

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成28年度研究分担報告書

研究分担課題：既存添加物の含有成分の構造解析に関する研究
研究分担者 天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

既存添加物 生コーヒー豆抽出物の成分研究

要旨 既存添加物名簿記載の酸化防止剤生コーヒー豆抽出物は、「アカネ科コーヒー（*Coffea arabica* LINNE）の種子より、温時アスコルビン酸又はクエン酸酸性水溶液で抽出して得られたものである。有効成分は、クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。本研究では、生コーヒー豆抽出物の品質規格作成のための化学的検討として、製品中の含有成分について検討を行っており、平成26,27年度の検討から、14種の化合物〔3-*O-trans*-caffeoylquinic acid,4-*O-trans*-caffeoylquinic acid,5-*O-trans*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid),3-*O-trans*-feruloylquinic acid,4-*O-trans*-feruloylquinic acid,5-*O-trans*-feruloylquinic acid,caffeine,3,4-di-*O-trans*-caffeoylquinic acid,4,5-di-*O-trans*-caffeoylquinic acid,trans-*p*-coumaroyl-L-tryptophan,3,5-di-*O-trans*-caffeoylquinic acid,ethyl chlorogenate,3-*O-trans*-feruloyl-5-*O-trans*-caffeoylquinic acid,trans-caffeoyl-L-tryptophan〕を単離、同定し報告している。今年度は新たに、5種の化合物〔vanillin,3-*O-trans*-caffeoyl-4-*O-trans*-feruloylquinic acid,4-*O-trans*-caffeoyl-5-*O-trans*-feruloylquinic acid,trans-feruloyl-L-tryptophan,trans-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester〕を単離、同定することができた。これまでの検討から、本添加物の主成分はcaffeine及びchlorogenic acidであり、またDPPHラジカル消去活性を指標とした酸化防止能の結果から、有効成分はchlorogenic acidをはじめとするカフェー酸誘導体であることが示唆された。

研究協力者

好村 守生 松山大学薬学部 講師

杉脇 秀美 松山大学薬学部 嘱託職員

A. 研究目的

生コーヒー豆抽出物は、酸化防止剤、製造用剤を用途に既存添加物名簿に記載されている。既存添加物名簿に生コーヒー豆抽出物は、「アカネ科コーヒー（*Coffea arabica* LINNE）の種子より、温時アスコルビン酸又はクエン酸酸性水溶液で抽出して得られたものである。有効成分は、クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。既存添加物の多くは植物抽出物であり、多数の成分が含まれているため、その品質管理には詳細な成分解析に基づいた規格作成

が必要であるが、本添加物については未検討であるため、その精査が求められる。

本研究では、生コーヒー豆抽出物製品中の含有成分を精査し、品質規格作成のための基礎的データの集積を目的とした検討を実施しており、今年度も引き続き製品中の成分精査と、単離成分についてDPPHラジカル消去活性を検討した。また、単離成分については、酸化防止能の別の評価法として、superoxide dismutase (SOD) 様活性についても併せて検討した。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

試料とした生コーヒー豆抽出物は、日本食品添加物協会を通じて入手した。分離、精製にはカ

ラム充填剤として YMC GEL ODS-AQ (AQ12S50)(ワイエムシイ), Chromatorex ODS(富士シリシア), MCI-gel CHP-20P(三菱化学)を用いた. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl はアルドリッチ製を, また trolox は和光純薬製を用いた. SOD 様活性は SOD assay kit-WST (同仁化学研究所)を用いた. その他の試薬はすべて特級又は高速液体クロマトグラフィー用を使用した.

