

ブドウ種子ポリフェノールのフリーラジカル捕捉活性

—酸性域における熱安定性—

北 尾 悟
寺 本 円 佳

I. 緒 言

ポリフェノールは「分子内に2つ以上のフェノール性水酸基をもつ植物成分の総称」と定義され、ほとんどの植物に含有されている。元々は光合成によって代謝生成された色素や苦味成分である。このポリフェノール化合物は多彩な機能性を有することが次々と報告され、5大栄養素(糖質・脂質・タンパク質・ビタミン・ミネラル)と食物繊維に次ぐ、第7の栄養素と呼ぶことが提唱されるに至っている。プロアントシアニジン(PA)はポリフェノールの中心的存在で、フラバノール骨格を持った縮合型タンニンである。PAは最も強力な抗酸化物の一つとして知られ、これまでにその抗酸化性に関する数多くの報告がある。これらの中にはPAがビタミンC(アスコルビン酸)、Eまたはベータカロチンよりはるかに強力な抗酸化物質であるという報告¹⁾もある。PAは様々な植物中に見いだされているが、ブドウ種子、ブドウ果皮、リンゴ未熟果実、柿渋、松樹皮などに、特に多く存在している。また「フレンチパラドックス」²⁾という言葉が一般に良く知られるように、赤ワインが心疾患の予防に良いとのことから赤ワインブームとなった。その赤い色素がPAである。本研究で用いたブドウ種子ポリフェノールは、ブドウ・ワイン工業の未利用副産物であるブドウ種子から熱水抽出により調製したものであり主成分はPAである³⁾。ブドウ種子ポリフェノールは、スーパーオキシドラジカル捕捉活性をはじめとする抗酸化活性を有することは既に知られており、この抗酸化作用に基づいて、機能性・生理機能・ヒトに対する効果なども調べられている。生体内の活性酸素・フリーラジカルによる酸化ストレスが、悪性新生物・脳血管疾患・心疾患を代表とする生活習慣病を引き起こす要因であることが知られており、これら活性酸素・フリーラジカルは、老化の一要因ともされ、アルツハイマー病・パーキンソン病などの疾病の引き金とも言われている⁴⁾。そこで、細胞膜を含む生体膜を酸化反応から守るため、活性酸素・フリーラジカルを捕捉・消去する物質を多く含有し、かつその活性が強い食品を摂取することにより、これらの疾病を予防することが予想される。その候補の一つとしてブドウ種子ポリフェノールに含まれているPAが有望視されている。

現在、PAは酸化防止剤や健康食品分野への利用が広がりつつあるが、食品素材として利用する場合、調理・加工に大きな影響を及ぼす熱ならびにpH処理に関する知見が見あたらなかった。そこで、我々は同じ水溶性の酸化安定剤として現在広く用いられているアスコルビン酸(AsA)と比較する形式で、ブドウ種子ポリフェノールの熱ならびにpHに対する安定性についてこれまで調べてきた。その結果、ブドウ種子ポリフェノールは熱および各種pH領域に対して非常に安

定であることを見いだした⁵⁾。ミネラルウォーターの pH 域である中性⁶⁾や、コンニャク製造時の pH 域であるアルカリ領域⁷⁾での熱に対する安定性を既に報告した。今回、酸性 pH 域における熱安定性について、同じく AsA と比較する形式でブドウ種子ポリフェノールを評価したので報告する。また、今回、ラジカル捕捉活性の指標として DPPH ラジカル捕捉活性とともに、違うラジカル種であるペルオキシラジカルを捕捉する活性も抗酸化性の指標として求めることとした。

II. 実験方法

1. 材 料

ブドウ種子ポリフェノールは、ブドウ (*Vitis vinifera* L.) 由来の全フラバノール含量が 96.0%、プロアントシアニジン含量が 88.9%の商品名グラヴィノールスーパー (GR-S) をキッコーマン株式会社より供試を受けた。アスコルビン酸 (AsA)、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH)、ルミノール、チトクローム *c* および、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール (Tris) はナカライテスク製特級試薬、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (Trolox) はアルドリッチ社製を使用した。また、2,2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩 (AAPH)、ほう砂は和光純薬より購入した。その他、試薬は特級グレードを用いた。

2. DPPH ラジカル捕捉活性の測定

Yamaguchi et al.⁸⁾の方法を一部改良して測定した。DPPH は比較的安定なラジカルで、不對電子を保持しているときには青紫の色調を帯びているが、不對電子をポリフェノールなどの捕捉物質などで引き抜かれると無色化する。517 nm の吸光度を測定することにより、その減少度から捕捉活性の割合を知ることが可能である。

