

クロロゲン酸とグリシンから生成する 緑色色素の分子量について

三沢尚子 渡辺 悟

Molecular Weights of Green Pigments Formed from Chlorogenic Acid and Glycine

NAOKO MISAWA and SATORU WATANABE

Determination of Chlorogenic Acid (5-CQA) isomers under alkaline condition was realized using C30 HPLC column instead of C18. The results of time course for the formation of CQA isomers suggested that green pigments were seemed to be mainly produced by reacting 3-CQA formed from 5-CQA with glycine. The results of LC-MS indicated that green pigments solution was composed of several green compounds, and that molecular weights of the four were identical to be 757.

クロロゲン酸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⁾。しかし、その緑色色素の構造はいまだ決定されておらず、モデル化合物による構造の推定がなされている²⁻⁴⁾。本報告では、生成させた緑色色素をアルカリ条件のままLC-MSを行ない、いくつかの緑色化合物の分子量が推定できたので、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)(5-*trans*-caffeoyl quinic acid, 以下5-CQA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。タートラジンは三栄化学工業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

5-CQA・Gly混合液(各20 mM) 1 mlに0.2 M Na₂HPO₄(pH9.4) 1 mlを加え混合後、37°Cで24時間インキュベーションして緑色色素液を調製した。

3. 吸収スペクトルの測定

吸収スペクトルの測定には、島津自記分光光度計UV-2200型を用いた。

4. 高速液体クロマトグラフィーによる分析

カラムは野村化学社製のDevelosil C30-UG-5(4.6φ×250 mm)(以下C30と略す)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・10 mM Na₂HPO₄(pH9.4)(5:95, v/v)を用いた。流

Key words : molecular weight, green pigments, chlorogenic acid

速は1.0ml/minでカラムオープンの温度は40℃で行なった。

5. LC-MSによる分子量の推定

LC-MSによる緑色色素の分子量の推定は東レ(株)のリサーチセンターに依頼した。LCの条件は、以下のものである。カラムは野村化学社製のC30(4.6φ×250 mm)で、溶離液はA液が10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液(pH9)、B液がアセトニトリルで、30分でA : B = 100 : 0から80 : 20になるようにグラジエントをかけた。流速は1.0 ml/minでカラムオープンの温度は30℃で行なった。MSはマイクロマス社製のLCT質量分析計を用いた。

結 果

1. 緑色色素液の吸収スペクトル

20 mM 5-CQA・Gly混合液に0.2 M Na₂HPO₄(pH9.4)を1 : 1の割合で混合し、

混合直後の混合液(0時間)と37℃で24時間インキュベーションして生成した緑色色素液をそれぞれ100倍希釈し、吸収スペクトルを測定した(図1)。その結果、37℃で24時間インキュベーションして生成した緑色色素液には、0時間の混合液には見られなかった680 nmの吸収が見られ、逆に366 nmの吸収は減少する結果が得られた。

2. アルカリ条件下における5-CQAの異性体の経時変化

5-CQAとGlyをアルカリ性で反応させて生成した緑色色素液を、アルカリ条件下のまま異性体の定量ができるか、HPLCで検討した。カラムは野村化学社製のC30を、溶離液はアセトニトリル・10 mM Na₂HPO₄(pH9.4)(5 : 95, v/v)を用い、タートラジンを内部標準として分析した(図2)。図2において、1のピークは3-CQA、2のピークは5-CQA、3

