

[研 究 報 文]

オンライン DPPH-HPLC 法によるブドウ種子フェノール中の抗酸化化合物の探索

久本雅嗣*・市川茉莉枝・依田 諭・小林浩武・奥田 徹

山梨大学大学院医学工学総合研究部 ワイン科学研究センター
〒400-0005 甲府市北新 1-13-1

Study of Antioxidative Phenolics in Grape Seed Using DPPH-Post-Column HPLC

Masashi HISAMOTO*, Marie ICHIKAWA, Satoshi YODA, Hirotake KOBAYASHI, and Tohru OKUDA

The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi,

1-13-1, Kitashin, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan.

Grape seed extract (GSE) were obtained from seeds of three grape cultivars ('Koshu', KOS; 'Muscat Bailey A', MBA; and 'Cabernet Sauvignon', CS) by treatment with 50% aqueous ethanol and partitioning with ethyl acetate. The ethyl acetate fraction and the aqueous fraction were analyzed by on-line DPPH-HPLC. The ethyl acetate fraction had strong radical scavenging activity and contained catechin, procyanidin B2, and epicatechin as the predominant phenolics. The aqueous fraction showed no peak on HPLC and had weak radical scavenging activity. The ethyl acetate fraction was further partitioned into the low molecular weight fraction and the polymer fraction by TOYOPEARL HW-40F column chromatography. Although the polymer fraction showed no peak on HPLC, its DPPH radical scavenging activity was stronger than that of the low molecular weight fraction.

Key words: DPPH, Grape seed extract (GSE), On-line DPPH-HPLC, Polymer fraction, DPPH radical scavenging activity

緒 言

赤ワインに含まれるフェノール化合物の大部分はブドウ種子由来であり、種子中のフェノール化合物は赤ワインの持つ健康効果において、重要な役割を担っていると考えられる。このため、ブドウ種子抽出物 (Grape Seed Extract; GSE) に関する多くの研究が行われてきた。実際、GSE には様々な疾病予防効果が報告されており、その効果は主としてプロアントシアニジンに代表される、フェノール化合物に由来する抗酸化活性であると考えられている (Ariga 2004, Bagchi et al. 2000 and 2003, Moreno et al. 2003, Pérez-Jiménez and Saura-Calixto 2008, Sato et al. 1999, Tyagi et al. 2003)。ブドウ種子は、ワイン産業の副産物として比較的多量に

排出され、バイオマス利用の観点からも、利用価値の高い素材として注目されている。Gonzalez-Paramas ら (2004) の研究によれば、アルコール発酵後の種子にも相当量のフェノール化合物が存在し、利用価値は高いことが報告されている。Revilla ら (1991) は GSE を HPLC で分離し、カテキンやプロシアニジンが含まれることを示した。また、Guendez ら (2005) は GSE を HPLC で分析し、GSE 中にカテキンなど複数の低分子化合物が存在し、これらの濃度と抗酸化活性に相関関係を示すことを報告している。また、有賀ら (2000) はプロアントシアニジンの 2 量体から 5 量体の範囲内では、重合度が高いほどその抗酸化活性が高いことを報告している。これまでの報告から、GSE にはプロアントシアニジンをはじめとした、様々な分子種が含まれると考えられている。GSE の持つ様々な疾病予防効果の原因を明らかにするためには、抗酸化活性の観点

*Corresponding author (email: hisamoto@yamanashi.ac.jp)

2011 年 1 月 18 日受理

から、GSEに含まれる化合物を詳細に検討する必要があると考えた。GSEはいろいろな化合物を含む混合物であり、その抗酸化活性に大きな影響を与えている成分を分析する必要があった。そこで、本実験では、混合物中から抗酸化活性の高い化合物をスクリーニングするために、2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去法を組み込んだポストカラム法によるHPLCを用いてGSEを分析し、GSE中のDPPHラジカル消去活性に寄与する成分の特定を行った。さらに、本実験では、GSEを分画し、低分子化合物を除去した状態でのDPPHラジカル消去活性についても検討した。

