

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）
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和5年度研究分担報告書
分析法及び試験法の開発に関する研究
相対モル感度（RMS）を用いたクロロゲン酸類の一斉分析法の検討
～クロロゲン酸類縁体の構造と RMS の関係～

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 主任研究官

研究要旨

既存添加物名簿収載品目のひとつである「生コーヒー豆抽出物」は、第10版食品添加物公定書に収載予定の品目であり、主成分であるクロロゲン酸の定量法が設定されている。一方、これまでの研究によりクロロゲン酸以外の様々なクロロゲン酸類(キナ酸に様々なケイ皮酸誘導体が結合した)が含まれていることが知られているが、すべてのクロロゲン酸類を絶対検量線法により定量することは現実的ではない。本研究では、既存添加物規格の改正を見据え、相対モル感度(RMS)を用いたクロロゲン酸類の一斉定量法を検討した。さらに、クロロゲン酸類の構造の違いが同一化合物を基準物質としたときのRMSにどのような影響を及ぼすか検討した。

研究協力者

中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部研究員

A. 研究目的

近年、標準物質の入手が困難な化合物の定量において、代わりに他の物質を基準として設定(基準物質)し、それに対する定量対象化合物の相対モル感度(relative molar sensitivity, RMS)を利用する定量法(以下, RMS法)が注目されている。我々はこれまでに食品添加物をはじめ、天然物由来製品に含まれる有効成分や機能性成分の RMS法を報告している。

RMS法での定量には、基準物質に対する定量対象の RMS値が必要である。通常、RMS値は定量 NMR ($^1\text{H-qNMR}$)と HPLC などのクロマトグラフィーを用い、分析対象物質と基準物質の正確な純度や応答値を求めたうえで算出する。そのため、RMS算出時には、試薬グレードは問わないものの分析対象物質そのものが必須である。しかし、類似構造の化合物はあっても分析対象物質の市販がなかった

り単離精製が必要であったりする場合も少なくない。

本研究では、市販試薬の入手が困難な化合物について、その類似化合物から RMS値をある程度予測できないかと仮定した。そこで、構造異性体が多く存在する様々なクロロゲン酸類(キナ酸にカフェ酸やフェルラ酸が結合したもの)について、RMS値を算出し比較、考察した。

B. 研究方法

B-1) 試薬

本研究に使用した試薬を表1に示す。また、市販品の入手が困難だったクロロゲン酸類については、長谷川香料(株)製の「生コーヒー豆抽出物」(部内管理番号 C2049)から B-3)に示すとおり単離精製した。その他の試薬は、特級品または液体クロマトグラフィー用を用いた。

B-2) 装置

以下の装置を本研究に用いた。
NMR装置: JNM-ECA600, JNM-ECZ600 および JNM-ECZL800 (日本電子(株)製)

HPLC-UV-PDA-MS 装置 (LC 装置 1) : Alliance-UV-PDA-XevoTQ システム(Waters 社製)

HPLC-UV 装置(LC 装置 2) : TS1000(日立製作所製)

紫外可視分光光度計: V-650(日本分光(株)製)

フラッシュ精製装置 : Biotage Isolera One

リサイクル分取装置 : LaboACE LC-5060 および LaboACE LC-5060 Plus (日本分析工業(株)製)

ウルトラマイクロ天秤 : XP2U (METTLER TOLEDO(株)製)

B-3) クロロゲン酸類の単離精製

ジカフェオイルキナ酸(diCQA), モノフェルロイルキナ酸(FQA)およびフェルロイルカフェオイルキナ酸(FCQA)は, 「生コーヒー豆抽出物」から図 1 に示すように単離精製した. なお, 「生コーヒー豆抽出物」から Fr.1-3 への分画工程は 5 回繰り返し, HPLC/UV/PDA/MS 分析にて含有成分を確認したのち, Fr.1-3 へそれぞれ合わせた. リサイクル分取により得られた画分はエバポレーターにより有機溶媒留去後, 凍結乾燥した. 分取装置条件および分析条件を以下に示す.

B-3-1) フラッシュ精製装置による分画条件
カラム : Sfar C18 D (Duo 100 Å 30 µm 30 g, Biotage 社製), 移動相 A : 0.1%ギ酸水溶液, 移動相 B : 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント条件: 平衡化(90:10)→1-4CV (90:10)→5-7CV (85:15)→8-12CV (85:15→50:50)→13-14CV (0:100), 流速 : 25 mL/min, 検出波長 : 325 nm, フラクション量 : 11 mL.

