

[Technical Brief]

フォーリン・シオカルト法を用いた逆相系高速液体クロマトグラフィーによる
フェノール化合物の分析—フェノールとフォーリン・シオカルト試薬との反応
条件の至適化

横塚弘毅¹・松土俊秀¹・奥田 徹¹・高柳 勉²

¹ 山梨大学ワイン科学研究センター機能成分学研究部門、² 果実遺伝子工学研究部門

〒400-0005 甲府市北新1丁目13-1

Analytical Reversed-Phase HPLC of Phenols Using the Folin-Ciocalteu Method:
Optimization of Conditions for Reaction between Phenols and the Reagent

Koki YOKOTSUKA¹, Toshihide MATSUDO¹, Tohru OKUDA¹, and Tsutomu
TAKAYANAGI²

¹ Laboratory of Biofunctional Science, ² Laboratory of Fruit Genetic Engineering, Institute of
Enology and Viticulture, Yamanashi University, 13-1 Kitashin-1-chome, Kofu, Yamanashi 400-

0005, Japan

Fundamental conditions for the reaction between the Folin-Ciocalteu reagent and three phenols (gallic acid, protocatechuic acid and caffeic acid) were investigated by applying the Folin-Ciocalteu method to phenol analysis by an HPLC post-column reaction system. The best reaction conditions were as follows: the eluate from a reversed-phase HPLC column was mixed with 20-fold diluted commercial Folin-Ciocalteu reagent at an equivalent volume. This mixture was further mixed with 0.2 N NaOH of an equal volume to the diluted Folin-Ciocalteu reagent, followed by heating at 60°C for 10 sec. The absorbance of the reaction mixture was monitored at 765 nm to draw a chromatogram. The peaks of all 11 different phenols on the chromatogram were sharp, and the differences among the peak heights of the individual phenols detected by the Folin-Ciocalteu method were smaller than in the case of the UV method.

Key words: wine, HPLC, Folin-Ciocalteu method, HPLC post-column reaction system

緒 言

ブドウに由来するフェノールは、ワインの外観（色調や濁り）、味（苦味）と口中の感覚（渋み）に影響することは以前より知られていたが、近年いくつかのフェノール化合物が様々な機能を有することが明らかになってきた。たとえば、クロロゲン酸、コーヒー酸、フェルラ酸のようなフェノール酸は酵母の生育を阻害し（12）、カテキン、エピカテキンのようなフラバノール、プロシアニジン、アントシアニン、ヒトの低密度リポ蛋白質（LDL）の酸化を抑制し、フラボノールであるケルセチンは血小板凝集抑制作用をもつことも報告されている（2, 3, 8, 14）。最近、スチルベン化合物であるリスベラトロールが、LDL酸化を阻害し、血小板凝集を抑制する作用をもつばかりか、抗ガン作用（5）をも有するという報告がだされた。リスベラトロール（またケルセチンも）は果皮や種子に含まれるので、白

ワインよりも醸し発酵を経て製造された赤ワインに多く含まれる（7, 9）。動脈硬化に繋がる恐れのあるヒトLDLの酸化は活性酸素によってなされるが、赤ワインには、この活性酸素を消去する物質が多く含まれ、ワインの全フェノール含量と活性酸素消去能との間に高い相関があることが報告されている（4, 14）。

このように、ワインにはブドウ由来の多種多様の機能性フェノール化合物が存在するが、それぞれの化合物の含有量が少ないために、迅速、かつ正確に分離定量することは依然として困難である。個々のフェノール化合物を分析するために現在最も多く用いられている手段は、C₁₈あるいはC₈アルキル基を共有結合させた多孔性シリカゲルを充填剤として用いた逆相系高速液体クロマトグラフィーである。通常、水/メタノールあるいはアセトニトリル溶媒が用いられ、HPLCカラムから溶出されたフェノールは、目的とするフェノール化合物の最大吸収波長近くで

