

Study on Chemical and Anti-Oxidation Properties of Coffee-Derived Polyphenols

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/00059711

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



学位論文要旨

コーヒー由来ポリフェノールの化学的性質と
抗酸化挙動に関する研究

Study on Chemical and Anti-Oxidation Properties
of Coffee-Derived Polyphenols

金沢大学大学院自然科学研究科

物質科学専攻

一谷 正己

Summary

Coffee-derived polyphenols are an important source of natural antioxidants. The most abundant polyphenols in coffee are chlorogenic acid and its subgroup, caffeoylquinic acids (CQAs). CQAs undergo various chemical changes during coffee bean roasting and processing. Here, we focused on 4-methylcatechol (MC) and CQAs and elucidated the reaction of their oxidation product (*o*-quinones) with thiol compounds (nucleophiles). We also examined the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of these polyphenols, the effect of various alcohols on the scavenging activity, and the interaction between CQAs and the food additive cyclodextrins (CyDs).

Nucleophiles enhanced the DPPH radical scavenging activity of polyphenols by regenerating the catechol structure from *o*-quinone. We analyzed the reaction of MC with DPPH in the presence of *N*-acetylcysteine (NACys), and four types of NACys adducts were isolated, purified, and structurally characterized. MC oxidation using a periodate-supported resin and the subsequent reaction with NACys were also studied. LC-MS revealed that a mono-NACys adduct was produced as the major product in the reaction of MC quinone with NACys by direct reduction. The reaction of 5-CQA quinone with NACys proceeded in a manner similar to the MC case.

Oxidation reactions of MC in alcohol solutions were performed using DPPH and periodate resins as oxidizing agents. Based on UV-Vis and LC-MS data, the DPPH radical scavenging activity of polyphenols was enhanced in the presence of alcohols. The reaction product was separated by preparative HPLC, and the structure was analyzed by two-dimensional NMR spectroscopy.

Examination of the mechanisms of inclusion complex formation between CQAs and various CyDs suggested cavity size dependence of complex formation. Structures of the positional isomers of CQA indicated that the inclusion complexes of CQA and CyD are formed at 1:1. The 1D and 2D ROESY spectra demonstrated the mode of the inclusion complex formation.

要約

1. 緒言

コーヒーは、世界で最も飲用されている嗜好飲料の一つである。一方、最新の疫学的研究に基づき、コーヒーが単に嗜好飲料としてだけでなく様々な健康作用や生理学的効果を有することが判明している。そのうち、代表的な生理活性の一つである抗酸化作用をコーヒー由来ポリフェノールが担っている。コーヒーポリフェノールの中で最も含有量が多い成分は、桂皮酸類とキナ酸のエステル誘導体であるクロロゲン酸類(CGAs)とそのサブグループであるカフェオイルキナ酸類(CQAs)やフェルロイルキナ酸類(FQAs)である(Fig. 1)。

