

# カカオポリフェノールの特性

## その生物学的利用率に関する最近の進歩

オーガステイン・スカルベルト (フランス国立農学研究所)

### 要約:

ココアはポリフェノールの重要な供給源である。カカオポリフェノール (CP) は多くのプロシアニジンと少量のカテキンモノマーを含んでいる。これらのポリフェノールは生物学的利用率が大きく異なる。動物やヒトによる試験によればカテキンモノマーは腸管壁からよく吸収されるのに対し、プロシアニジンは分子量が大きくほとんど吸収されない。経鼻胃挿入管による臨床実験によればプロシアニジンは胃の中では消化されない。したがってほとんどのココアプロシアニジンは大腸に到達する。ヒト糞便中に存在する分離菌による *in vitro* の検討によれば、プロシアニジンは腸内細菌によって広範囲に分解され、さまざまなポリフェノール酸代謝産物となる。以下にプロシアニジンの生物学的利用率に関して最新データをもとにココア健康特性について述べる。

### 序論:

ココアはポリフェノールが最も豊富な食品原料のひとつである。ココアはフラバノールを含むが、それらはエピカテキンやカテキンなどのモノマーとオリゴマーならびにポリマー (プロシアニジン) などの特徴的なポリフェノールからなる。総ポリフェノール量はチョコレートの種類によっても異なるが500–840mg/100g程度であり、ココア粉末では2000mg/100gになる。また7000mg/100gもの高ポリフェノール含量を示すココア粉末も報告されている。フラバノールのオリゴマーならびにポリマーはポリフェノール全体の少なくとも90%を占め、カテキンモノマーは5–10%を占める。

このようにカカオのポリフェノール含量が高いことは食事によるポリフェノール摂取にたいしてカカオ製品がきわめて大きな影響をもつということである。代表的なオランダ人のサンプル調査では食事性カテキンモノマー摂取量は1日50mgと推定されるが、なかでもチョコレートはおもなカテキン供給源で、このうちの3–20%がチョコレートによるものと考えられている。食事性のプロアントシアニジンオリゴマーならびにポリマー摂取については、これらが食品中にどれくらい含まれているかの正確なデータに乏しいためはっきりしたことは分からないが、1日数百mg程度になるかもしれない。カカオ製品がプロアントシアニジンの摂取にどのくらい寄与しているかははっきりしないが、カテキンと同程度と考えてよいかもしれない。それは植物中ではカテキンとプロシアニジンとはしばしば結合しているからである。

カテキンならびにプロシアニジンは栄養学的にも医学的にもたいへん興味深い物質である。それは抗酸化能が高く、循環器系疾患やがんの危険性を少なくする予防効果が期待されるからである。いくつかの異なる *in vitro* の試験結果からはカカオフラバノールはLDLの酸化をおさえ、過酸化した亜硝酸に誘導されるチロシンの硝酸化をおさえ、分離したラット大動脈の内皮細胞依存性弛緩をうながし、末梢血単核細胞中のサイトカイン転写を調節することが確認されている。

これら *in vitro* の試験によって CP は生物活性に富み、組織内標的に到達すると考えられる。カテキンモノマーは腸管壁でよく吸収され、チョコレートとして吸収されたエピカテキンの約 25–30% は尿中で吸収される。しかしプロシアニジンの生物学的利用率についてはほとんど分かっていなかった。生体内におけるエピカテキンやプロシアニジンの効果をそれぞれの役割のなかで評価するためには、カカオや CP 抽出物によってこれまでにみられていたことを *in vivo* で生物学的利用率として確かめることが重要である。ヒトによって吸収された CP については、血漿中の抗酸化力を高める、LDL の酸化抵抗性を高める、血小板の活性化を調整したり、血漿中のロイコトリエン/プロスタサイクリンの割合を減少させるなどの効果が報告されている。摂取したプロシアニジンの健康への影響を明らかにするために、その腸管吸収ならびに代謝について動物およびヒトの細胞壁モデルを用いた *in vitro* の試験を行った。