材料と方法

ブドウ種子

抽出に用いた種子は、2007年にメルシャン株式会社から恵与された‘甲州’(*Vitis vinifera* L. 以下KOS)と、2007年に山梨大学ワイン科学研究センター育種試験場にて収穫された‘マスカット・ベリーA’(*V. labruscana* Bailey. 以下MBA)、2003年に同試験場にて収穫された‘カベルネ・ソーヴィニヨン’(*V. vinifera* L. 以下CS)から調製した。種子は水洗後、十分に室温で乾燥させた。

種子からのフェノール化合物の抽出

乾燥した種子をミル・ミキサーで粉末化した。粉末種子300gにヘキサン500mLを加え、30分攪拌し、その後、吸引濾過(ADVANTEC #101)した。この工程を計3回実施した。濾液はロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、油状の液体(以下、種子油脂)を得た。残渣は濾紙上で十分に風乾し、ヘキサンを除去後、50%エタノール水溶液1000mLを加え、1時間攪拌抽出した。その後、吸引濾過した。この工程を計3回実施した。これらの濾液を集め、ロータリーエバポレーターで約1000mLまで濃縮し、等量の酢酸エチルを加え、分配抽出を3回行った。酢酸エチル層はロータリーエバポレーターで酢酸エチルを除去後、凍結乾燥した。また、水層画分は凍結乾燥した。抽出工程をFig. 1に示す。

酢酸エチル画分の分画

Kennedy and Jones (2001)らの方法に従い、前述の酢酸エチル画分を低分子と高分子の画分に分画した。すなわち、TOYOPEARL HW-40F (TOSOH)を14.8(i.d.)×150mmのガラスカラムに充填し、1%トリフ

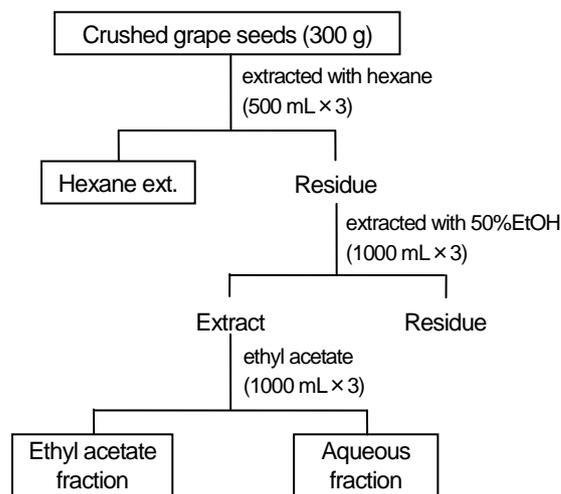


Fig. 1 Extraction procedure for grape seeds.

ルオロ酢酸(以下TFA)-50%MeOH水溶液で平衡化後、150mgの酢酸エチル画分を同溶液に溶解して、カラムクロマトフラフィーに供した。非吸着画分(低分子画分)を同溶液で洗浄し、さらに、高分子画分を1%TFA-66.6%アセトン水溶液で溶出させた。溶出液はフェノール性化合物濃度とDPPHラジカル消去活性を測定後、濃縮して脱アルコールし、凍結乾燥して重量を測定した。

ポリフェノール濃度の定量

各画分中のポリフェノール濃度は、フォーリン・シオカルト法(F-C法)で定量し、没食子酸換算で濃度を算出した(横塚2000)。また、非フラボノイドおよびフラボノイド濃度は、ホルムアルデヒド沈澱法により定量した(横塚2000)。

DPPHラジカル消去活性

前述の各ブドウ種子から得られた抽出物や画分は、1000mg/Lになるように50%エタノール水溶液で調製後、順次希釈した。その希釈した試料溶液100μLと200μM DPPHエタノール溶液100μLを96穴プレート中で十分混合し、30分間静置後、520nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(CORONA, MTP-450)で測定した(Okuda et al. 2002)。ブランクの吸光度を100%とした場合に、50%の消去濃度が得られる試料濃度(IC₅₀)を算出した。

