

クロロゲン酸の異性体の調製とその同定について

渡辺 悟 三沢尚子 小澤哲夫*

Preparation and Identification of Chlorogenic Acid Isomers

SATORU WATANABE, NAOKO MISAWA and TETSUO OZAWA*

The alkali treatment of chlorogenic acid (5-*trans*-caffeoyl quinic acid, 5-CQA) gave three peaks on HPLC, and they were isomers of 5-CQA. The amount of these three components (I, II and III) were estimated to be approximately 1 : 1 : 1 after 24 hr at 37°C and pH 9.4. These isomers were separated and purified using preparative HPLC, HP-20 column chromatography and active carbon treatment. The structures of the three were identified by ¹³C-NMR spectra; I is 3-CQA, II is 5-CQA and III is 4-CQA. These are positional isomers. The similar phenomenon was also seemed to occur on 5-*trans*-caffeoyl shikimic acid.

クロロゲン酸 (5-CQA) とグリシンをアルカリ性で反応させると緑色色素が生成する¹⁾。その緑色色素の生成の条件検討の過程で、著者らは5-CQAの異性体が生成することを見出した²⁾。そこで本報告では、5-CQAをアルカリ処理して異性体を生成させ、分離精製し同定を試みた。またクロロゲン酸と類似の物質でもこのような現象がおきるかどうかについても報告する。

材料と方法

1. 試薬

クロロゲン酸 (5-*trans*-カフェオイルキナ酸) は和光純薬社製のものを使用した。5-*trans*-カフェオイルシキミ酸 (以下5-CSAと略す) はガマ (*Typha latifolia*) という植物より小澤らの方法³⁾で調製したのものを使用した。

多孔性樹脂のHP-20は三菱化成工業から購入した。その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. 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×250 mm) を使い、ポンプは日立製作所製のL-6200、検出は東ソー(株)の多波長検出器PD-8020を使用した。溶離液はアセトニトリル/1%酢酸 (5 : 95, v/v) を使い、流速は1.0 ml/minでカラムオープンの温度は40°Cで行った。

3. 分取用の高速液体クロマトグラフィーについて

カラムは和光純薬社製のWakosil-II 5C18 AR (20φ×250 mm) を使い、分取自体については、分析のスケールアップを基本として京都有機化学研究所に依頼した。

Key Words: chlorogenic acid, chlorogenic acid isomers, ¹³C-NMR

※筑波大学 応用生物化学系

4. ^{13}C -NMRスペクトルの測定

^{13}C -NMRスペクトルは日本電子JNM-A400W型フーリエ変換核磁気共鳴装置を用いて測定した。基準周波数は100MHzで、試料の溶媒は重水素化メタノールを、内部基準物質はテトラメチルシランを用いた。

結 果

1. クロロゲン酸の異性体生成の確認

既報²⁾においては、5-CQAとグリシンを共存させてアルカリ処理をすることにより5-CQAの異性体の生成を確認したが、今回は

グリシンを共存させずに5-CQAのみをアルカリ処理して、5-CQAの異性体が生成するかどうかを確認した。すなわち、20 mM 5-CQA 1 mlに0.2 M Na_2HPO_4 (pH9.4) 1 mlを加え混合して室温で24時間放置後、酸性条件下でのRP-HPLCを行った。酸性条件は既報において0.1Mクエン酸でpH2.3程度にしたが、今回は既報のLC-MSの条件を参考にして1%酢酸でpH3程度にした。その結果、既報で得られたパターンと同様なパターンが得られ(図-1)、ピークの溶出順にI、II、IIIと名づけた。IIは5-CQAと溶出時間が同じであった。