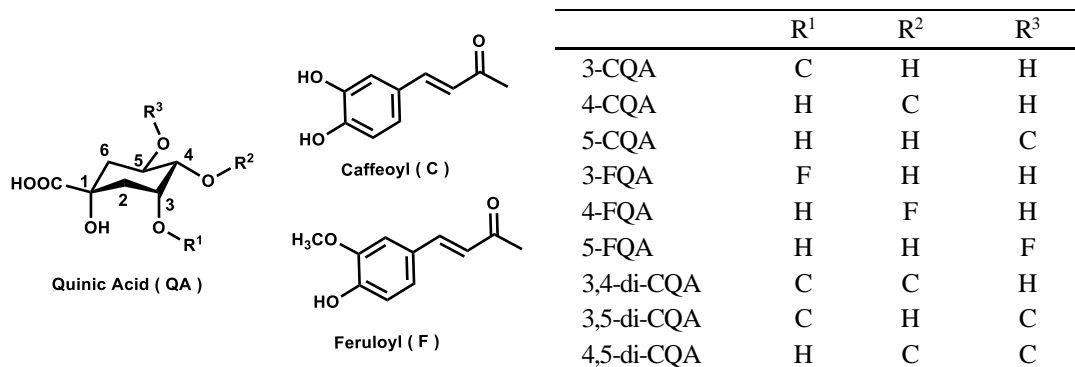


Fig. 1 コーヒーに含有されている CGAs の分子構造

CQAs は、焙煎や加工のプロセスで酸化反応はじめ種々の化学的変化を受け、さらに共存する成分との間で複雑な反応も進行するが、その詳細は未解明な部分が多い。本研究では、酸化活性の評価法として DPPH(2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル)ラジカル消去法を用い、CQAs が有する抗酸化活性が、コーヒーの重要な香り成分であるチオール化合物等の求核物質の共存下では増強される事象を検証し、その反応機構の解明を目指した。また、CQAs が発現する生理活性作用の制御を目的として、食品添加物として利用されるシクロデキストリン (CyD)を用いた CQAs の包接複合体の形成とそれらの相互作用について詳細に検討した。

2. *N*-アセチルシステイン存在下での 4-メチルカテコールの酸化反応により生成するチオール付加体の分光学的特性

CQAs のモデル化合物として 4-メチルカテコール (MC)を用いてチオール化合物共存下における DPPH ラジカル消去活性 (Scavenging Ability, SA)を測定した。*N*-アセチルシステイン(NACys), システイン (Cys), またはグルタチオン(GSH)などのチオール化合物を含む溶液は、いずれも実測 SA 値

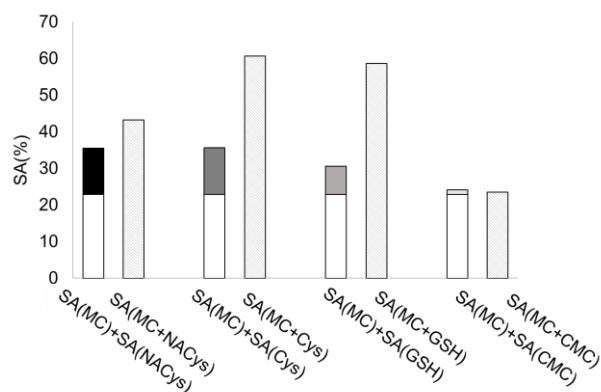


Fig. 2 MCと種々のチオール化合物の組合せにおける理論的および実験的な消去活性の比較

と理論SA値との差が正の値を示し、MCのラジカル消去活性が増強することを示した(Fig. 2).

MCの酸化反応とそれに引き続くNACysとの反応について詳細に検討した。反応生成物を単離し、NMRによる構造解析から、付加反応物の分子構造を明らかにした(Fig. 3).

MCの酸化反応では、まず*o*-キノン(MCキノン)が生成し、生じたキノンへのNACysの求核付加により、主要な

mono-NACys付加体として5-NACys MCが生成することを明らかにした。さらに、得られた5-NACys MCが酸化を受けて5-NACys MCキノンに変換され、このキノンはさらなるNACysの求核付加反応により、主生成物である2,5-NACys MCに変換された。2,5-NACys MCがさらに酸化を受けると2,5-NACys MCキノンが生成するが、これがNACysにより直接還元され、主に2,5-NACys MCを生成するとともに、NACysの求核付加反応も並行して進行し、少量の

2,5,6-NACys MCが生成する。以上のように、カテコール構造の酸化中間体であるキノンへのNACysの求核付加により、反応系中にカテコール構造が再生されるために、チオール存在下では抗酸化活性が増強され

ることを明らかにした(Scheme 1).