プロアントシアニジンは腸管壁からほとんど吸収されない

プロシアニジンはポリマーとしての性質や高分子化合物であることから他の植物性ポリフェノールと異なっている。この特性のため腸管壁からの吸収は少なく、また標準的な商品が少ないため、その生物学的利用率に関しては最近までほとんど分かっていなかった。1970年代にブドウの木に放射性同位元素による前駆体をフィードしておなじく放射性同位元素でラベルしたプロアントシアニジンを調製する試みが行われたが、純度が高くなかったため吸収率はよく分からなかった。われわれはヒト小腸上皮細胞 (Caco-2) の単層での輸送によって吸収率を求めるために放射性同位元素でラベルした高純度のプロアントシアニジンを調製した。用いたのは柳若枝の薄皮で、それはカテキン、プロシアニジンダイマー (ダイマー-B3 = カテキン- (4a→8) - カテキン) やプロシアニジントリマー (トリマー-C2 = カテキン- (4a→8) - カテキン- カテキン) を高濃度に含有するからである。方法は柳若枝のうすい葉柄に  $1-^{14}\text{C}$  酢酸塩をフィードした。平均重合度 6 のカテキン、ダイマー、トリマーおよびオリゴマー分画は溶媒抽出およびセファデックス LH クロマトグラフィーならびにセルロース高速液体クロマトグラフィーによって精製した。純度はオートラジオグラフィーならびにチオール基の化学的分解によって調べた。

異なる  $^{14}\text{C}$  でラベルしたプロシアニジンと (+) - カテキンを透過性膜上で融合させてヒト小腸上皮細胞 (Caco-2) 舌端にべつべつに加えた。プロシアニジンの膜透過性は好塩基性画分に 2–3 時間暴露して放射性を測定して評価したところ、(+)-カテキンモノマー、ダイマー-B3 およびトリマー-C2 の間で透過性に明らかな差はみられなかった。ポリマー分画は透過性が明らかに異なる画分がみられたが、重合度 4 以上のプロアントシアニジンは腸上皮を通して吸収されなかった。

プロシアニジンの生物学的利用率についてラットを用いてさらに検討した。柳若枝のカテキンより大量に精製したダイマー-B3 を半合成食餌とともに 24 時間投与した。それとは別に 2 群のラットにカテキン食餌を与えたが、これはブドウの種からの抽出物を原料としており、カテキン、エピカテキンならびにプロシアニジンを含んでいる。サルファターゼおよびグルクロニダーゼによる分解後の血漿中カテキンおよびプロシアニジンを定量し、尿素は多電極性電量計をつけて高速液体クロマトグラフィーにより追跡した。血漿中のカテキン、エピカテキンおよび 3'-O-メチル誘導体は食餌投与 3 時間後ならびに 9 時間後に定量した。尿素としての回収率は投与して消化されたうちの 29–43% であった。一方、ダイマーは血漿、尿のいずれからも検出されず、生物学的利用率はきわめて低いことを示している。

最近の二つの臨床治験でも同様の結果が得られている。ひとつは323mgのカテキンモノマーならびに256mgのプロシアニジンダイマーを含むココア飲料をボランティアに飲んでもらうというものである。ココアの主なダイマーであるダイマーB2（エピカテキン（4a-8）-エピカテキン）が摂取2時間後に0.04  $\mu$ M検出されたが、これはエピカテキンの6.0  $\mu$ Mという濃度にくらべてきわめて低い。同様にテアフラビン混合物（お茶の発酵過程中にカテキンが酸化的に結合して生じるダイマー）は2名のボランティアによって消化された後、尿中テアフラビンとして検出されたのは投与量のわずか0.0006%にすぎない。この値は緑茶摂取後のエピカテキンおよびエピガロカテキンがそれぞれ3%および6%であるのにくらべ著しく低い。

プロアントシアニジンは腸内ではカテキンモノマーにまで分解されない

プロアントシアニジンは酸化的条件でアントシアニジン（内側のポリマー骨格）やカテキン（低分子の末端部分）に分解される。この反応は加熱条件下にブタノール・塩酸混合系で植物中のプロアントシアニジンを推定する方法としてこれまで最も一般的に用いられてきた。水系条件下では再凝結反応がおり、純度の低いポリマーが生成したり、アントシアニジンの収率が低くなる。胃を模した*in vitro*試験によれば、胃の中でプロアントシアニジンの脱ポリマー化がおり、生理活性に富んだカテキンモノマーが形成される。そこでわれわれは胃の中におけるカカオプロシアニジンの安定性を評価する臨床試験を行った。

