

ワインに含まれるポリフェノールの抗酸化能

石 沢 信 人¹⁾, 杉 田 収¹⁾, 中 野 正 春¹⁾,
松 戸 隆 之²⁾, 岡 田 正 彦²⁾

新潟県立看護短期大学¹⁾, 新潟大学医学部検査診断学教室²⁾

Antioxidant activities of polyphenols contained in wine

Nobuhito ISHIZAWA¹⁾, Osamu SUGITA¹⁾, Masaharu NAKANO¹⁾,
Takayuki MATSUTO²⁾, Masahiko OKADA²⁾

Niigata College of Nursing¹⁾,
Department of Laboratory Medicine, Niigata University School of Medicine²⁾

Summary Using CHP / Hb·MB method, we measured antioxidant activity of red wine (6 varieties), white wine (7 varieties) and polyphenol (8 varieties). The main points are briefly summarized in the following outline.

1. Wine had high level of antioxidant activity, and not always red wine had antioxidant activity higher than white wine.
2. CHP / Hb·MB method could measure the antioxidant activity of polyphenols contained in wine.
3. Antioxidant activity of polyphenols depended on the number of hydroxyl group in their molecules within the same classification.

要 約 生活習慣病との関連で抗酸化能への関心が高まっている。しかし、抗酸化能の測定法は標準化されていない。私どもはクメンヒドロペルオキシド／ヘモグロビン・メチレンブルー（CHP / Hb·MB）法により赤ワイン6銘柄と白ワイン7銘柄、ポリフェノール類8種類の抗酸化能を測定し、下記のような結論を得た。

- (1) ワインは、常に赤ワインが白ワインよりも高い抗酸化能を持つとは限らない。
- (2) CHP / Hb·MB 法によりポリフェノール類の抗酸化能が測定できる。
- (3) ポリフェノール類の抗酸化能の序列が、同一骨格を持つグループ内では、分子中の水酸基の数に依存する。

Key words クメンヒドロペルオキシド／ヘモグロビン・メチレンブルー法
(cumene hydroperoxide / hemoglobin·methylene blue method)
抗酸化能 (antioxidant activity)
ワイン (wine)
ポリフェノール (polyphenol)

1. はじめに

現在、大気約 21% を占めている酸素は反応性に富む化学成分であり、生物は酸素のこの性質を利用して効率の高い代謝を行い生物学的エネルギーを得ている。この過程で生体内に活性酸素が生成される。また、非生物学的な物理的要因によっても活性酸素が生じる。つまり生物は活性酸素が存在する環境で生存しなければならないために、抗酸化能を発達させたと考えられている。植物は光合成を行うので、種々の抗酸化物質を自ら生成する。動物は食事を介してこれらを体内に取り込み、自らの内因性抗酸化機構と組合わせて生体の抗酸化能を維持している¹⁾。

一方、先進国における主な死因は循環器系疾患と悪性新生物(図1)²⁾であり、これらの疾患と活性酸素との関連が指摘された。また、循環器系疾患と脂肪摂取量および過酸化脂質との関連も指摘されている。しかし、フランスの死亡率のデータは、これらからは説明できずフレンチ・パラドックス³⁾と称された。そこでフランス人のライフスタイルが注目され、ワインの抗酸化能について多くの報告がなされた^{5, 7-12)}。

私どもはクメンヒドロペルオキシド/ヘモグロビン・メチレンブルー (CHP / Hb·MB) 法⁴⁾により

アルコール飲料と非アルコール飲料の抗酸化能、さらにワインに含まれる亜硫酸ナトリウムとワインの抗酸化能の経時的変化を報告した⁵⁾。また CHP / Hb·MB 法はアスコルビン酸と α -トコフェロールの抗酸化能を測定することが報告されている^{4, 5)}ので、今回は、CHP / Hb·MB 法を用いてワイン 13 銘柄とそこに含まれる抗酸化物質であるポリフェノール類のうち 8 種類の抗酸化能を測定し、若干の知見を得たので報告する。

2. 測定方法

CHP / Hb·MB 法は既報^{4, 5)}の通り、簡便に試料の抗酸化能を測定できる方法である。測定に必要な器具は恒温槽、分光光度計、マイクロピペット、1 mL 用と 2 mL 用の分注器、ストップウォッチである。試薬は協和メディックスより市販されている試薬キットであるデタミナー LPO を用いた。光による測定中の活性酸素生成を最小限にするために、できる限り室内を暗くして測定した。