検出され、ピーク面積を測定することによって定量される。たとえば、フラバノールや単純フェノール (simple phenols) の検出には280 nm、フラバノールのためには290 nm、ヒドロキシシナム酸のためには320 nm、フラボノールのためには360 nm、アントシアニンのためには520 nmが用いられている。多くの波長で同時にモニターできればそれぞれの (フェノール) ピークの純度と同定の信頼性を増すが、一般には一つの (UV吸収) 波長で検出することが多い。たとえば、ワインの全フェノールを定量するために用いられている波長は普通280 nmである。この波長で測定した赤ワインの吸収値 (A_{280}) とフォーリン・シオカルト法によって得られた値とは良い相関が得られているが (1)、白ワインに対しては、フォーリン・シオカルト法と280nmで測定した全フェノール量との間の相関は低い (7, 11)。すなわち、フェノールの種類によってその280 nmでの分子吸光係数が著しく異なるので、白ワインの全フェノール量は、フォーリン・シオカルト法で測定するのが一般的である。フォーリン・シオカルト法においても、フェノールの種類による発色の度合いの差は各フェノールの水酸基数と関連し、個々のフェノール化合物に対する呈色 (青) のレベルは異なるものの、UV法におけるほどフェノールの種類による差異は少ないと考えられる (11)。白ワインのHPLC分析において、280 nmで溶出曲線を描いた場合、非常に多くのピークが認められ、各ピークの溶出位置が近接し (13)、個々のピークを分離することが困難な場合が多い。HPLC分析においてフェノール以外のUV吸収物質がフェノールの同定を妨げている可能性が大きいことが推定される。さらに、機能性のある個々のフェノール化合物は含有量が少ないので、それぞれのピークの高さはかなり低く、UV吸収法に代わる検出法の開発が望まれている。フォーリン・シオカルト法をHPLCにおける検出手段として用いることができれば、フェノールを特異的に検出でき、さらにUV法と併用すればピークの検出と同定がより確実になると考えられる。本研究では、HPLCによるフェノールの分析にフォーリン・シオカルト法を適用するための基礎的データを収集した。すなわち、HPLCで数種の標準フェノールを分離後フォーリン・シオカルト法で検出する際に最適なフ

ォーリン試薬とフェノールとの反応条件を調べた。

材料と方法

1. 試薬

フォーリン・シオカルト試薬は和光純薬 (株) より購入した。

没食子酸、プロトカテキュ酸、コーヒー酸、カテキン、エピカテキン、チロソール、*p*-ヒドロキシ安息香酸、*p*-クマール酸、フェルラ酸、サリチル酸は和光純薬 (株) あるいはナカライテスク (株) より購入した。カフタリック酸 (カフェオイル酒石酸) は前報 (15) に従って調製した。

2. HPLC機器

フェノール化合物の分析には、島津高速液体クロマトグラフィー用ポンプ (LC-4A)、溶媒切換器 (SGR-1A)、サンプルインジェクター (SIL-1A)、カラムオープン (CTO-2A) を用いた。フェノールは、14- μ Lフローセルを装着した島津UV-VIS検出器 (SPD-2ASとSPD-1) を用い、280 nm (UV法) と765 nm (フォーリン・シオカルト法) で検出した。

3. HPLC用カラムと溶媒

フェノールの分離には、Zorbax ODS (5-6 μ m, 0.4 \times 15 cm) あるいはユニシルQC8 (5 μ m, 0.4 \times 25 cm) カラムと2種類の溶媒系を用い、流速は0.5 mL/min、室温で溶出した。一つの溶媒系は0.02 M 酒石酸/メタノール (75:25, v/v) 単独で用いた。もう一つの溶媒系は0.1 %ギ酸から0.1%ギ酸-65%メタノールへのグラジエントを用いた。

4. フォーリン・シオカルト試薬を用いてフェノール類を検出するための反応条件の至適化

Fig. 1 は、フォーリン・シオカルト試薬を用いてフェノール類を検出するための反応至適条件を検討するためのフローダイアグラムである。試料液 (20 μ L) はインジェクター (Fig. 1 中の2) を用いて注入した。カラムからの溶出液はUV (A_{280}) を測定した (Fig. 1 中の5) 後に、第1のステンレスチール製ミキシングコイル (Fig. 1 中の7, 0.25 mm \times 1 m) 中で25倍希釈-フォーリン・シオカルト試薬 (市販フォーリン・シオカルト試薬を蒸留水で25倍に希釈して使用) と混合後、第2のミキシングコイル (Fig. 1 中の8, 0.25 mm \times 1 m) で0.2 N NaOHと混合した。脈流をなくすための背圧