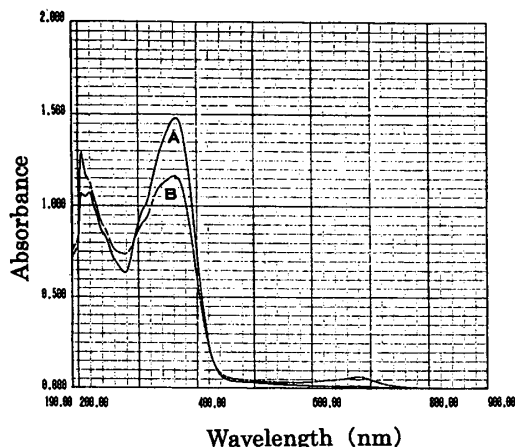


図1 5-CQA・Gly混合液の吸収スペクトルの変化
A : 0時間 B : 37℃、24時間

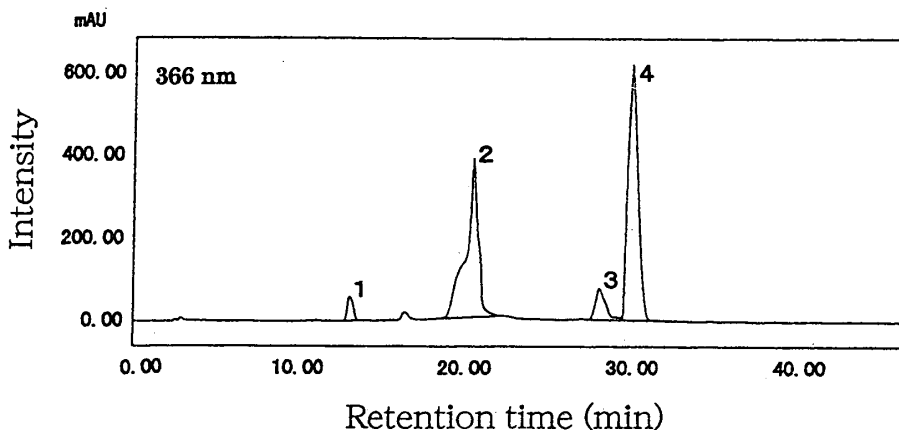


図2 アルカリ条件下でのHPLCパターン

のピークは4-CQA、そして4のピークはター
トラジンを示しており、分離が良くアルカリ
条件下のままで異性体の定量ができた。

そこで、上記の条件下で異性体生成を経時
的に追跡した(図3)。図3でわかるように5-
CQAは時間とともに減少していき、4-CQA
は5時間までは時間とともに増加した。一方、
3-CQAは1時間でわずかに生成されたもの
のその後ほとんど見られなかった。又、反応
24時間において3つの異性体の総量はもとの
5-CQAの量よりも少なかった。

3. LC-MSの結果

5-CQAとGlyから前述の条件で生成させた
緑色色素液のLC-MSを、東レ(株)のリサー
チセンターに依頼分析した。LCの結果を図4
に示した。366 nmの吸収においては、2.50分
のピークが3-CQA、9.25分のピークが5-
CQA、15.73分のピークが4-CQAであった。
一方、680 nmの吸収においては、いくつもの
ピークが見られた。680 nmの吸収に見られる
ピークのうち、13.84分に見られるピーク I を
MSで測定した。その測定した結果を図5に

