

## *Legionella pneumophila* に抗菌活性を示すコーヒー成分の化学構造について

堂ヶ崎知格,<sup>\*a</sup> 新藤哲也,<sup>b</sup> 古畑勝則,<sup>a</sup> 福山正文<sup>a</sup>

### Identification of Chemical Structure of Antibacterial Components against *Legionella pneumophila* in a Coffee Beverage

Chikaku DOGASAKI,<sup>\*a</sup> Tetsuya SHINDO,<sup>b</sup> Katsunori FURUHATA,<sup>a</sup> and Masafumi FUKUYAMA<sup>a</sup>  
Faculty of Environmental Health Science, Azabu University,<sup>a</sup> 1-17-71, Fuchinobe, Sagami-hara City,  
Kanagawa 229-8501, Japan, and Tokyo Metropolitan Research Institute of Public Health,<sup>b</sup>  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

(Received December 25, 2001; Accepted April 2, 2002)

We previously reported that certain constituents in brewed coffee exhibited antibacterial activities against a strain of *Legionella pneumophila*. The constituents showing antibacterial activities were included only in extracts cold with water or hot water. To determine the antibacterial substances in coffee extract, the extract was fractionated by HPLC using a UV/photodiode array detector. The optimum HPLC conditions for analysis were UV wavelength of 250 nm and eluents of methanol/acetic acid (10/90), pH 3.0. When several fractions separated by HPLC were investigated for antibacterial activities against *L. pneumophila*, it was found that three peak fractions exhibited strong antibacterial activities. Each product from these fractions was analyzed by NMR and LC-mass spectrometry, and the chemical structure of each was determined. It was shown that the antibacterial substances were protocatechuic acid (3,4-dihydroxy benzoic acid), chlorogenic acid, and caffeic acid.

**Key words**—coffee; *Legionella pneumophila*; antibacterial substances; chlorogenic acid; caffeic acid; protocatechuic acid

## 緒 言

市販の缶入りコーヒー飲料や焙煎して挽いたコーヒー豆から熱湯抽出して得られたコーヒー飲料には、*Legionella pneumophila* に対する強い抗菌活性が認められることを既に報告<sup>1)</sup>した。お茶や紅茶などの渋み、苦味成分として知られるカテキンの抗菌効果<sup>2-4)</sup>についてはもとより、カカオマス<sup>5)</sup>の腸管出血性大腸菌 O-157 に対する抗菌効果なども報告されているが、同じ嗜好飲料であるコーヒー中の成分の抗菌性に関しては十分な報告は見当たらない。そこで今回はコーヒー中の抗菌活性成分を明らかにするため、コーヒー抽出液を高速液体クロマトグラフィーを用いて分画した。さらに単離した活性画分を核磁気共鳴装置及び液体クロマトグラフ・質量分析計などの各種分析機器を用いて構造解析し、コーヒー中の抗菌活性本体の化学構造を明らかにしたの

で報告する。

## 実 験 の 部

### 1. 材料

1) コーヒー焙煎豆：深炒りし、ドリップ用に中細挽きした市販の Maxim モカコーヒー（味の素ゼネラルフーズ株式会社製）を用いた。

2) コーヒー豆の各種溶媒による抽出：中細挽きした市販のコーヒー 50 g をとり、倍容量のヘキサン、酢酸エチル、クロロホルム、ブタノール、エタノール及び水で順次抽出し、それぞれ溶媒を完全に留去した後、DMSO 又は水 1 ml に再溶解して抗菌試験用試料とした。

3) コーヒー豆の熱水抽出：抽出はペーパー・ドリップ式で行った。焙煎豆を中細挽きした市販のコーヒー 30 g をドリッパーにセットされたペーパーフィルターにとり、沸騰直後の蒸留水 20 ml を静かに全体に注いで数十秒間蒸らした。次いで、新たに 100 ml の沸騰蒸留水を注いで抽出を行い、抽

<sup>a)</sup>麻布大学環境保健学部, <sup>b)</sup>東京都立衛生研究所  
e-mail: dogasaki@azabu-u.ac.jp

出液が完全に滴下し終わった後、サーバー内のコーヒー抽出液 50 ml をとり、2 ml にまで濃縮したもの（コーヒー濃縮液）を分析用試料とした。

**2. 試薬及び培地** ヘキサン、酢酸エチル、クロロホルム、ブタノール、エタノール、酢酸、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム（一般試薬はすべて和光純薬工業株式会社製の特級品を用いた。）

