどう, マスカットの4種類のぶどうのそれぞれの皮と実を手で剥き試験管にとり、直ちに皮および実を別々に5倍量の50%メタノール-水(抽出溶媒)を加え、ミキサーで速やかにホモジナイズした. 室温で静置して24時間抽出を行った. 抽出液は減圧濃縮した後50%メタノール-水に溶かして試料とした.

2-3 アントシアニン、フラボン、ポリフェノールの分析

アントシアニンの測定は、試料を波長528 nmでHPLC分析を行った. 塩化シアニジンを使って検量線を作成し、アントシアニン総量は塩化シアニジン当量として求めた(1, 2, 8).

フラボノイドの測定はChukwumah等の報告している方法に従って行った. 試料2.0 mlに5%硝酸ナトリウム0.15 mlを添加し、10%塩化アルミニウム0.15 mlを添加し、10分間静置した. 水1.2 mlと1 M水

酸化ナトリウム 1.0 ml を添加した。510 nm の吸光度を測定した。試料中のフラボノイドは、カテキン当量として求めた(7)。

ポリフェノールの測定は Nasr 等の方法に従って行った。試料 0.2 ml に、水 4.0 ml、フォーリン・チオカルト フェノール(Folin & Ciocalteu's phenol) 試薬 0.2 ml を添加し 8 分間反応させた。7 % 炭酸ナトリウム 0.6 ml を添加し、40 °C で 30 分静置した。570 nm の吸光度を測定した。試料中のポリフェノールは、没食子酸当量として求めた(9)。

2-4 LC-MS によるカテキン、スチルベン化合物(レスベラトロール, ピセイド)の測定

抽出液を 0.45 μ m メンブランフィルターでろ過し試料とした。LC-MS は JMS-T 100CS (日本電子製)で試料 20 μ l を分析した。LC 部は逆相カラム(TSK-gel ODS-100V, Φ 2.0 \times 75 mm), カラム温度: 40°C, 流速 0.2 ml/min, 検出波長は 306 nm で、溶出は水-メタノール系で、40 分間でメタノールを 0 % から 100% にリニアグラジエントで増加させ分析を行った。マススペクトルはエレクトロスプレー負イオン化モード(ESI⁻)で、質量(m/z)範囲は 50.0~1000.0 を記録した。[検出器電圧 (2300 V), ニードル電圧 (2000 V), オリフィス1 電圧 (-80 V), リングレンズ電圧 (-17 V), オリフィス1 温度 (80 °C), スペクトル記録間隔 (0.4 s), 待ち時間 (0.03 s)] データ収集間隔 0.5 ns でデータを集め、マスクロマトグラム(MC)分析を行った。標準物質を同様に分析し、検量線を作成した。

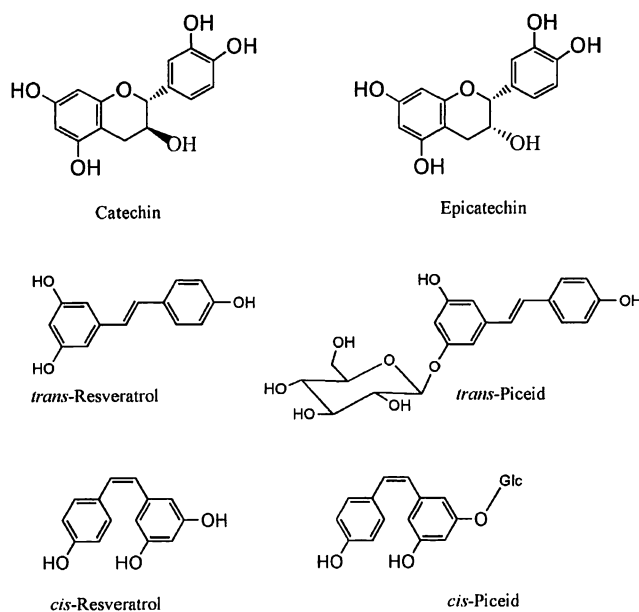


図1 ぶどうに含まれる生理活性化合物

3. 結果

3-1 ぶどうの皮及び実に含まれるアントシアニン, フラボノイド, ポリフェノールの分析

表1 ぶどうの皮及び実に含まれるアントシアニン, フラボノイド, ポリフェノール総量

ぶどうの種類	皮部の含有量 (mg/g)		
	アントシアニン	フラボノイド	ポリフェノール
巨峰	7.78 \pm 0.19	14.60 \pm 3.32	103 \pm 12
ピオーネ	3.72 \pm 1.73	6.44 \pm 2.83	53.2 \pm 14.6
桃太郎ぶどう	0.09 \pm 0.02	3.77 \pm 0.84	10.5 \pm 1.6
マスカット	0.07 \pm 0.02	0.32 \pm 0.09	0.95 \pm 0.20