プロシアニジン733mgおよびカテキンモノマー351mgを含むココア飲料を6人のボランティアに飲んでもらった。胃内容物は経鼻胃チューブを用いて胃内が空になるまで10分ごとにサンプリングした。カテキンおよびプロシアニジンは順相および逆相の高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。胃内通過中のカテキン、プロシアニジンダイマーならびにオリゴマーの相対濃度はほとんど変わらず、プロアントシアニジンはヒト胃内ではほとんど脱ポリマー化されない。*in vivo*の試験結果と*in vitro*のそれが一致しないのは*in vitro*がpH 2という酸性条件下で行われたことによると思われる。実際の胃ではココア飲料が消化される段階ではpH 5、また胃内容物が無い時にはpH 2程度と変動すると考えられる。

脱ポリマー化が起きていないことはプロシアニジンを投与したネズミの実験でも確かめられている。ダイマーB3摂取後にカテキンモノマーは血漿中ならびに尿中のいずれからも見出されなかった。ブドウの種からの抽出物（カテキンモノマーおよびプロシアニジンの両方を含む）を与えたところ、血漿中に存在するか尿中に排泄されるカテキンモノマーは抽出物に含まれると考えられるカテキンやエピカテキン吸収量とは異なった量であった。

プロアントシアニジンは大腸内でフェノール酸に分解される

さまざまな*in vitro*ならびに*in vivo*試験の結果、カテキンは腸内細菌によって芳香族の酸に分解されていることが明らかになった。しかしプロアントシアニジンが微生物に利用されにくい性質も持っていることもよく知られており、腸内細菌によって分解されるかどうか疑わしい。そこでわれわれはヒト腸内細菌の存在下で放射性同位元素を用い、プロシアニジンポリマーの消長を*in vitro*試験によって確かめた。

上述したプロシアニジンポリマー、遊離のカテキンモノマー、あるいはプロシアニジンダイマーおよびモノマーをヒト腸内細菌存在下で嫌氣的に振とうしたところ、12ないし48時間後にプロシア

ニジンは広い範囲で分解され、その過程で数種の代謝産物がオートラジオグラフィーによって検出された。

GS-MSによって同定された代謝産物はm-ヒドロキシフェニルバレル酸、pおよびm-ヒドロキシフェニルプロピオン酸、フェニルプロピオン酸、pおよびm-ヒドロキシフェニル酢酸であった。ラット盲腸の腸内細菌を用いた同様の*in vitro*試験で以前に報告されているプロシアニジンダイマーB3の代謝産物としてのカテキンは、今回のわれわれの試験では確認されなかった。

チョコレート摂取後に尿中あるいは尿への排泄過程にみられるさまざまな芳香族酸を分析する方法として、われわれはLC-ESI-MS-MS法を開発した。11人の被験者に80gのチョコレートを食べてもらった（このチョコレートはプロアントシアニジン439mg、カテキンモノマー147mgを含む）。試験期間中、被験者にはポリフェノールを含まない食事をしてもらい、チョコレート摂取24時間前ならびに摂取時、および摂取48時間後に採尿した。その結果、チョコレート摂取により6種のフェノール酸排泄が増加し、そのうち5種は摂取後6-9時間に検出され、それは腸内細菌由来のものであった。またこれら化合物の化学的性質はカテキンならびにプロシアニジン前駆物質の代謝産物によるものであった。これらはチョコレート摂取後3時間以内にチョコレートバニリンの吸収や酸化によって生じるバニリン酸とは異なっていた。ここにみられたフェノール酸はフェノール化合物の減少に伴って生じたもので、酸化ストレスを防ぐ働きをしていると思われる。