ポストカラムDPPH-HPLC分析

ポストカラムDPPH-HPLC分析は、Bandoniene and Murkovic (2002)およびBartasiuteら(2007)らの方法を一部改変して行った。装置の概要をFig. 2に示す。

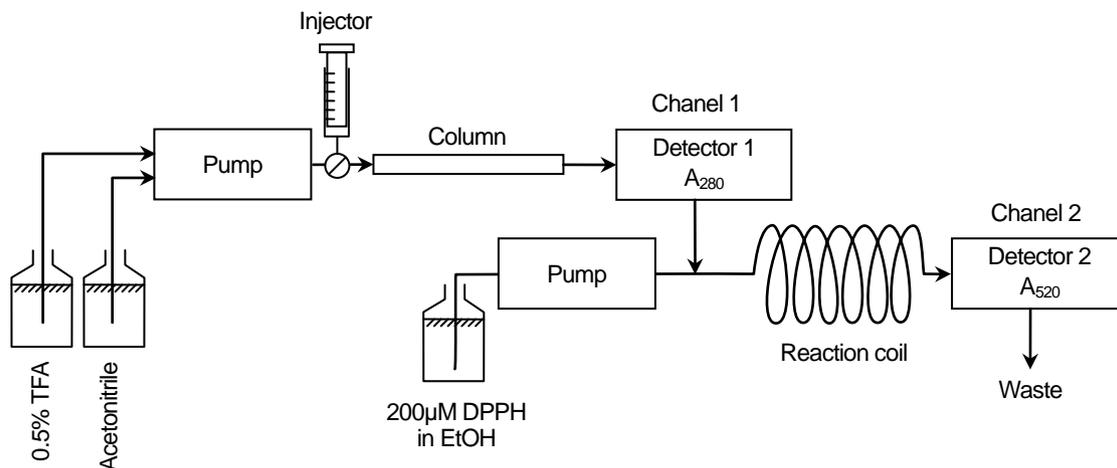


Fig. 2 Schematic diagram for DPPH-post-column-HPLC

1 チャンネルでは、試料は 50%エタノール水溶液に溶解し、20 μL をインジェクションした。溶出液 A および B を、0.5%TFA 水溶液およびアセトニトリルとし、リニアグラジエント (Table 1) で溶出させた (Hitachi L-6200 pump)。検出波長はポリフェノール検出用に 280 nm とした (Hitachi L-4000 detector)。カラム温度は 45°C とし、また、流速は 0.550 mL/min とした。

2 チャンネルでは、溶出液を 100 μM DPPH エタノール溶液と混合した (Hitachi L-6200 pump)。検出波長は DPPH 検出用として 520 nm とした (Hitachi L-4200H detector)。また、2 チャンネルの波長はラジカル消去活性を有する化合物により減少するため、図中では極性を反転して表示した。DPPH との反応は、0.25 mm \times 1.5 mm のテフロン製のチューブで行い、反応温度は 45°C、流速は 0.550 mL/min とした。

Table 1 Gradient conditions for channel 1.

Time (min)	Solvent A	Solvent B
0	100	0
10.0	95	5
50.0	80	20
100.0	40	60
100.1	0	100
120.0	0	100
120.1	100	0
140.0	100	0

Solvent A: 0.5% trifluoroacetic acid.
Solvent B: acetonitrile

結果と考察

種子からのフェノール化合物の抽出

赤ワインは高い抗酸化活性を有し、その活性は種子由来のプロアントシアニンにあると考えられる

(Rigo et al. 2000, Yilmaz and Toledo 2004)。しかし、GSE にどのような化合物が含まれ、どの程度の抗酸化活性を持つのかを調べるのが重要であると考えた。そこで、DPPH ラジカル消去法を組み込んだポストカラム法による HPLC を用いて、GSE の成分のラジカル消去活性を評価するために、はじめにブドウ種子から主としてフェノール性化合物を抽出・分離し、その抗酸化活性を測定した。健康食品としての利用も視野に入れ、抽出には 50%エタノール水溶液を使用した。