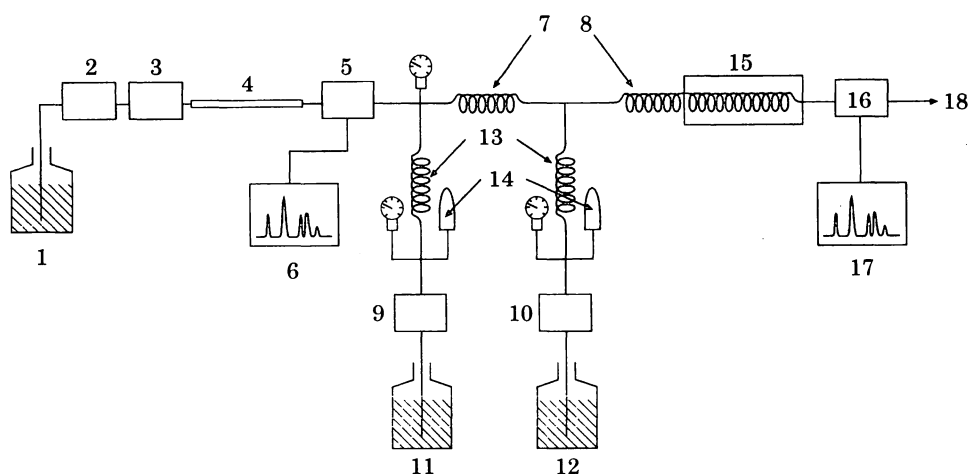


Fig. 1. Flow diagram for phenolic analysis by high-performance liquid chromatography using UV detection (280 nm) and the Folin-Ciocalteu method (765 nm). Key: 1 = eluting solutions, 2 = eluting solution pump, 3 = sample injector, 4 = separation column, 5 = UV detector, 6 = recorder, 7 and 8 = mixing coil, 9 and 10 = reagent pump, 11 = Folin-Ciocalteu reagent, 12 = 0.2 N NaOH, 13 = resistance tube, 14 = damper, 15 = heating box, 16 = VIS detector, 17, recorder.

管のサイズは、0.25 mm × 5 mとした。混合液を40～75℃の反応コイル(0.25 mm × 5 m)中で加熱後生成する青色化合物の吸光度(765 nm)をSPD-1型分光光度計を用いて測定した。反応至適条件として、フォーリン・シオカルト試薬の希釈率(5～10倍)、水酸化ナトリウム水溶液の濃度(0.05N～0.35N)反応温度(25～75℃)、反応時間(5～10秒)に関する実験を、同じ試料について3回ずつ行った。得られた結果は、Microsoft Excel を用いて統計処理を行った。

結果と考察

1. フォーリン・シオカルト反応における0.2 N NaOHの使用

フォーリン・シオカルト反応では、ポリフェノールの還元性を利用して(フェノールは酸化される)、アルカリ溶液中で、リンタングステン酸およびモリブデン酸を還元して生じる青色を740 nm～770 nmで比色定量するものである。フォーリン・シオカルト法とUV吸収法を比較するために、カラムより溶出した各フェノールはまずUV 検出器(280 nm)に通した後、フォーリン・シオカルト法の反応系に送った(Fig. 1)。

このHPLC系では、ODSカラム中で分離されたフェノールをフォーリン・シオカルト試薬と混合し、

次いでこれを希NaOH水溶液でアルカリ性にした後、一定温度で反応させ、生じた青色強度を測定してフェノール分析を行った。一般に、フォーリン・シオカルト法では、フェノールとフォーリン・シオカルト試薬との反応系をアルカリ性に保つために、炭酸ナトリウム(75あるいは100 g/L)が用いられているが(10)、Fig. 1のフローダイアグラムにおいて、第2のミキシングコイル

中で溶出液-フォーリン・シオカルト試薬混合物と8%炭酸ナトリウムを混合したとき、非常に微細な白い結晶が析出し、クロマトグラムのベースラインが乱れた。そこで、種々の濃度の水酸化ナトリウム溶液(0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.30, 0.35 N)を用いて3種のフェノール(没食子酸、プロトカテキュ酸、コーヒー酸、各6 μg)のフォーリン・シオカルト反応性(発色強度)を検討した(Fig. 2)。NaOH溶液の濃度が0.15 Nまでは3種のフェノールのピーク面積は直線的に