B-3-2) リサイクル分取装置による分画条件
カラム : JAIGEL-ODS-AP-L (20.0 × 500 mm, 日本分析工業(株)製), 移動相 : 0.5%ギ酸水溶液/アセトニトリル溶液(80:20), 流速 : 10 mL/min, 検出波長 : 325 nm.

B-3-3) HPLC/UV/PDA/MS 分析条件

HPLC 条件 カラム : Wakopak Ultra C18-5 (4.6 × 250 mm, 5 µm, 富士フイルム和光純薬(株)製), カラム温度 : 40 °C, 移動相 A : 0.1%ギ酸水溶液, 移動相 B : 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント条件①: 0-10 min (85:

15)→10-25 min (85:15→50:50)→25-30 min (0:100)→30-45 min (85:15), グラジエント条件②: 移動相 A と B の混液(80:20 または 85:15), 流速 : 1.0 mL/min, PDA 検出器 : 190 nm-800 nm, UV 検出波長 : 325 nm
MS 条件 キャピラリー電圧 : 2 kV, コーン電圧 : 30 V, ソース温度 : 150 °C, 脱溶媒温度 : 350 °C, 脱溶媒ガス流量 : 1000 L/hr, コーンガス流量 : 50 L/hr, イオン化モード : ESI (pos., neg.), 走査範囲 : *m/z* 100-1200.

B-4) NMR による単離精製物の同定

B-3)にて精製した画分を重メタノールに溶解して NMR スペクトル(¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HMQC, HMBC (Long Range J : 4 Hz または 6 Hz), NOE)を測定し, 文献値¹⁻⁴⁾と比較して化合物を同定した.

B-5)クロロゲン酸(5CQA)のUV吸収スペクトル測定

リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.39 g を秤量し, リン酸 0.17 mL とともに 500 mL メスフラスコに入れ, 水で定容し, 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液(pH=2.6)とした.

酢酸ナトリウム 8.3g を秤量し, 1 L のメスフラスコに入れ, 水で定容し, 0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液とした. 酢酸 2.86 mL を 500 mL メスフラスコに入れ, 水で定容し, 0.1 M 酢酸水溶液とした. 0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液 600 mL と 0.1 M 酢酸水溶液 400 mL を混合し, 0.1 M 酢酸ナトリウム : 0.1 M 酢酸(60/40)溶液(pH=4.8)とした.

リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.39 g およびリン酸水素二ナトリウム 12 水和物 0.895 g を秤量し, 500 mL メスフラスコに入れ, 水で定容し, 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液(pH=6.9)とした.

セミマイクロ天秤を用いて, 5CQA 約 20 mg を量り取り, 20 mL メスフラスコに入れ 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液(pH=2.6)でメスアップした. この液を同じ溶媒で 100 倍希釈し, UV 吸収スペクトルを測定した. 同様の操作を, 0.1 M 酢酸ナトリウム : 0.1 M 酢酸(60/40)溶液(pH=4.8)および 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液(pH=6.9)で行った.

B-6)クロロゲン酸類の RMS 算出

B-6-1) 試料液調製

NMR 用試料液: ウルトラマイクロ天秤を用いて、5CQA (試料)約 10 mg および DSS-*d*₆約 1 mg をそれぞれ精密に量りとり、重メタノール 2.0 mL を加えて溶解させたものを NMR 用試料液とした。NMR 用試料液 0.6 mL を 5 mm NMR 試料管に移し、トーチバーナーで封管して NMR 分析に付した。試料として 3CQA, 4CQA および CA を用いた際も同様の操作を行った。一方、diCQA, FQA および FCQA の RMS を求める際は、これら試料の秤量値を約 5 mg とした。

HPLC 用試料液: NMR 用試料液(5000 µg/mL または 2500 µg/mL)を、水:メタノール(9/1)溶液を用いて精密に希釈し、6 濃度の検量線用標準液(1, 5, 10, 20, 40, 50 µg/mL)を調製し HPLC 用試料液とした。

B-6-2) 定量 NMR による純度測定

NMR 測定条件は以下のとおり。

レシーバーゲイン, 30; 照射中心, 5 ppm; 観測幅, 20 ppm; データポイント数, 60018; 遅延時間, 60 秒; 積算回数, 8 回; ダミースキップ, 2 回; サンプル回転, なし; ¹³C デカップリング, MPF8 (取込み時間のみ)。