ぶどうの種類	実の含有量 (mg/g)		
	アントシアニン	フラボノイド	ポリフェノール
巨峰	0.018±0.004	0.189±0.037	0.552 ± 0.100
ピオーネ	0.022±0.002	0.200±0.063	0.528 ± 0.081
桃太郎ぶどう	0.003±0.001	0.099±0.021	0.327 ± 0.072
マスカット	0.001±0.001	0.063±0.024	0.218 ± 0.026

実と比べ皮部にポリフェノールが多く含まれていた。ポリフェノール量の中では、アントシアニン量よりフラボノイド量が多かった。また、ポリフェノール濃度と、フラボノイド、アントシアニン濃度には、それぞれ正の相関がみられた。皮部での相関係数は $\gamma=0.92$ と $\gamma=0.96$ であった(図 2A)

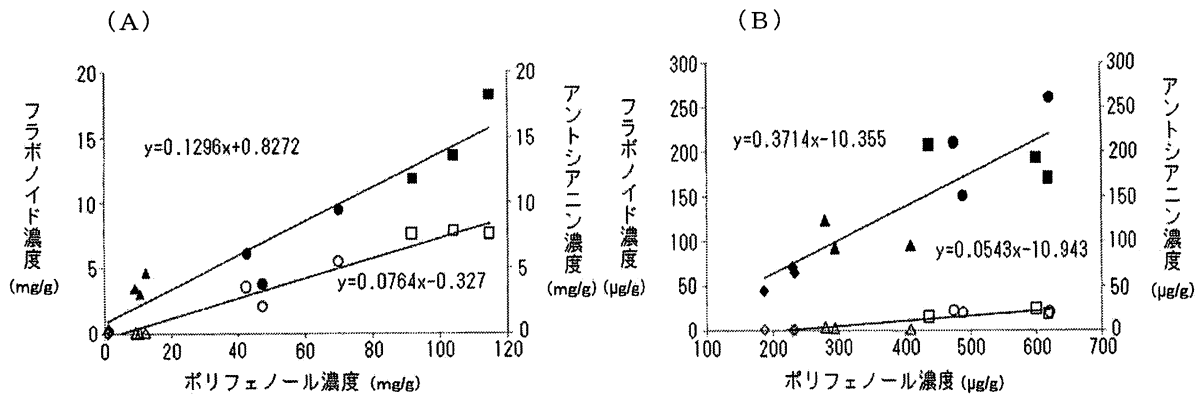


図 2 ぶどう皮部(A), ぶどう実部(B)に含まれるフラボノイド量・アントシアニン量とポリフェノール量
 黒色記号はフラボノイド, 白色記号はアントシアニン. 巨峰 (四角 ■, □), ピオーネ (丸 ●, ○), 桃太郎ぶどう (三角 ▲, △), マスカット (菱 ◆, ◇).

3-2 ぶどうの皮・実に含まれるカテキン, エピカテキンの分析

フラボノイドの1つであるカテキン, エピカテキンを HPLC-ESI/MS した. カテキンの保持時間 13.8 分で, 質量分析スペクトル (MS) は m/z 289 ($M-H^+$, 100%) であった. エピカテキンは 16.4 分に溶出され, MS は m/z 289 ($M-H^+$, 100%) であった. m/z 289 のマスクロマトグラムより各検量線を作成し, カテキン量とエピカテキン量を算出した.