ブドウ種子に比較的多量に含まれる油脂成分は、抽出物の濃縮や乾燥などの妨げになるため、種子粉末をヘキサンで脱脂した。その結果、種子から 11%以上の油脂と考えられる化合物が抽出された (Table 2) が、ラジカル消去活性は検出されなかった (データ未載)。脱脂後の種子を 50%エタノール水溶液で抽出し、さらに酢酸エチルで分配し、酢酸エチル画分と水層画分に分画した。酢酸エチル画分には中極性のフェノール化合物が、また、水層画分には親水性あるいは疎水性の化合物が含まれると考えられた。酢酸エチル画分の収率は低く、0.8~2.0%程度であった。一方、水層画分は 7~10%程度の収率であった。また、50%エタノール水溶液に不溶の残渣は 70~75%程度存在した。全体的な収率の点では品種間の差は少なく、全体的な収率は 94%以上と良好であった。

抽出物のフェノール化合物含量と DPPH ラジカル消去活性

酢酸エチル画分および水層画分のフェノール化合物濃度を F-C 法で測定した結果、酢酸エチル画分のフ

Table 2 Recovery of grape seed extracts.

	KOS (n = 3)	MBA (n = 3)	CS (n = 3)
Hexane ext.	31.6±3.0 (11.2)	33.6±4.7 (12.1)	36.4±5.5 (12.1)
Ethyl acetate fraction	3.7±0.2 (1.2)	2.3±0.1 (0.8)	6.0±1.4 (2.0)
Aqueous fraction	25.8±0.3 (8.5)	20.2±1.4 (6.7)	32.3±1.0 (10.8)
Residue	227.5±2.7 (75.9)	226.3±13.4 (75.4)	207.5±13.9 (69.2)
Total	288.6±3.6 (96.2)	282.4±7.4 (94.1)	282.2±8.0 (94.1)

Seed weight: 300 g.

Data are expressed as g ± SD.

Values in parenthesis indicate % recovery.

KOS: 'Koshu,' MBA: 'Muscat Bailey A,' CS: 'Cabernet Sauvignon.'

Table 3 Percentage of phenolics in grape seed extracts.

	KOS (n = 3)	MBA (n = 3)	CS (n = 3)
Ethyl acetate fraction	97.2±2.0 (86.9)	90.2±4.0 (87.4)	92.0±0.1 (92.3)
Aqueous fraction	45.6±2.1 (92.3)	25.5±0.7 (90.7)	55.4±7.5 (98.3)

Parenthesis showed percentage of flavonoids in phenolics measured by formaldehyde precipitation method.

エノール化合物含量は非常に高く、90%以上であった (Table 3)。また、その大部分 (90%程度) がフラボノイド型のフェノール化合物であった。一方、水層画分は品種によりフェノール化合物含量が異なり、MBAでは25.5%と低かった。しかし、フェノール化合物の大部分は、酢酸エチル画分と同様にフラボノイド型であった。種子のフェノール化合物含量の品種差については、ほとんど検討されておらず、ワインのプロアントシアニン濃度などへの影響を考えると、さらに詳細の研究が必要である。これらの画分の DPPH ラジカル消去活性を調べたところ、酢酸エチル画分では IC₅₀ 値が KOS (7.16 ± 0.22 mg/L)、MBA (7.11 ± 0.31 mg/L)、CS (7.67 ± 0.20 mg/L) と高い活性を示した。一方、水層画分では IC₅₀ 値が KOS (16.7 ± 0.05 mg/L)、MBA (30.5 ± 1.41 mg/L)、CS (13.4 ± 0.87 mg/L) と酢酸エチル画分より大きな値となり、特に MBA で消去活性が低かった。これまでの研究でも、ラジカル消去活性はフェノール化合物濃度と非常に高く相関することが知られており (Sato et al. 1996, Okuda et al. 2002)、MBA の水層画分のフェノール含量が低いために、他の品種より DPPH ラジカル消去活性が低いことが考えられた。ポストカラム DPPH-HPLC 分析法を用いた画分の評価