取得した FID に対して窓関数の設定を外し、ゼロフィルでポイント数を 2 倍に増やした後、フーリエ変換を行った。次に、位相およびベースラインを補正し、定量用の ¹H NMR スペクトルとした。このスペクトル上のシグナルに対して自動積分を行い、式(1)および式(2)を用いて試料の純度を算出した。複数のシグナルを使用した場合は、それらの純度を平均して、試料の純度(%)とした。定量に用いたシグナルを表 2 に示す。

$$molC_A = molC_B \times I_A/I_B \times H_B/H_A \quad \text{式(1)}$$

$$P_A = molC_A \times MW_A/C_S \times 92.4\% \quad \text{式(2)}$$

ここで、*molC*: モル濃度(mol/L), *I*: シグナル面積, *H*: プロトン数, *P*: 純度(%), *MW*: 分子量(g/mol), *C*: 濃度(mg/mL), *A*: 分析対象化合物, *B*: DSS-*d*₆(標準), *S*: 試料。

B-6-3) HPLC 分析

HPLC 測定条件は以下の通り。

カラム: Wakopak Ultra C18-5 (4.6 × 250 mm, 5 µm), カラム温度: 40 °C, 移動相 A: 0.1% 酢酸水溶液, 移動相 B: 0.1% 酢酸アセトニトリル溶液, 移動相条件: 0-15 min (90:10) → 15-30 min (90:10→50:50) → 30-45 min (90:10), 流速: 1.0 mL/min, 注入量: 10 µL, PDA 検出器: 190 nm-800 nm (定量用検出波長 325 nm)。

B-6-4) RMS の決定

各クロロゲン酸類について、B-6-2)にて得られた純度を用いて検量線用標準液濃度(µmol/mL)を補正した。これらの濃度を横軸に、B-6-3)で得られたピーク面積を縦軸にとった絶対検量線を各クロロゲン酸類について作成した。各クロロゲン酸類の絶対検量線の傾きを CA の絶対検量線の傾きでそれぞれ除し、RMS を求めた。

C. 結果および考察

C-1) HPLC 条件検討および基準物質の選定

クロロゲン酸類の RMS 決定に先立ち、溶解溶媒の pH を変えて 5CQA の UV 吸収スペクトルを測定した(図 2)。溶解溶媒の pH を pH 2.6, 4.8, および 6.9 としたところ、吸収極大波長(λ max)や吸収極小波長(λ min)に変化はなく、HPLC 分析時の試料の溶解溶媒や移動相の pH が変化しても λ max 等のずれは考慮しなくてよいと考えられた。

次に、移動相条件を検討した。通常、RMS 法を検討する際は、装置間のポンプ性能の差による溶媒比率の差が RMS に及ぼす影響を小さくするため、アイソクラティック条件を採用する。しかし、本研究では分析対象とするクロロゲン酸類が多く、分析効率等も考慮し、B-5-3)に示すようなグラジエント条件を採用した。なお、検討には「生コーヒー豆抽出物」を用い、対象とするクロロゲン酸類が良好に分離する条件を模索した(図 3)。

さらに、検出波長を考慮しながら、基準物質を選定した。基準物質は、化学的に安定かつ安価で高純度の市販試薬が入手可能なものが望ましい。また、検出器に UV や PDA を用いる場合は、分析対象物質と近い λ max をもつも

のが望ましい。これらの条件を満たす化合物として、CQA の部分構造であり発色団であるカフェ酸(CA)を選択した。

C-2) クロロゲン酸類の単離・精製

B-3)に示すように「生コーヒー豆抽出物」の分画を実施した。フラッシュ精製により FQA を含む画分(Fr.1), diCQA を含む画分(Fr.2)および FCQA を含む画分(Fr.3)を得た(図 1)。各画分には複数の化合物が含まれており、さらにリサイクル分取装置によりそれぞれを精製した。各化合物は NMR を測定し、文献値¹⁻⁴⁾と比較して化合物を同定した。

Fr.1 に含まれていた 2 つの化合物は、それぞれ¹H-NMR スペクトルのケミカルシフトおよび積分値を文献⁴⁾と比較し、4FQA (26 mg) および 5FQA (45 mg)と同定した。Fr.2 に含まれていた 3 つの化合物も、それぞれ¹H-NMR スペクトルのケミカルシフトおよび積分値を文献²⁾と比較し、3,4-diCQA (19.4 mg), 3,5-diCQA (36.4 mg)および 4,5-diCQA (37.3 mg)と同定した。Fr.3 には複数の化合物が含まれており、このなかから FCQA_F2, FCQA_F5 および FCQA_F7 をそれぞれ 7.7 mg, 8.0 mg および 19.7 mg を精製した。これらの化合物について、¹H-NMR スペクトルのシグナルのケミカルシフトおよび積分値から、カフェ酸とフェルラ酸をひとつずつ有する化合物であることが推察された。キナ酸の水酸基とカフェ酸およびフェルラ酸の結合位置は、¹H-NMR スペクトルを diCQA のものと比較して、FCQA_F2 は 3,4-diCQA と、FCQA_F5 は 3,5-diCQA と、FCQA_F7 は 4,5-diCQA と同じ結合位置であると予測した。また、HMBC より、F_CQA F2 においてキナ酸の 3 位にカフェ酸の、4 位にフェルラ酸の相関が見られ、3-caffeoyl-4-feruloylquinic acid と同定した。同様に FCQA_F5 ではキナ酸の 3 位にフェルラ酸の、5 位にカフェ酸の相関が見られ、3-feruloyl-5-caffeoylquinic acid, FCQA_F7 においてキナ酸の 4 位にカフェ酸の、5 位にフェルラ酸の相関が見られ、4-caffeoyl-5-feruloylquinic acid と、それぞれ同定した。さらに、これら FCQA の¹H-NMR ス