(1) 測定原理

CHP / Hb·MB 法はデタミナー LPO を利用して、試料の持つ全抗酸化能 (Total Antioxidant

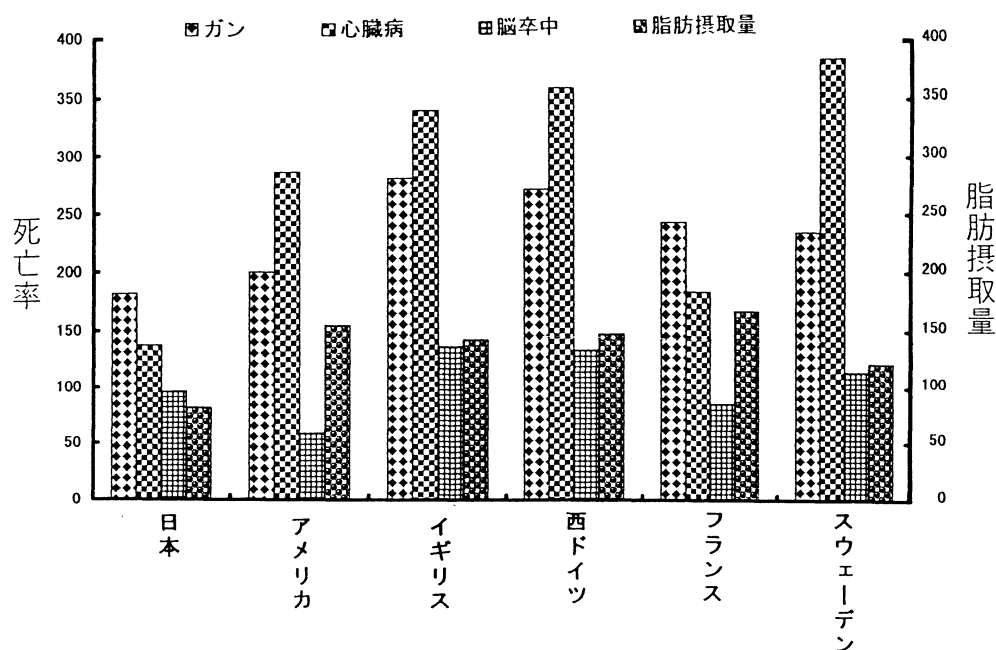


図1 主要6カ国の死亡率と脂肪摂取量(文献2)より作成)

先進6カ国の対人口10万人あたりの3大死因(悪性新生物, 心臓病, 脳卒中)による死亡率と脂肪摂取量を示した('88~'90年)。
縦軸(左)は死亡率を示す。
縦軸(右)脂肪摂取量(g/day)を示す。

Capacity ; TAC) を測定する方法である。

ヒドロペルオキシドとメチレンブルー誘導体がヘモグロビンを触媒として反応すると、メチレンブルーがヒドロペルオキシドと等モル生成する。生成したメチレンブルーの呈色の程度を分光光度計で測定すると、試料中に存在していたヒドロペルオキシドのモル数が求められる。分光光度計で測定する波長は 675nm である。このようにして血清中の過酸化脂質の定量を行う方法が Hb-MB 法⁶⁾ であり、その測定試薬キットとしてデタミナー LPO は市販されている。

CHP / Hb-MB 法はデタミナー LPO に添付される CHP 標準液 50.0nmol/mL を用いて、試料が還元した CHP の量を定量する方法であり、この試料の持つ CHP に対する還元能を、その試料の抗酸化能とみなしている。

(2) ワインの抗酸化能の測定方法

ワインの抗酸化能を CHP / Hb-MB 法で測定する方法は以下の通りである。まずワインを蒸留水で 10 倍に希釈する。試験管は盲検用、標準用、検体用それぞれに 2 本ずつ準備する。

盲検用試験管に 100 μ L ずつ蒸留水をマイクロピペ

ットを用いて入れる。標準用試験管と検体用試験管には、それぞれ蒸留水と試料を 30 μ L ずつ同一のマイクロピペットを用いて入れる。次に、標準用試験管と検体用試験管には CHP 標準液を 70 μ L ずつ同一のマイクロピペットを用いて入れる。