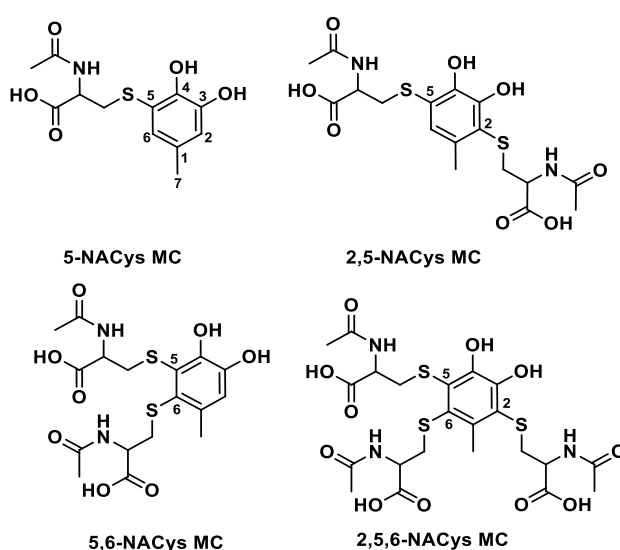
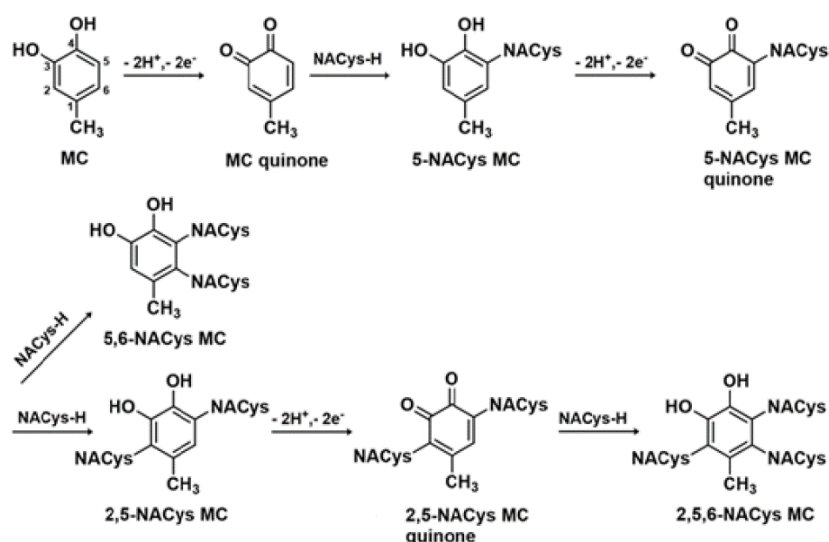


Fig. 3 NACys存在下でのMCとDPPHの反応における単離生成物の構造



Scheme 1 NACysの存在下でのMCのDPPHラジカル消去反応に対する妥当な反応機構

さらに、本研究では DPPH に代えて、過ヨウ素酸を担持した樹脂を調製し、これを酸化剤として用いた系でも反応を実施した (Fig. 4).

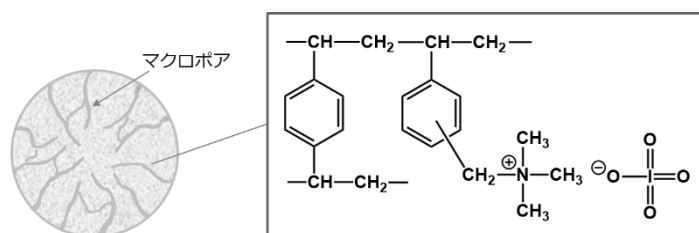


Fig. 4 過ヨウ素酸担持樹脂の化学構造モデル

この手法を用いることにより、酸化反応を制御し、各反応を段階的に進行させることに成功した。さらに、種々の分光学的分析法による抗酸化反応の段階的な追跡が可能となり、反応中間体の構造解析が大きく進展した。

3. アルコール存在下における MC の抗酸化反応機構

アルコール溶液 (メタノール, エタノール, 1-プロパノール, 1-ブタノール) 中の DPPH ラジカル消去活性は、非アルコール溶媒であるアセトニトリルと比較して高まることを確認した。そこで、アルコール溶液中でのラジカル消去活性の増強機構について検討した。メタノール溶液中における MC の抗酸化反応を HPLC, LC-MS を用いて経時的に追跡した。また、酸化剤として過ヨウ素酸担持樹脂を用いた場合において、反応経過を UV-Vis スペクトルにより解析した。