ペクトルも文献^{2,3)}と合致していることを確認した。

なお、3FQA は試薬を購入したが、夾雑物が多かったため精製を行い、3.9 mg の生成物を得た。

精製したものも含め、本研究で RMS を決定したクロロゲン酸類の構造式を図 4 に示す。

C-3) クロロゲン酸類の RMS 決定

クロロゲン酸類の HPLC 測定用溶液には、単離精製品などもあり異性体等が含まれている可能性があるため、得られる HPLC クロマトグラム上で目的成分ピークと近接した位置に夾雑物由来のピークが検出する可能性がある。夾雑物等の影響を最小限にするため、各 HPLC 測定用溶液は化合物毎に調製し測定した。得られたクロマトグラムから、B-6-4)に記載の通り各クロロゲン酸類のカフェ酸に対する RMS を決定した。得られた RMS を表 3 に示す。

キナ酸にひとつカフェ酸が結合したモノカフェオイルキナ酸(CQA)のうち、結合位置だけが異なる 3CQA, 4CQA および 5CQA の RMS はそれぞれ 1.123, 1.115 および 1.115 であり、ほぼ同じであった。キナ酸にひとつフェルラ酸が結合し FQA のうち、結合位置だけが異なる 3FQA, 4FQA および 5FQA の RMS はそれぞれ 1.246, 1.262 および 1.502 であった。4FQA および 5FQA はモノカフェオイルキナ酸同様、ほぼ同じ RMS であったが、3FQA のみ大きな値となった。3FQA のみ大きな値である理由は不明であるが、ケイ皮酸誘導体のキナ酸への結合数が一つである場合、ケイ皮酸誘導体の化合物種が同じであれば、同一の RMS を用いても定量値への影響はせいぜい 1%程度と考えられた。

一方、5CQA の RMS に対する CQA および FQA (3FQA を除く)の RMS の比を算出したところ、FQA は CQA よりも 10%程度大きな値であった。フェルラ酸はカフェ酸の 3 位の水酸基がメトキシル基となった構造である。基準物質と 4FQA および 5FQA は溶出時の移動相条件が異なるため、CQA と 4FQA および 5FQA の RMS の違いは構造もしくは溶媒に

よる深色効果／淡色効果によるものと推測された。クロマトグラフィーの分析条件にもよるが、ケイ皮酸誘導体の種類が異なる場合、この構造が発色団であることから、同一の RMS と見なす前に一考が必要であることが示唆された。

キナ酸にカフェ酸が二つ結合した diCQA のうち、3,4-diCQA, 3,5-diCQA および 4,5-diCQA の RMS はそれぞれ 2.175, 2.268 および 2.151 であった。5CQA の RMS に対するこれらの RMS の比はそれぞれ 1.95, 2.03 および 1.93 であった。発色団のカフェ酸の数が単純に 2 倍に増えると RMS も 2 倍になると予想していたが、3,4-diCQA および 4,5-diCQA では 1.9 倍程度とわずかに小さな値となった。分子内に立体障害があると ϵ は低下することが知られている⁵⁾。3,4-diCQA および 4,5-diCQA の二つのカフェ酸はキナ酸の隣り合った炭素に結合しており、二つのカフェ酸が隣り合っていない 3,5-diCQA と比較して立体障害の影響があるのではと考えられた。溶媒系は異なるが 5CQA と 4,5-diCQA のモル吸光係数を比較した報告があり、4,5-diCQA は 5CQA の 1.9 倍程度という結果とも矛盾がなかった⁶⁾。