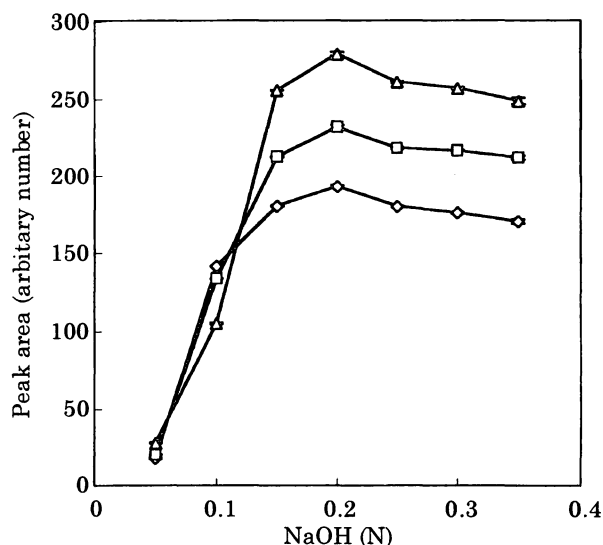


Fig. 2. Effect of concentration of sodium hydroxide on peak areas of three phenols. Symbols: Δ = caffeic acid, \square = protocatechuic acid, \diamond = gallic acid. Vertical bars indicate SE. Where not shown, SE bars are smaller than the symbols.

増加し、0.2 Nで最大のピーク面積を示し、0.35 Nでわずかに減少した。これらの結果から、以後の実験では最大面積値を示す0.2 N NaOHを用いることにした。

なお、本実験では主として没食子酸、プロトカテキュ酸、コーヒー酸の3つのフェノールを用いたが、その理由は次のようなものである。没食子酸は、ワインに比較的多量に含まれ、ポリフェノールオキシダーゼの作用を受けにくい代表的な非フラボノイド型フェノールであり、一方コーヒー酸は、白ワインに最も多量に含まれるカフタリック酸と同じジフェノール・シンナム酸であり、ポリフェノールオキシダーゼで容易に酸化され、キノンとなり、ワインを着色させる(15)。またプロトカテキュ酸は、没食子酸と同じ安息香酸類であるが、ジフェノールであるためポリフェノールオキシダーゼで酸化されやすく、酸化物は着色しているのでワインの色調に大きく影響する(15)。さらに、クロマトグラム上で3種のフェノールのピークの高さは(同量をカラムに添加したとき)ほぼ同じであり、溶出位置は完全に離れ、分離しやすく、標準フェノール試料として最適であった(Fig. 7)。

2. フォーリン・シオカルト試薬濃度の決定

市販のフォーリン・シオカルト試薬を5~10倍に蒸留水で希釈して用いた。3種のフェノール(各フェノール1~10 µgをカラムに添加)のピーク面積とフォーリン・シオカルト試薬の希釈率との関係をプロットした結果をFig. 3に示した。蒸留水で5倍から15倍に希釈した市販のフォーリン・シオカルト試薬を用いたとき、ピーク面積は直線的に増加した。15倍希釈液と20倍希釈液を用いたときの3種のフェノールのピーク面積の差は少なかった。3種のフェノールのカラムへの添加量が少ない場合(1~4 µg)、フォーリン・シオカルト試薬を15倍以上に希釈したときにピーク面積はほぼ一定となった。6 µg以上の場合には、フォーリン・シオカルト試薬の希釈率を20倍以上にするとピーク面積は徐々に減少した。これらの結果から、大きなピーク面積値を安定的に得るために、市販のフォーリン・シオカルト試薬を20倍に希釈して使用することにした。