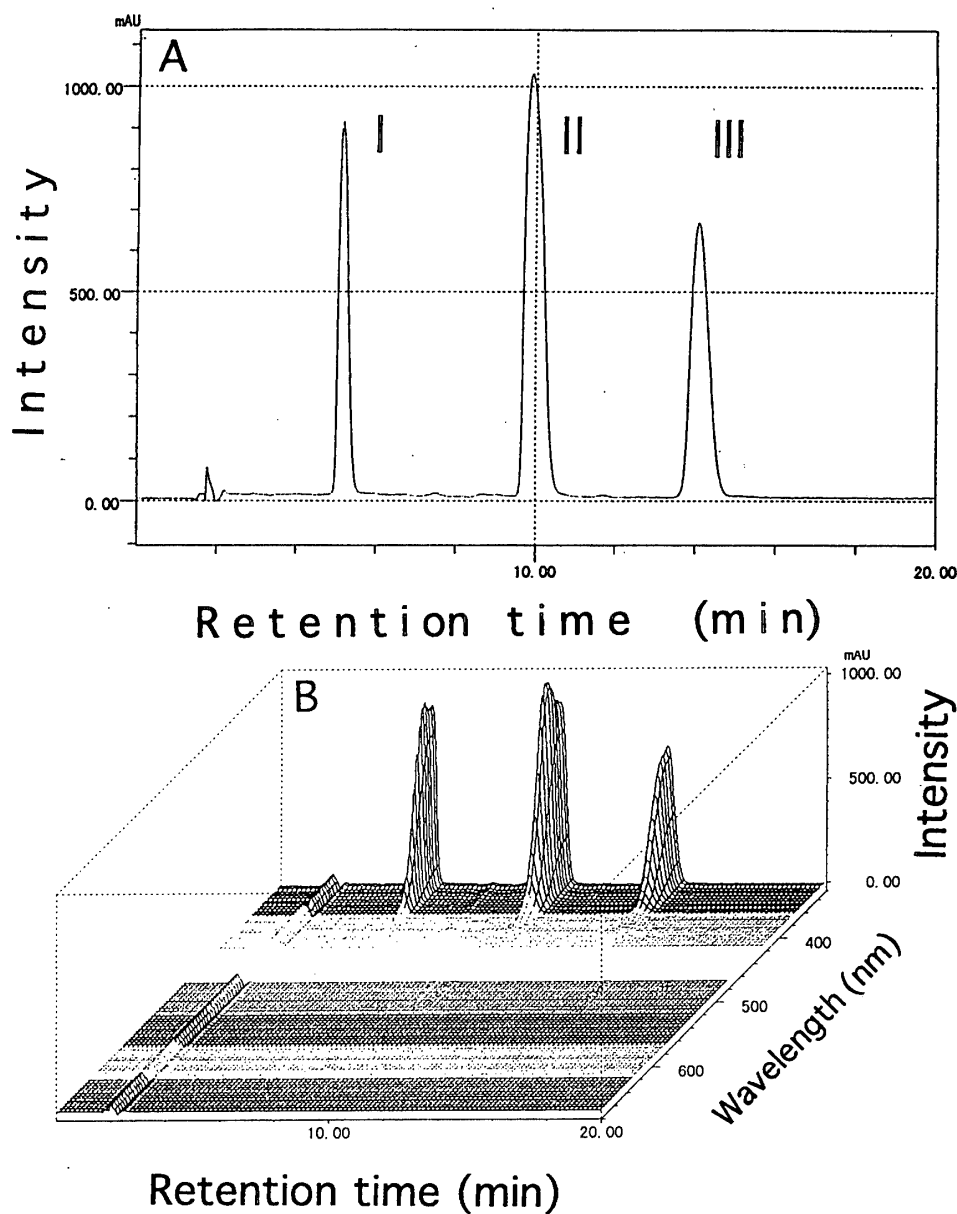


図-1 酸性条件下でのRP-HPLCパターン

A : 325nmでの溶出パターン、B : 三次元パターン

2. クロロゲン酸の異性体生成の条件検討
 温度を37°Cに設定して10 mM 5-CQA (0.1 M Na₂HPO₄, pH9.4) をインキュベーションし、5-CQAの異性体生成の経時変化をRP-HPLCで分析した。生成量はピークI、II、IIIの総面積を100%としてI、II、IIIそれぞれの百分率を示した(図-2)。時間経過とともにIIが減少し、IとIIIが次第に増加し、24時間で異性体の生成比率がほぼ1 : 1 : 1となった。