キナ酸にカフェ酸とフェルラ酸がひとつずつ結合した FCQA のうち、本研究で単離精製した F_CQA F2, F_CQA F5 および F_CQA F7 の RMS はそれぞれ 2.274, 2.429 および 2.398 であった。diCQA 同様、立体障害がもっとも小さいと思われる 3 位および 5 位にケイ皮酸誘導体が結合した F_CQA F5 が最も大きい値を示したが、その RMS は diCQA よりも 10% 程大きく、FQA の RMS を 2 倍にした値(仮に 4FQA の 2 倍の 2.26)よりも 4% 程小さかった。これは、CQA の RMS が FQA の RMS より小さいことが影響していると考えられた。

以上の結果から、クロロゲン酸類の場合、立体障害等の影響もあり、発色団であるケイ皮酸誘導体の数が増えたからといって、その RMS が単純に 2 倍などになるとは限らないことが示された。しかし、キナ酸にケイ皮酸誘

導体が一つであれば、その位置異性体は同一の RMS が使用できそうであること、ケイ皮酸誘導体が 2 つだから RMS も 2 倍にして計算したとしても定量値への影響は 10% 程度で収まることが示唆された。

D. 結論

CA を基準物質としてクロロゲン酸類 12 化合物の RMS を求めた。CA を基準物質とした場合 CQA の RMS は概ね 1.12 であった。その他のクロロゲン酸類の RMS は、diCQA は CQA の約 2 倍、FQA は 1.1 倍、F+CQA は 2.1 倍程度であった。

本研究で用いた化合物のうち、CQA 以外は単離精製が必要であったり、市販試薬があっても非常に高価であったりするものがほとんどである。本研究の結果から、同一の発色団をもつ化合物群において、ひとつの化合物の RMS が明らかであれば、発色団の位置や数が異なっても、他の化合物の RMS がある程度予測可能と考えられた。

E. 参考文献

- 1) Chunpeng Wan *et. al.* “Caffeoylquinic Acids from the Aerial Parts of *Chrysanthemum coronarium* L.,” plants, 2017.
- 2) 天倉吉章, “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_平成 27 年度研究分担報告書,” 2015.
- 3) 天倉吉章, “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_平成 28 年度研究分担報告書,” 2016.
- 4) 天倉吉章, “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_平成 26 年度研究分担報告書,” 2014.
- 5) 脇田久伸, 増田勲, 藤原学, “可視・紫外線吸収スペクトル法および蛍光スペクトル法,” 著: 第二版 機器分析のてびき①, 化学同人, 1996, p. 131.
- 6) Kaeswurm J A H, Scharinger A, Teipel J,

Buchweitz M: Absorption Coefficients of Phenolic Structures in Different Solvents Routinely Used for Experiments. *molecules*, 2021; 26: 4656. (doi: 10.3390/molecules26154656)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 増本直子, 杉本直樹, 佐藤恭子: 食品添加物公定書収載品目における基原生物に使用される学名の考え方とその表記法. *食衛誌*, 2023; 64: 78-88.
- 2) Masumoto N, Ohno T, Suzuki T, Togawa T, Sugimoto N. Application of the relative molar

sensitivity method using GC-FID to quantify safranal in saffron (*Crocus sativus* L.). *J Nat Med* 2023; 77: 829–838. (<https://doi.org/10.1007/s11418-023-01724-8>)

該当無し

2. 学会発表

- 1) 増本直子: 相対モル感度(RMS)を用いた定量法、室間共同試験をしてみたら. 第5回日本定量NMR研究会年会(2023.12).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

表 1 本研究に用いた試薬

試薬名	略称	メーカー	製造番号	Lot. No.	管理番号
カフェ酸	CA	Cayman Chemical Co.	70602	0452227-5	08-52a
クロロゲン酸	5CQA	Sigma-Aldrich Co.	C3878	025K1096	04-74b
クリプトクロロゲン酸	4CQA	Sigma-Aldrich Co.	65969-10MG2	BCCB9338	22100146
ネオクロロゲン酸	3CQA	東京化成工業(株)	N11552	7PD5G-HK	22100096
3- <i>O</i> -フェルロイルキナ酸	3FQA	フナコシ (株) ChemFaces Biochemical Co., Ltd.	NS430401 CFN923932	0002 CFS202101	22100013 22200009
2,2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸ナトリウム	DSS- <i>d</i> ₆	富士フィルム和光純薬(株)	044-31671	APL6177	23-40c , 23-95c
重メタノール		MERCK(株)	1.06028.0025 2	S5831128 116	2210008 9,221000 90,22100 165,2220 0011