3. 反応温度

カラムからの溶出液と20倍希釈フォーリン・シオ

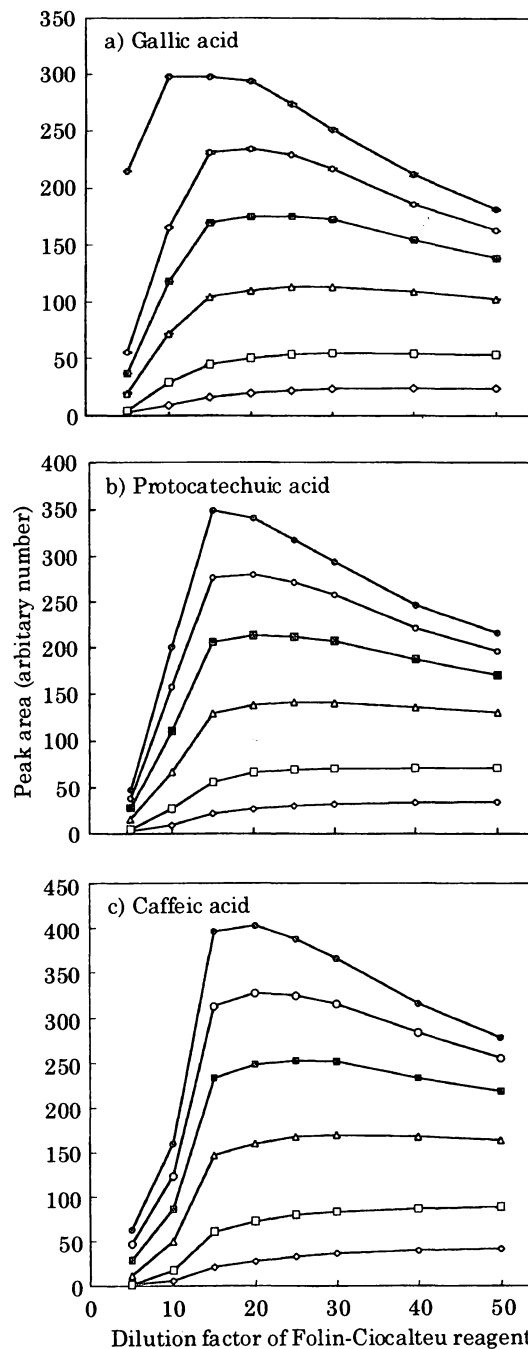


Fig. 3. Effect of dilution of commercial Folin-Ciocalteu reagent on peak areas of three phenols. Concentrations of each phenol applied onto an HPLC column: ● = 10 µg, ○ = 8 µg, ■ = 6 µg, △ = 4 µg, □ = 2 µg, ◇ = 1 µg. Vertical bars indicate SE. Where not shown, SE bars are smaller than the symbols.

カルト試薬を1:1に混合し、さらに0.2 N NaOHを希釈フォーリン・シオカルト試薬と同量加えた後、Fig. 1のヒーター(反応コイル)中で、25~75℃で10秒間(0.25 mm × 5 m)反応させ、3種のフェ

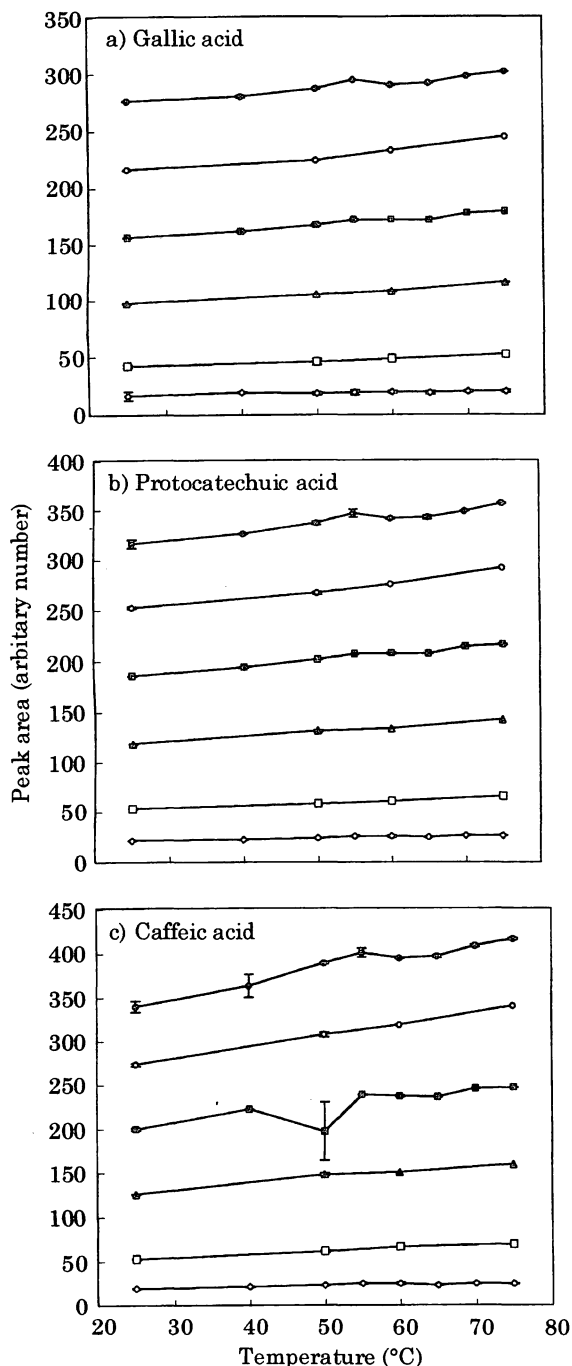


Fig. 4. Effect of reaction temperature (°C) on peak areas of three phenols. Concentrations of each phenol applied onto an HPLC column: ● = 10 µg, ○ = 8 µg, ■ = 6 µg, △ = 4 µg, □ = 2 µg, ◇ = 1 µg. Vertical bars indicate SE. Where not shown, SE bars are smaller than the symbols.