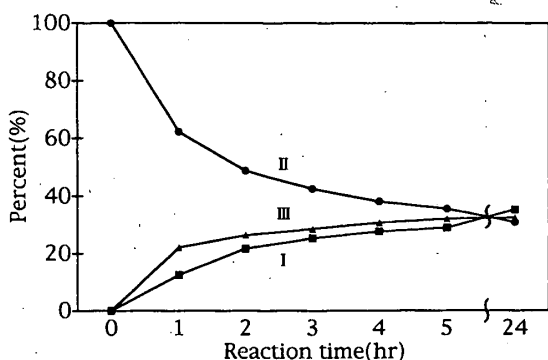


図-2 クロロゲン酸の異性体生成の経時変化

3. クロロゲン酸の異性体の調製

異性体生成の条件検討の結果をふまえ、図-3に示すフローシートで5-CQAの異性体の調製を行った。すなわち、20%5-CQA水溶液10 mlと0.2M Na₂HPO₄水溶液10 mlを混合して、37°Cで24時間インキュベーションした。その反応液から調製用のHPLCによりピークI、II、IIIの分画を得た。得られた分画液からそれぞれHP-20カラム(62φ×150 mm)によ

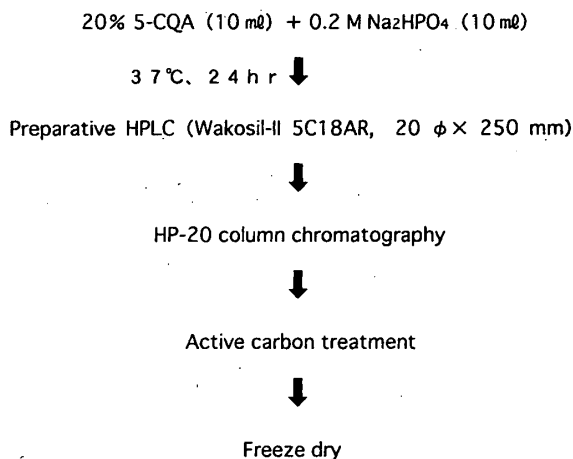


図-3 クロロゲン酸の異性体調製のフローシート

表-1 クロロゲン酸およびその異性体の¹³C-NMR化学シフト値

炭素番号	I	II	III
1	72.8	73.4	74.0
2	35.5	37.1	37.5
3	70.9	68.0	63.7
4	71.2	70.3	77.0
5	65.2	70.6	66.5
6	39.0	36.2	40.8
7	175.9	174.8	175.1
8	166.0	165.6	166.2
α	145.5	145.5	145.5
β	115.0	114.2	114.5
1'	125.6	125.5	125.5
2'	114.5	114.7	114.6
3'	144.3	144.8	144.7
4'	148.1	148.2	148.2
5'	115.7	115.6	115.7
6'	121.0	121.2	121.1

単位はppm

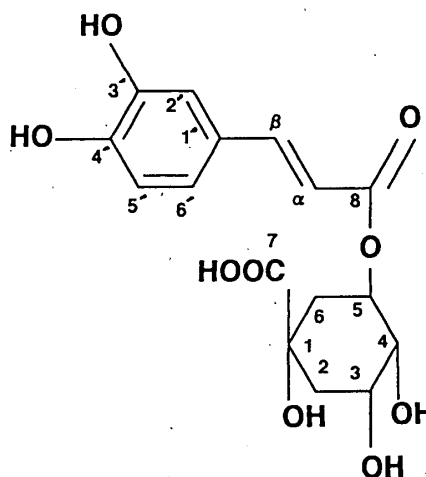


図-4 クロロゲン酸の構造

り脱酸をした。充分水洗後にメタノールで溶出し、濃縮後に活性炭処理して脱色し、凍結乾燥によりI、II、IIIをそれぞれ約50 mg程度取得した。

4. ¹³C-NMRスペクトルによる構造の同定

取得したI、II、IIIそれぞれについて¹³C-NMRスペクトルを測定した結果を表-1に示す。また帰属が分かるように炭素番号を付けた5-CQAの構造式を示した(図-4)。表-1よりIにおいては炭素番号3番、IIにおいては炭素番号5番、IIIにおいては炭素番号4番のケミカルシフトが明らかに他のものより

