

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：82601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20735

研究課題名(和文) 精確性に重点をおいた相対モル感度を用いた天然物の品質評価法の確立

研究課題名(英文) Study on quality control methods of natural products using relative molar sensitivity with an emphasis on accuracy

研究代表者

増本 直子 (Masumoto, Naoko)

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部・主任研究官

研究者番号：70754034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：定量対象と基準物質との相対モル感度(RMS)を用いて定量するRMS法について検討した。定量対象としたクロロゲン酸類は、桂皮酸誘導体とキナ酸のエステル化合物であり、キナ酸に結合する酸の種類や位置の違いにより多くの化合物種が存在する。キナ酸にはほとんどUV吸収がないため、HPLC-PDAを用いた場合、発色団である桂皮酸誘導体の種類や数から各クロロゲン酸類のRMSを予想可能と思われた。桂皮酸誘導体の結合位のみ異なる場合、RMSは一致した。結合数が2つの場合は概ね2倍のRMSとなったが、立体障害が予測される場合は2倍より5%ほど減少した。類似化合物の構造からある程度RMSが予測可能であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は古くから様々な天然資源を薬や食品として活用しており、これらの有効かつ安全な活用には、含まれる有用成分や有害成分の量を正しく把握し適切に用いることが肝要である。天然物のような多成分系試料中の成分の定量では定量用標品の入手が障壁となり不正確な定量値しか得られない場合も少なくない。このような課題の解決策の一つとしてRMS法が用いられているが、構造とRMSとの関係はどのようなものがあるか、装置間差はどうかといった学術的な情報が十分に集められているとは言いがたい。本研究の成果を含めRMS法の開発が進むことは、定量可能な成分の幅が広がり、人々がより有効かつ安全に天然資源を活用できることにつながる。

研究成果の概要(英文)：The RMS method, a quantitative method using the relative molar sensitivity (RMS) of an analyte to reference material (RMS reference), was studied. Chlorogenic acid and its relatives (CGAs) are esters between quinic acid and cinnamic acid derivatives, and many compound types exist depending on the type and position of the cinnamic acid derivatives bonded to the quinic acid. Because quinic acid has almost no UV absorption, RMSs of CGAs used for HPLC/PDA could be predicted from the type and number of cinnamic acid derivatives, which are chromophores. RMSs of chlorogenic acid isomers, which differed in the bonding position, were almost identical. The RMS was almost twice as large when the number of cinnamic acid derivatives binding to quinic acid was two as when it was one. However, it was about 5% less than twice when steric hindrance was predicted. The results suggest that the RMS of a compound could be predicted from the RMSs of its analogs.

研究分野：分析化学、生薬・天然物

キーワード：相対モル感度 クロロゲン酸 カフェ酸 クロマトグラフィー HPLC-PDA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は古くから様々な天然資源を薬や食品として活用しているが、これらの有効かつ安全な活用のためには、含まれる有用成分や有害成分の量を正しく把握し適切に用いることが肝要である。しかし、天然資源のような多成分系試料に含まれる成分の定量では、定量用標品入手が障壁となり不正確な定量値しか得られず、品質確保・評価が困難な場合が多い。

そこで本研究では、定量用標品が不要な定量法として、近年注目されている相対モル感度 (RMS; relative molar sensitivity) を用いた定量法 (RMS 法) を有用天然成分に適用することを計画した。しかしこの定量法は、分析条件や装置によっては定量値がばらつく課題がある。本研究ではさらに、定量値がばらつく要因を探索し補正法を新たに見出し、どこで定量しても正確な値を得られる手法の確立を試みる予定であった。

