

[研 究 報 文]

UPLC-DAD-TOFMS による熟成中の赤ワインのアントシアニン誘導体の分析

藤原 陽・久本雅嗣*・鈴木淳平・田村彰吾・斉藤史恵・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 1-13-1UPLC-DAD-TOFMS Analysis of Changes in Anthocyanin Derivatives in Red Wines
during Bottle StorageAkira FUJIWARA, Masashi HISAMOTO*, Junpei SUZUKI, Shogo TAMURA, Fumie SAITOH, and Tohru OKUDA
The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi

Anthocyanins are the major components responsible for the color of young wines. However, they are relatively unstable and tend to form anthocyanin derivatives during maturation and aging. Some of the anthocyanin derivatives are more stable than anthocyanins themselves. In this study, changes in anthocyanin derivative content as measured by UPLC-DAD-TOFMS were examined in Cabernet Sauvignon (CS) and Muscat Bailey A (MBA) wines during bottle storage, in order to determine the contribution of major pigment families to wine color. CS and MBA wines were produced in Japan from grapes from the same vineyard in vintages (2000-2008). It was found that the contents of anthocyanins and flavanol-anthocyanin acetaldehyde-mediated condensation products were decreased, whereas those of pyranoanthocyanins and polymeric pigments were increased in wines. The results indicate that the chemical reactivity of red pigments in wine is influenced by the grape variety and the chemical structure of each anthocyanin derivative during aging under bottle storage.

Key words: Anthocyanin, Polymeric Pigment, Pyranoanthocyanin, Wine

緒 言

赤ワインの赤色は、ブドウ果皮から溶出したアントシアニンに由来し、熟成中にワインの色調は紫色や輝きのある赤色から澄んだルビー、ガーネット、レンガ色、マホガニー色へと変化する。この色調の変化は、若い赤ワインの色調の主体である Malvidin-3-O-glucoside やそのアシル体など、ブドウ果皮由来のアントシアニンが、熟成中に温度や空気との接触の程度、pH、亜硫酸、他の成分などによって影響を受け、その色素組成が変化することは以前から知られている (Brouillard *et al.* 1977, Somers 1971)。ワインの熟成が進むにつれてブドウ果皮由来のアントシアニ

ン量が減少し、製造後数年経過すると、ほとんど存在しない。この間に赤ワインでは、スタッキングなどによるコピグメンテーションや、アントシアニンと他の化合物の間で新しい色素成分を形成して、赤ワインの色調を安定化している (Nagel *et al.* 1979, Singleton *et al.* 1992.)。Sato *et al.* (1996) は、製造年が異なるメルロー種のワインにおけるアントシアニンの重合と熟成の関係について調べ、熟成と共にブドウ果皮由来のアントシアニン量は減少し、分子量の大きい重合体へと変化することを報告している。さらに、アントシアニンやタンニンの重合が進み、分子量が大きくなるとともに、ラジカル捕捉活性も強くなることが示された (鈴木由美子ら 1999, 佐藤充克 2010)。また、横塚ら (1995) はワインの色調は、アントシアニンモノマー及び色素

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

2012年6月29日受理

オリゴマーと高分子色素体に由来していると考え、高分子色素体を精製し、重亜硫酸塩添加にもpH変化にも影響されないことを見いだした。

近年の質量分析や核磁気共鳴装置などの機器分析技術の発達により、発酵・熟成中に形成される赤ワイン中の色素成分について、以下に示すような成分が報告されている。

- ・アントシアニン縮合重合体 (Alcalde-Eon *et al.* 2007, Salas *et al.* 2005, Vidal *et al.* 2004)
- ・アントシアニン-フラバノール縮合重合体 (Remy *et al.* 2000, Sala *et al.* 2004)
- ・アセトアルデヒドを介したアントシアニン-フラバノール、アントシアニン-アントシアニンのエチルブリッジ体 (Rivas-Gonzalo *et al.* 1995, Timberlake *et al.* 1976)
- ・キサナンチリウム塩体 (Es-Safi *et al.* 1999)
- ・アントシアニンと *o*-キノン体との色素付加体 (Singleton *et al.* 1985, Somers 1971)
- ・ピラノアントシアニン (Bakker *et al.* 1997, Fulcrand *et al.* 1996)

が挙げられる。

アントシアニン誘導体の中でも、ピラノアントシアニンは、他の化合物(ピルビン酸、ビニルフェノール、アセトアルデヒド、シナナム酸誘導体など)がアントシアニジンの4位と5位の間でピラン環を形成したアントシアニン誘導体の総称であり、熟成した赤ワインが赤レンガ色になるということにこれらの成分の影響が大きい。アントシアニンは、亜硫酸が求核性のある4位と容易に置換することにより無色になる。それに対し、Vitisin Aのようなピラノアントシアニンはピラン環を形成し、4位が四級炭素のため、亜硫酸に対する安定性を示す。この結果、ピラノアントシアニンはアントシアニンより色調安定性が高い (Bakker *et al.* 1997, Oliveira *et al.* 2006, Rentzsch *et al.* 2010, Quijada-Morín *et al.* 2010)。現在のところ、熟成中の赤ワインのアントシアニン誘導体の変化について、製造年別や瓶内、樽貯蔵中のアントシアニン誘導体の各成分の変動の経緯を調査したものは報告されているが (Alcalde-Eon *et al.* 2006, Boido *et al.* 2006, María *et al.* 2005)、多年に渡って同じビンテージについて瓶内での熟成中のアントシアニン誘導体の経緯や、MBAワインのアントシアニン