表 2 ぶどうの皮・実に含まれるカテキン, エピカテキン含量

ぶどうの種類	皮部の含有量 (μg/g)		実の含有量 (μg/g)	
	カテキン	エピカテキン	カテキン	エピカテキン
巨峰	0.99 ± 0.11	1.35 ± 0.88	1.23 ± 0.46	4.78 ± 2.03
ピオーネ	5.16 ± 2.28	11.48 ± 3.32	2.12 ± 0.72	4.50 ± 1.40
桃太郎ぶどう	3.12 ± 2.27	11.48 ± 6.14	0.15 ± 0.03	5.98 ± 0.69
マスカット	2.14 ± 0.53	1.22 ± 0.35	0.36 ± 0.22	0.20 ± 0.07

ぶどうの実と皮部を比較すると, 巨峰を除いてポリフェノールと同様に皮部にカテキン類が多く含まれていた.

3-3 ぶどうの皮・実に含まれるスチルベン化合物の分析

トランス-レスベラトロールとトランス-ピセイドはそれぞれ 306 nm に吸収極大を持っている. HPLC 分析では 306 nm の吸光度で検出した. ぶどうに含まれる量が極めて低いことと, 光による異性化で生じるシステを検出するため, LC-MS で高感度に分析を行った(6). トランス-レスベラトロールのマスマスペクトルは m/z

227(M-H⁺, 100%), 228(24), トランス-ピセイドは m/z 389(M-H⁺, 21%), 228(17), 227(100)にピークを示した. m/z 227 でマスクロマトグラムを行うと, トランス-レスベラトロールは 22.6 分、シス-レスベラトロールは 23.7 分, トランス-ピセイドは 19.6 分, シス-ピセイドは 21.8 分それぞれ溶出された. m/z 227 のピーク強度で, 検量線を描きトランス-レスベラトロールとトランス-ピセイドを定量した. シス-レスベラトロールとシス-ピセイドはそれぞれのトランス体の検量線を使い定量した.

表3 ぶどうの皮・実に含まれるレスベラトロールとピセイド含量

	皮部の含有量 ($\mu\text{g/g}$)			
	トランス-レスベラトロール	シス-レスベラトロール	トランス-ピセイド*	シス-ピセイド*
巨峰	<0.107	<0.107	0.045±0.004	0.910±0.149
ピオーネ	<0.099	<0.099	0.179±0.060	<0.018
桃太郎ぶどう	<0.269	<0.269	2.801±0.290	58.103±11.140
マスカット	12.253±2.897	2.535±0.110	2.833±0.118	24.745±2.682

	実の含有量 ($\mu\text{g/g}$)			
	トランス-レスベラトロール	シス-レスベラトロール	トランス-ピセイド*	シス-ピセイド*
巨峰	<0.019	<0.019	<0.003	<0.003
ピオーネ	<0.019	<0.019	<0.003	<0.003
桃太郎ぶどう	<0.019	<0.019	0.110±0.028	0.161±0.026
マスカット	<0.019	<0.019	<0.003	0.046±0.005

(<定量下限, S/N =3)

レスベラトロールとその配糖体(ピセイド)のトランスおよびシス異性体が検出された. スチルベン化合物は黒ぶどうより白ぶどうに多く含まれ, 実より皮部に多く含まれていた.

4. 考察

ぶどうに含まれるポリフェノールが注目されている理由の1つに, フレンチパラドックス (French Paradox)が挙げられる. フレンチパラドックスは, フランス人が飽和脂肪酸を多量に含むバターや肉などの食物を多食しているにも関わらず, 赤ワインを多飲することにより, 心臓血管病, 高血圧, 高脂血症などが少ないことを言う. これは, ワイン中のポリフェノールの効果とされている. 本研究でポリフェノールとその構成成分であるアントシアニン, フラボノイド, カテキン, スチルベン化合物を分析した(図1).

ポリフェノール, フラボノイド, アントシアニンの結果を(表1)に示す. 皮部と実を比較すると, 皮部には, それらが実部に比べて約100倍近く高濃度であった. 一方, 色の濃い黒ぶどうではポリフェノール, アントシアニン, フラボノイドの濃度が高く, 色の薄い白ぶどうでは全て低濃度であった. また, 種を超えて, ポリフェノール濃度と, フラボノイド, アントシアニン濃度には, 正の相関がみられた(図2). これは黒ぶどうのアントシアニン調節遺伝子の突然変異が起ったことで白ぶどうができた(10)と推定されているので, その遺伝子調節はアントシアニンの生合成の上流にあるフラボノイドの生合成経路より更に上流で起こっていると考えられた(図3).