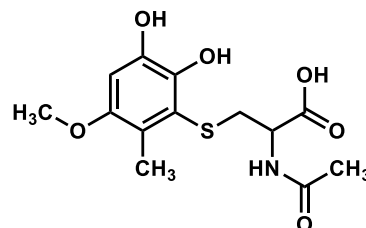
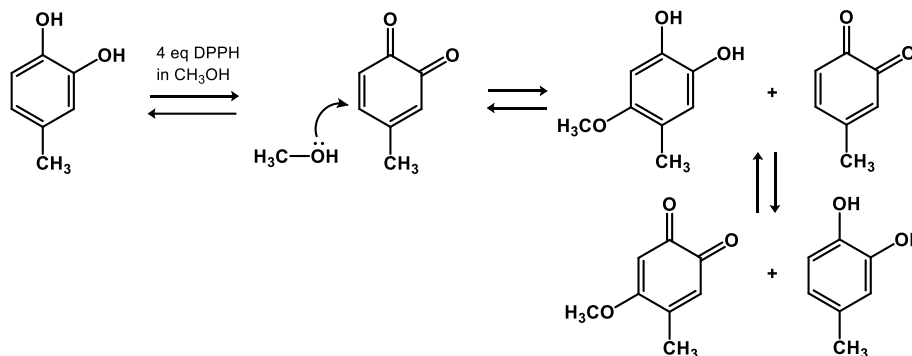


Fig. 5 MeOH 存在下での MC 酸化反応生成物の分子構造

さらに反応生成物を分取し、NMR 分光法による構造解析から付加体の分子構造を明らかにした (Fig. 5)。これらの結

果からアルコール溶液中における MC のラジカル消去活性の増強機構を解明した (Scheme 2)。



Scheme 2 アルコールの存在下での MC のラジカル消去反応機構

4. NACys 存在下における CQAs の抗酸化反応機構

コーヒー抽出物に最も多く含有されている CGA の一種である 5-CQA を対象物質として、5-CQA の DPPH ラジカル消去活性に対して、チオールが及ぼす増強効果を検証した。続いて、5-CQA の酸化反応を NACys の非存在下および存在下で行い、LC-MS により分析した。また、主要な反応生成物を分取 HPLC により単離し、その分子構造を NMR スペクトルを用いて解析した。その結果、反応生成物は 5-CQA-NACys 付加体であることが明らかになった (Fig. 6)。

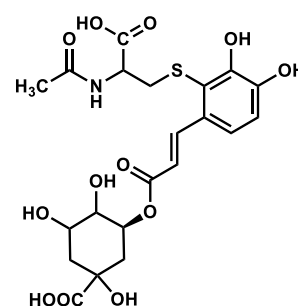


Fig. 6 5-CQA-NACys 付加体の分子構造

最後に CQAs を含有する生豆抽出物を試料に用いて酸化反応と引き続く NACys との反応を行い、食品サンプル中における CQAs の反応挙動について検証した。LC-MS を用いて反応前後を比較解析することにより、カテコール構造を分子内に有する CQAs は、MC と同様の酸化反応機構に従い、CQA キノンを経由して、CQA-NACys 付加体へ変換されることを明らかにした (Fig. 7)。