表 2 各化合物の定量 NMR 測定時に定量に用いたシグナル

化合物名	定量対象シグナル
5CQA	H-7' (1H, d, 7.54 ppm), H-2' (1H, d, 7.04 ppm), H-6' (1H, dd, 6.93 ppm), H-5' (1H, d, 6.76 ppm), H-8' (1H, d, 6.25 ppm), H-5 (1H, td, 5.32 ppm), H-3 (1H, m, 4.15 ppm), H-4 (1H, dd, 3.71 ppm);
3CQA	H-7' (1H, d, 7.56 ppm), H-2' (1H, d, 7.03 ppm), H-6' (1H, dd, 6.93 ppm), H-5' (1H, d, 6.76 ppm), H-8' (1H, d, 6.30 ppm), H-5 (1H, q, 5.34 ppm), H-3 (1H, td, 4.15 ppm), H-4 (1H, dd, 3.66 ppm)
4CQA	H-7' (1H, d, 7.63 ppm), H-2' (1H, d, 7.05 ppm), H-6' (1H, dd, 6.95 ppm), H-5' (1H, d, 6.78 ppm), H-8' (1H, d, 6.36 ppm), H-3+H-5 (2H, m, 4.28 ppm);
3,4-diCQA	H-5 (1H, q, 5.65 ppm), H-4 (1H, td, 4.36 ppm);
3,5-diCQA	H-7'+H-7'' (2H, dd, 7.56 ppm), H-6'+H-6'' (2H, t, 7.06 ppm), H-2'+H-2'' (2H, td, 6.93 ppm), H-5'+H-5'' (2H, dd, 6.76 ppm), H-8'+H-8'' (2H, dd, 6.31 ppm), H-3+H-5 (2H, m, 5.40 ppm), H-4 (1H, dd, 3.95 ppm)
4,5-diCQA	H-7'+H-7'' (2H, dd, 7.56 ppm), H-6'+H-6'' (2H, dd, 7.01 ppm), H-2'+H-2'' (2H, td, 6.89 ppm), H-5'+H-5'' (2H, dd, 6.74 ppm), H-8'+H-8'' (2H, dd, 6.23 ppm), H-5 (1H, m, 5.63 ppm), H-3 (1H, dd, 5.10 ppm), H-4 (1H, m, 4.36 ppm)
5FQA	H-7' (1H, d, 7.61 ppm), H-6' (1H, s, 7.19 ppm), H-2' (1H, d, 7.06 ppm), H-5' (1H, d, 6.80 ppm), H-8' (1H, d, 6.34 ppm), H-5 (1H, m, 5.32 ppm), H-3 (1H, s, 4.15 ppm), H-4 (1H, d, 3.72 ppm)
4FQA	H-7' (1H, d, 7.70 ppm), H-6' (1H, s, 7.20 ppm), H-2' (1H, d, 7.06 ppm), H-5' (1H, d, 6.80 ppm), H-8' (1H, d, 6.44 ppm), H-3+H-5 (2H, m, 4.28 ppm)
3FQA	H-5 (1H, m, 5.36 ppm), H-4 (1H, d, 3.66 ppm)
F+CQA_F2	H-2'' +H-2'+H-6' (3H, m, 7.06 ppm), H-6'' (1H, m, 6.89 ppm), H-5'+H-5'' (2H, m, 6.75 ppm), H-5 (1H, m, 5.63 ppm), H-3 (1H, m, 4.36 ppm)
F+CQA_F5	H-2' (1H, s, 7.19 ppm), H-5'+H-2'' (2H, m, 7.06 ppm), H-5'' (1H, m, 6.94 ppm), H-5+H-3 (2H, m, 5.41 ppm)
F+CQA_F7	H-2'' +H-2'+H-6'' (3H, m, 7.06 ppm), H-3 (1H, m, 5.63 ppm)

表3 クロロゲン酸類のカフェ酸に対する相対モル感度 (RMS)

	CA に対する RMS			平均値 (SD)	5CQA の RMS に 対する 各クロロゲン酸類の RMS の比
	LC 装置 1		LC 装置 2		
	PDA 検出器	UV 検出器	UV 検出器		
5CQA	1.116	1.112	1.116	1.115 (0.002)	1.00
4CQA	1.117	1.113	1.115	1.115 (0.002)	1.00
3CQA	1.126	1.124	1.120	1.123 (0.003)	1.01
3,4-diCQA	2.175	2.171	2.179	2.175 (0.004)	1.95
3,5-diCQA	2.264	2.250	2.291	2.268 (0.021)	2.03
4,5-diCQA	2.140	2.132	2.180	2.151 (0.026)	1.93
5FQA	1.232	1.245	1.261	1.246 (0.015)	1.12
4FQA	1.252	1.264	1.269	1.262 (0.009)	1.13
3FQA	1.481	1.500	1.524	1.502 (0.022)	1.34
FCQA_F2	2.269	2.275	2.278	2.274 (0.005)	2.04
FCQA_F5	2.411	2.422	2.453	2.429 (0.022)	2.17
FCQA_F7	2.400	2.405	2.389	2.398 (0.008)	2.15