誘導体の変化に関する報告はない。

本研究は、瓶内で熟成中の赤ワインのアントシアニンモノマーや発酵・熟成中に形成される赤色色素体の量と推移を広範囲で測定するため、超高速液体クロマトグラフィー-飛行時間型質量分析装置 (UPLC-DAD-TOFMS) によるワイン中に含まれる各成分の分析を行った。UPLCは、2 μm 以下の超微粒子をカラム充填剤に用いた液体クロマトグラフィー装置で、従来のHPLCと比較して、分解能・分析速度・感度において数倍の向上が可能である。また、TOFMSの特徴として、Scanモードにおける高感度・高分解能で各ピークの精密質量が測定でき、それぞれの成分の元素組成を導くことができる。そこで、山梨大学ワイン科学研究センターで製造した2000年から2008年のCabernet Sauvignon (CS) と Muscat Bailey A (MBA) ワインを1年ごとに3年間、UPLC-DAD-TOFMSでそれぞれのワイン中に含まれるアントシアニンとその誘導体の変化を測定した。

材料及び方法

試薬

アセトニトリル (LC/MS用、関東化学(株))、ギ酸 (LC/MS用、和光純薬工業(株))、ゲニステイン (フジッコ(株)) 及び、ロイシン-エンケファリン (Sigma-Aldrich Co.) を使用した。

ワイン

2000年~2008年に山梨大学ワイン科学研究センターで製造し、15°Cで1.8 Lのガラス瓶中に保存している Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*, CS) Muscat Bailey A (hybrid: Bailey \times Muscat Hamburg, MBA) ワインを試験試料とした。これらのワインの製造や貯酒管理方法は、横塚ら (2007) の方法に準ずる。それぞれのワインに内部標準としてゲニステインを2 mg/Lになるように加え、0.20 μm のPTFEフィルターでろ過し、2009年から2011年の各1年おきに5月にUPLC-DAD-TOFMSを用いて毎回同じ測定方法で分析を行った。

UPLC-DAD-TOFMSによる分析

UPLCは、ACQUITY UPLC[®]システム (Waters)、カラムはACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm , 2.1 \times 100 mm, Waters) を使用した。移動相は、A液: 0.1%ギ酸-水溶液、B液: 0.1%ギ酸-アセトニトリル溶液を用い、リ

ニアグラジエントにより 0.0 min, 99/1 (A/B, %/%) ; 3.0 min, 99/1; 30.0 min, 75/25; 40.0 min, 40/60; 42.0 min, 0/100、流速 0.2 mL/min、カラム温度 40°Cで行った。検出にはフォトダイオードアレイ装置（検出波長 200-600 nm）を用いた。TOFMS は LCT Premier™ XE (Waters) 飛行時間型質量分析装置を用いた。イオン化法は、ESI (ポジティブモード)、キャピラリー電圧 2.8 kV、コーン電圧 60 V、脱溶媒プレート 350 °C、イオン源温度 120°C、脱溶媒プレートガス流量 600 L/h、コーンガス流量 50 L/h、質量検出レンジは m/z 100-2000 及び、MS 用のリファレンスは、ロイシン-エンケファリン (25 fmol/mL) で行った。データ処理は MassLynx™ (Waters) で行った。測定は、各試料を 5 μ L を注入し、3 回ずつ行った。各成分の面積の算出は、内部標準のゲニステイン (t_R 35.0) を指標にして補正を行った。

結果及び考察

Cabernet Sauvignon (CS) と Muscat Bailey A (MBA) ワインを 1 年ごとに 3 年間超高速液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析装置 (UPLC-DAD-TOFMS) でワイン中に含まれる各成分の定性・定量分析を行った。Table 1 は、UPLC-DAD-TOFMS 分析によって得られた各ワインに含まれる主なアントシアニンやその誘導体を示す。これらの化合物の特定は、TOFMS より得られた精密質量の結果から推測される組成式と、そのフラグメントイオンの精密質量と組成式ならびに以前の報告 (Alcalde-Eon *et al.* 2006, 2007, Baoshan *et al.* 2010, Boido *et al.* 2006, Pati *et al.* 2006) から決定した。これらの主な化合物を Fig. 1, 2 に示す。その分析により、ブドウ果皮由来のアントシアニン (**1-4**, **8**, **10**, **11**, **13**, **14**, **17**)、発酵または熟成中に生成するピラノアントシアニン (**5-7**, **12**, **15**, **16**, **18-23**) 及び Malvidin-3-*O*-glucoside と catechin とのエチルブリッジ体 (**9**) の計 23 成分のアントシアニンとその誘導体を同定した。特に、Malvidin-3-(6-*p*-coumaroyl),5-*O*-diglucoside (**10**) は、MBA の果汁やワインに含まれ、CS にはないブドウ果皮由来のアントシアニンである (Yokotsuka *et al.* 1990)。Fig. 3 は、CS と MBA ワイン中のブドウ由来の主なアントシアニンとして Malvidin-3-*O*-glucoside (**4**) の 520 nm におけるピーク

面積の推移を示す。Malvidin-3-*O*-glucoside は、製造間もない時には多く含まれるが、時間が経過するにつれて減少した (Alcalde-Eon *et al.* 2006, Monagas *et al.* 2005)。

MBA ワインではその減少が顕著であった。Fig. 4 は、Malvidin-3-*O*-glucoside にピルビン酸が付加したカルボキシピラノアントシアニンである Vitisin A (**6**) の CS と MBA ワイン中での推移を示す。2002 年の CS、2008 年の MBA を除き、同じ製造年のワインでは 3 年間の分析中に、緩やかながら減少していた。しかしながら、Malvidin-3-*O*-glucoside ほど大きく減少はしなかった。Vitisin A と同じ類似の化学構造を持つ A-type Vitisin of Malvidin-3-*O*-(6-acetyl)glucoside (**7**) や A-type Vitisin of Malvidin-3-*O*-(6-*p*-coumaroyl)glucoside (**12**) も同様の傾向を示した。製造年による違いは、それぞれの醸造時のブドウの品質やアントシアニン量が影響すると推測される。2008 年の MBA ワインの Vitisin A は、熟成年数の経過とともに増加する傾向を示した。