ポストカラム DPPH-HPLC 分析では、1 チャンネルで 280 nm の吸収を用いた通常の HPLC を行い、2 チャンネル目で DPPH ラジカルの消去活性を測定した。これにより、ピークの同定が困難な場合でも、ラジカル消去活性をもつ化合物の検索が可能となる。また、280 nm に吸収を持たない化合物でも、ラジカル消去活性により検出が可能であり、本方法は抗酸化化合物の探索に有用と考えられた。KOS 種子由来の酢酸エチル画分を本法で分析した結果を Fig. 3 に示す。

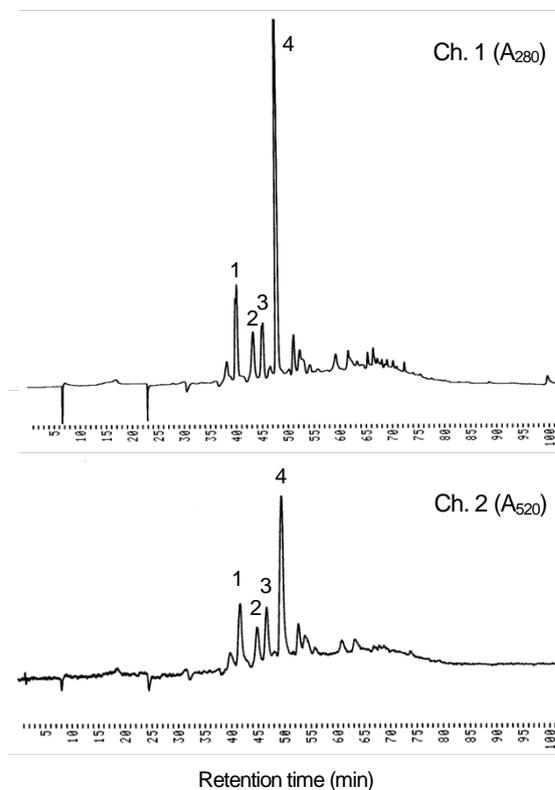


Fig. 3 Post-column DPPH-HPLC of ethyl acetate fraction from KOS seeds.

1 チャンネル (280 nm による検出) では、多くのピークが検出された。主要な4つのピークは、標準物質の溶出時間と、LC-MS による分子量測定から、1 がカテキン、3 はプロシアニジン B2、4 がエピカテキンであった。ピーク 2 はプロシアニジン B4 と考えられたが、標準物質が入手できず、未同定であった。Guendezら (2005) は、種子の酢酸エチル抽出物の分析を行っており、カテキンとエピカテキンが主要な成分であることを報告しており、クロマトグラムの溶出パターンも本結果と類似した。これらの化合物は、種子における抗酸化活性の重要な成分であることが確認された。また、3 品種のブドウ種子から得られた酢酸エチル画

分は、いずれも同様のピークのパターンを示した。また、2チャンネル（DPPH ラジカル消去活性）では、これらのピークに対応する明確なピークが認められた。従って1チャンネルで検出されたピーク以外の化合物で、ラジカル消去能が高い化合物はほとんど含まれていないと考えられた。

KOS 種子由来の水層画分のクロマトグラムを Fig. 4 に示す。水層画分の1チャンネルでは、明確なピークは認められず、溶出時間 70 分あたりを中心とした大きなピークが検出された。一方、2チャンネルでも同様のクロマトグラムが見られ、この部分にはフェノール化合物の重合体（プロアントシアニジン）が溶出していることが示唆された。3品種の種子から得られた水層画分を分析したが、いずれも同様のクロマトグラムを示し、水層画分にはモノマーのフェノール化合物は含まれないと考えられた。