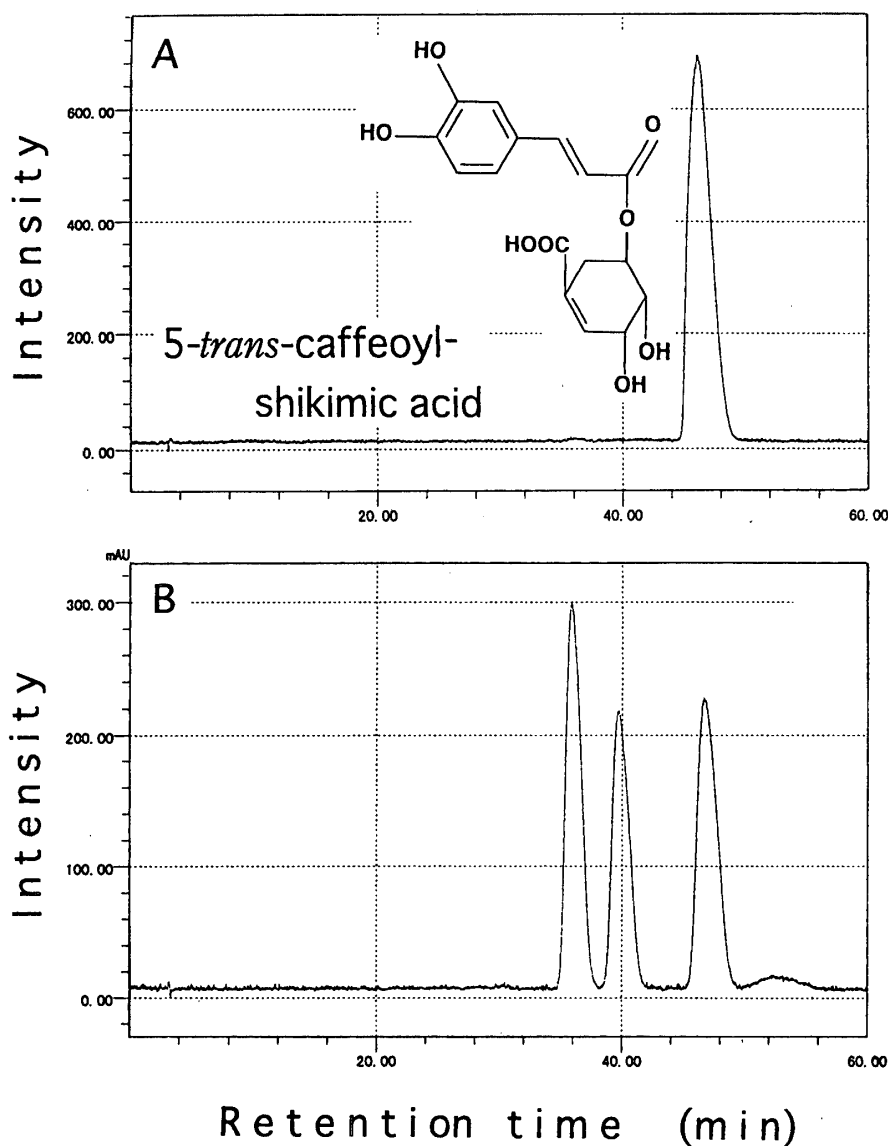


図-5 5-CSAの構造とRP-HPLCパターン

A：未処理の5-CSA， B：アルカリ処理した5-CSA， AとBいずれも検出波長は325nm

低磁場側にシフトしている。その他のケミカルシフトはほぼ同じであり、炭素数はいずれも16個である。これらのことよりIはキナ酸の3位にコーヒー酸がエステル結合した3-カフェオイルキナ酸(3-CQA)と同定された。同様にIIは5-CQA、IIIは4-CQAと同定された。つまり、I、II、IIIは位置異性体であった。

5. アルカリ処理した5-CSAのHPLCパターン

5-CSAはシキミ酸の5位にコーヒー酸がエステル結合した構造をしており、アルカリ処理により5-CQAと同様な現象がおきる可能性が考えられた。そこで5-CQAの時と同じ条件でアルカリ処理を行い、酸性条件下での