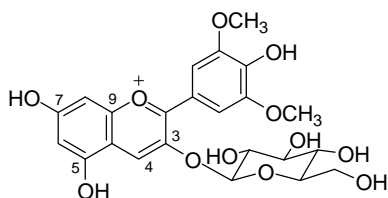
Fig. 5 は、ピラノアントシアニンの中でもヒドロキシフェニル付加体である Malvidin-3-*O*-glucose-4-vinylphenol (**19**) の CS と MBA ワイン中での推移を示す。Vitisin A (Fig. 4) は、逆に、本化合物は熟成時間が経過するとともにその量が増加する傾向を示した。同じヒドロキシフェニル付加体である Malvidin-3-*O*-glucoside-4-vinylcatechol (**16**) や Malvidin-3-*O*-glucoside-4-vinylguaiacol (**20**)、Malvidin-3-*O*-(6-*p*-coumaroyl)glucoside-4-vinylcatechol (**22**)、Malvidin-3-*O*-(6-*p*-coumaroyl)glucoside-4-vinylcatechol (**23**) も同様であった。この結果は Boido ら (2006) も示唆している。また、フラバニル-ビニルカテキンピラノアントシアニンの Malvidin-3-*O*-glucoside-4-vinylcatechin (**15**)、Malvidin-3-*O*-glucoside-4-vinylepicatechin (**18**) も同様の増加傾向を示した。

熟成した赤ワインには、高分子色素重合体 (Polymeric pigments) が多く含まれている (Somers 1971)。Fig. 6 は、2002 年製造の CS ワインの Abs. 520 nm におけるクロマトグラフを示す。赤ワインに含まれる高分子の色素重合体は、ODS カラムで分離時に保持が比較的強い画分であることが報告されている (Hayasaka *et al.* 2003, Peng *et al.* 2002)。

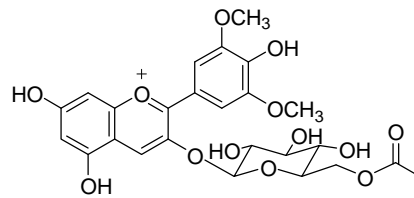
Table 1 Major anthocyanins and their derivatives as identified by UPLC-DAD-TOFMS in Cabernet Sauvignon and Muscat Bailey A wines.

No.	t_R [min]	Experimental m/z [M+H] ⁺	Theoretical m/z [M+H] ⁺	Experimental fragment ion		Formula	Compound
1	15.01	625.1794	625.1769	301.0761	463.1274	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₆	Pn-3,5-O-diglucoside
2	15.05	655.1879	655.1874	331.0871	493.1395	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₇	Mv-3,5-O-diglucoside
3	18.30	463.1256	463.1240	301.0768		C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	Pn-3-O-glucoside
4	19.20	493.1378	493.1346	331.0853		C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	Mv-3-O-glucoside
5	20.80	531.1196	531.1139	369.0636		C ₂₅ H ₂₅ O ₁₃	A-type Vitisin of Pn-3-O-glucoside
6	21.56	561.1255	561.1244	399.0777		C ₂₆ H ₂₅ O ₁₄	Vitisin A
7	22.98	603.2546	603.1350	399.0745		C ₂₈ H ₂₇ O ₁₅	A-type Vitisin of Mv-3-O-acetylglucoside
8	24.60	535.1451	535.1452	331.0856	493.1286	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₃	Mv-3-O-(6-acetyl)glucoside
9	24.98	809.2389	809.2293	331.0883		C ₄₀ H ₄₁ O ₁₈	Mv-3-O-glucoside-8-ethyl-catechin
10	25.22	801.2278	801.2242	331.0963	493.1363	C ₃₈ H ₄₁ O ₁₉	Mv-3-(6-p-coumaroyl),5-O-diglucoside
11	25.48	771.2159	771.2136	301.0756	463.1252	C ₃₇ H ₃₉ O ₁₈	Pn-3-(6-p-coumaroyl),5-O-diglucoside
12	27.07	707.1603	707.1612	399.0759	561.1466	C ₃₅ H ₃₁ O ₁₆	A-type Vitisin of Mv-3-O-(6-p-coumaroyl)glucoside
13	27.61	655.1879	655.1663	331.0790	493.1187	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₅	Mv-3-O-(6-caffeoyl)glucoside
14	29.28	805.2021	805.1980	643.1479		C ₄₀ H ₃₇ O ₁₈	Mv-3-O-glucoside-4-vinylcatechin
15	29.40	639.1752	639.1714	331.0907	493.1494	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₄	Mv-3-O-(6-p-coumaroyl)glucoside
16	30.16	625.1588	625.1557	463.1177		C ₃₁ H ₂₉ O ₁₄	Mv-3-O-glucoside-4-vinylcatechol
17	31.10	677.1998	677.1506	301.0557	463.1098	C ₃₄ H ₂₉ O ₁₅	Pn-3-O-(6-p-coumaroyl)glucoside
18	31.20	805.2001	805.1980	643.1487		C ₄₀ H ₃₇ O ₁₈	Mv-3-O-glucoside-4-vinylepicatechin
19	31.56	609.1619	609.1608	447.1134		C ₃₁ H ₂₉ O ₁₃	Mv-3-O-glucoside-4-vinylphenol
20	32.06	639.1708	639.1714	477.1246		C ₃₂ H ₃₁ O ₁₄	Mv-3-O-glucoside-4-vinylguaiacol
21	32.83	651.1753	651.1714	447.1121		C ₃₃ H ₃₁ O ₁₄	Mv-3-O-(6-acetyl)glucoside-4-vinylphenol
22	33.00	771.1920	771.1925	463.0834		C ₄₀ H ₃₅ O ₁₆	Mv-3-O-(6-p-coumaroyl)glucoside-4-vinylcatechol
23	33.72	755.2006	755.1976	447.1132	609.2082	C ₄₀ H ₃₅ O ₁₅	Mv-3-O-(6-p-coumaroyl)glucoside-4-vinylphenol