ノール（各フェノール1～10 µgをカラムに添加）のピーク面積を比較した（Fig. 4）。3種のフェノールのピーク面積は、温度が上昇するとともに増加し、特に高い添加量（6 µg以上）のコーヒー酸ではピ

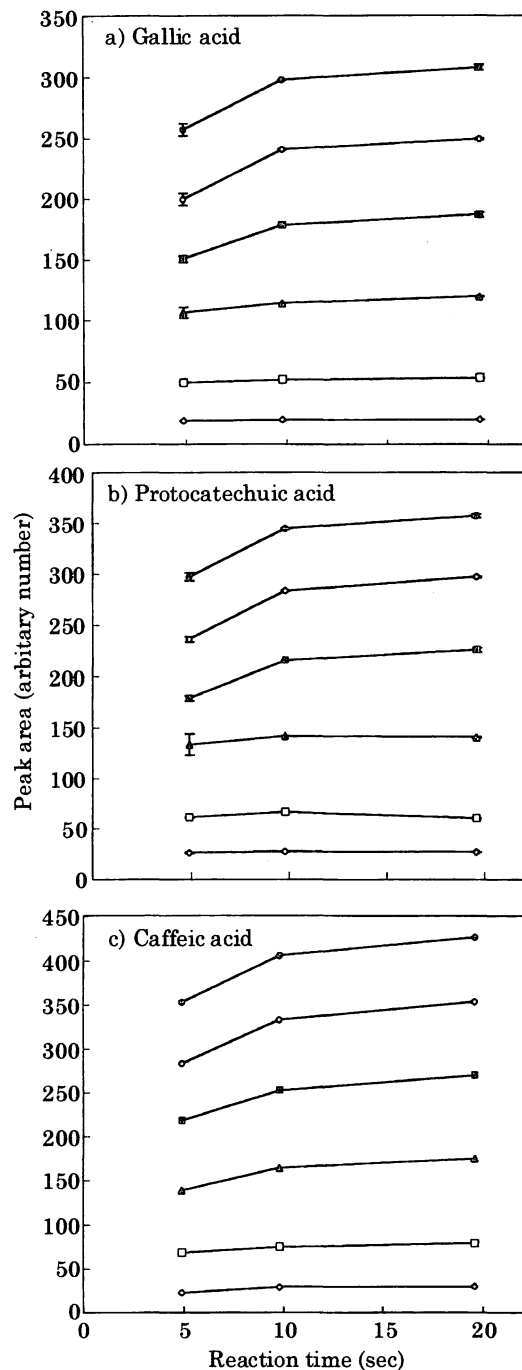


Fig. 5. Effect of Folin-Ciocalteu reaction time (s) on peak areas of three phenols. Concentrations of each phenol applied onto an HPLC column: ● = 10 µg, ○ = 8 µg, ■ = 6 µg, △ = 4 µg, □ = 2 µg, ◇ = 1 µg. Vertical bars indicate SE. Where not shown, SE bars are smaller than the symbols.

ーク面積の増加が顕著であった。このように、各フェノールのピーク面積は反応温度の高いほうが大きくなったが、ヒーターの性能と維持管理の容易さおよび安全性などを考慮し、反応温度を60°Cとした。

4. 加熱反応時間

本系におけるフォーリン・シオカルト反応の至適時間を決定するために、反応温度60℃としたときの反応時間を検討した。Fig. 1において（カラムポンプ流速 0.5 mL/min、フォーリン・シオカルト試薬ポンプ流速、0.5 mL/min、NaOHポンプ流速 0.5 mL/min）、反応管の内径を0.25 mmとしたとき、チューブの長さを 2.5, 5, 10 mとすれば、加熱反応時間はそれぞれ4.9, 9.8, および19.8秒となる。3種のフェノールのピーク面積は、反応時間10秒と20秒の間でほとんど変化しなかったため、反応時間を10秒間（反応管の長さ5m）とした。

5. 標準曲線

本HPLCシステムを用いて3種のフェノールの標準曲線を作成した（Fig. 6）。各フェノール（1～10 μg）とピーク面積との間には高い相関があった（Fig. 6）。コーヒー酸、プロトカテキュ酸、および没食子酸の相関係数は、それぞれ0.998 (p < 0.001)、0.9991 (p < 0.001)、0.9992 (p < 0.001) であった。