フェノール酸代謝産物の重要性を評価するため、われわれは吸収率の良いカテキンと吸収率の低いワインポリフェノールそれぞれを含む食餌を与えたラットによる比較試験を行った。ワイン抽出物はプロシアニジン、高分子酸化ポリフェノール、フェノール酸、フラバノール、アントシアニン、フラボノールを含んでいる。カテキン食では尿中排泄された腸内細菌由来の代謝産物は摂取カテキン量の47%w/wで、この値はカテキンそのものに由来する排泄量41.2%w/wよりはるかに低い。一方ワインポリフェノールでは、芳香族酸は摂取した全ポリフェノール量の10%w/wで、何らの変化も受けないカテキンは1.2%である。ワインポリフェノールにみられた芳香族酸排泄量の増大はこれらが腸のあたりではほとんど吸収されることなく大腸に達しているためと思われる。

#### プロシアニジンの生物学的利用性と作用機作

ヒトに消化された後のCPの生物学的効果については次のようないくつかの課程で説明される。

すなわち——腸管壁からのカテキンモノマーとしての吸収

——腸管壁からのプロアントシアニジンおよびカテキン腸内細菌代謝物としての吸収

——腸内腔におけるプロアントシアニジンの部分的作用

ヒトにおけるCPの効果を臨床的にみた試験ではチョコレートで40-80g、ココア粉末では18-36gという量で確かめられている。これだけのチョコレートならびにココアの摂取量はカテキンモノマーとしては135-315mgに相当する。これだけ高濃度に摂取した結果からはカテキンモノマーは腸管で吸収された後に抗酸化性、血小板凝集作用およびエイコサノイド合成に明らかな効果がみられる。

こうした生物学的効果の多くはカテキンやプロシアニジンの細菌由来代謝産物によって説明できるが、ポリフェノールの細菌由来代謝産物の生物学的特性についてはこれまでほとんど研究されていない。フェノールの特性からいって酸化ストレス防止効果はあるであろう。これらのうち3,4-ジヒドロフェニル酢酸や4-ヒドロキシフェニル酢酸は血小板凝集抑制作用がある。実際はほと

んど吸収されないプロシアニジンの活性に焦点をあてるよりも、こうした細菌由来代謝産物のさまざまな活性についてもっと詳しく検討される必要がある。

ポリフェノールの健康効果のうちあるものは腸管壁から吸収される必要のないものかもしれない。ポリフェノールは腸の内腔に最も高濃度に分布し、腸粘膜に直接作用して酸化的ストレスや発がん物質の働きを抑えると思われる。ラットを用いて経口投与したワインおよびお茶のポリフェノールはほとんど吸収されず、盲腸粘膜細胞のDNAの酸化による障害を少なくし、アゾキシメタン処理で生じた腫瘍の数を減少させる。

ポリフェノールは腸内腔の栄養成分と反応する。非ヘム鉄と反応して安定した錯体を形成し、腸での吸収を妨げる。したがってポリフェノールの過剰摂取は鉄不足の可能性が懸念されるグループ（乳児、児童、妊婦）の貧血の危険性を増大させる。一方では体内の鉄保有量の多い人にとってはポリフェノールを摂取することは健康上有利といえるかもしれない。鉄の状態をあらゆる指標である血清フェリチン濃度が高いと55歳以上の男女では心筋梗塞のリスクが高くなることが知られているが、このことは血漿鉄の内皮細胞へのマイナス効果によって説明できる。したがって紅茶ポリフェノールを摂取すると冠動脈疾患をもつ患者の内皮細胞機能障害が改善されることが確かめられている。

#### 結論：

ココア健康効果については食事全体のなかでとらえるべきであろう。オランダ人ではチョコレート由来のカテキン摂取は最大で全体の20%に達し、1日あたり摂取量としては10mgになる。この数値はチョコレートの臨床結果をもとにした文献値よりもかなり低いものである。プロアントシアニジン摂取および食事からのポリフェノール摂取を全体的に把握して、カカオ製品がどれだけ寄与しているか決定することが重要である。しかしチョコレートはたんにポリフェノールを供給しているだけでなくエネルギー供給という面からもとらえなくてはならない。この点でお茶とかコーヒーのようなポリフェノール供給源とは明らかに異なる。ポリフェノールの摂取を勧める前に健康にたいする役割をまず評価する必要がある——すなわちとくに鉄の体内保有状態を考慮したうえでどのような対象者に勧めるのか、またさまざまなポリフェノール供給源の個々の特徴を比較することも必要である。