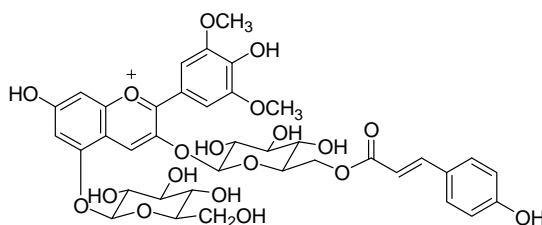
Values were determined by integration of UPLC-DAD signals and response factors were calculated from standards. Each value is the mean of three separate experiments. Mv: Malvidin, Pn: Peonidin



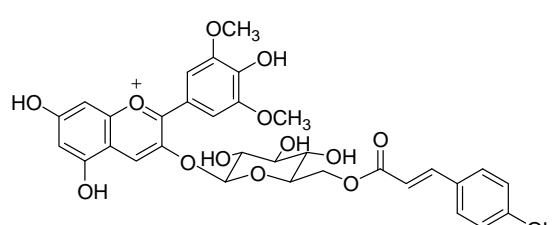
Malvidin-3-O-glucoside (4)



Malvidin-3-O-(6-acetyl)glucoside (8)



Malvidin-3-(6-p-coumaroyl),5-O-diglucoside (10)



Malvidin-3-O-(6-p-coumaroyl)glucoside (14)

Fig. 1 Structures of major anthocyanins identified in Cabernet Sauvignon and Muscat Bailey A wines.

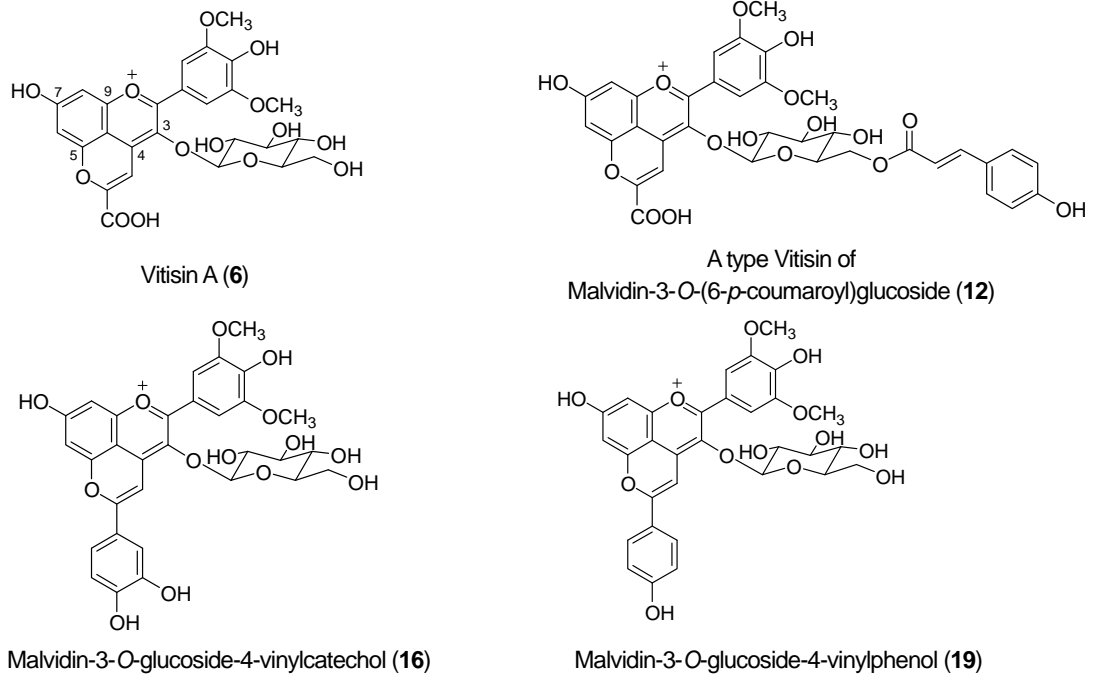


Fig. 2 Structures of major pyranoanthocyanins identified in Cabernet Sauvignon and Muscat Bailey A wines.