2. 装置及び測定条件

逆相 HPLC は, Shimadzu Prominence システム (島津製作所)を使用した. 測定条件を下記に記す. カラム: L-column ODS (2.1 i.d. × 150 mm) (化学物質評価研究機構), カラム温度: 40°C, 流速: 0.3 mL/min, 測定波長: 200 ~ 400 nm, 移動相: (A) 5% 酢酸, 及び (B) アセトニトリル [濃度勾配条件 (B in A): 0→30 min (0→50%), 30→35 min (50→85%), 35→40 min (85%), 40→50 min (85→90%), 50→55 min (90→100%), 55→60 min (100%)]. NMR は Bruker AVANCE500 (ブルカー・バイオスピン社製) (¹H-NMR: 500 MHz, ¹³C-NMR: 126 MHz) を使用し, 測定溶媒としてメタノール-*d*₄を用いた. ケミカルシフトはそれぞれの溶媒由来ピーク [メタノール-*d*₄ (¹H: 3.30 ppm, ¹³C: 49.0 ppm)] を基準とした. 高分解能 (HR) ESI-MS は micrOTOF-Q (ブルカー・ダルトニクス社製) を使用し, 測定溶媒にはアセトニトリルを用いた. 分光光度計は Shimadzu UV mini-1240 (島津製作所製) 及び JASCO V-530 (日本分光製) を使用した. 旋光計は JASCO P-1020 (日本分光製) を用いた.

3. 分画物の調製及び化合物の単離

生コーヒー豆抽出物 (150 g) を減圧濃縮後, 凍結乾燥し, 濃縮物 (64.1 g) を得た. 濃縮物 (1回目: 30 g, 2回目: 21.5 g) をカラムクロマトグラフィー (YMC gel ODS-AQ, Sephadex LH-20, Chromatorex ODS, MCI-gel CHP 20P) による分離・精製を繰り返し, 化合物の単離を行った. 単離した化合物については標品の分析データとの直接比較, あるいは文献値と比較することにより同定した.

4. DPPH ラジカル消去活性の評価

試料溶液 (200 µL) に 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) (800 µL), 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) エタノール溶液 (1 mL) を加え, 10 秒間振とう後, 暗所で 30 分間放置し, 吸光度 (517 nm) を測定した. 試料溶液のかわりにエタノールを添加した時の吸光度をコントロールとし, DPPH 溶液のかわりにエタノールを添加したものをブランクとした. コントロールの吸光度に対する試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を算出した.

5. SOD 様活性の評価

SOD 様活性は, SOD assay kit-WST (同仁化学) を用いて測定した. 試料溶液 (20 µL) に WST working solution (200 µL) を加えて攪拌後, さらに Enzyme working solution (20 µL) を加え, 37 にて 20 分間インキュベートし, 450 nm における吸光度 (*A*_s) を測定した. 得られた吸光度の数値から阻害率を算出した.

C. 研究結果

1. 化合物の単離

生コーヒー豆抽出物の濃縮物について, カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し, これまで単離, 同定した 14 種の化合物に加え, vanillin (1) (1.0 mg), 3-*O*-caffeoyl-4-*O*-feruloylquinic acid (2) (4.5 mg), 4-*O*-caffeoyl-5-*O*-feruloylquinic acid (3) (55.3 mg), *trans*-feruloyl-L-tryptophan (4) (5.1 mg), *trans*-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester (5) (1.8 mg) の 5 種を新たに単離した. このうち, 化合物 4, 5 については LC/MS による分析等に関する報告¹⁾⁻³⁾ はあるが, 単離報告は見あたらない. 化合物の NMR データを以下に記す.

Vanillin (1): HR-ESI-MS: *m/z* 151.0411 [M-H]⁻ (Calcd for C₈H₈O₃-H, 151.0401). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ 9.74 (1H, s, H-7), 7.43 (1H, dd, *J*=2, 8 Hz, H-6), 7.41 (1H, d, *J*=8 Hz, H-2), 6.93 (1H, d, *J*=8 Hz, H-5), 3.91 (3H, s, 3-OMe).