アセトニトリル、メタノール（いずれも関東化学株式会社製の高速度液体クロマトグラフィー用試薬を用いた。）

NMR 測定溶媒：重メタノール ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; Eurisotop group 社製)、20% 重塩酸 (DCI; ACROS ORGANICS 社製)、重ジメチルスルホキサイド ( $\text{DMSO-d}_6$ ; 和光純薬工業株式会社製)

試薬標準品：Chlorogenic acid (純度 95% 以上)、caffeic acid (純度 97%); Sigma Chemical Co., protocatechuic acid (3,4-dihydroxy benzoic acid (純度 97%); Aldrich Chemical Co.

培地：BCYE $\alpha$  寒天培地及び BSYE 寒天培地（株式会社 日研生物医学研究所製）

### 3. 装置及び分析

#### 1) 装置

高速液体クロマトグラフ：ポンプ PU-1580, 検出器 MD-1515 型 (UV/フォトダイオードアレイ検出器), オートサンプラー AS-1555-10 型, フラクシオンコレクター SF-212, 日本分光工業株式会社製

液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC-MS; TSQ 700) Finnigan MAT 社製

核磁気共鳴装置 (NMR; JNM-A500 型) 日本電子工業株式会社製

ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC-MS; GC-17A, MS-QP 5000) 株式会社島津製作所製

#### 2) HPLC による分析

##### 2-1) 溶離液の検討

- アセトニトリル/水 = 0/100  $\rightarrow$  10/90 (10 min), 10/90  $\rightarrow$  100/0 (30 min) (グラジエント法による)
- アセトニトリル/20 mM リン酸水素二ナトリウム (pH 7.0) = 10/90, 50/5
- アセトニトリル/10 mM リン酸二水素ナトリウム (pH 3.0) = 10/90, 30/70, 50/50

- メタノール/水 = 10/90, 50/50
- メタノール/10 mM リン酸二水素ナトリウム (pH 3.0) = 10/90, 50/50
- メタノール/10 mM リン酸二水素ナトリウム (pH 4.8) = 10/90, 50/50
- メタノール/10 mM リン酸水素二ナトリウム (pH 7.0) = 10/90, 50/50
- メタノール/0.07 M 酢酸 (pH 3.0) = 10/90, 50/50

#### 2-2) 分析条件

カラム (ODS) Mightysil RP-18 (150- $\phi$ 4.6 mm) 及び Mightysil RP-18GP (250- $\phi$ 6.0 mm) (いずれも関東化学株式会社製)

流量 1 ml/min, カラムオープン温度 30°C, 検出波長 250 nm

#### 2-3) コーヒー成分の分画と分取

コーヒー濃縮溶液について HPLC 分析を行った。カラムサイズ 150- $\phi$ 4.6 mm 又は 250- $\phi$ 6.0 mm を用いて分画した。次に、オートサンプラーを用いて繰り返し HPLC に試料を注入し、それぞれピークに相当する画分をフラクションコレクターにより分取した。各ピークの全量をそれぞれ集めて濃縮乾燥した後、HPLC への全注入試料量となるように水又は熱水で再溶解し、抗菌活性試験用試料とした。また、一部は化学分析用試料として用いた。

#### 3) LC-MS による分析

導入方法：フローインジェクション, 導入溶媒：0.2% 塩酸/メタノール, イオンモード：ESI (negative)

#### 4) NMR 測定

化合物を 0.2% DCI/ $\text{CD}_3\text{OD}$  あるいは  $\text{DMSO-d}_6$  溶液に溶解し,  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) 及び  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz), HMQC ( $^1\text{H}$  観測  $^1\text{H-}^{13}\text{C}_2\text{D}$  隣接相関) 及び HMBC

( $^1\text{H-}^{13}\text{C}_2\text{D}$  遠隔相関) スペクトルの測定を行った。

#### 5) GC-MS による分析

カラム：DB-5MS (30 m- $\phi$ 0.25 mm), カラム温度：150°C (1 min)  $\rightarrow$  250°C (5°C/min)  $\rightarrow$  250°C (4 min), 注入口温度：200°C, インターフェース温度：250°C, スプリット比：42, スキャン範囲：m/z 40  $\sim$  500

