

pHの変化によるクロロゲン酸の異性体の生成について

渡辺 悟 三沢尚子

Formation of Chlorogenic Acid Isomers by the Change of pH

SATORU WATANABE and NAOKO MISAWA

Green pigments are formed by mixing chlorogenic acid(Chl) and glycine under the alkaline condition. The analysis of the green solution by RP (Reversed Phase)-HPLC under the alkaline condition with a multi-channel detector revealed that the reaction products were composed of several components. On the other hand, the RP-HPLC pattern of the sample under the acidic condition indicated 2 peaks other than that of Chl. Surprisingly, molecular weight of each substance was determined by LC-MS analysis to be 355, which corresponds to the molecular weight for protonated ion of Chl. These findings suggest that the change of pH condition may result in the formation of Chl isomers.

クロロゲン酸とアミノ酸の共存下でアルカリ性にすると緑変する¹⁾が、この現象はよく知られている。著者らは前報²⁾において、クロロゲン酸とグリシンから生成する緑色色素に対するpHの影響について報告した。

しかし、その緑色色素の構造はいまだ解明されていない。構造の解明には、まず緑色色素を単離することが必要であるが、その条件検討の過程で、クロロゲン酸の異性体が生成する現象を見いだしたのでここに報告する。

材料と方法

1. 試薬

クロロゲン酸(0.5水和物)(以下Chlと略す)とグリシン(以下Glyと略す)は和光純薬社製のものを使用した。他のすべての試薬は

市販品特級またはこれに準ずるものを使用した。

2. 緑色色素液の調製

Chl・Gly混合液(各20mM) 1 mlにMcIlvaine緩衝液(pH 9) 1 mlを加え混合後、室温で24時間放置し、緑色色素液を調製した。

3. 高速液体クロマトグラフィーによる分析

カラムは和光純薬社製のWakosil-II 5C18 AR(5 μm)(4.6φ×150 mm)を用い、ポンプは日立製作所製のL-6200、検出は東ソー(株)のPD-8020(多波長検出器)を使用した。溶離液はアセトニトリル・10mM Na₂HPO₄(pH 9.4)(5:95, v/v)とアセトニトリル・0.1Mクエン酸(pH 2.3)(5:95, v/v)の2種を用いた。流速は1.0 ml/分でカラムオープンの温度は40℃で行なった。