3-*O*-*trans*-Caffeoyl-4-*O*-*trans*-feruloylquinic acid (2): HR-ESI-MS: m/z 529.1379 [M-H]⁻ (Calcd for C₂₆H₂₆O₁₂-H, 529.1352). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ 7.61 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-7'), 7.53 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-7''), 7.12 (1H, brd, $J=2$ Hz, H-2'), 7.04 (1H, brdd, $J=2, 8.5$ Hz, H-6'), 7.01 (1H, brd, $J=2$ Hz, H-2''), 6.89 (1H, brdd, $J=2, 8$ Hz, H-6''), 6.77 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.74 (1H, d, $J=8$ Hz, H-5''), 6.37 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8'), 6.26 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8''), 5.63 (1H, m, H-3), 5.11 (1H, m, H-4), 4.21 (1H, brd, $J=12$ Hz, H-5), 3.82 (3H, brs, 3''-OMe), 2.12 (4H, m, H-2, 6). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄): δ 168.4 (C-9'), 168.4 (C-9''), 150.6 (C-4') 149.6 (C-4''), 149.4 (C-3'), 147.2 (C-7') 147.1 (C-7''), 146.8 (C-3'') 127.8 (C-1''), 127.7 (C-1'), 124.1 (C-6') 123.1 (C-6), 116.5 (C-5''), 115.4 and 115.3 (C-8', 8''), 115.1 (C-2'') 111.9 (C-2'), 75.4 (C-4), 70.1 (C-3), 67.0 (C-5), 56.4 (3''-OMe), 37.7 (C-2, 6).

4-*O*-*trans*-Caffeoyl-5-*O*-*trans*-feruloylquinic acid (3): HR-ESI-MS: m/z 529.1351 [M-H]⁻ (Calcd for C₂₆H₂₆O₁₂-H, 529.135). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ 7.58 (1H, d, $J=16.5$ Hz, H-7'), 7.52 (1H, d, $J=16.5$ Hz, H-7''), 7.08 (1H, brs, H-2'), 7.00 (1H, brs, H-6''), 6.99 (1H, brs, H-2'), 6.89 (1H, brd, $J=3$ Hz, H-6'), 6.75 (1H, brd, $J=8$ Hz, H-5''), 6.73 (1H, brd, $J=8$ Hz, H-5'), 6.27 (2H, d, H-8', 8''), 5.65 (1H, brs, H-5), 5.11 (1H, brdd, $J=3, 8.5$ Hz, H-4), 4.37 (1H, brs, H-3), 3.81 (3H, brs, 3''-OMe), 2.16 (4H, m, H-2, 6).

trans-Feruloyl-L-tryptophan (4): [α]_D -25 ° ($c=0.1$ MeOH). UVλ_{max} MeOH nm (log ε) : 324.5 (3.82), 290.5 (3.80), 220.5 (4.22). HR-ESI-MS: m/z 379.1296 [M-H]⁻ (Calcd for C₂₁H₂₀O₅N₂-H, 379.1300). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ 7.57 (1H, d, $J=8$ Hz, H-4), 7.39 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7'), 7.29 (1H, d, $J=8$ Hz, H-5'), 7.09 (2H, brs, H-2, 2'), 7.04 (1H, dt, $J=1, 6$ Hz, H-5), 6.98 (2H, m, H-6, 6'), 6.77 (1H, d, $J=8$ Hz, H-7), 6.44 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8'), 5.79 (1H, d, $J=16$ Hz, H-11), 3.86 (3H, s, 3'-OMe), 3.37 (2H, m, H-10). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄): δ 175.7 (C-12), 168.9 (C-9'), 149.9

(C-3'), 149.3 (C-4'), 142.2 (C-7'), 138.0 and 138.8 (C-8, 2'), 130.7 (C-6'), 129.0 (C-9), 1247.7 (C-1'), 124.3 (C-2), 122.3 (C-5), 119.7 (C-6), 119.4 (C-4), 118.2 (C-8'), 116.7 (C-5'), 115.9 (C-7), 111.2 (C-3), 56.4 (3'-OMe), 55.1 (C-11), 28.7 (C-10).