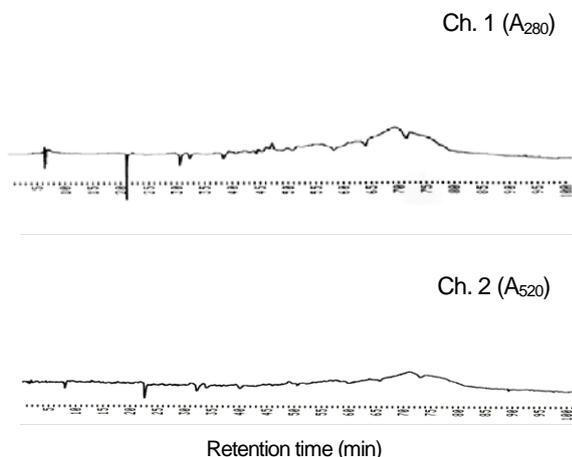


Fig. 4 Post-column DPPH-HPLC of aqueous fraction from KOS seeds.

2チャンネルで得られるピーク面積と、1チャンネルで得られるピーク面積の比を計算した結果を Fig. 5 に示す。なお、Fig. 5 では、3品種の酢酸エチル画分から得られた1~4のピークの平均と、標準物質を分析して得られた比を示した。カテキンおよびエピカテキンから得られたピーク比に対して、プロシアニジン B2 から得られたピーク比が高かった。また、カテキンおよびプロシアニジン B2 では、酢酸エチル画分から得られたピーク比と、標準物質から得られたピーク比はほぼ一致したことから、ピークの純度が高いことが示唆された。一方、エピカテキンでは試料により比が

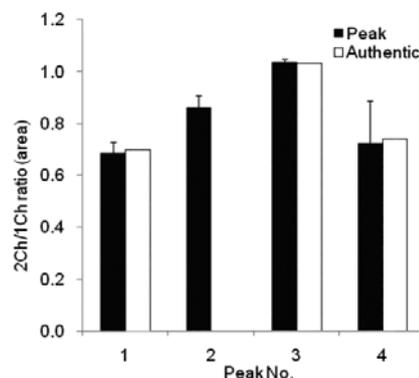


Fig. 5 Comparisons of 2Ch/1Ch ratio between ethyl acetate fraction and authentic standard: (+)-catechin (1), unknown (2), procyanidin B2 (3), and (-)-epicatechin (4).

変化し、標準偏差が大きくなったことから、他の化合物が混在することが示唆された。化合物により 280 nm の吸収特性が異なるため、単純な比較はできないが、ピーク比からラジカル消去活性の強さを推測することが可能であり、本方法が抗酸化化合物の探索に効果的であることが示された。

酢酸エチル画分中のフェノール化合物組成

1チャンネルのピーク面積から算出した酢酸エチル画分の組成比を Fig. 6 に示す。

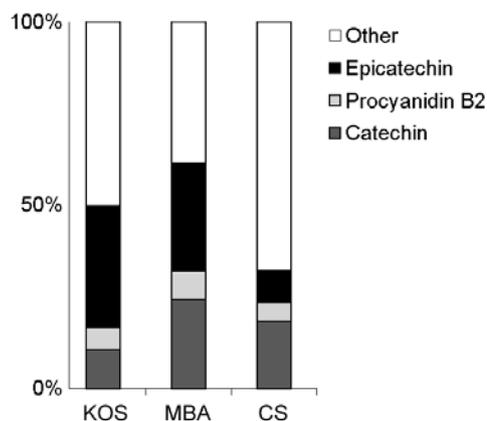


Fig. 6 Compositions of monomeric phenolics in ethyl acetate fractions from seeds of three grape cultivars (KOS, MBA, and CS).