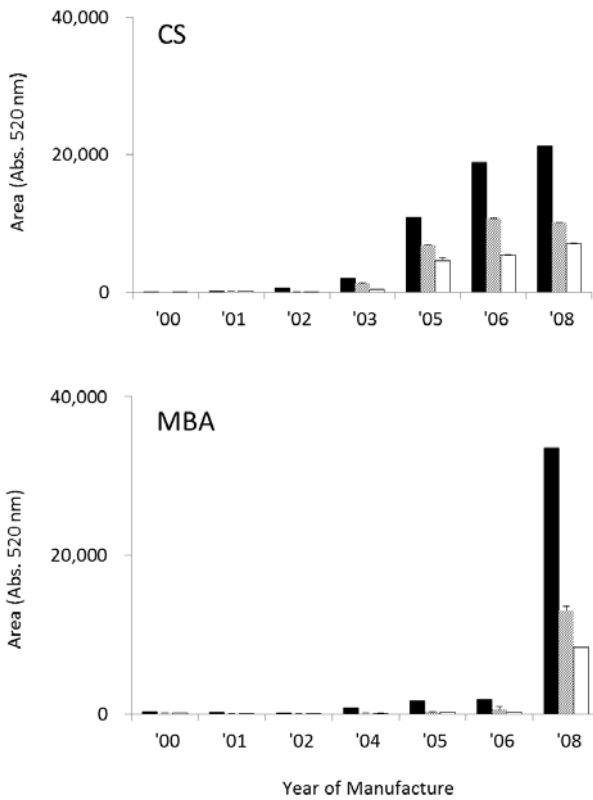


Fig. 3 Changes in the level of Malvidin-3-O-glucoside in Cabernet Sauvignon and Muscat Bailey A wines. Analyzed year: ■, 2009; ▨, 2010; and □, 2011. Data were reported as mean ± standard deviation of triplicate determinations.

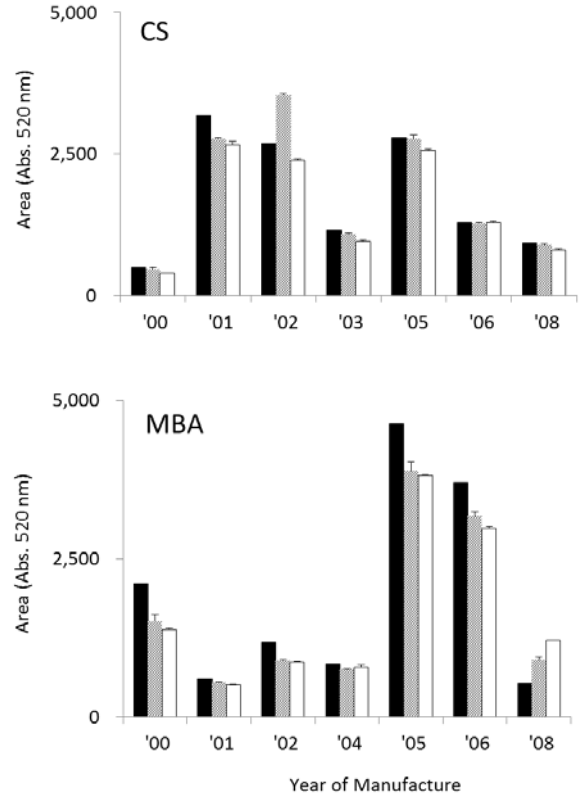


Fig. 4 Changes in the level of Vitisin A in Cabernet Sauvignon and Muscat Bailey A wines. Analyzed year: ■, 2009; ▨, 2010; and □, 2011. Data were reported as mean ± standard deviation of triplicate determinations.

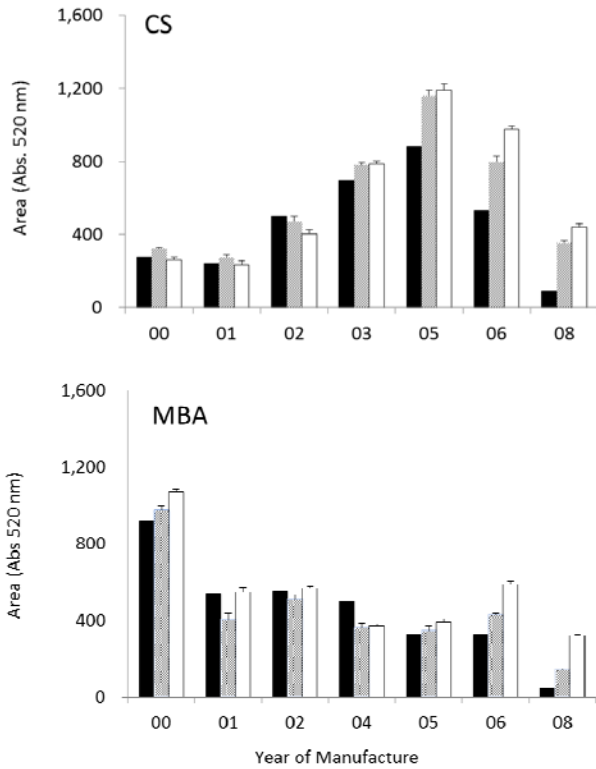


Fig. 5 Changes in the level of Malvidin-3-O-glucoside-4-vinylphenol in Cabernet Sauvignon and Muscat Bailey A wines. ■, 2009; ▨, 2010; □, 2011. Data were reported as mean ± standard deviation of triplicate determinations.

本研究では、Fig. 6のリテンションタイム31.5分から35分にかけてブロードに現れるピークを高分子色素重合体とした。これらから得られた結果から、CSとMBAワインの520 nmにおけるクロマトグラムで現れたすべてのピークのエリアの値をアントシアニン、ピラノアントシアニン、高分子色素重合体及びその他の化合物（エチルブリッジ体や定性できなかった化合物）の各成分群別に分け、Fig. 7に示した。製造年による違いはあるが、製造年が新しいワインは、ブドウ果皮由来のアントシアニン（Malvidin-3-O-glucosideやMalvidin-3-O-(6-acetyl)glucoside）が赤色色素成分の全体の大部分を占めていて、時間が経過するにつれて、ブドウ果皮由来のアントシアニンが減少し、2000～2003年に製造したワインには、ほとんどなかった。これは、亜硫酸との反応、水和による分解、ピラノアントシアニンや高分子色素体への変換が原因と考えられる。MBAワインでもCSワインと同じような減少傾向を示したが、製造から3年以上経過したワイン中のブドウ果皮由来のアントシアニンの大半は、Malvidin-3-(6-p-coumaroyl),5-O-diglucoside (10)であった（データは示していない）。