HPLCを行った結果が図-5である。Aが未処理の5-CSAのHPLCパターンである。Bがアルカリ処理した5-CSAのHPLCパターンであり、未処理の5-CSAがシングルピークであったのに対して、アルカリ処理することにより元のピークを含めて3つのピークが見られた。

考 察

アルカリ性で5-CQAとグリシンを反応させると緑色色素が生成する¹⁾が、それと同時に5-CQAの異性体が生成する²⁾。本報告ではグリシンを共存させずに5-CQAのみをアルカリ性にして、反応しても5-CQAの異性体が

生成することを確認した(図-1)。5-CQAをpH7で37°C、24時間インキュベーションしたが、異性体は生成しなかった(データ不掲載)。すなわち、アルカリ性にすることが、5-CQAの異性体生成に必須であることが分かった。5-CQAのみのアルカリ処理では緑色素は生成せずに褐色色素が生成するが、今後、色素生成と異性体生成の関係を追求する必要がある。

異性体生成の比率は、37°C、pH9.4で5時間以降それほど変化せずに24時間でほぼ1:1であり(図-2)、3つの異性体間には平衡が保たれることが推定される。異性体の調製においては、酸性条件下で各異性体が安定であるが、酸を含んだ状態での濃縮は酸分解がおきる可能性があるため、HP-20という多孔性樹脂をつめたカラムにより脱酸を行った。異性体はHP-20に吸着しメタノールで溶出して容易にエバポレーターで濃縮することができた。しかし黄色の着色が見られたので活性炭処理で脱色し、凍結乾燥により白色の粉体を得ることができた(図-3)。得られたそれぞれの粉体の純度をHPLCで確認したところ、それぞれシングルピークが得られほぼ純品であると思われた(データ不掲載)。しかし、その粉体は吸湿性が高く、結晶を得ることはできなかった。¹³C-NMRスペクトルの測定により3つの異性体の同定ができ、それらは位置異性体であることがわかった(表-1)。また、3つの異性体の吸収スペクトルは全く同じ形であり、吸収極大はいずれも325 nmであった(データ不掲載)。

5-CSAをアルカリ処理して酸性条件下でHPLCをすると、5-CQAの場合と同様な現象が見られた(図-5)。おそらく5-CSAの位置異性体が生成したと推定できるが、5-CQAの場合とピークの相対的位置関係がちがうという疑問もあり、各ピークを分取して構造決定する必要がある。このような現象は、コーヒー酸がエステル結合したフェノール化合物にお

いて同様におこることが推定される。たとえば、コーヒー酸2分子がキナ酸にエステル結合したイソクロゲン酸においても、アルカリ処理によって位置異性体が生成するであろう。このことを応用して、コーヒー酸がエステル結合したフェノール化合物の位置異性体の調製法が考えられる。

5-CQAはアルカリ性にするにしたがいラジカル強度を増すことが報告されている⁴⁾。ラジカル強度が増加すると反応性が高まるが、そのことと位置異性体の生成とが関係あると推察できる。アルカリ性で生じる位置異性化、あるいはアシル基転移のメカニズムを解明することは意義あることと思われる。

要 約

5-CQAのみをアルカリ処理してもグリシンを共存させた時と同様に5-CQAの異性体が生成した。異性体生成の条件はpH9.4で37°C、24時間が適していた。5-CQA200 mgのアルカリ処理液から調製用HPLCで分画I、II、IIIを分取後、それぞれを脱酸脱色して各異性体を約50 mg程度ずつ取得できた。¹³C-NMR測定の結果、I、II、IIIは順に3-CQA、5-CQA、4-CQAと同定された。すなわち、5-CQAをアルカリ処理することにより位置異性体が生成することが判明した。同様の現象が5-CSAでもおきたと思われた。

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) 渡辺 悟, 三沢尚子: 聖徳栄養短期大学紀要, **29**, 33 (1998)
- 3) OZAWA, T. and IMAGAWA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 595 (1988)
- 4) JIANG, Y., SATOH, K., KUSAMA, K., WATANABE, S. and SAKAGAMI, H.: *Anticancer Res.*, **20**, 2473 (2000)