組成比は品種により異なったが、全ての品種で、半分程度はカテキン、エピカテキン、プロシアニジン B2 以外の化合物であると推測された。Fig. 3 の1チャンネルのクロマトグラムにおいて、他に大きいピークが認められないこと、Table 3 において酢酸エチル画分の大部分がフェノール化合物であると推測されることから、未同定の成分の大部分はプロアントシアニジンで

あることが示唆された。品種による組成の差は、収穫時期等による違いである可能性もあり、詳細については今後、検討する必要があると考える。

TOYOPEARL HW-40F による酢酸エチル画分の分画と DPPH ラジカル消去活性

TOYOPEARL HW-40F カラムクロマトフラフィーにより、酢酸エチル画分を低分子画分とポリマー画分に分画し、それぞれの画分の重量およびフェノール化合物量、DPPH ラジカル消去活性を測定した (Table 4)。なお、CS の酢酸エチル抽出物は、都合により分画できなかった。重量での回収率はともに 59%程度と低くなったが、これは凍結乾燥時のロスと考えられた。一方、凍結乾燥前に測定した全フェノール化合物量から見た回収率は 80%以上と良好であった。KOS の酢酸エチル画分から得られたこれらの画分を HPLC で分析した結果を Fig. 7 に示した。

Table 4 Composition and DPPH radical scavenging activity of low molecular weight and polymer fractions obtained by further separation of the ethyl acetate fraction by TOYOPEARL HW-40F column chromatography.

	Low molecular weight fraction	Polymer fraction	Total	Recovery (%)
KOS				
Weight (mg)	54.86	33.92	88.81	59.2
Total phenols (mg)	63.1	35.3	98.4	81.3
IC ₅₀ (mg/L)	8.22	8.14		
MBA				
Weight (mg)	50.57	37.88	88.45	59.0
Total phenols (mg)	68.1	39.6	107.7	85.5
IC ₅₀ (mg/L)	7.92	7.10		

低分子画分では Fig. 3 で見られたピークと同様のクロマトグラムが得られ、低分子画分がカテキン、エピカテキンなどから構成されていると考えられた。一方、ポリマー画分では、小さいピークが少し見られたが、明確なピークは認められなかった。また、これら小さいピークは微量であり、ポリマー画分中の濃度は非常に低いと考えられた。Table 3 において酢酸エチル画分の 90%以上がフェノール化合物と考えられること、また、Table 4 においてポリマー画分にもフェノール化合物が検出されていることから、ポリマー画分の大部分はプロアントシアニジンなどから構成されていると考えられた。一方、低分子画分とポリマー画分の DPPH ラジカル消去能 (IC₅₀) を分析したところ (Table 4)、

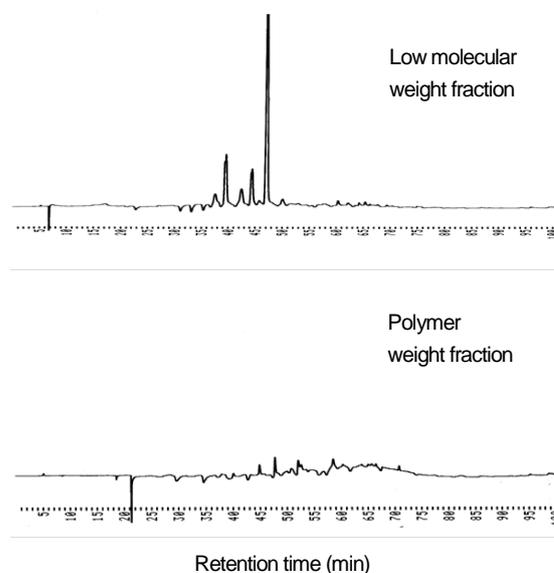


Fig. 7 Chromatograms of low molecular weight fraction and polymer fraction derived from ethyl acetate fraction obtained from KOS seeds by HPLC (detection: 280 nm).