実際には、アルミホイルを巻いて遮光した試験管に 0.4 ml の各種濃度の抗酸化剤水溶液と 1.6 ml の 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え、エタノールに溶解した 2.0 ml の 500 μ M DPPH 溶液を充分混合攪拌し、室温で捕捉反応を開始した。20 分経過後、517 nm の吸光度を測定し、ラジカル捕捉活性算出の数値とした。同様にして、抗酸化剤を溶解していない緩衝液に Tris 緩衝液と DPPH エタノール溶液を混合し、反応させたときの 517 nm の吸光度をコントロールとした。コントロールと各種抗酸化剤水溶液を用いた場合の 517 nm の吸光度の差を、同時に測定した各種濃度の水溶性トコフェロールの誘導体である Trolox の吸光度減少度を指標とし、Trolox 濃度換算の DPPH ラジカル捕捉活性 (μ mol Trolox eq.) として求めた。

3. AAPH ラジカル捕捉活性の測定

Harada et al.⁹⁾の方法を一部改良して測定した。AAPH は加温によりアルキルラジカルを発生する。この発生したラジカルをアルカリ条件下ルミノールを発光させる方法を用いた。この AAPH はラジカル発生量を温度により制御することが可能であり、実際に脂質過酸化の発生剤

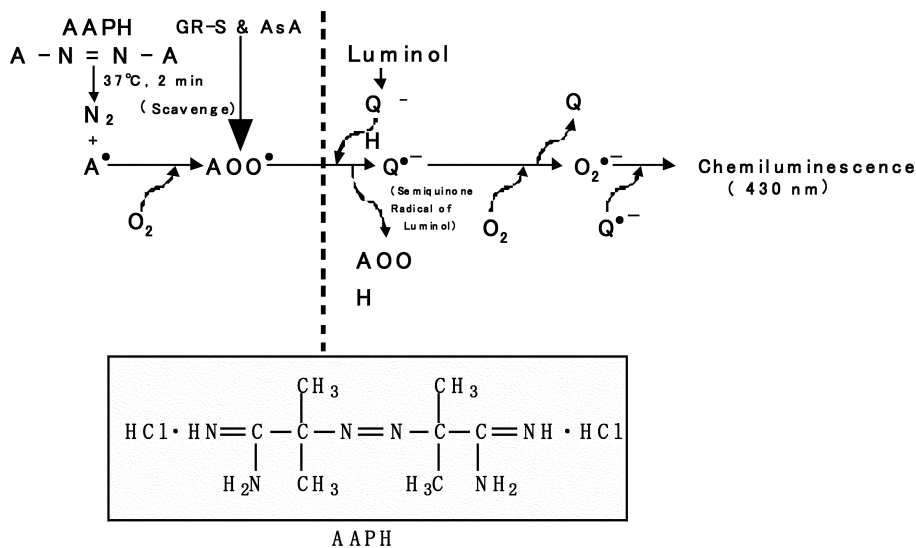


図1 AAPH ヒドロキシラジカル生成および化学発光反応

として広く評価されている。図1に示したように、AAPHは加温により窒素分子とその他のアルキル部分に分かれる。この現象は温度および時間依存性である。次に緩衝液中に溶存している酸素とアルキル部分が結合し、アルキルペル（A-O-O）ラジカルが発生する。その後、アルカリ条件下ルミノールの作用により、A-O-OHとセミキノラジカルが生じ、このセミキノラジカルが溶存酸素と反応し、スーパーアニオンラジカルへと変化する。最終的に、スーパーアニオンラジカル、セミキノラジカル、そしてルミノールが反応することにより発光（430 nm）する。もしAAPH加温時にラジカルを捕捉する物質、本研究ではブドウ種子ポリフェノールやアスコルビン酸など、が存在すると生じたA-O-Oラジカルを捕捉消去するため図1中の反応が停止し発光が起こらない。つまりラジカル捕捉能が強いほど発光量が抑制されることになる。