2. 研究の目的

RMS 法検討の対象として、自然界に広く存在し、生薬や食品に含まれ機能性も期待されるクロロゲン酸類を選択した。これらは桂皮酸誘導体とキナ酸のエステル化合物であり、キナ酸に結合する酸の種類や位置の違いにより多くの化合物種がある。しかし、熱や水の存在下で不安定で扱いにくいうえ、化合物種のなかには純度不明・高価な市販試薬しかないものや、試薬がなく単離精製が必要なものもあり、正確な定量は難しい。これらの化合物種については、ひとつの基準物質を設定しこれに対する各クロロゲン酸類の RMS を求めることで、一斉定量が可能になると考えられる。当初の研究予定では、装置間差をどのように補正していくか、という点が研究目的のひとつであった。しかし、様々なクロロゲン酸類を入手し、RMS を求めていく過程で、ある化合物の RMS を求めればその類似化合物の RMS はある程度予想することが可能ではないか、という仮説が考えられた。そこで、時間は要するが単離精製を含めてできる限り多くの種類のクロロゲン酸類を入手し、RMS と構造の関係を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) クロロゲン酸類および基準物質

基準物質として、Cayman Chemical Co. 製のカフェ酸を用いた。また、クロロゲン酸類として、表 1 に示す構造のものを用いた。

表 1 本研究で用いたクロロゲン酸類

【市販品を使用】	略称	桂皮酸誘導体 1	結合位
クロロゲン酸	5CQA	カフェ酸	5
ネオクロロゲン酸	3CQA	カフェ酸	3
クリプトクロロゲン酸	4CQA	カフェ酸	4
5-フェルロイルキナ酸	5FQA	フェルラ酸	5
3-フェルロイルキナ酸	3FQA	フェルラ酸	3
4-フェルロイルキナ酸	4FQA	フェルラ酸	4

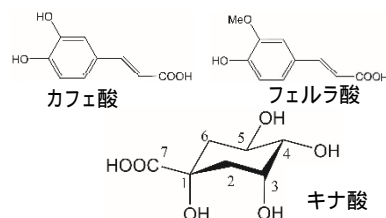


図 カフェ酸、フェルラ酸、キナ酸の構造

【単離精製品を使用】	略称	桂皮酸誘導体 1	結合位	桂皮酸誘導体 2	結合位
3,4-ジカフェオイルキナ酸	3,4-diCQA	カフェ酸	3	カフェ酸	4
3,5-ジカフェオイルキナ酸	3,5-diCQA	カフェ酸	3	カフェ酸	5
4,5-ジカフェオイルキナ酸	4,5-diCQA	カフェ酸	4	カフェ酸	5
3-フェルロイル-4-カフェオイルキナ酸	3F4CQA	フェルラ酸	3	カフェ酸	4
3-カフェオイル-5-フェルロイルキナ酸	3C5FQA	カフェ酸	3	フェルラ酸	5
4-カフェオイル-5-フェルロイルキナ酸	4C5FQA	カフェ酸	4	フェルラ酸	5

表 1 に単離精製品と記載のあるものはすべて、食品添加物として流通する「生コーヒー豆抽出物」から単離した。なお、用いたクロロゲン酸類はすべて定量 NMR により純度を決定した。

(2) HPLC 分析条件

カラム：ODS カラム (4.6 × 250mm, 5 μ m) 移動相 A : 0.1% ぎ酸水、移動相 B : 0.1% ぎ酸アセトニトリル、移動相勾配: B10%iso(0-15 min) B10-50%(15-30min)、カラム温度: 40%、流量: 1mL/min、検出器および検出波長: PDA(325nm)

(3) RMS の算出

各化合物 1-50 μ g/mL の標準液(濃度は定量 NMR により求めた純度で補正)を作成し、(2)に示す HPLC 条件で分析した。得られた検量線(横軸: モル濃度、縦軸: ピーク面積)の傾きの比から RMS を算出した。