trans-Caffeoyl-L-tryptophan methyl ester (5): [α]_D -22 ° ($c=0.1$ MeOH). UVλ_{max} MeOH nm (log ε) : 311 (4.17), 291 (4.23), 222 (4.49). HR-ESI-MS: m/z 379.1297 [M-H]⁻ (Calcd for C₂₁H₂₀O₅N₂-H, 379.1299). ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-*d*₄): δ 7.52 (1H, d, $J=8$ Hz, H-4), 7.36 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7'), 7.31 (1H, brdd, $J=2, 8$ Hz, H-7), 7.07 (1H, s, H-2), 7.06 (1H, brt, $J=2$ Hz, H-5), 6.99 (1H, brs, H-6), 6.98 (1H, d, $J=2$ Hz, H-2'), 6.89 (1H, dd, $J=2, 8$ Hz, H-6'), 6.74 (1H, d, $J=8$ Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8'), 4.87 (1H, dd, $J=5, 7.5$ Hz, H-11), 3.40 (1H, dd, $J=5, 14.5$ Hz) and 3.23 (1H, dd, $J=8, 15$ Hz) (H-10). ¹³C-NMR (126 MHz, MeOH-*d*₄): δ 174.1 (C-12), 169.1 (C-9'), 148.9 (C-4'), 146.7 (C-3'), 142.9 (C-7'), 138.1 (C-8), 128.8 (C-1'), 128.2 (C-9), 124.4 (C-2), 122.4 (C-5), 122.2 (C-6'), 119.8 (C-6), 119.1 (C-4), 117.8 (C-8'), 116.4 (C-5'), 115.1 (C-2'), 112.3 (C-7), 110.8 (C-3), 55.1 (C-11), 52.7 (12-OMe), 28.7 (C-10).

2. 生コーヒー豆抽出物の HPLC 分析

新たに単離した各化合物を標品として HPLC 分析を行い、5 化合物のデータを加えた。図 1 に新たな HPLC 成分プロファイリングデータを示す。

3. DPPH ラジカル消去活性の評価

単離した 5 化合物について、DPPH ラジカル消去活性を評価した。これまでの結果とあわせたものを表 1 に示す。5-*O*-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) をはじめとするカフェー酸誘導体の活性が強いことがわかる。

4. SOD 様活性の評価

これまで単離した 19 化合物について、SOD 様活性を評価した。結果を表 2 に示す。DPPH ラジカル消去活性と同様、カフェー酸誘導体の活性が

顕著であった。

D. 考察

既存添加物名簿に生コーヒー抽出物の有効成分は、「クロロゲン酸及びポリフェノールである」と記載されている。これまでの検討で、DPPHラジカル消去活性を指標に酸化防止能を評価した結果、活性の強かった画分には5-*O*-caffeoylquinic acid (クロロゲン酸)、4-*O*-caffeoylquinic acid、3-*O*-caffeoylquinic acid が主検出され、これらの添加物活性への寄与が大きいことを考察していた。今回の結果を加え、これまでの考察がさらに支持された。また、単離した19化合物について、DPPHラジカル消去活性及びSOD様活性を評価した結果、いずれの評価法においてもカフェー酸誘導体が顕著な活性を示した。よって、本添加物の活性への寄与はカフェー酸誘導体であることがあげられ、caffeoyl基が活性に大きく影響していることが示唆された。

E. 結論

既存添加物名簿収載の酸化防止剤生コーヒー豆抽出物製品中の含有成分について検討した結果、これまで明らかにした14化合物に加え、新たに5種の化合物〔vanillin, 3-*O*-*trans*-caffeoyl-4-*O*-*trans*-feruloylquinic acid, 4-*O*-*trans*-caffeoyl-5-*O*-*trans*-feruloylquinic acid, *trans*-feruloyl-L-tryptophan, *trans*-caffeoyl-L-tryptophan methyl ester〕を単離することができた。今回の結果を加えたこれまでの検討から、本添加物の主成分はcaffeine及びchlorogenic acidであり、またDPPHラジカル消去活性及びSOD様活性を指標とした酸化防止能の結果から、有効成分はchlorogenic acidをはじめとするカフェー酸誘導体であることが示唆された。

E. 参考文献

1) Podio NS., López-Froilán R., Ramirez-Moreno E., Bertrand L., Baroni MV., Pérez-Rodríguez ML., Sánchez-Mata M., Wunderlin DA.: Matching in vitro

bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of soluble coffee by boosted regression trees, *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 9572-9582 (2015).