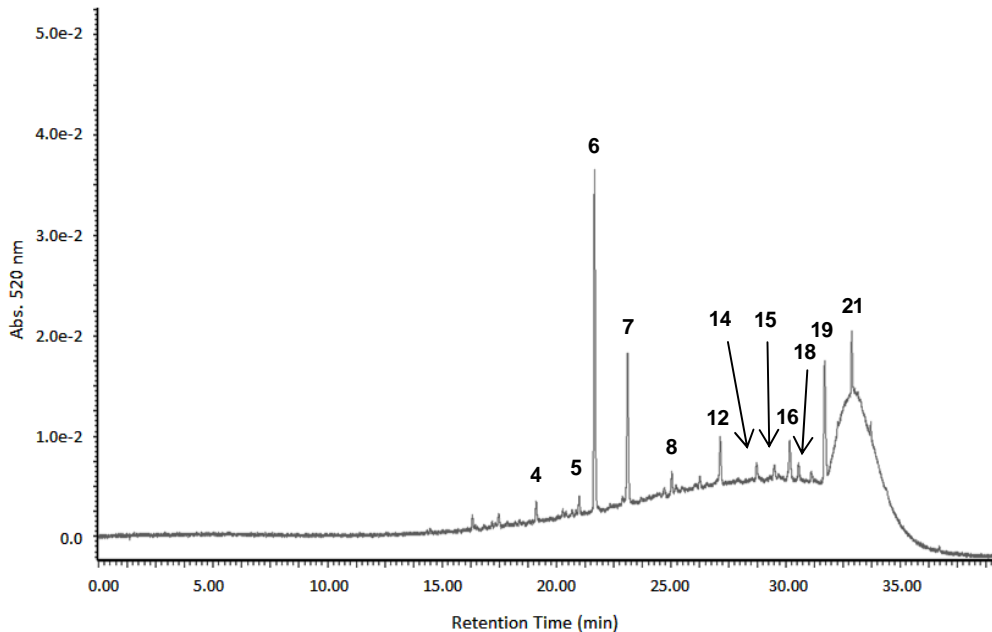


Fig. 6 UPLC-DAD chromatogram (Abs. 520 nm) of materials in Cabernet Sauvignon wine (2002).

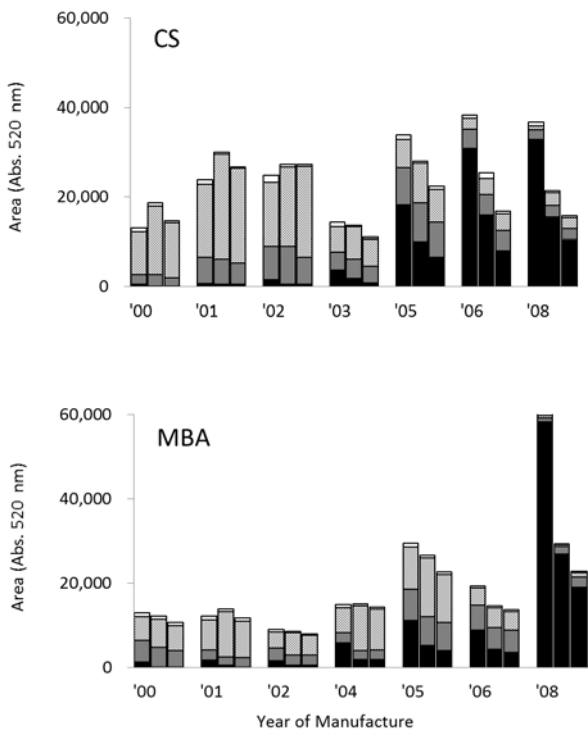


Fig. 7 Changes in pigment components of Cabernet Sauvignon and Muscat Bailey A wines. Pigment Components: ■, anthocyanins; ■, pyranoanthocyanins; ▨, polymeric pigments; and □, other compounds. Analyzed year: left, 2009; center, 2010; and right, 2011. Data are means ± standard deviation of triplicate determinations.

アシル化アントシアニンは、非アシル化アントシアニンより分解が少し速いとされているが (Monagas *et al.* 2005)、本化合物はそれにあてはまらなかった。これは、Malvidin-3-*O*-glucosideと比較し、5位がグルコシル化していることで分子内でのスタッキングによる保護効果や、アグリコンの2位への水による求核的置換を防いでいるために比較的長期で安定していると考えられる。Malvidin-3-(6-*p*-coumaroyl),5-*O*-diglucoside (10) は、*Vitis labrusca*や*V. coignetiae*に含まれる果皮由来アントシアニンであり、MBAでもMalvidin-3-*O*-glucosideの次に多い果皮由来のアントシアニンであることから、比較的製造年が若いMBAワインの色調へ大きく影響を与えていると考えられる。

Fig. 4 や Fig. 5 で示すように、各ピラノアントシアニンでは熟成年数とともに増減の変化が見られたが、ピ

ラノアントシアニンの全体量としては、時間が経過してもその量に大きな変化はなかった。ピラノアントシアニンは、アグリコンの4位の水による求核的置換に対して、4位が置換されているため、アントシアニンより安定性が高い。また、亜硫酸に対する安定性も、ピラノアントシアニン色素体の4位が亜硫酸の求核置換反応を妨げる構造をしているためと考えられる。また、立体配座の影響も大きい。平面の芳香族を持つアントシアニンは、すでに強い分子内コピグメンテーションの効果が確認されているが、ピラノアントシアニンはピラン環を有することから、さらに強いスタッキングを起こしやすくなるため、化学構造の安定性に寄与していると思われる。ワイン中のピラノアントシアニンとフラバノールやフェニルプロパノイドとの分子間コピグメンテーションは、ワインの赤色の濃色効果高めたり、水和に対する抵抗性を示す (Duenas *et al.* 2006. Gómez-Míguez *et al.* 2006)。このように、熟成年数が長いワインでは、ピラノアントシアニンはワインの色調の安定性に寄与している成分といえる。