フラボノイドに含まれる化合物カテキン類については, 黒ぶどうの巨峰では皮部と実のカテキン濃度が逆転していた. 実と皮部の重量比が約9であることを考慮すると, 巨峰にも多く含まれると推定された(表2). また, ぶどうの種類によりエピカテキンとカテキンの割合も皮部では0.57-3.68, 実では0.56-39.9と大きく変動していた. このことはフラボノイドの各成分では, 種の違いにより成分濃度および果実での分布が異なる可能性があることが示された.

続いて, ポリフェノールの1つであるスチルベン化合物については, ポリフェノール総量から予想される結果と逆になり, 白ぶどうの皮部に多く含まれていた. また, このレスベラトロールとピセイドはイタドリ根ではシス異性体が僅か検出されただけである(6)が, ぶどうでは遮光条件で分析したにもかかわらず高濃度のシス異性体が検出された. 更に, レスベラトロールのトランス体/シス体の比とピセイドの比を較べると,

例外もあるが、シス異性体が多く検出された。これは、*in vitro* の光による異性化反応ではレスベラトロールよりピセイド(配糖体)の方が速やかに起こることから、果実に蓄積されたレスベラトロール、ピセイドが光によりシス体に異性化したと説明できる。また、白ぶどうにレスベラトロールが多く含まれることから、ぶどうのアントシアニン生合成調節遺伝子はジスチルベンの生合成経路への枝分かれより下流で、生合成の調節を行っているかと推定できた(図3)。

以上の結果から、ぶどうの種類によりポリフェノール、アントシアニン、フラボノイド、スチルベン化合物の含有量に大きな違いがあることが明確になった。色の濃いぶどうはポリフェノール含有量が高いこと、色の薄いぶどうはポリフェノール含有量が低いとポリフェノールの1種であるスチルベン化合物を多く含むことが明確になった。ポリフェノールは栽培時の温度変化および乾燥度(乾燥ストレス)により影響されることも報告されている(11,12)こと、レスベラトロールは植物では防御化合物として働き動物に強い作用を持つと推定されることから更に詳細な分析が必要と考えている。

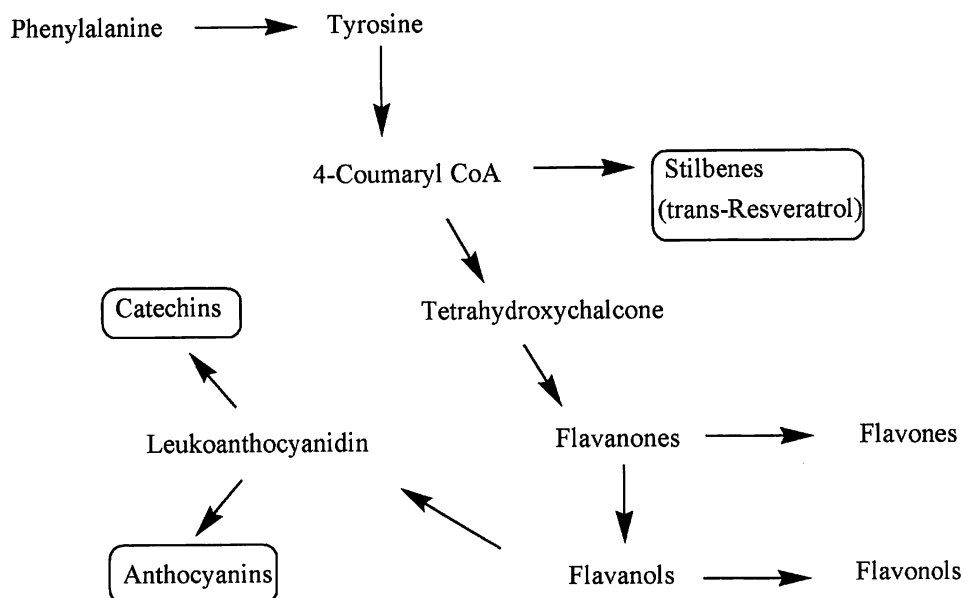


図3 ポリフェノールの生合成経路

5. 謝辞

本研究の一部は文部科学省学術高度化推進事業「社会連携研究推進事業」岡山理科大学「地域社会とのコラボレーションによるQOL向上の一体的アプローチ」研究の一環として行った。