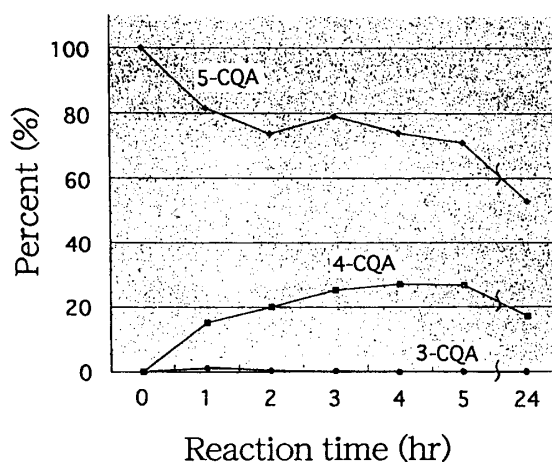


図3 アルカリ条件下での異性体生成の経時変化

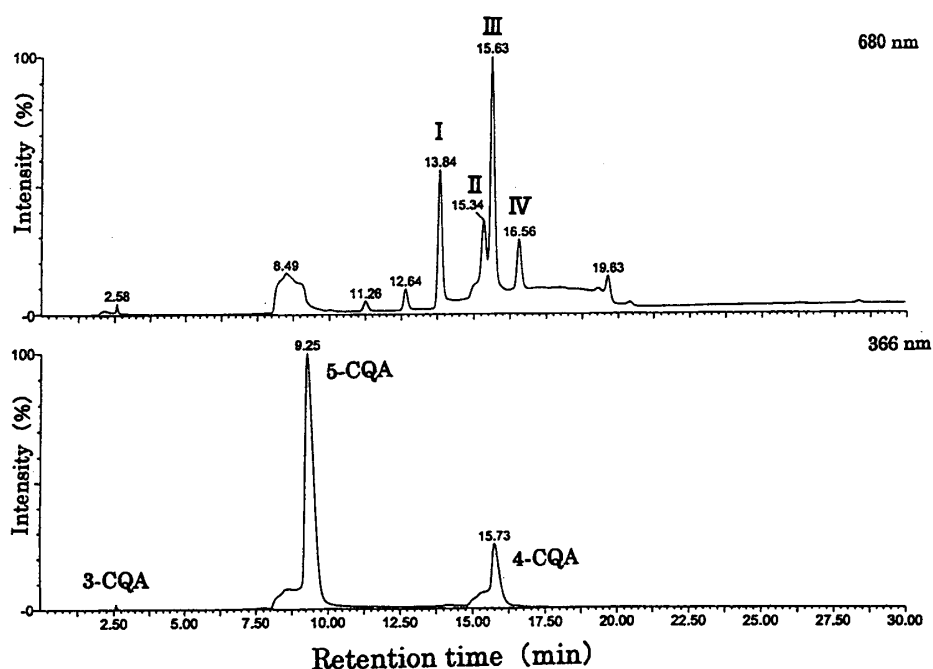


図4 5-CQA・Gly反応物のHPLCパターン

示す。それでわかるように、758に親イオンが観測された。又、同じように図4のピークII、III、IVをそれぞれMSで測定したところ、いずれも758に親イオンが観測された(データ不掲載)。

考 察

5-CQAとGlyをアルカリ性で反応させると緑色色素が生成する¹⁾。366 nmの吸収は5-CQAに特有なものであり、680 nmの吸収は緑色色素に特有なものである。5-CQA・Gly混合液(pH9.4)の0時間と24時間の吸収スペクトルを比較したところ、24時間では、0時間には見られなかった680 nmの吸収が見られ、逆に366 nmの吸収は減少する結果が得られた(図1)。このことから、減少した5-CQAはGlyと反応して緑色色素の生成に使われたと考えられる。

既報⁵⁾において、アルカリ条件で生成させた緑色色素液を酸性条件下でHPLCを行なったところ、5-CQAの異性体の生成が確認できた。このことの意味することは、アルカリ条件で5-CQAの異性体が生成し、酸性条件にすることにより異性体の生成状況が安定化するということである。アルカリ条件下では5-

CQAの異性体が生成するとともに緑色色素も生成する。異性体と緑色色素の生成が同時進行するが、緑色色素の生成量を定量することはできない。したがって、アルカリ条件下で5-CQAの異性体生成の定量をすることは、緑色色素の生成量を把握するのに必要不可欠と思われる。そこで、今回は生成した緑色色素液をアルカリ条件下のままで異性体の定量ができるかHPLCで検討した。従来のODSカラム(C18)はアルカリ条件下では5-CQA類の分離が悪く、緑色色素のピークは不鮮明であった(データ不掲載)。しかし、野村化学社製のC30カラムを使って分析したところ、分離が良く、内部標準としてタートラジンをを用いて5-CQAの異性体が定量できた(図2)。つまり、アルカリ条件での異性体の生成量を経時的に追跡することができた。5-CQAは時間とともに減少していき、4-CQAは5時間までは時間とともに増加していた。又、3-CQAは1時間でわずかに生成されたものの、その後ほとんど見られなかった(図3)。この結果と、酸性条件下での5-CQAの異性体生成の経時変化の結果⁵⁾を比較することにより、アルカリ条件下においては5-CQAから生成される3-CQAとGlyから主に緑色色素が生成すると