実際の手順は次の通りである。40 mMとなるよう100 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）にAAPHを溶解し、AAPH溶液を作製した。この溶液と適当な濃度に溶解したブドウ種子ポリフェノールあるいはアスコルビン酸のサンプル溶液を0.2 mlずつ混合し、37°C 2分間加温した。直ちにルミノール溶液0.2 mlを混合し、化学発光量を測定した。ルミノール溶液は、0.113 mMとなるようルミノールを、また0.004 mMとなるようチトクロームcを100 mMほう砂緩衝液（pH 9.28）に溶解した液、水、そしてメタノールの混合溶液（体積比 9:1:30）である。最終的なAAPH、ルミノール、チトクロームcの濃度は各々13.333、0.038、そして0.001 mMとなる。化学発光量は、キッコマン社製フォトンカウンターであるルミテスターC-100を用いて測定した。発光量の単位はRelative Light Unit (RLU)である。1 RLUは1秒間に43フォトンを生ずる量に相当する。

4. 安定化試験

抗酸化剤を溶解する緩衝液は、pH緩衝能範囲が広い3,3-ジメチルグルタル酸、Tris、2-ア

ミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール (GTA) を用いた。50 mM GTA 緩衝液 (pH 4.0) に 100 ppm となるよう溶解した抗酸化剤溶液 3 ml を 20 ml 容ガラス製バイアルビンに入れ、各温度に指示された時間まで保持し、サンプリングした溶液の DPPH あるいは AAPH ラジカル捕捉活性を測定した。

III. 結果

1. 各種ラジカルに対するブドウ種子ポリフェノールとアスコルビン酸の阻害活性

DPPH あるいは AAPH ラジカルを 50% 捕捉する濃度 (IC_{50}) を測定し、まとめたものが表 1 である。DPPH ラジカルに関する数値は既報⁵⁾より引用した。各種濃度の抗酸化剤に対する AAPH ラジカル捕捉活性を図 2 に示した。この結果が表 1 に反映されている。なお、GR-S は (+)-カテキンが C4-C8 結合した混合物であるが、重合度分布より概算した平均分子量 (2000) からモル数を計算した。

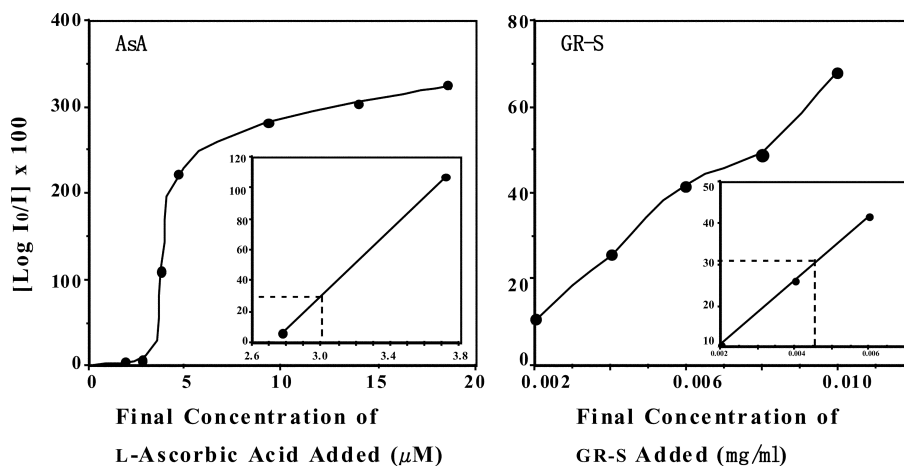


図 2 AAPH ヒドロキシラジカル捕捉活性に対する IC_{50} 値

表 1 ラジカルを 50% 捕捉する濃度

捕捉剤	ラジカル種	濃度	
		ppm	μM
GR-S	DPPH	7.14	3.57
AsA	DPPH	8.57	48.7
GR-S	AAPH	4.52	2.26
AsA	AAPH	0.54	3.07

その結果、GR-S、AsA とともに DPPH ラジカルより AAPH から発生するヒドロキシラジカルをよく捕捉することが判明した。AsA の DPPH ラジカルに対する IC_{50} 値は $48.7 \mu\text{M}$ であるのに対し AAPH 由来ヒドロキシラジカルに対するそれが $3.07 \mu\text{M}$ であった。ヒドロキシラジカルは生体脂質過酸化ラジカルを反映していることが示唆されており、より生体内の状態に近いこのラジカルに対して AsA は強くこのラジカルを捕捉することが判った。一方、GR-S は、DPPH

ラジカルに対する IC₅₀ 値が 3.57 μM であるのに対して AAPH 由来ヒドロキシラジカルに対するそれが 2.26 μM と両者に大きな違いが見られなかった。GR-S はラジカル種に関係なく捕捉活性を発現することが予想される。また両ラジカルに対して、AsA よりも GR-S の IC₅₀ 値が小さいことより、GR-S の優位性が示された。