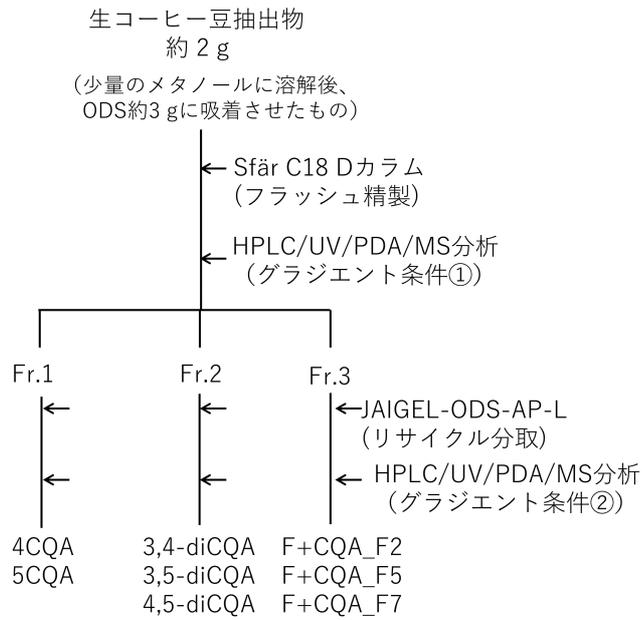


図 1 「生コーヒー豆抽出物」からクロロゲン酸類単離のスキーム

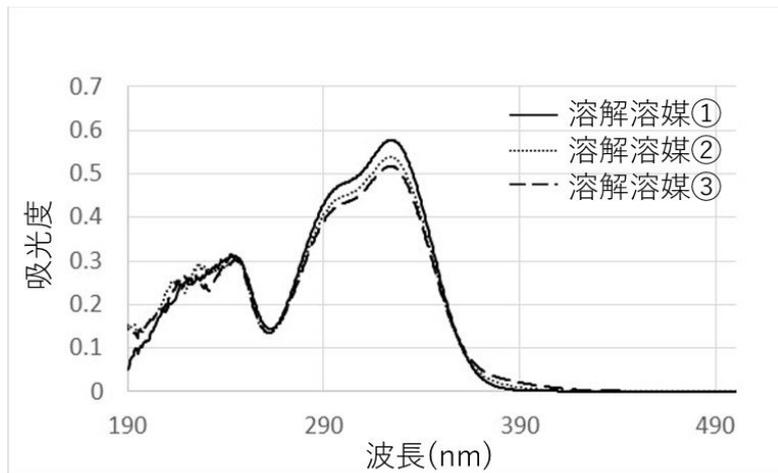


図 2 pH を変化させたときの 5CQA 溶液の UV 吸収スペクトル
溶解溶媒① : 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液 pH=2.6,
溶解溶媒② : 0.1 M CH₃COONa : 0.1M CH₃COOH = 60 : 40 pH=4.8,
溶解溶媒③ : 10 mM リン酸(ナトリウム)緩衝液 pH=6.9

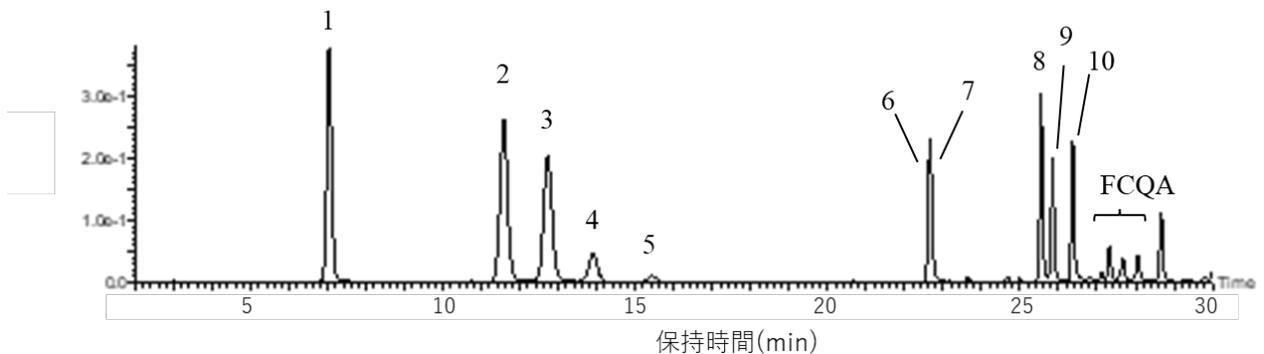


図 3 「生コーヒー豆抽出物」の HPLC クロマトグラム
ピーク 1: 3CQA, ピーク 2: 5CQA, ピーク 3: 4CQA, ピーク 4: 3FQA, ピーク 5: CA,
ピーク 6: 4FQA, ピーク 7: 5FQA, ピーク 8: 3,4-diCQA, ピーク 9: 3,5-diCQA,
ピーク 10: 4,5-diCQA. HPLC 条件は B-6-3)に記載