Key Words: chlorogenic acid, chlorogenic acid isomers, pH

4. LC-MSによる分析

LC-MSによる分析は東レ(株)のリサーチセンターに依頼した。

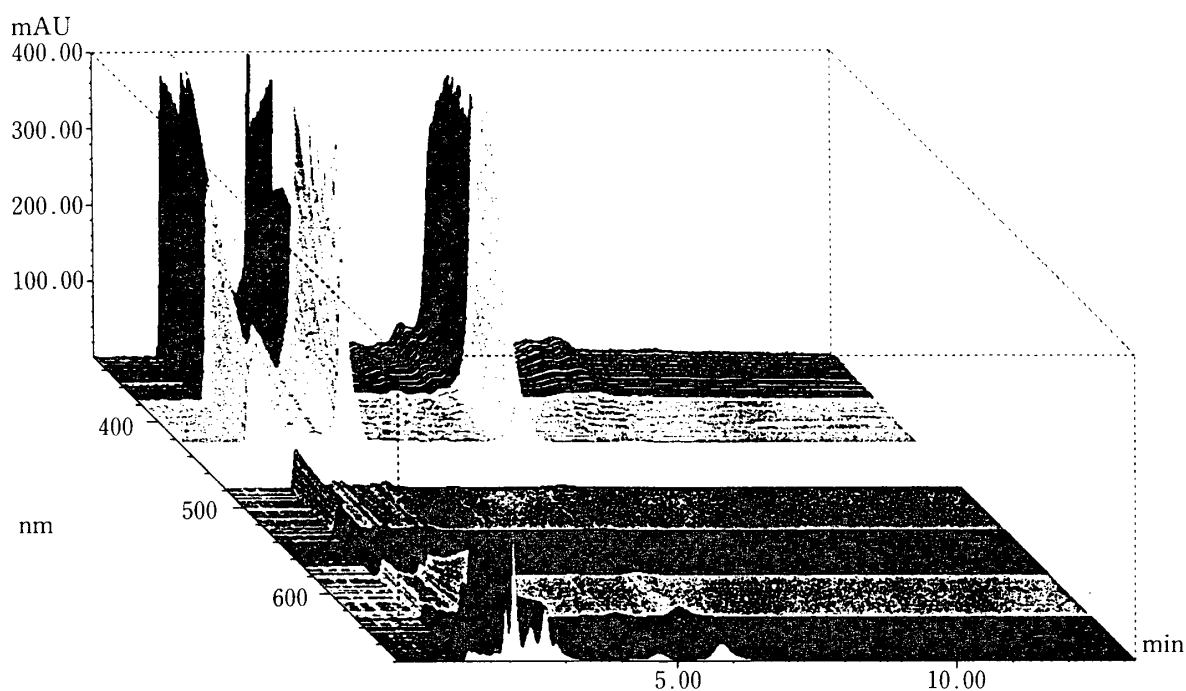
結果および考察

1. 高速液体クロマトグラフィーによる分析

溶離液がアセトニトリル・10mM Na₂HPO₄

(pH 9.4) (5:95, v/v) の場合における RP-HPLC の三次元パターンを 図-1 に示す。325~680 nm の吸収スペクトルを各溶出時間で追跡したわけであるが、325 nm の吸収が Chl 特有のものであり、680 nm の吸収が緑色色素に特有のものである。680 nm におけるピークは少なくとも 12 個見られ、このことから前報²⁾

図-1 アルカリ性条件下 (pH9.4) での RP-HPLC の三次元パターン

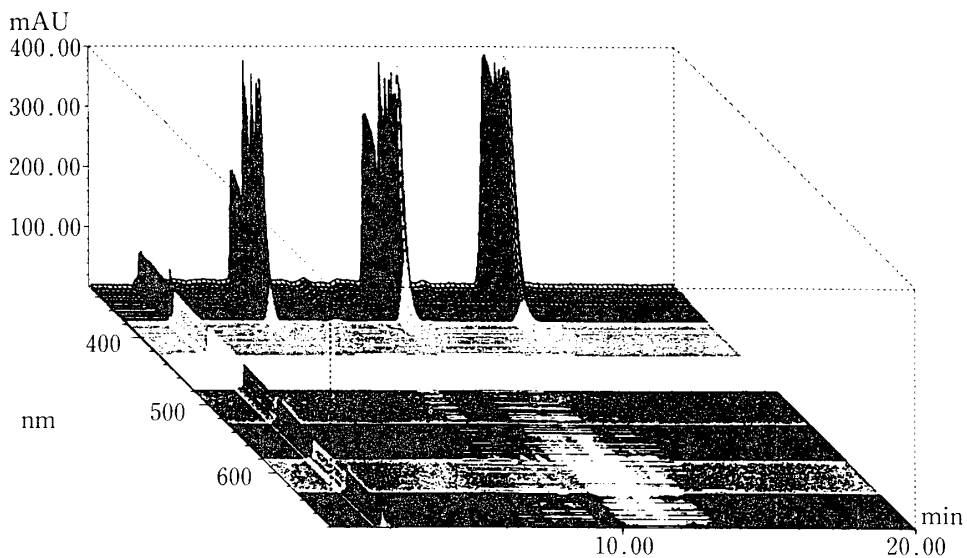


で示したようにアルカリ性条件下で生成した緑色色素は単一成分ではなく、複数の成分の混合液であることが再確認できた。325 nm におけるピークは主要なものは 3 つ存在し、2 つめのピークがスタンダードの Chl と溶出時間が一致した。また 325 nm のピークの溶出時間と 680 nm のピークの溶出時間は必ずしも一致を見なかった。