これらの試験管はすべてパラフィルムで封印し、サーモミキサーを用いて攪拌する。その後、30℃で 2 時間加温する。

試験管からパラフィルムを取り除き、前処理液を 10 秒間隔で分注器を用いて 1 mL ずつ各試験管に添加する。そして、サーモミキサーで攪拌した後に、恒温槽に戻す。その後 5 分間の加温を行う。

前処理液を加えた順番で、発色液を分注器を用いて 2 mL ずつ試験管に添加する。このときも、試薬の分注間隔を 10 秒間に統一する。そして、サーモミキサーで攪拌した後に、恒温槽に戻す。発色液添加後の加温時間は 10 分間である。

加温を終えたら、分光光度計で吸光度の測定を行う。測定する波長は 675nm である。この時も 10 秒間隔で測定を行う。

測定に使用したワインは表 1 に示した。赤ワインは 6 銘柄 6 本、白ワインは 7 銘柄 7 本であった。

表 1. ワインの抗酸化能

赤 ワ イ ン (nmol/ml)				白 ワ イ ン (nmol/ml)		
国産 (新潟・新発田市) 1983 *	Tainai Wine	172		1983 *	Tainai Wine	147
国産 (新潟・上越市)	岩の原ワイン菊水印	267			岩の原ワイン菊水印	210
国産 (新潟・巻町)	1997 CAVE D'OCCI MAKI	219		1997	CAVE D'OCCI MAKI	312
イタリア	1996 CHIANTI RUHHINO	206		1996	FALESCO	238
カリフォルニア	1995 PETERSON	251		1993	SANFORD CHARDONNAY	147
フランス	1991 SORDEAUX SUPERIEUR	268		1994	BORDEAUX BLANC	216
南アフリカ				1996	CAPELANDS	315
平 均		230.5				226.4