### 4. 抗菌試験<sup>1)</sup>

- 1) 供試菌株 *L. pneumophila* IID 5232 株

2) 試験方法 コーヒー濃縮液及び抗菌試験用試料液をメンブランフィルター (0.2  $\mu\text{m}$ ) でろ過滅菌し、滅菌した感受性試験用ペーパーディスク (直径 8 mm, 厚さ 1.5 mm) に少量ずつ乾燥させながら最終的には全量 100  $\mu\text{l}$  をしみ込ませ、抗菌試験用のディスクを調製した。供試菌は BCYE $\alpha$  寒天培地で塗沫培養後、菌体を集菌して滅菌蒸留水に浮遊させ、McFarland No. 1 (10<sup>8</sup> CFU/ml) 相当となるように調製した。

この菌液 0.2 ml を BSYE 寒天培地の全面に塗沫後、先に作製したディスクを培地表面に密着させ、37°C, 7 日間培養した。培養後、平板上の阻止円直径を測定し、抗菌性を判定した。なお、著者らは阻止円直径 (mm) による抗菌活性の強弱を薬剤感受性試験の判定法を準用して以下のように評価した。  
0 mm : 「活性なし (-)」, 1—9 mm : 「やや活性あり (+)」, 10—19 mm : 「明らかに活性あり (++)」, 20 mm 以上 : 「顕著な活性あり (+++)」と表した。

## 結果及び考察

1. コーヒーの各種溶媒抽出画分における抗菌活性の定性 活性成分の化学的な性状を知るために、以下のような各種溶媒 (ヘキサン, 酢酸エチル, クロロホルム, ブタノール, エタノール及び水又は熱水) を用いて得た抽出画分について、*L. pneumophila* に対する抗菌性を検討した結果、水抽出画分のみ平板上に阻止帯が認められたことから、本活性成分は水相に残存することがわかった。

2. HPLC における溶離液の検討 抗菌活性成分が水相に存在することから、主に水系溶離液を中心とした各種溶離液について、UV/フォトダイオードアレイ検出器による多波長分析を行った。その結果、波長 250 nm において最も多くのピークが検出されることがわかった。したがって、以後の分析では、検出感度が最も優れている 250 nm を測定波長とした。また、溶離液については水だけより少量のメタノールを含み、pH がより低くなるに従って分離能が高くなることがわかった。さらに、分画後の溶媒除去が容易であることなども考慮しながら、各種溶離液による分離能を検討した結果、メタノール/0.07 M 酢酸 (pH 3.0) = 10/90 を用いた場合に最も多くのシャープなピークが検出されたことから分離能が高く、最も適した溶離液であることがわかつ

た (Fig. 1)。したがって、以下の実験では、メタノール/0.07 M 酢酸 (pH 3.0) = 10/90 を溶離液として、また 250 nm を測定波長として固定して用いることにした。

3. HPLC 分画とそれら画分の抗菌活性 コーヒー濃縮液 10  $\mu\text{l}$  を用いて HPLC 分析を行った。ODS カラム 150- $\phi$ 4.6 mm を用いて分析した時のクロマトグラムは Fig. 2 に示すとおりであり、a~g の 7 つの主なピークが得られた。

各ピークについて、活性画分を特定するために前述の抗菌活性試験を行った。活性試験に先立ち、オートサンプラーを用いてコーヒー濃縮液を 20  $\mu\text{l}$  ずつ全量 0.5 ml を HPLC に注入し、フラクションコレクターにより各ピーク画分を得た。各ピーク画分の溶離液を完全に除去した後、0.5 ml の水又は DMSO に再溶解したものを試料液とし、その 100  $\mu\text{l}$  ずつを試験に供した。結果は Table 1 に示すとおり、ピーク c 画分及びピーク e 画分のいずれにも (++) の明らかな抗菌活性が認められた。しかしながら、他の画分においてはいずれも活性は (-) であった。

同試料について、より大きなカラムサイズ (250- $\phi$ 6.0 mm) に交換して再度分析を行った。コーヒー濃縮液 200  $\mu\text{l}$  ずつ全量 0.8 ml (乾燥重量 : 142.4 mg) を HPLC に注入し、フラクションコレクターにより各ピーク画分を得た。その結果、ピーク e は新たな 3 つのピークに分離されたことから、それぞれピーク 2, ピーク 3 及びピーク 4 と称した (Fig. 3)。また、ピーク e 以外はすべて前記ピークと同一であることが確認された。また、ピーク c に相当するものをピーク 1 と称した。溶離液を完全に除去した後のピーク 1~ピーク 4 は白色から灰白色の結晶粉末であった。また、乾燥重量はそれぞれ 1.3 mg, 1.9 mg, 1.1 mg 及び 2.8 mg であり、コーヒー濃縮液中ではいずれも微量な含有成分であることがわかった。試験に際して、それぞれのピーク画分の結晶粉末は 0.8 ml の水又は DMSO に再溶解して試料液とし、その 100  $\mu\text{l}$  ずつを試験に供した。