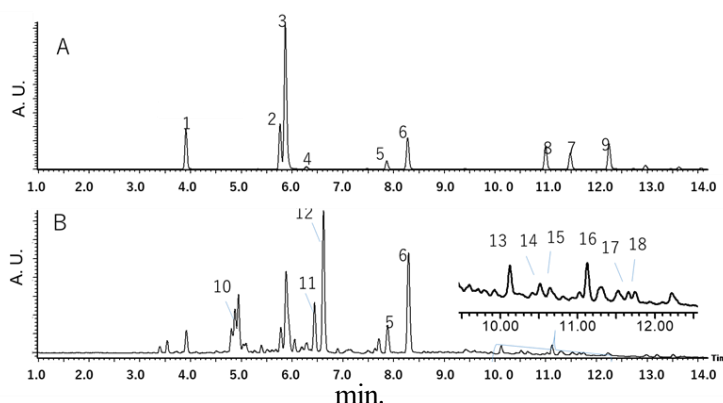


Fig. 7 生コーヒー豆抽出物のHPLCクロマトグラム
A: 酸化反応前, B: 酸化反応後

5. CQAs の CyD 包接挙動

CQAs と CyD との包接複合体形成の分子機構について検討した。まず、蛍光スペクトルのデータを基に連続変化法と Benesi-Hildebrand 式を用いた解析を行い、複合体の化学量論と安定度定数を算出した。いずれの CQAs においても安定度定数は β -CyD > α -CyD > γ -CyD の順となり、複合体形成に対する CyD のキャビティサイズ依存性を示した (Table 1)。また、 α -CyD および β -CyD に対する安定度定数は 5-CQA > 4-CQA > 3-CQA の順となり、CQAs の位置異性体の構造を認識することを示唆した。

Table 1 蛍光スペクトルから算出した包接複合体の安定度定数 (M^{-1})

Host	Guest					
	3-CQA	4-CQA	5-CQA	3,4-di-CQA	4,5-di-CQA	3,5-di-CQA
α -CyD	55 \pm 15	76 \pm 20	312 \pm 25	60 \pm 11	46 \pm 11	406 \pm 52
β -CyD	56 \pm 14	180 \pm 3.5	481 \pm 36	115 \pm 14	588 \pm 48	431 \pm 23
γ -CyD	14 \pm 10	26 \pm 22	9.7 \pm 4.6	-	-	52 \pm 21

連続変化法プロットの結果, CQAs と CyD の包接複合体は 1:1 で形成されることが明らかとなった. 1H NMR および ROESY スペクトル解析のデータは, CQAs のカフェオイル基部分が CyD の広い側から包接されること示唆した.

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

.....コーヒー由来ポリフェノールの化学的性質と抗酸化挙動に関する研究.....

2. 論文提出者 (1) 所 属 物質科学 専攻

(2) ^{ふり}氏 ^{がな}名 いちたに まさき
一谷 正己

3. 審査結果の要旨（600～650字）

.....提出された学位論文について、各審査委員による予備審査を実施するとともに、令和2年2月4日に開催された口頭発表および質疑応答の結果を踏まえて、論文審査委員会にて協議を行い、以下の様に判定した。.....

.....コーヒー由来ポリフェノールであるクロロゲン酸類は、抗酸化作用をもつことから市販飲料の健康成分として近年注目を集めている。生豆に含まれるクロロゲン酸類は、焙煎等の製品化プロセスにおいて様々な化学変化を受けるとともに、共存する他の化合物と複雑な反応を起こすが、その詳細は未解明な部分が多い。本論文では、コーヒーの香気成分であるチオール類の共存下で、クロロゲン酸類のもつ抗酸化活性が増強される事象を確認し、種々の分析方法を駆使してその反応機構を明らかにしている。また、アルコール溶液中での抗酸化活性が、非アルコール溶媒中に比べ増大する機構についても解明した。本研究では、過ヨウ素酸を担持した樹脂を酸化剤として用いることにより、反応系から任意に酸化剤を取り除くことが可能となり、抗酸化反応の段階的な追跡および反応中間体の単離と構造解析が容易になることを実証した。一方、クロロゲン酸類が発現する生理活性作用の制御を目的として、食品添加物として利用されているシクロデキストリンを用いた包接複合体を形成し、それらの包接挙動を明らかにした。以上、本研究の成果は、生理活性物質としてのクロロゲン酸類の活用に必要な知見を与えるだけでなく、食品化学の発展に貢献することが期待される。よって本論文は博士(工学)の学位に値するものと判断した。.....

4. 審査結果 (1) 判 定 (いずれかに○印) 合 格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博 士 (工 学)