CHP / Hb-MB 法で測定した赤ワイン 6 銘柄 6 本、白ワイン 7 銘柄 7 本の抗酸化能を示した。

単位は nmol/mL。

*: ワインのラベルに表示されていた西暦年数。

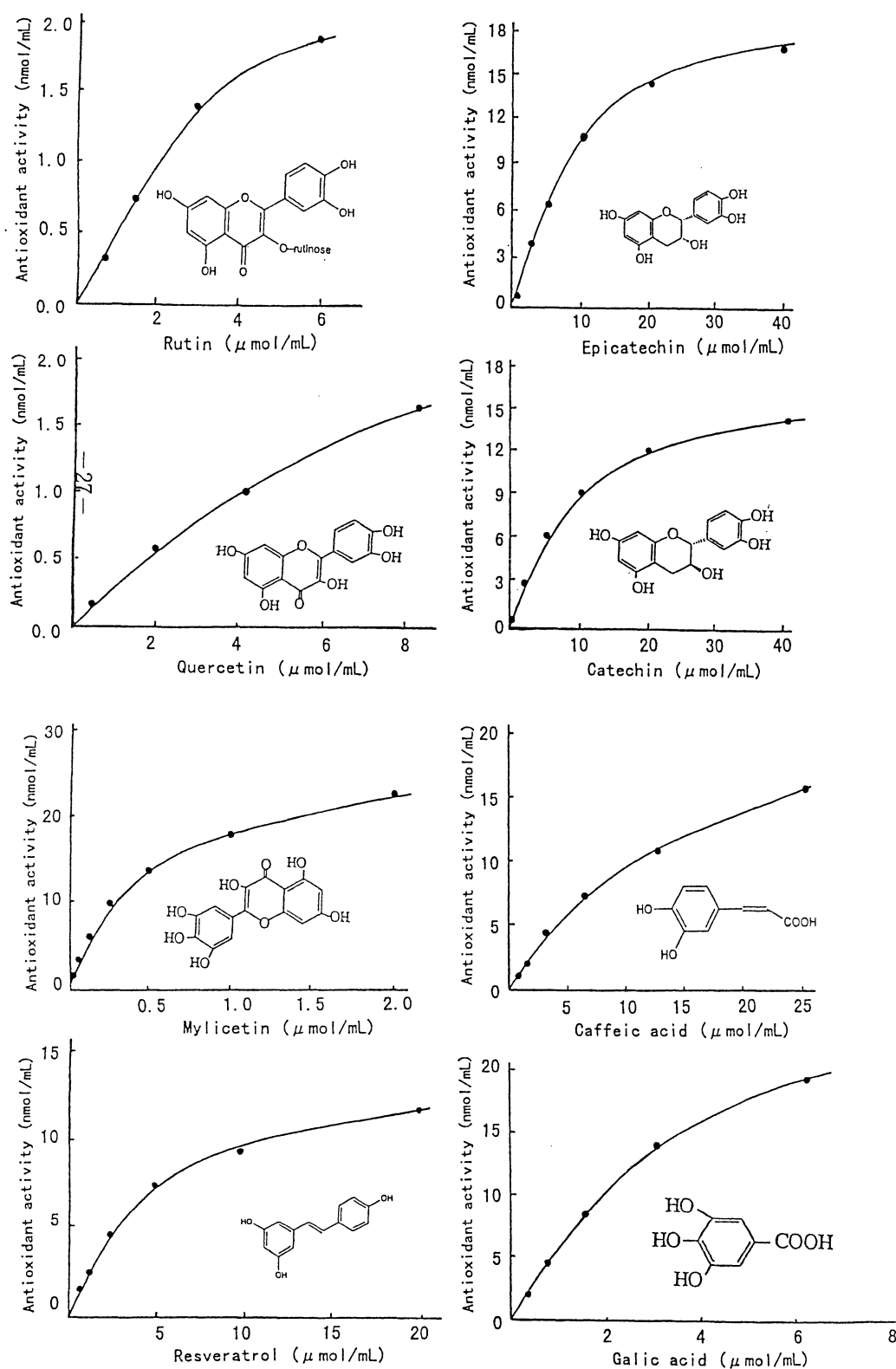


図2 ポリフェノール類の抗酸化能

ワインに含有されていることが明らかにされているポリフェノール類のうち入手できたものについてその抗酸化能を CHP / Hb・MB 法で測定した結果を図示した。
縦軸は抗酸化能を nmol/ml で表示。
横軸は溶液の濃度を $\mu\text{mol/ml}$ で表示。

(3) ポリフェノール類の抗酸化能の測定法

ワインに含まれる既知のポリフェノール類⁷⁾のうち、入手できたもの（カテキン、エピカテキン、没食子酸、ルチン、クエルセチン、ミリセチン、カフェイン酸、レスベラトロール）をメタノールで溶解して7～4濃度系列に溶液を調整した。それぞれ、7濃度系列にはカテキン（ $\leq 40 \mu\text{mol/mL}$ ）、エピカテキン（ $\leq 40 \mu\text{mol/mL}$ ）、ミリセチン（ $\leq 2.0 \mu\text{mol/mL}$ ）の3種類、6濃度系列にはカフェイン酸（ $\leq 25 \mu\text{mol/mL}$ ）、レスベラトロール（ $\leq 20 \mu\text{mol/mL}$ ）の2種類、5濃度系列には没食子酸（ $\leq 6 \mu\text{mol/mL}$ ）、ルチン（ $\leq 30 \mu\text{mol/mL}$ ）の2種類、4濃度系列にはクエルセチン（ $\leq 2.0 \mu\text{mol/mL}$ ）の1種類とした。この溶液の抗酸化能を CHP / Hb・MB 法で測定した。

3. 測定結果

CHP / Hb・MB 法で測定した赤ワイン6本と白ワイン7本の抗酸化能を表1に示した。赤ワインの抗酸化能は172 nmol/mL から268 nmol/mL、平均230.5 nmol/mLであった。白ワインの抗酸化能は147 nmol/mL から315 nmol/mL、平均226.4 nmol/mLであった。赤ワインが白ワインよりもわずかに高い抗酸化能を示したが、有意な差ではなかった。

ワイン中に含まれていることが明らかなポリフェノール類のうち、8種類の物質の構造式と、抗酸化能を測定した結果を図2に示した。これらの化合物の抗酸化能が CHP / Hb・MB 法で測定できた。これらの化合物を分子構造に同一骨格を持つグループに