なお、Fig. 1～Fig. 5において、測定誤差は誤差線がシンボルに隠れるほど小さかった。

6. UV法とフォーリン・シオカルト法によって検出した11種フェノールのHPLCクロマトグラム

没食子酸、プロトカテキュ酸、カftarリック酸、チロソール、*p*-ヒドロキシ安息香酸、(+)-カテキン、(-)-エピカテキン、コーヒー酸、サリチリ酸、*p*-クマール酸、フェルラ酸の11種のフェノール（各5 μg）をZorbax ODS カラムで分離し、まずUV検出器（280 nm）でクロマトグラム（Fig. 7 中点線）を作成するとともに、（フォーリン・シオカルト反応発色液のための）VIS 検出器（765 nm）を用いたクロマトグラム（Fig. 7 中実線）を作成した。フォーリン・シオカルト法で得たピークの高さがUV法で得たピークの高さよりも大きいことは必ずしもなかったが、UV法で得た各フェノールのピークの高さが大きく異なったのに対し

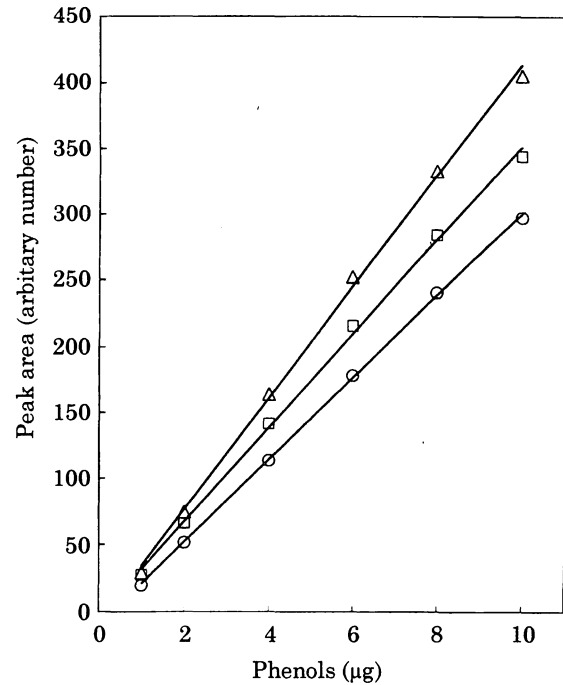


Fig. 6. Standard curves for three phenols. Symbols: Δ = caffeic acid, \square = protocatechuic acid, \diamond = gallic acid.

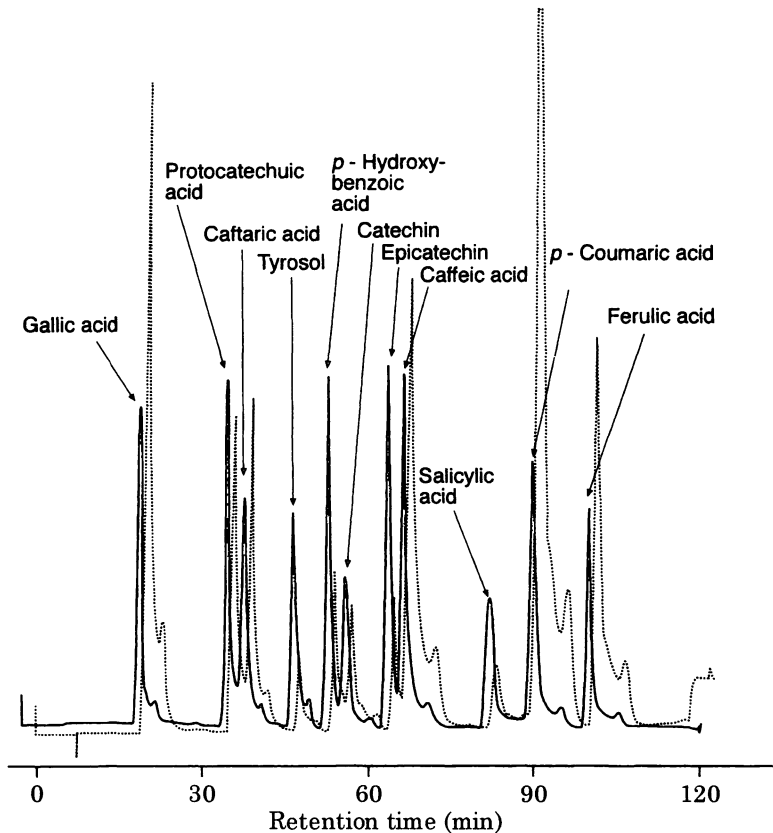


Fig. 7. HPLC chromatograms of a standard mixture of 11 phenols detected by the UV (dotted line) and Folin-Ciocalteu (solid line) methods.