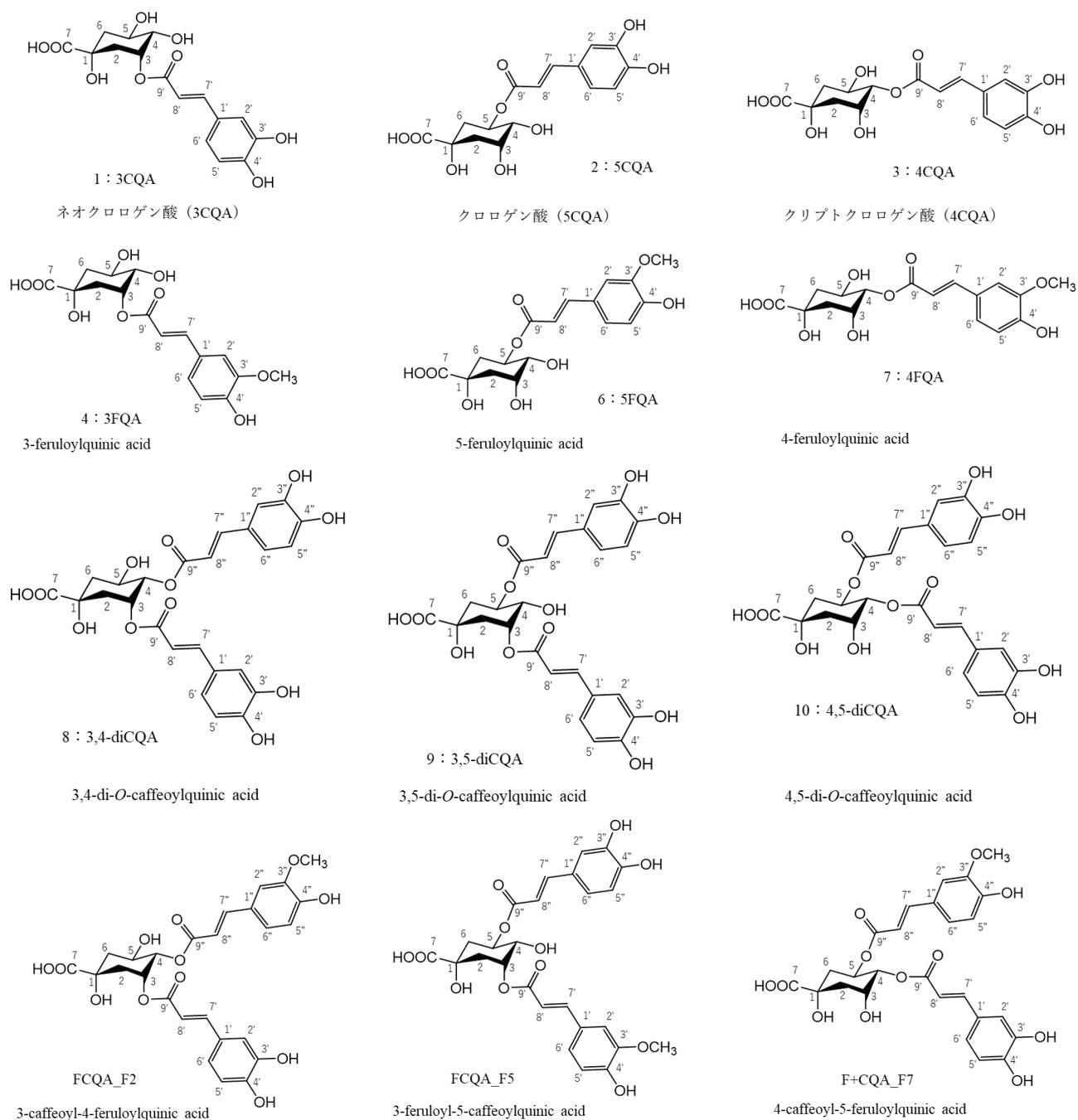


図4 本研究でカフェ酸に対する RMS を決定したクロロゲン酸類の構造