## 文献

- Adamson G.E., Lazarus S.A., Mitchell A.E., Prior R.L., Cao G., Jacobs P.H., Kremers B.G., Hammerstone J.F., Rucker R.B., Ritter K.A. and Schmitz H.H. (1999) HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4184.
- Arteel G.E., Schroeder P. and Sies H. (2000) Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J. Nutr* **130**, 2100S.
- Arts I.C., Hollman P.C., Feskens E.J., Bueno de Mesquita H.B. and Kromhout D. (2001) Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women. *Eur J Clin Nutr* **55**, 76.
- Baba S., Osakabe N., Yasuda A., Natsume M., Takizawa T., Nakamura T. and Terao J. (2000) Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res* **33**, 635.
- Caderni G., Filippo C., Luceri C., Salvadori M., Giannini A., Biggeri A., Remy S., Cheynier V. and Dolara P. (2000) Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis* **21**, 1965.
- Das N.P. (1969) Studies on flavonoid metabolism. Degradation of (+)-catechin by rat intestinal contents. *Biochim. Biophys. Acta* **177**, 668.
- Das N.P. (1971) Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 3435.
- Déprez S., Brezillon C., Rabot S., Philippe C., Milla I., Lapiere C. and Scalbert A. (2000) Polymeric proanthocyanidins are catabolized by a human colonic microflora into low molecular weight phenolic acids. *J. Nutr.* **130**, 2733.
- Déprez S. and Scalbert A. (1999) [<sup>14</sup>C]-Biolabelling of (+)-catechin and proanthocyanidin oligomers in willow-tree cuttings. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4219.
- Donovan J.L., Manach C., Rios L., Morand C., Scalbert A. and Rémésy C. (2002) Procyanidin are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grape seed extract or the procyanidin dimer B3 *Brit. J. Nutr.* **87**, 299.
- Duffy S.J., Biegelsen E.S., Holbrook M., Russell J.D., Gokce N., Keaney J.F., Jr. and Vita J.A. (2001) Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation* **103**, 2799.
- Duffy S.J., Keaney J.F., Jr. Holbrook M., Gokce N., Swerdlow P.L., Frei B. and Vita J.A. (2001) Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104**, 151.
- Gabrielli G.B. and Desandre G. (1995) Excessive tea consumption can inhibit the efficacy of oral iron treatment in iron-deficiency anemia. *Haematologica* **80**, 518.
- Giovannelli L., Testa G., De Filippo C., Cheynier V., Clifford M.N. and Dolara P. (2000) Effect of complex polyphenols and tannins from red wine on DNA oxidative damage of rat colon mucosa in vivo. *Eur J Nutr* **39**, 207.

- Gonthier M.-P., Cheynier V., Donovan J.L., Manach C., Morand C., Mila I., Lapierre C., Remesy C. and Scalbert A. (2002) Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols., submitted.
- Groenewoud G. and Hundt H.K.L., (1986) The microbial metabolism of condensed (+)-catechins by rat-caecal microflora. *Xenobiotica* **16**, 99.
- Harmand M.F. and Blanquet P. (1978) The fate of total flavanolic oligomers (OFT) extracted from *Vitis vinifera* L. in the rat. *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinet.* **3**, 15.
- Holt R.R., Lazarus S.A., Sullards M.C., Zhu Q.Y., Schramm D.D., Hammerstone G.F., Fraga C.G., Schmitz H.H. and Keen C.L., (2002) Procyanidin dimer B2 (epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin) in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am. J. Clin. Nutr.*, in press.
- Hurrell R.F., Reddy M. and Cook J.D. (1999) Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Brit J Nutr* **81**, 289.
- Karim M., McCormick K. and Kappagoda C.T. (2000) Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* **130**, 2105S.
- Kim D.-H., Jung E.-A., Sohng I.-S., Han J.-A., Kim T.-H. and Han M.J. (1998) Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 17.
- Klipstein-Grobusch K., Koster J.F., Grobbee D.E., Lindemans J., Boeing H., Hofman A. and Witteman J.C. (1999) Serum ferritin and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* **69**, 1231.
- Lee M.-J., Wang Z.-Y., Li H., Chen L., Sun y., Gobbo S., Balentine D.A. and Yang C.S. (1995) Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **4**, 393.
- Li C., Lee M.J., Sheng S., Meng X., Prabhu S., Winnik B., Huang B., Chung J.Y., Yan S., Ho C.T. and Yang c.s. (2000) Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chem Res Toxicol* **13**, 177.
- Lodovici M., Casalini C., De Filippo C., Copeland E., Xu X., Clifford M. and Dolara P. (2000) Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage in rat colon mucosa by black tea complex polyphenols. *Food Chem Toxicol* **38**, 1085.
- Mao T., Van De Water J., Keen C.L., Schmitz H.H. and Gershwin M.E. (2000) Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. *J Nutr* **130**, 2093S.
- Matthews S., Mila I., Scalbert A., Pollet B., Lapierre C., Hervé du Penhoat C.L.M., Rolando C. and Donnelly D.M.X. (1997) Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1195.
- Meselhy M.R., Nakamura N. and Hattori M. (1997) Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **45**, 888.
- Mulder T.P., van Platerink C.J., Wijnand Schuyf P.J. and van Amelsvoort J.M. (2001) Analysis of theaflavins in biological fluids using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **760**, 271.
- Osakabe N., Baba S., Yasuda A., Iwamoto T., Kamiyama M., Takizawa T., Itakura H. and Kondo K.