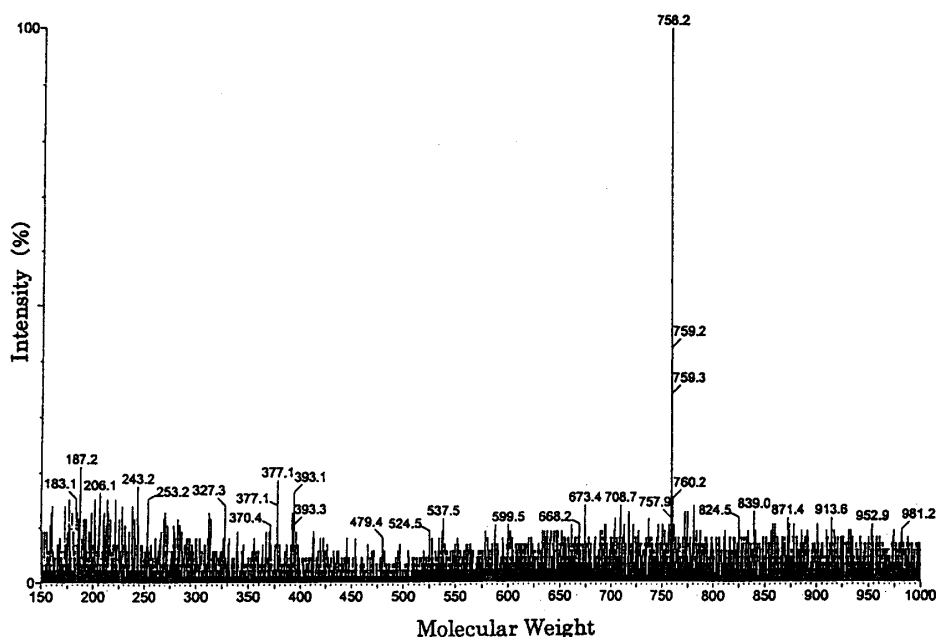


図5 ピークIのマススペクトル

思われる。一方、反応24時間において3つの異性体の総量は、もとの5-CQA量より少なかった(図3)。このことから、この5-CQAの減少分が緑色色素の生成に使われたと考えられる。

このHPLCの結果をふまえて、東レ(株)のリサーチセンターにLC-MSを依頼分析した。図4において366 nmの吸収で2.50分に見られるピークは3-CQA、9.25分に見られるピークはもとの5-CQA、15.73分に見られるピークは4-CQAであった。また680 nmの吸収ではいくつものピークが見られ、緑色色素液はいくつもの成分からなることがわかった。そして、680 nmの吸収のうちピークI(図4)をMSにかけたところ758に親イオンが観測され(図5)、これが緑色化合物のプロトン化されたものであると考えられ、ピークIは分子量757の緑色化合物であると推定される。又、ピークII、III、IV(図4)をそれぞれMSにかけたところ、いずれも758に親イオンが観測され(データ不掲載)、いずれのピークも分子量757の緑色化合物であると推定される。すなわち、緑色色素液は複数の緑色化合物からなるが、そのうち4つの緑色化合物の分子量は同じ757で異性体であると推定される。

今後、アルカリ条件下において緑色化合物の分取を検討し、これら分子量757からなる

緑色化合物の構造の解明を行なう必要がある。

要 約

(1)アルカリ条件下での5-CQAの異性体の経時変化が定量できるようになった。

(2)アルカリ条件下での5-CQAの異性体の経時変化から、緑色色素は5-CQAから生成される3-CQAとGlyから主に生成すると考えられた。

(3)LC-MSの結果より、緑色色素はいくつかの緑色化合物からなり、そのうちの4つについて、分子量がいずれも757で異性体であると推定できた。

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) HORIKAWA, H.: *Tokyo Joshi Ika Daigaku Zasshi*, **49**, 1011(1979)
- 3) MATSUI, T.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 573(1981)
- 4) YABUTA, G., KOIZUMI, Y., NAMIKI, K., KAWAI, T., HAYASHI, T., and NAMIKI, M.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1701(1996)
- 5) 渡辺 悟, 三沢尚子, 小澤哲夫: 聖徳栄養短期大学紀要, **31**, 7(2000)