6. 文献

- 1) 浜田博喜, 益岡典芳, ピオーネ皮成分の機能性物質の分離と生理機能の解析: 新素材の開発 第6回「バイオアクティブおかやま」セミナー抄録 2004, pp.5-6.
- 2) H. Kawanishi, H. Hamada, N. Masuoka, Activation factors of antioxidant enzyme activity in a purple sweet potato and piono: application of functional estimation methods for foods. *Okayama Rika Daigaku Kiyo*, (2005), 41 A, 23-31.
- 3) N. Masuoka, D.H. Wang, M. Kogashiwa, K. Miyashita, T. Nakaie, K. Ishihara, H. Hamada, The effect of juice made from Pione grape-skin extract. *Okayama Rika Daigaku Kiyo*, (2007), 43 A, 33-39.
- 4) J. Oyama, T. Maeda, K. Kouzuma, R. Ochiai, I. Tokimitsu, Y. Higuchi, M. Sugano, N. Makino. Green tea catechins improve human forearm endothelial dysfunction and have antiatherosclerotic effects in smokers. *Circ. J.*, (2010), 74(3), 578-88.

- 5) K. Shimizu, N. Kinouchi Shimizu, W. Hakamata, K. Unno, T. Asai, N. Oku. Preventive effect of green tea catechins on experimental tumor metastasis in senescence-accelerated mice. *Biol. Pharm. Bull.*, (2010), 33(1), 117–121.
- 6) T. Okada, Y. Konishi, K. Ishihara and N. Masuoka, *Cis-trans* isomerization of stilbene compounds and their content in *Polygonum cuspidatum* (Polygonaceae), *Naturalistae*, (2009), 14, 17-21.
- 7) Y. Chukwumah, L. Walker, B. Vogler and M. Verghese, Changes in the phytochemical composition and profile of raw, boiled, and roasted peanuts. *J. Agric. Food Chem.*, (2007), 55, 9266–9273.
- 8) D. Burdulis, L. Ivanauskas, V. Dirse, S. Kazlauskas, A. Razukas, Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *Medicina (Kaunas)*, (2007), 43 (12), 971–977
- 9) C.B.Nasr, N. Ayed, and M. Metche, Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Z. Lebensm Unters Forsch.*, 203, 374-378 (1996)
- 10) A.R. Walker, E. Lee, J. Bogs, D.A. McDavid, M.R. Thomas, S.P. Robinson, White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *Plant J.*, (2007), 49(5), 772-785.
- 11) K. Mori, S. Sugaya and H. Gemma. Changes in the coloration and activities of enzymes involved in anthocyanin synthesis of “Kokuo” grapes grown under different temperature conditions during ripening. *Hort. Res.(Japan)* (2004), 3, 209-214.
- 12) H. Ojeda, C. Andary, E. Kraeva, A. Carbonneau and A. Deloire, Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Amer. J. Enol. Vitic.* (2002), 53, 261-267.

Analysis of several polyphenol compounds in grapes cultured in Okayama Prefecture

Noriyoshi MASUOKA, Kouhei KURODA*, Takehiko OKADA*,

Maki HASHIMOTO and Kohji ISHIHARA

Department of Life Science, Faculty of Science,

**Graduate School of Science,*

Okayama University of Science,

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama, 700-0005, Japan

(Received September 27, 2010; accepted November 9, 2010)

Polyphenols in grapes consisted of flavonoids, anthocyanins, stilbenes and so on. We examined contents of polyphenols in several kinds of grapes cultured in Okayama Prefecture. When contents of anthocyanins, flavonoids and polyphenols in fruit of grapes were compared with those in skin of grapes, all contents in skin of grapes are generally higher than these in fruit. Their polyphenol contents in red (colored) grapes are higher than these in white (colorless) grapes. Furthermore, there are positive correlations between polyphenol contents and anthocyanin contents or flavonoid contents. Using LC-MS, catechin and stilbene contents in these grapes were examined. Interestingly, *trans*- and *cis*-isomers of resveratrol and piceid are detected and are rich in skin of white grapes.

Keywords: polyphenols; catechins; resveratrol; grapes.