- (2001) Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radic Res* **34**, 93.
- Pannala A.S., Rice-Evans C.A., Halliwell B. and Singh S, (1997) Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* **232**, 164.
- Pearson D.A., Schmitz H.H., Lazarus S.A. and Keen C.L. (2001) Inhibition of in vitro low-density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas. *Methods Enzymol* **335**, 350.
- Rein D., Lotito S., Holt R.R., Keen C.L., Schmitz H.H. and Fraga C.G. (2000) Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* **130**, 2109S.
- Rein D., Paglieroni T.G., Wun T., Pearson D.A., Schmitz H.H. Gosselin R. and Keen C.L. (2000) Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr* **72**, 30.
- Rios L.Y., Bennett R.N., Lazarus S.A., Révész C., Scalbert A. and Williamson G. (2002) Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, in press.
- Rios L.Y., Gonthier M.-P., Révész C., Mila I., Lapiere C., Lazarus S.A. Williamson G. and Scalbert A. (2002) Chocolate intake increases the urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human volunteers. *submitted for publication*.
- Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P. and Rice-Evans C. (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* **322**, 339.
- Santos-Buelga C. and Scalbert A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1094.
- Scalbert A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. **30**, 3875.
- Scalbert A. (1992) Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In *Plant Polyphenols, Synthesis, Properties, Significance* (Hemingway R.W. and Laks P.E.; Eds.), p.259. Plenum Press, New York.
- Scalbert A., Monties B. and Janin G. (1989) Tannins in wood: Comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1324.
- Scalbert A., Morand C., Manach C. and Révész C. (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.*, in press.
- Scalbert A., Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **130**, 2073S.
- Schramm D.D., Wang J.F., Holt R.R., Ensunsa J.L., Gonsalves J.L., Lazarus S.A., Schmitz H.H., German J.B. and Keen C.L. (2001) Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am. J. Clin. Nutr* **73**, 36.
- Spencer J.P., Chaudry F., Pannala A.S., Srai S.K., Debnam E. and Rice-Evans C. (2000) Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 236.
- Swain T. and Hillis W.E. (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*- I -The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **10**, 63.
- Tuomainen T.P., Punnonen K., Nyyssonen K. and Salonen J.T. (1998) Association between body iron



- stores and the risk of acute myocardial infarction in men. *Circulation* **97**, 1461.
- Vinson J.A., Proch J. and Zubik L. (1999) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4821.
- Wang J.F., Schramm D.D., Holt R.R., Ensunsa J.L., Fraga C.G., Schmitz H.H. and Keen C.L. (2000) A doseresponse effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J. Nutr* **130**, 2115S.
- Waterhouse A.L., Shirley J.R. and Donovan J.L. (1996) Antioxidants in chocolate [letter]. *Lancet* **348**, 834.
- Zhu Q.Y., Holt R.R., Lazarus S.A., Ensunsa J.L., Hammerstone J.F., Schmitz H.H. and Keen C.L. (2002) Stability of the flavan-3-ols epicatechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J. Agric. Food Chem* **50**, 1700.