2. 酸性 pH 領域における熱安定性

図 3 に pH 4.0 における DPPH ラジカル捕捉活性を指標とした熱安定性の結果を示した。この図は 0℃ から 100℃ の各温度に保持したときの捕捉活性の経時変化を表している。各々の試料液の試験スタート時、つまり、0 分時の DPPH ラジカル捕捉活性を 100% として相対値で示した。GR-S は 100℃ 5 時間処理後もほとんど活性を減少させなかったことから、非常に安定性が高いことが判明した。一方、AsA は 0℃ (水中) で 5 時間経過後も活性減少がほとんど見られなかったが、25、37℃ で約 20%、50℃ で約 30%、75℃ で約 40% の活性が減少した。そして 100℃ 5 時間処理では 90% 以上その捕捉活性を消失していた。中性からアルカリ pH 領域に比べると本研究で検討した酸性 pH 領域では AsA は安定であったが、GR-S に比べるといずれの pH 領域でも不安定であった。

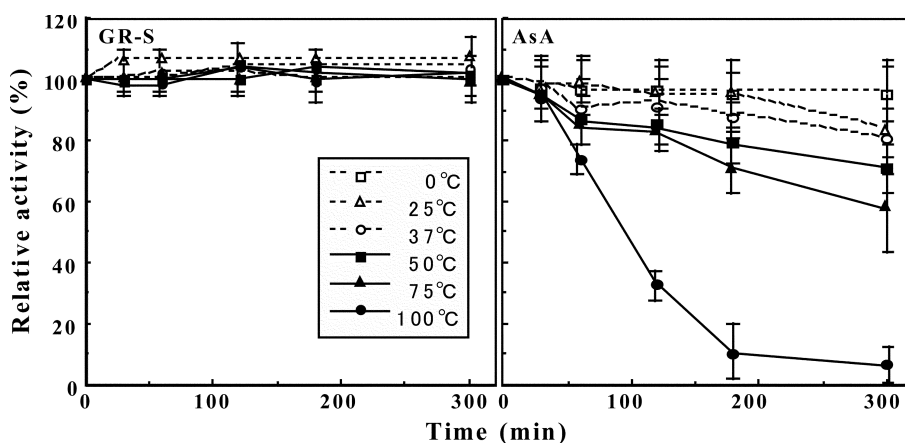


図 3 各温度における DPPH ラジカル捕捉活性の経時変化

図 4 は、pH 4.0 における各温度 30 分処理後の DPPH ラジカル捕捉活性を、0℃、30 分処理時の GR-S の活性を 100% として相対値で表したものである。その結果、30 分という比較的短時間の酸性処理では、GR-S、AsA にあまり大差がないように見えるが、ここでも GR-S は AsA よりも安定である傾向は明らかであった。

AAPH を加温して発生したヒドロキシラジカルを捕捉する活性に対する安定性を示したものが図 5 である。図 3 と同じく各々の試料液の試験スタート時、つまり、0 分時の AAPH ラジカル捕捉活性を 100% として相対活性で表したが、処理温度は 37℃ のみを掲示した。その結果、GR-S は DPPH ラジカルに対する結果 (図 3) と同様、5 時間経過後もほとんどその捕捉活性を失活させなかった。一方、AsA は 3 時間まではその活性をほぼ維持していたが、5 時間経過