まとめるとフラボノール類、タンニン類、シンプルフエノール類、その他の4つに分けられた。これらの化合物1 $\mu\text{mol/mL}$ あたりの抗酸化能を表2に示した。

フラボノール類はミリセチン、クエルセチン、ルチンである。ミリセチン1 $\mu\text{mol/mL}$ あたりの抗酸化能は18.0 nmol/mLであった。ミリセチン分子の水酸基1個が水素に置換されたものがクエルセチンである。クエルセチン1 $\mu\text{mol/mL}$ あたりの抗酸化能は3.8 nmol/mLであった。また、クエルセチン分子の1個の水酸基中の水素が rutinose に置換されたものがルチンである。ルチン1 $\mu\text{mol/mL}$ あたりの抗酸化能は0.4 nmol/mLであった。

タンニン類はエピカテキンとカテキンであるが、これらは互いにジアステレオマーといわれる異性体であり、水酸基1個の立体配置が異なっている。エピカテキンとカテキンの1 $\mu\text{mol/mL}$ あたりの抗酸化能はそれぞれ1.1 nmol/mL、1.0 nmol/mLであった。

シンプルフエノール類は没食子酸とカフェイン酸である。没食子酸1 $\mu\text{mol/mL}$ あたりの抗酸化能は5.0 nmol/mLであった。没食子酸分子中のフェノール環と結合する水酸基1個が水素と置換され、カルボキシル基とフェノール環の間に炭素2個が付加されたものがカフェイン酸である。カフェイン酸の1 $\mu\text{mol/mL}$ あたりの抗酸化能は1.2 nmol/mLであった。

その他はレスベラトロールである。レスベラトロール1 $\mu\text{mol/mL}$ あたりの抗酸化能は1.8 nmol/mLであった。

表2：ポリフェノール類の水酸基数と抗酸化能

分 類	物 質	水酸基数	抗酸化能
フラボノール類	ミリセチン	6	18.0
	クエルセチン	5	3.8
	ルチン	4	0.4
タンニン類	エピカテキン	5	1.1
	カテキン	5	1.0
シンプルフエノール類	没食子酸	3	5.0
	カフェイン酸	2	1.2
その他	レスベラトロール	3	1.8

試料に用いたポリフェノール類のそれぞれ1分子中に含まれる水酸基の数と CHP / Hb・MB 法で測定した抗酸化能を示した。抗酸化能は各物質1 $\mu\text{mol/mL}$ あたりの測定結果を示した。抗酸化能の単位は nmol/mL。

4. 考 察

ワインにはぶどうに由来する種々の物質が含まれている。一般に植物は活性酸素を効率よく処理する機構を持っているので、ぶどうも同様であると考えられた。ワインに含まれる事が確認されている抗酸化物質にはカテキン、エピカテキン、没食子酸、シアニジン、マルビジン-3-グルコシド、ルチン、クエルセチン、ミリセチン、レスベラトロール、カフェイン酸といったポリフェノール類があり、カテキンと没食子酸がワインの抗酸化能に大きく寄与していると考えられた⁸⁾。

我々はこれらのポリフェノール類のうち入手できた8種類の物質について CHP / Hb・MB 法により抗酸化能を測定した。シアニジンとマルビジン-3-グルコシドは入手できなかった。

これらの測定結果から、それぞれの物質の抗酸化能は、基本骨格が同一の化合物間では分子中の水酸基の数に依存すると考えられた(表2)。フラボノール類のうち最も抗酸化能が高かった物質はミリセチンであり6個の水酸基を持ち、ついでクエルセチンは5個、ルチンは4個の水酸基を持っている。タンニン類であるエピカテキン、カテキンは互いにジアステレオマーなので水酸基の数は同じであり、その抗酸化能もほぼ同じであった。シンプルフエノール類である没食子酸は3個の水酸基を持ち、2個の水酸基を持つカフェイン酸より高い抗酸化能を示した。その他に分類されたレスベラトロールは3個の水酸基を持っている。