高分子色素重合体は、同じ製造年でも時間が経過すると、Abs. 520 nmにおいて占める割合が多くなる。特に製造年が古いCSワインでは、高分子色素重合体の占める割合が多くなった。MBAワインは、CSワインと比較すると高分子色素重合体の量は少なかったが、いずれの品種の熟成したワインも、高分子色素重合体が赤ワインの色調に大きく影響していると示唆される。樽貯蔵やMicro-oxygenation技術など比較的ワイン中の溶存酸素が多い条件下では、ブドウ果皮由来のアントシアニンは急速に低下し、早い段階で高分子色素重合体が形成され、ワインの色調が安定する (Cano-López *et al.* 2008, 2010)。今回の瓶内での熟成は、比較的酸化条件下と考えられるので、高分子色素重合体の形成は穏やかに進んでいると思われる。Malvidin-3-*O*-glucosideとcatechinとのエチルブリッジ体 (9) は、発酵初期の段階で急速に増えるが、アントシアニンより反応性が高く、不安定で、今回の結果でも製造年が古いワインでは検出されなかった。しかしながら、エチルブリッジ体は、高分子色素重合体を形成する上でその初期段階の構造の一つと考えられており (Jingren *et al.* 2010)、高分子色素重合体の発達や化学構造を知る上で非常に重要である。また、高分子色素

重合体の部分構造として、Malvidin-3-*O*-glucosideとフラバノールとの直接縮合体も確認されている (Remy *et al.* 2000, Hayasaka *et al.* 2003.)。高分子色素重合体は、ブドウの品種や酸素、樽由来の成分との反応などいろいろな影響により、高分子色素重合体の化学構造やその特性は異なると考えられる。熟成した赤ワインで最も重要な色素である高分子色素重合体の化学構造やその特性については、まだ不明な点が多く、今後調査する必要がある。

要 約

赤ワインの赤色は、ブドウ果皮から溶出するアントシアニンに由来する。しかし、熟成が進むにつれてブドウ由来のアントシアニンは減少し、醸造後数年経過するとほとんどなくなり、色調も熟成によって赤色から赤褐色へと変化する。この色調の変化は、アントシアニンの非酵素的酸化や他のカルボニル化合物やフラバノールなどと反応して、ピラノアントシアニンや高分子の色素重合体 (Polymeric pigments) が形成され、ワインの品質に密接に関連している。Cabernet Sauvignon と Muscat Bailey A に含まれるアントシアニンや色素重合体の化学構造と含量について、超高速液体クロマトグラフィー—飛行時間型質量分析装置 (UPLC-DAD-TOFMS) で分析を行った。その結果、製造年が新しいワインは、ブドウ由来のアントシアニン (Malvidin-3-*O*-glucoside など) が赤色色素成分の全体の大部分を占めているが、時間が経過するにつれて、ブドウ由来のアントシアニンが減少した。発酵で生じる主要なピラノアントシアニンである Vitisin A は緩やかに減少した。それに対し、ビニルフェノール付加体のピラノアントシアニン (Malvidin-3-*O*-glucoside-4-vinylphenol など) は時間の経過とともに増加する傾向にあった。同じ製造年でも年数が経過すると、ピラノアントシアニンや高分子色素重合体が、赤ワイン中の赤色色素成分で占める割合が多くなり、赤ワインの色調に大きく影響を及ぼしていることが考えられた。

謝 辞

本論文は、平成23年度財団法人日本食品化学研究振興財団の研究助成により実施されました。

文 献

- Alcalde-Eon, C., M.T. Escribano-Bailon, C. Santos-Buelga and J.C. Rivas-Gonzalo. 2006. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta* 563: 238-254.
- Alcalde-Eon, C., M.T. Escribano-Bailon, C. Santos-Buelga and J.C. Rivas-Gonzalo. 2007. Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wine by means of HPLC-DAD-ESI/MSn. *J. Mass Spectrom.* 42: 735-748.
- Bakker, J. and C.F. Timberlake. 1997. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agric. Food Chem.* 45: 35-43.
- Baoshan, S., F.A. Tiago and S.M. Isabel. 2010. A new class of anthocyanin-procyanidin condensation products detected in red wine by electrospray ionization multi-stage mass spectrometry analysis. *Rap. Comm. in Mass Spectrom.* 24: 254-260.
- Boido, E., C. Alcalde-Eon, F. Carrau, E. Dellacassa and J.C. Rivas-Gonzalo. 2006. Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. Cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6692-6704.
- Brouillard, R. and J. E., Dubois. 1977. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* 99: 1359-1364.
- Cano-López, M., F. Pardo-Mínguez, G. Schmauch, C. Saucier, P.L. Teissedre, J.M. López-Roca and E. Gómez-Plaza. 2008. Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents. *J. Agric. Food Chem.* 56: 5932-5941.
- Cano-López, M., J.M. López-Roca, F. Pardo-Mínguez and E. Gómez-Plaza. 2010. Oak barrel maturation vs. micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour. *Food Chem.* 119: 191-195.
- Duenas, M., H. Fulcrand and V. Cheynier. 2006. Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions. *Anal.*