2) Alonso-Salces RM., Serra F., Reniero F., Héberger K.: Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea Arabica* and *Coffea canephora*): Chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4224-4235 (2009).

3) Yuanchao X., Bing H., Shi K., Liu F., Wenfang X.: Caffeic acid derivatives: A new type of influenza neuraminidase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 3556-3560 (2013).

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 天倉吉章, 吉田晴菜, 杉脇秀美, 好村守生, 多田敦子, 西崎雄三, 杉本直樹, 佐藤恭子, 穠山浩, 既存添加物「生コーヒー豆抽出物」の成分研究, 日本食品化学学会第22回総会・学術大会, 2016年6月3日(高知)

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

H. 健康危機情報

なし

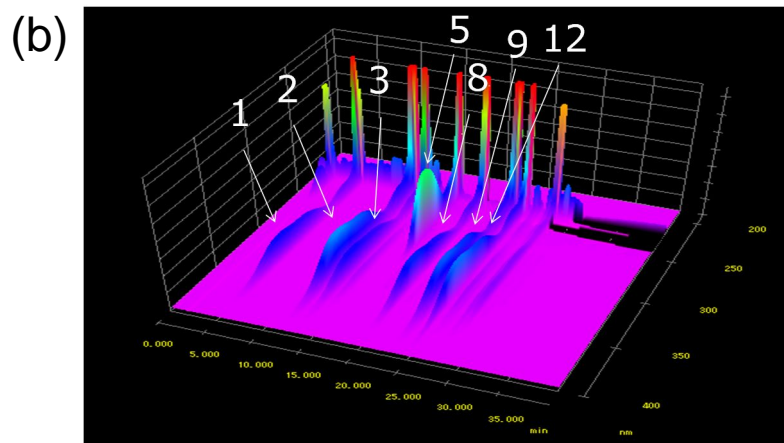
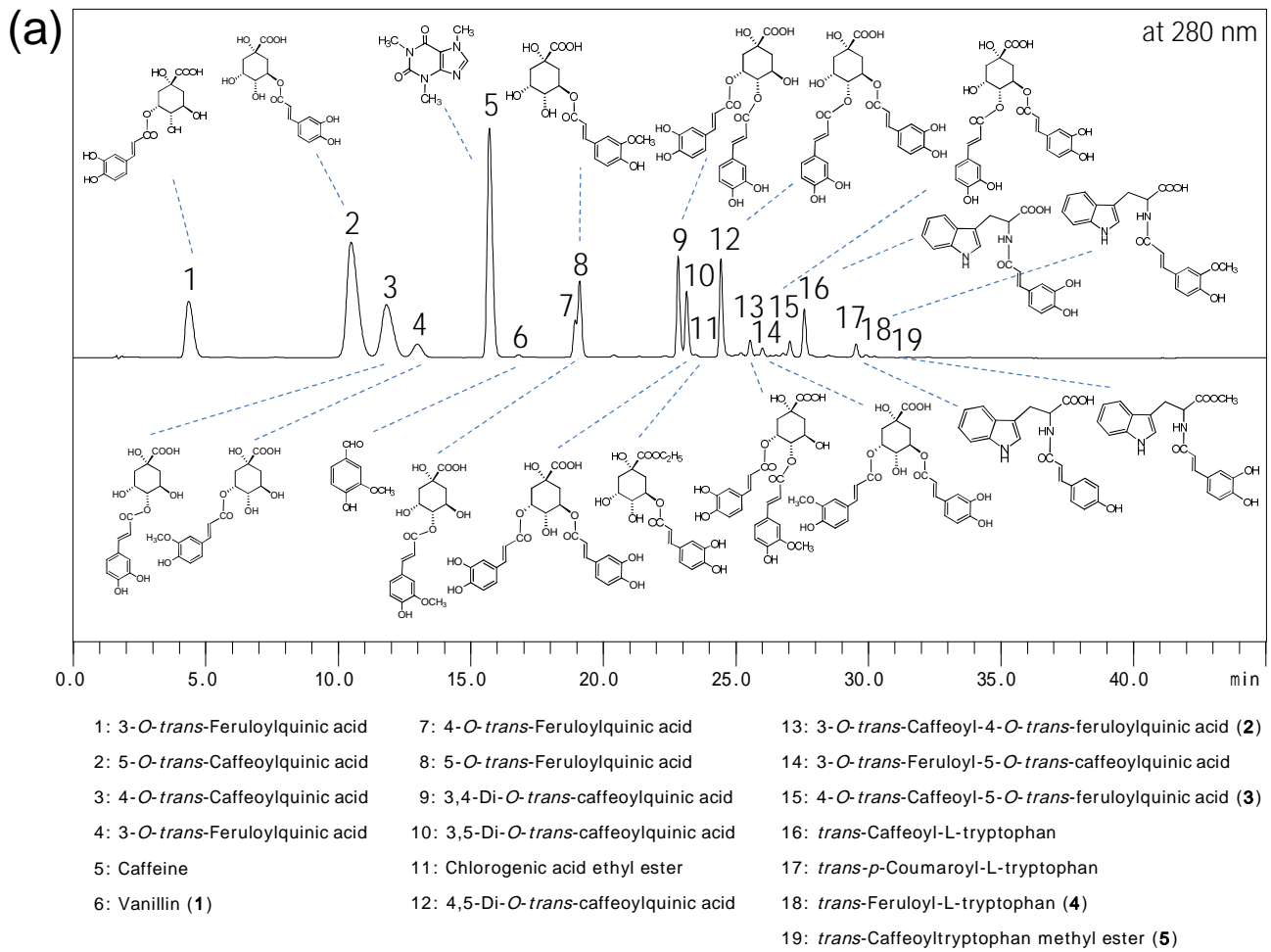