このように、同じ基本骨格を持つ物質が、分子中の水酸基の数によって異なる抗酸化能を示したことは、非常に興味深いことである。

赤ワインと白ワインの製法の違いが、両者の抗酸化能が違う原因といわれている。すなわち、赤ワインが高い抗酸化能を持つのは果皮や種子も原料に用いるため、すなわち果皮にポリフェノール類などの抗酸化物質が多く含まれているためだと思われる。しかし、私どもの測定結果は恒常的に赤ワインが白ワインよりも高い抗酸化能を持つとは限らないことを示した。白ワインが赤ワインよりも高い抗酸化能を持ち得ることを支持する報告は、赤ワインが白ワインよりも高い抗酸化能を有するとする報告に比べて少ない⁸⁾。この結果の差違が何を意味しているのかについては、今後検討が必要であろう。

ワインが高い抗酸化能を有するという知見は、我々

の実験結果からも支持された。ワインを生体に負荷すると、被検者の血清抗酸化能が負荷後に向上すること⁸⁻¹²⁾やレスベラトロールが cancer chemopreventive activity を有する¹³⁾との報告がある。これらの報告は食生活と生活習慣病との関係を考えるうえで興味深い知見である。しかし、抗酸化能と疾病経過の定量的成績は現在までのところ得られていない。これは、抗酸化能の測定方法が標準化されていないことも関係していると思われ、我々の用いた CHP / Hb・MB 法についても、その限界を明らかにすることが必要である。活性酸素が関与する疾病の臨床経過と抗酸化能の関連を明らかにすることも今後の課題である。

5. 結 論

以上のことより次のことが結論される。

1. CHP / Hb・MB 法によりワインの抗酸化能が測定でき、常に赤ワインが白ワインよりも高い抗酸化能を有するとは限らない。
2. CHP / Hb・MB 法はワイン中に含まれるポリフェノールの抗酸化能を測定している。
3. ポリフェノール類の抗酸化能は、同一骨格を持つグループに属する物質間での序列は分子中の水酸基の数に依存する事が示唆された。

本研究は本学共同研究研究費より助成を受けたものであり、ここに感謝申し上げます。また、本研究の一部成果を第16回日本臨床化学会甲信越支部総会(1998年6月6-7日、新潟県妙高高原町)において発表した。

文 献

- 1) Woodford F.P., Whitehead T.P.: Is measuring serum antioxidant capacity clinically useful?, *Ann Clin Biochem*, 35, 48-56, 1998.
- 2) 国立社会保障・人口問題研究所 編: 人口の動向 日本と世界, 89, 1997.
- 3) Renaud S, de Lorgeril M: Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet*, 339, 1523 - 1526, 1992.
- 4) 杉田 収, 中野正春, 松戸隆之, 他: クメンヒドロペルオキシドを用いたヒト血漿抗酸化能の測定, *臨床病理* 46, 271-276, 1998.
- 5) 石沢信人, 杉田 収, 斎藤秀晃, 他: ワインと各種飲料物の抗酸化能, *新潟県立看護短期大学紀要*, 第3巻, 3-8, 1997.

- 6) Ohishi N, Ohkawa H, Miike A, et al: A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative, *Biochem Int*, 10, 205 - 211, 1985.
- 7) Miller NJ, Rice-Evans CA: Antioxidant activity of resveratrol in red wine, *Clin Chem*, 41, 1789, 1995.
- 8) Struck M, Watkins T, Tomeo A, et al: Effect of red and white wine on serum lipids, platelet aggregation, oxidation products and antioxidants: a preliminary report, *Nutr Res*, 14, 1811 - 1819, 1994.
- 9) Wickramasinghe SN, Hasan R, Khalpey Z: Differences in the serum levels of acetaldehyde and cytotoxic acetaldehyde-albumin complex after the consumption of red and white wine: in vitro effects of flavonoids, vitamin E, and other dietary antioxidants on cytotoxic complexes, *Alcohol Clin Exp Res*, 20, 799 - 803, 1996.
- 10) Abu-Amsha R, Croft KD, Puddey IB, et al: Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine, *Clin Sci* 91, 449 - 458, 1996.
- 11) Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, et al: Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum, *Clin Chem*, 41, 32 - 35, 1995.
- 12) Kondo K, Matsumoto A, Kurata H, et al: Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein with red wine, *Lancet*, 344, 1152, 1994.
- 13) Jang M, Cai L, Udeani GO, et al: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science*, 275, 218 - 220, 1997.