- Chem. Acta 563: 15-25.
- Es-Safi, N.E., C. Le Guerneve, H. Fulcrand, V. Cheynier and M. Moutounet. 1999. New polyphenolic compounds with xanthylium skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *J. Agric. Food Chem.* 47: 5211-5217.
- Fulcrand, H., P.J. Cameira-dos-Santos, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier and L. Favre Bonvin. 1996. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc. Perkin 1*: 735-739.
- Gómez-Míguez, M., S. González-Manzano, M. T. Escribano-Bailón, F. J. Heredia and C. Santos-Buelga. 2006. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5422-5429.
- Hayasaka, Y. and J.A. Kennedy. 2003. Mass spectrometric evidence for the formation of pigmented polymers in red wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9: 210-220.
- Jingren H, R.F.C. Alexandre, M. Nuno and D.F. Victor. 2010. Spectral features and stability of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments isolated from red wines. 58: 9249-9258.
- María M., G.C. Carmen and B. Begoña. 2005. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis Vinifera* L. during aging in the bottle. I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 607-614.
- Nagel, C.W. and L.W. Wulf, 1979. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 30: 111-116.
- Oliveira, J., C. Santos-Buelga, V.A.M.S. Silva, V. de Freitas, and N. Mateus. 2006. Chromatic and structural features of blue anthocyanin-derived pigments present in port wine. *Anal. Chim. Acta* 563: 2-9.
- Quijada-Morín N, O, Dangles, J.C. Rivas-Gonzalo and M.T. Escribano-Bailón. 2010. Physico-chemical and chromatic characterization of malvidin 3-glucoside-vinylcatechol and malvidin 3-glucoside-vinylguaiacol wine pigments. *J. Agric. Food Chem.* 58: 9744-9752.
- Pati, S., I. Losito, G. Gambacorta, E. La Notte, F. Palmisano and P.G. Zambonin. 2006. Simultaneous separation and identification of oligomeric procyanidins and anthocyanin-derived pigments in raw red wine by HPLC-UV-ESI-MSⁿ. *J. Mass Spectrom.* 41: 861-871.
- Peng, Z., P.G. Iland, A. Oberholster, M.A. Sefton and E.J. Waters. 2002. Analysis of pigmented polymers in red wine by reverse phase HPLC. *Aust. J. Grape Wine Res.* 8: 70-75.
- Remy S, H. Fulcrand, B. Labarbe, V. Cheynier and M. Moutounet. 2000. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *J. Sci. Food Agric.* 80: 745-751.
- Rentsch, M., M. Schwarz, P. Winterhalter, D. Blanco-Vega and I. Hermosin-Gutiérrez. 2010. Survey on the content of vitisin A and hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Tempranillo wines. *Food Chem.* 119: 1426-1434.
- Rivas-Gonzalo J.C., S. Bravo-Haro and C. Santos-Buelga. 1995. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1444-1449.
- Salas, E, V. Atanasova, C. Poncet-Legrand, E. Meudec, J.P. Mazauric and V. Cheynier. 2004. Demonstration of the occurrence of flavanolanthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Anal. Chim. Acta.* 513: 325-332.
- Salas, E, M. Duenas, M. Schwarz, P. Winterhalter, V. Cheynier and H. Fulcrand. 2005. Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4536-4546.
- 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.
- Singleton, V.L., M. Salgues, J. Zaya and E. Trousdale. 1985. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 50-56.
- Singleton, V.L. and E.K. Trousdale. 1992. Anthocyanin-tannin interactions explaining differences in

- polymeric phenols between white and red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 63-70.
- Somers T.C. 1971. Polymeric nature of wine pigments. *Phytochem.* 10: 2175-2186.
- Timberlake, C.F. and P. Bridle. 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 27: 97-105.
- Vidal, S., E. Meudec, V. Cheynier, G. Skouroumounis and Y. Hayasaka. 2004. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7144-7151.
- Yokotsuka, K. and N. Nishino. 1990. Extraction of anthocyanins from Muscat Bailey A grape skin. *J. Ferm. Bioeng.* 69: 328-334.
- 佐藤充克. 2010. ワインの熟成と成分の変化について -最近の醸造方法と機能性-. *New Food Industry*, 52: 59-65.
- 鈴木由美子, 佐藤充克 1999. ゲル濾過クロマトグラフィーによるワイン・アントシアニンの分画および抗酸化能. *J. ASEV Jpn.* 10: 112-113.
- 横塚弘毅. 1995. カベルネ・ソービニオン及びマスカット・ベリーA赤ワインの熟成中における色調の変化 I. 色素パラメータのスペクトル分析. *日本醸造協会誌.* 90: 222-229.
- 横塚弘毅. 1995. カベルネ・ソービニオン及びマスカット・ベリーA赤ワインの熟成中における色調の変化 II. 赤ワインのイソアミルアルコール抽出で水層に残った色素ポリマー画分の性質. *日本醸造協会誌.* 90: 485-491.
- 横塚弘毅. 1995. カベルネ・ソービニオン及びマスカット・ベリーA赤ワインの熟成中における色調の変化III. 赤ワインの溶媒抽出による4つの色素画分の分別と得られた画分のpH及び亜硫酸に対する感受性. *日本醸造協会誌.* 90: 560-565.
- 横塚弘毅. 2002. ワイン製造 (その7). *日本醸造協会誌.* 95: 318-327.
- 横塚弘毅, 福井正一, 久本雅嗣, 奥田 徹. 2007. 1993年~2003年に製造したワイン貯蔵中のタンパク質の変化. *J. ASEV Jpn.* 18: 3-14.