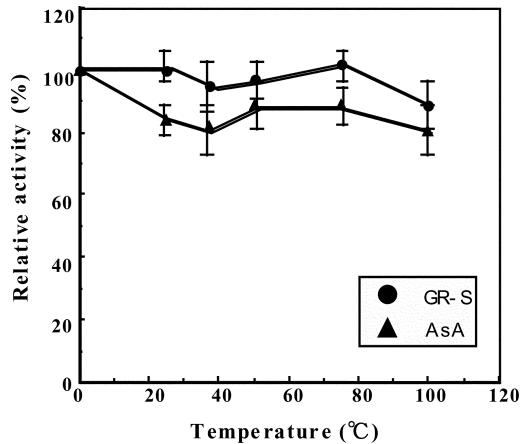


図4 各温度 30 分保持後の DPPH ラジカル捕捉活性の安定性

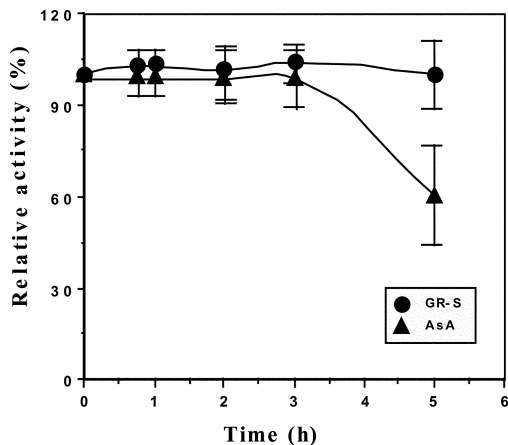


図5 AAPH ラジカル捕捉活性の経時変化

後では約 40% その活性を失っていた。DPPH ラジカルに対して AsA は 37°C 5 時間処理で約 20% 捕捉活性を減少させたが、AAPH 由来ヒドロキシラジカルはその約 2 倍である約 40% も活性を減少させていた。

IV. 考 察

PA が主成分であるブドウ種子ポリフェノール（商品名 GR-S）の酸性 pH 領域におけるラジカル捕捉活性の熱安定性をアスコルビン酸（AsA）と比較検討した。また、これまでに中性およびアルカリ pH 領域における加工工程を想定した熱安定性についても検討してきた。これらの結果より、GR-S は AsA と比べて非常に安定かつ捕捉活性も強い素材であることが明らかとなった。GR-S の主成分である PA が構造上、(+)-カテキンを主として 6~8 個重合していることにより 1 分子あたり多くのフェノール性水酸基を有することから、複数のフェノール性水酸基の共同作用によりラジカル捕捉活性が高まる¹⁰⁾ ことが予想される。また、GR-S も AsA も DPPH ラジカルより AAPH 由来ヒドロキシラジカルに対する IC₅₀ 値が低いことから、ヒドロキシラジ

カルに対する親和性が高く、より実践的な捕捉剤であることが示唆された。ただ AsA は 37°C における捕捉活性の経時変化の結果から、5 時間経過後においてヒドロキシラジカル捕捉活性の残存量が DPPH ラジカルに対するそれより低い結果 (図 3 と図 5) となった。ヒドロキシラジカルに対して親和性が高い分、何らかの相互作用により安定性が悪くなることが示唆される。一方、GR-S は安定な素材ではあるが、中性からアルカリ pH 領域になるにつれて不安定となり着色が認められる。カテキン類はアルカリ・加熱処理により重合化し、また微量の鉄との結合反応も促進するため、このような着色が起こるとされている。食品加工上、素材の色合いを重視する食品では着色化が問題となるため、今後の課題と考えている。

レダクトン類に属する AsA は、2, 6-ジクロロインドフェノール色素を還元し脱色するような強い還元力を示すエンジオール構造を有している。酸性から中性 pH 領域ではこのエンジオール構造を有しているが、アルカリ条件下ではこの構造が維持できなくなる。つまり、AsA (還元型アスコルビン酸) は中性からアルカリ pH 領域において容易に酸化され、モノデヒドロアスコルビン酸ラジカル、デヒドロアスコルビン酸を介してジケトグルン酸へと変化する (図 6)¹⁾。さらにそれ以降、種々の分解反応過程を経て変化し、食品の加工調理過程で着色をもたらすことになる。もともと AsA は酸化防止剤 (還元剤) として食品へ用いられてきたが、例えばカテコールなどの無色のポリフェノール化合物が酸素存在下ポリフェノールオキシダーゼの作用により生じる赤