4. 研究成果

表1に示す12のクロロゲン酸類について、カフェ酸を基準物質としたRMSを算出した。キナ酸にひとつのカフェ酸が結合したモノカフェオイルキナ酸(3CQA、4CQAおよび5CQA)は結合位が異なるのみであり、これらのカフェ酸に対するRMSはすべて1.12であった。発色団はカフェ酸のみであり、その結合位の違いによる吸収スペクトルの変化がないため、RMSにも変動がなかったと考えられる。ここで、母体となる骨格は同一で、発色団の種類、数、結合位が異なるのみの場合、それら類縁体のうちどれかひとつのRMSを求めれば、その他の化合物のRMSはある程度予想可能ではないかと着想した。なお、今回用いたクロロゲン酸類のうち、5CQAは95%程度の高純度のものが比較的安価(1gで1万円弱)で入手可能である。5CQAのRMSを求めれば、他のクロロゲン酸類のRMSもその値から予想できる可能性が考えられた。そこで、表1に示すクロロゲン酸類すべてについて、カフェ酸に対する5CQAのRMSを1.00としたときの値に換算した結果を、表2に示す。

表2 カフェ酸に対する5CQAのRMSを1としたときの各クロロゲン酸類のRMS

クロロゲン酸類 1		クロロゲン酸類 2	
5CQA	1.00	3,4-diCQA	1.94
3CQA	1.01	3,5-diCQA	2.02
4CQA	1.00	4,5-diCQA	1.91
5FQA	1.09	3F4CQA	2.01
3FQA	1.31	3C5FQA	2.14
4FQA	1.11	4C5FQA	2.13

カフェ酸の代わりにフェルラ酸がひとつ結合したモノフェルロイルキナ酸(3FQA、4FQAおよび5FQA)では、どの化合物もモノカフェオイルキナ酸より1.1~1.3倍の値となった。助色団であるヒドロキシル基がメトキシ基となることによる変化と考えられる。モノカフェオイルキナ酸の結果を考えると、4FQAおよび5FQAの値はほぼ一致しており妥当だが、3FQAの値は少し大きすぎるように思われた。

カフェ酸がふたつ結合したジカフェオイルキナ酸(3,4-diCQA、3,5-diCQAおよび4,5-diCQA)では、モノカフェオイルキナ酸のRMS値のほぼ2倍であった。しかし、3,4-diCQAおよび4,5-diCQAは2倍よりも5%程度小さい値であった。立体障害がある化合物の場合、モル吸光係数が減少することが知られており、3,4-diCQAおよび4,5-diCQAは3,5-diCQAと比較すると立体障害があると予測されるため、5%程度小さい値となったと考えられた。

カフェ酸とフェルラ酸がひとつずつ結合したカフェオイルフェルロイルキナ酸(3F4CQA、3C5FQAおよび4C5FQA)では概ね2倍から2.1倍であった。モノフェルロイルキナ酸のRMSがモノカフェオイルキナ酸のRMSより10%程度大きな値であったことを考慮すると、ジカフェオイルキナ酸と比較して大きめの値であったことは妥当であると考えられる。しかし、3F4CQAと同様立体障害があると考えられる4C5FQAの値が、これらより立体障害がないと思われる3C5FQAと同程度であった。

以上の結果より、結合する酸の種類や数によってRMSは単純に2倍などと予想はできないものの、10%程度のズレを許容できる場合は発色団の数等を考慮しつつRMSを予想することが可能であることが示唆された。各化合物のモル吸光係数についてより精度の高い予測ができれば、より精度の高いRMS予測が可能であると考えられる。

一方で、今回桂皮酸誘導体がキナ酸にふたつ結合した化合物はすべて単離精製品を用いたが、それはこれら化合物の市販試薬がない、あるいは大変高価だったためである。たとえ試薬を入手して検量線法で定量したとしても、比較的高純度であった5CQAでさえその純度は95%程度であり、真の値から5%のズレがある。おおよその定量値がモニタリングできればよい、といった条件であれば、試薬入手のコストや手間の点からも、本研究での考え方で十分定量可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 増本直子、中島馨、西崎雄三、石附京子、杉本直樹、佐藤恭子
2. 発表標題 クロロゲン酸類縁体の構造と相対モル感度の関係
3. 学会等名 日本食品化学学会 第28回総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増本直子
2. 発表標題 相対モル感度を用いた定量法と最近の動向
3. 学会等名 第4回 日本定量NMR研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------