緑色色素の生成は褐変反応の一部であると考えられ、一般に pH を下げると褐変反応が抑制される³⁾ことは知られている。そこで緑変現象の初期段階の生成物が追跡できるのではという意図で酸性条件下での RP-HPLC を行なった。

溶離液がアセトニトリル・0.1M クエン酸 (pH 2.3) (5:95, v/v) の場合における RP-HPLC の三次元パターンを 図-2 に示す。325 nm におけるピークは大きく 3 つ見られ、その 1 つはもとの Chl と同じ溶出時間であった。680 nm においてはなんらピークが見られず、酸性条件下になると緑色色素は消失し、図-1 で見られた複雑な生成物があたかも反応初期の数少ない生成物に戻るかのような結果が得られた。325 nm におけるピークはきれいであり、ピークの溶出時間も離れていたため (それぞれ約 5 分、10 分、14 分)、LC-MS による分子量の測定により、緑変現象の初期段階における生成物の分子量がわかるのではと推測された。

図-2 酸性条件下 (pH 2.3) でのRP-HPLCの三次元パターン



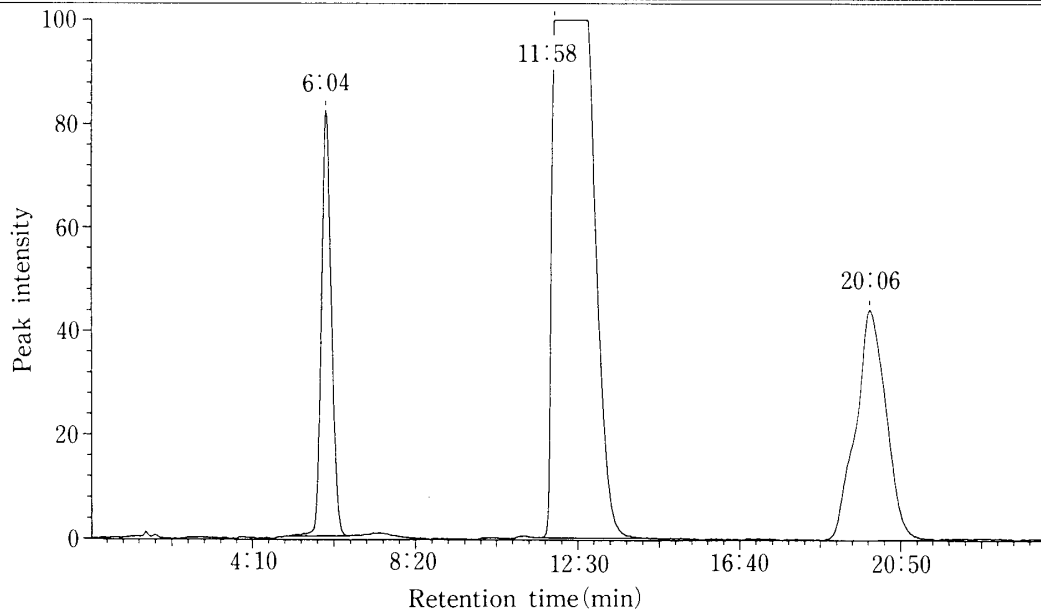
2. LC-MSによる分析

ChlとGlyの初期反応生成物の分子量の決定を期待して、LC-MSによる分析を東レ(株)のリサーチセンターに依頼した。

図-3にLC-MSによる分析時におけるLCの

結果を示す。図-2における325 nmの吸収で見られた3つのピークが得られた。溶離液の酸としてはMSで影響のない1%酢酸を用いている他はLCの条件は図-2の場合と同じである。