両品種とも高いラジカル消去能を示した。また、低分子画分よりも、ポリマー画分の方が若干強い活性を示した。以上の結果より、プロアントシアニジンなどのポリマーにも非常に強いラジカル消去能があることが示された。

要 約

ブドウ種子 3 品種を 50%エタノールで抽出し、さらに酢酸エチルで分配し、酢酸エチル画分と水層画分を得た。これらをオンライン DPPH-HPLC 法で分析したところ、酢酸エチル画分にはラジカル消去活性の強い成分として、カテキン、プロシアニジン B2 およびエピカテキンが検出された。一方、水層画分はピークが認められず、プロアントシアニジンなどポリマーのフェノール化合物が含まれると考えられた。酢酸エチル画分は強いラジカル消去活性を示したが、水層画分はラジカル消去能が酢酸エチル画分より低かった。酢酸エチル画分を TOYOPEARL HW-40F で低分子画分とポリマー画分に分画した。ポリマー画分には低分子フェノール化合物はほとんど検出されず、ポリマーが主体の画分であると考えられた。しかし、DPPH ラジカル消去活性は低分子画分より強かった。

文 献

- 有賀敏明・細山 浩・徳武 昌一・山越 純. 2000. プロアントシアニジンの機能性解明と開発. 日本農芸化学会誌 74: 1-8.
- Ariga, T. 2004. The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *BioFactors* 21: 197-201.
- Bagchi, D., M. Bagchi, S. J. Stohs, D. K. Das, S. D. Ray, C. A. Kuszynski, S. S. Joshi, and H. G. Pruess. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148: 187-197.
- Bagchi, D., C. K. Sen, S. D. Ray, D. K. Das, M. Bagchi, H. G. Preuss, and J. A. Vinson. 2003. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Res.* 523-524: 87-97.
- Bandoniene, D. and M. Murkovic. 2002. The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH method. *J. Biochem. Biophys. Methods* 53: 45-49.
- Bartasiute, A., B. H. Westerink, E. Verpoorte, and H. A. Niederländer. 2007. Improving the *in vivo* predict ability of an on-line HPLC stable free radical decoloration assay for antioxidant activity in methanol-buffer medium. *Free Radic. Biol. Med.* 42: 413-423.
- González-Paramás, A. M., S. Esteban-Ruano, C. Santos-Buelga, S. D. Pascual-Teresa, and J. C. Rivas-Gonzalo. 2004. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 52: 234-238.
- Guendez, R., S. Kallithraka, D. P. Makris, and P. Kefalas. 2005. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chem.* 89: 1-9.
- Kennedy, J. A. and G. P. Jones. 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1740-1746.
- Moreno, D. A., N. Ilic, A. Poulev, D. L. Brasaemle, S. K. Fried, and I. Raskin. 2003. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 19: 876-879.
- Okuda, T., T. Takayanagi, M. Sato, and K. Yokotsuka. 2002. Changes in radical scavenging activity of Japanese Cabernet Sauvignon red wines during ageing. *J. Wine Res.* 13: 93-100.
- Pérez-Jiménez, J. and F. Saura-Calixto. 2008. Grape products and cardiovascular disease risk factors. *Nutr. Res. Rev.* 21: 158-173.
- Rigo, A., F. Vianello, and G. Clementi. 2000. Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1996-2002.
- Revilla, E., M. Bourzeix, and E. Alonso. 1991. Analysis of catechins and proanthocyanidins in grape seeds by HPLC with photodiode array detection. *Chromatographia* 31: 465-468.
- Sato, M., N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi, and H. Ochi. 1996. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* 44: 37-41.
- Sato, M., G. Maulik, P. S. Ray, D. Bagchi, and D. K. Das. 1999. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31: 1289-1297.
- Tyagi, A., R. Agarwal, and C. Agarwal. 2003. Grape seed extract inhibits EGF-induced and constitutively active mitogenic signaling but activates JNK in human prostate carcinoma DU145 cells: Possible role in antiproliferation and apoptosis. *Oncogene* 22: 1302-1316.
- Yilmaz, Y. and R. T. Toledo. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.* 52: 255-260.
- 横塚 弘毅. 2000. ワイン製造 (その7) シリーズ・醸造の基本技術. 日本醸造協会誌 95: 318-327.