図1．生コーヒー豆抽出物の HPLC 成分プロファイリング

(a)HPLC クロマトグラム (at 280 nm), (b)3D-HPLC クロマトグラム (200 ~ 400 nm)

表 1 . 単離化合物の DPPH ラジカル消去活性

	IC ₅₀ (μM)
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	83.5
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	88.3
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	84.7
3- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	1094.2
Caffeine	>5000
Vanillin (1)	>5000
4- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	1052.1
5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	995.1
3,4-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	69.7
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	54.8
Chlorogenic acid ethyl ester	65.4
4,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	66.4
3- <i>O</i> -Caffeoyl-4- <i>O</i> -feruloylquinic acid (2)	98.1
3- <i>O</i> -Feruloyl-5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	71.7
4- <i>O</i> -Caffeoyl-5- <i>O</i> -feruloylquinic acid (3)	83.0
Caffeoyltryptophan	83.7
<i>p</i> -Coumaroyltryptophan	1041.4
Feruloyltryptophan (4)	537.1
Caffeoyltryptophan methyl ester (5)	149.6

表 2 . 単離化合物の SOD 様活性

	IC ₅₀ (μM)
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	88.6
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	80.1
4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	123.4
3- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	973.6
Caffeine	> 1000
Vanillin (1)	>1000
4- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	788.9
5- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	>1000
3,4-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	56.1
3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	36.1
Chlorogenic acid ethyl ester	46.3
4,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	37.9
3- <i>O</i> -Caffeoyl-4- <i>O</i> -feruloylquinic acid (2)	99.0
3- <i>O</i> -Feruloyl-5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	105.1
4- <i>O</i> -Caffeoyl-5- <i>O</i> -feruloylquinic acid (3)	68.1
Caffeoyltryptophan	33.1
<i>p</i> -Coumaroyltryptophan	414.3
Feruloyltryptophan (4)	856.7
Caffeoyltryptophan methyl ester (5)	100.9