て、フォーリン・シオカルト法で得た各フェノールのピークの高さの差はUV法に比べて小さかった。

フォーリン・シオカルト法を検出手段としたHPLCによるフェノール分析は、カftarリック酸あるいはクータリック酸（クマロイル酒石酸）そして（赤ワインの）アントシアニンのように、それぞれ320 nmや520 nmに特有の最大吸収波長をもつような特定のフェノールの分析を行うのに効率がよいわけではない。しかし、フェノール以外の多量のワイン成分が存在し、あるいはUV吸収で著しく分子吸光係数の異なる多種多様のフェノールを含み、これらがクロマトグラムを複雑にしている場合に、本法によるフェノール（特に非フラボノイド型フェノール）の分析は有用であり、またワインのタイプやスタイルによらず適用できると考えられる。本法の実用化には多くのワインや果汁試料でさらに検討することが必要である。

要 約

ワインの全フェノールの定量に用いられているフォーリン・シオカルト法をHPLCの検出手段に適用するために、ポストカラムにおけるフォーリン・シオカルト試薬とフェノールとの基礎的な反応条件を検討した。その結果、逆相系HPLCカラム（カラム流速、0.5 mL/min）より溶出したフェノールを市販フォーリン・シオカルト試薬の20倍希釈液（希釈フォーリン・シオカルト試薬の流速、0.5 mL/min）と1:1に混合後、0.2 N NaOH溶液（NaOH液の流速、0.5 mL/min）と混合し、10秒間60℃で反応させ、発色した反応液を765 nmで測定することによって良好なクロマトグラムを作成できた。クロマトグラム上の各ピークはいずれもシャープで、UV法で描いた各フェノールのピーク間の高さの差よりも、フォーリン・シオカルト法で描いた差のほうが小さかった。

文 献

1. Flanzky, M. and Poux, C. Les possibilités de la microvinification application, application à l'étude la macération. *Ann. Technol. Agric.* 7:377-401 (1958).
2. Frankel, E. N., A. L. Waterhouse, and P. L. Teissedre. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant

activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 43:890-894 (1995).

3. Ghiselli, A., M. Nardini, A. Baldi, and C. Scaccini. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J. Agric. Food Chem.* 46:361-367 (1998).
4. Hackett, A. M. *Plant Flavonoid in Biology and Medicine. Biochemical Pharmacological and Structure - Activity Relationships; Progress in Clinical and Biological Research*, 213 (ed. by V. Cody *et al.*) Liss, New York, p. 177 (1986).
5. Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. W. Beecher, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kingdom, R. G. Mehta, R. C. Moon, and J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Pezzuto Science* 275:218-220 (1997).
6. Okuda, T. and K. Yokotsuka. Trans-Resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan. *Am. J. Enol. Vitic.* 47:93-99 (1996).
7. Ribéreau-Gayon, P. *Interprétation chimique de la couleur des vins rouges. Vitis du raisin. II Discussion des résultats obtenus en 1969, 1970 et 1971. Connaiss Vigne Vin.* 6:161-175 (1972).
8. Sato, M., N. Ramarathmam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, N. Takeuchi, and H. Ochi. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* 44:37-41 (1996).
9. Sato, M., Y. Suzuki, T. Okuda, and K. Yokotsuka. Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61:1800-1805 (1997).
10. Slinkard, K. and V. L. Singleton. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 28:49-55 (1977).

11. Singleton, V. L. Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine, and some practical uses of such analyses. In: Webb A. D. (ed) Chemistry of wine-making. ACS Symp. ser 137 Ch 9. (1974).
12. Singleton, V. L. and P. Esau. Phenolic Substances in Grapes and Wine, and Their Significance. Advances in food research, Supplement 1, (Academic Press, New York and London), p. 161 (1969).
13. Singleton, V. L. and E. Trousdale. White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. Am. J. Enol. Vitic. 34:27-34 (1983).
14. Teissedre, P. L., E. N. Frankel, A. L. Waterhouse, H. Peleg, and J. B. German. Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. J. Sci. Food Agric. 70:55-61 (1996).
15. Yokotsuka, K. and V. L. Singleton. Disappearance of anthocyanins as grape juice is prepared and oxidized with PPO and PPO substances. Am. J. Enol. Vitic. 48:13-25 (1997).