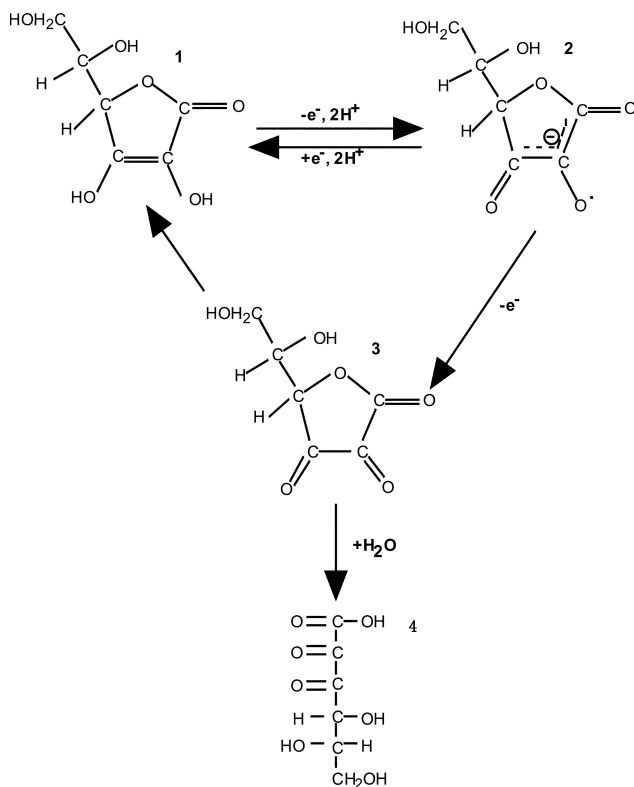


図 6 アスコルビン酸の酸化経路
 1: アスコルビン酸 (還元型)、2: モノデヒドロアスコルビン酸、
 3: デヒドロアスコルビン酸、4: ジケトグルン酸

色のキノンを還元し無色に戻すような作用を期待して利用されている。いわゆる褐変防止剤である。ただこのAsAの還元反応は通常、非可逆的であり、AsA添加量以上にキノン化合物が存在すると褐変が速やかに復活し反応が加速される。なお、酸化型アスコルビン酸であるデヒドロアスコルビン酸やジケトグルン酸は、DPPHラジカル捕捉活性を示さないことは既に知られている¹²⁾。現在、これらの化合物がヒドロキシラジカルに対して捕捉活性を有するか否かを検討中である。

AsAに比べてGR-Sが安定なことから、この両化合物を混在させた場合にAsAの活性低下をGR-Sにより抑制可能か現在検討している。AsAは安定性に欠けるという欠点をもっている反面、安価、安全性に優れ長年使用されてきたという実績があり、加工食品に多く含まれている。そこでAsAに安定性を付与する助剤としてGR-Sの可能性を調べることは価値があることと思われる。特に中性からアルカリpH領域における構造変化に起因するラジカル捕捉活性の低下を抑えることが期待される。pH 10.0のアルカリ領域でのGR-SとAsAの相乗効果は見いだされているが、pH 7.0では見いだされなかった。今回データを示さなかったが、酸性pH領域であるpH 4.0での両化合物のラジカル捕捉活性に対する相乗効果も認められなかった。ただ、条件を検討すれば、酸性から中性pH領域での相乗効果が期待出来ると考えている。

食品は多物質の混合系であり、例えば、デンプンなどの炭水化物や脂質、タンパク質などが混在している。加工食品へのこれらラジカル捕捉剤の適性を検討する場合、これらの要因を考慮する必要がある。今後、まずデンプンを用いて、AsAやGR-Sのラジカル捕捉活性に及ぼす多糖類の影響を調べ、その後、タンパク質、脂質、ミネラルなどへと検討対象を拡げる予定である。

V. 参考文献

- 1) D. Bagchi, A. Garg, R. L. Krohn, M. Bagchi, M. X. Tran, and S. J. Stohn: *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **95**, 179–189 (1997).
- 2) S. Renaud, M. and De Lorgeril: *Lancet*, **339**, 1523–1526 (1992).
- 3) 有賀敏明、細山浩、徳武昌一、山越純：日本農芸化学会誌、**74** (1)、1–8 (2000).
- 4) 寺尾純二、五十嵐脩：“フリーラジカルと疾病予防”、建帛社 (1997).
- 5) 北尾悟、寺本円佳、的場輝佳：日本食品工学会誌、**48** (8)、591–597 (2001).
- 6) 北尾悟、寺本円佳：大阪樟蔭女子大学論集、**38**、93–100 (2001).
- 7) 北尾悟、寺本円佳：大阪樟蔭女子大学論集、**39**、69–78 (2002).
- 8) T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba and J. Terao: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (6), 1201–1204 (1998).
- 9) K. Harada, C. Okano, H. Kadoguchi, Y. Okubo, M. Ando, S. Kitao, and Y. Tamura: *Int. J. Mol. Med.*, **12** (4), 621–626 (2003).
- 10) W. Bors, W. Heller, C. Michel, and M. Saran: *Methods Enzymol.*, **186**, 343–355 (1990).
- 11) T. Kurata and Y. Nishikawa: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64** (8), 1651–1655 (2000).
- 12) 山口智子、梶川理恵、溝渕妙子、寺尾純二、高村仁知、的場輝佳：日本農芸化学会平成11年度大会講演要旨集、p. 125 (1999).