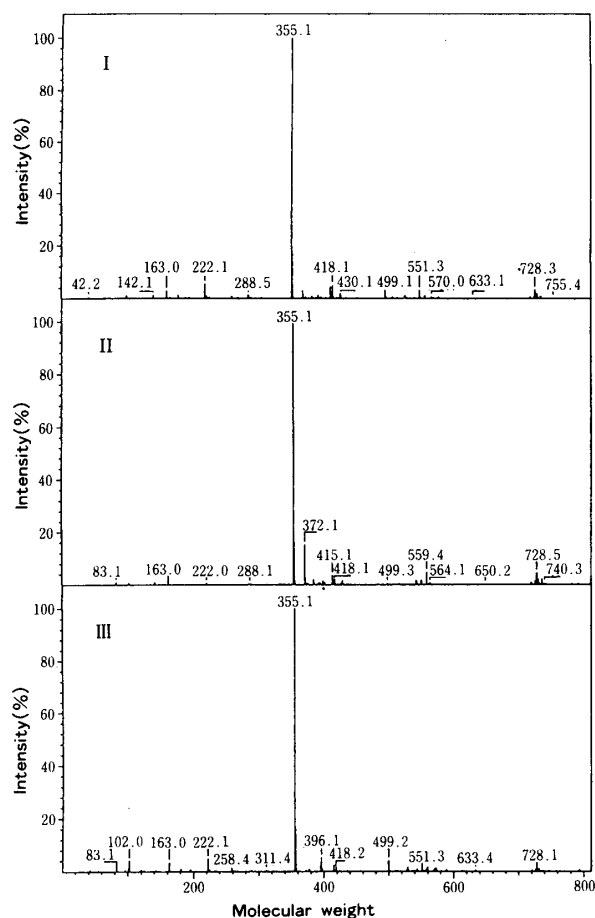
図-3 LC-MS分析におけるLCのパターン



この3つのピーク（溶出時間がそれぞれ約6分、12分、20分）に関してMS分析を行った。それらの結果が図-4のI、II、IIIである。驚いたことにいずれも分子量は355という値が得られた。図-4のIIがChlそのものであり、

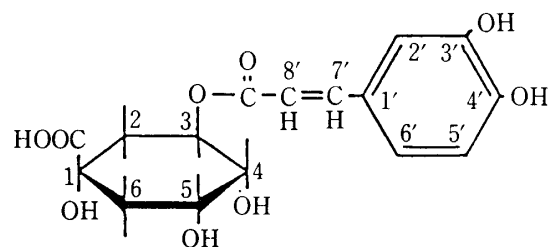
Chlの分子量は354であるので、図-4のI、II、IIIはすべてChlのプロトン化分子が観測されたものと結論づけられた。このことにより、図-3の3つのピークはChlの異性体であると推定された。

図-4 各溶出時間におけるマススペクトル
(I: 6分, II: 12分 (Chl), III: 20分)



Chlの構造は図-5に示すようにキナ酸の3位の水酸基とコーヒ酸のカルボキシル基がエステル結合したものである。キナ酸には1位と4位と5位にも水酸基があり、どの位置にコーヒ酸がエステル結合したかによってChlの異性体が生成する。今後、図-3で見られた3つのピークをそれぞれ単離して構造研究する必要がある。また、その異性体の生成機構の解明にも興味を持たれる所である。

図-5 クロロゲン酸の構造



要 約

クロロゲン酸 (Chl) とグリシンからアルカリ性で緑色色素ができる。その緑色色素液をアルカリ条件下でRP-HPLCで分析し、多波長検出器で追跡したところ、複雑なピークが見られ、緑色色素は複数の反応生成物からなることがわかった。しかしながら、その緑色色素液を酸性条件下でRP-HPLC分析すると、Chlのピークの外、2つのピークが得られた。それらの分子量をLC-MSで解析すると、いずれも355であり、Chlのプロトン化イオンの分子量に一致した。したがって、緑色色素液を酸性条件下にすると、Chlの異性体が生成すると考えられた。

文 献

- 1) 堀川博朗、岡安美恵子、和田篤子、草間正夫：日食工誌、**18**、115(1971)
- 2) 渡邊悟、牛澤良美、草間正夫：日食工誌、**43**、1(1996)
- 3) 木村進、中林敏郎、加藤博通編著：食品の変色の化学、p.331、光琳(1995)