ピーク 1~ピーク 4 について抗菌試験を同様に行った結果、ピーク 1 にはピーク c と同様に (++) の明らかな活性が認められた。また、ピーク 2 及びピーク 3 においてもピーク e に認められたと同程度に (++) の明らかな活性が認められたが、ピーク 4

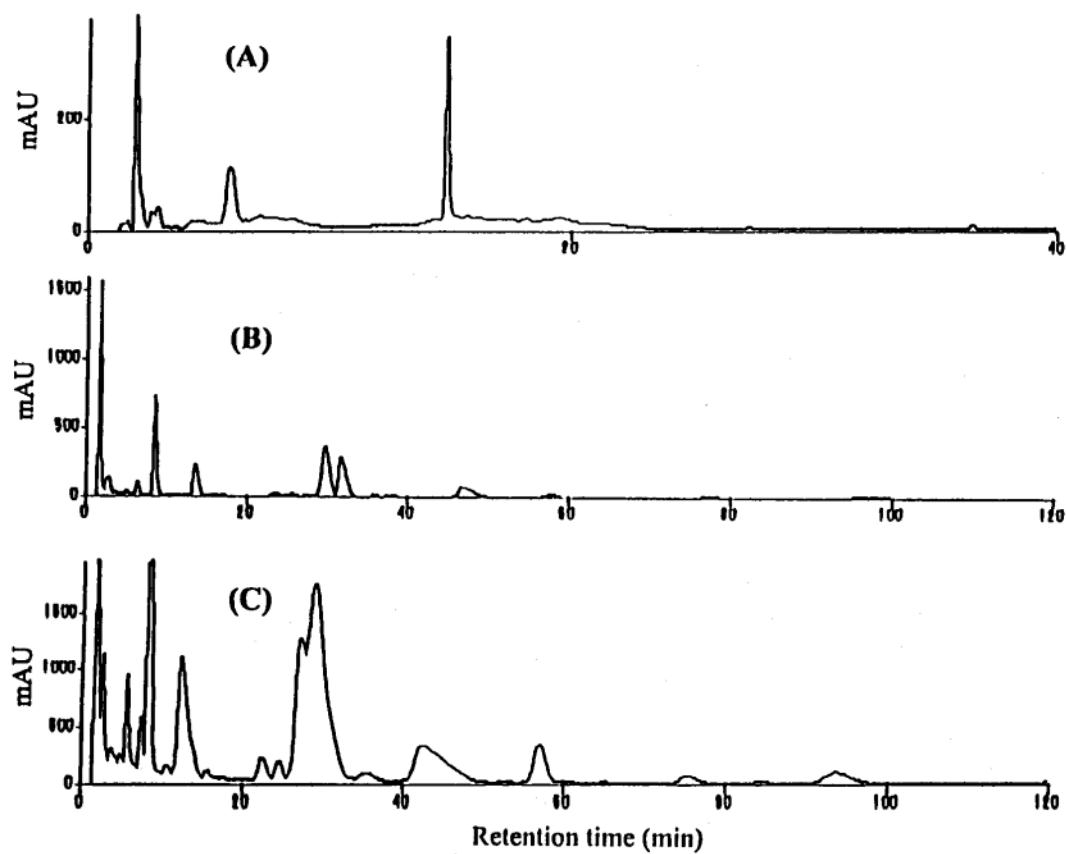


Fig. 1. Principal HPLC Chromatograms Obtained Using Several Eluents

Eluents: (A)  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=0/100$  (0 min)  $\rightarrow 10/90$  (10 min)  $\rightarrow 100/0$  (30 min), (B)  $\text{CH}_3\text{OH}/10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 4.8)  $=10/90$ , (C)  $\text{CH}_3\text{OH}/0.07 \text{ M CH}_3\text{COOH}$  (pH 3.0)  $=10/90$ .

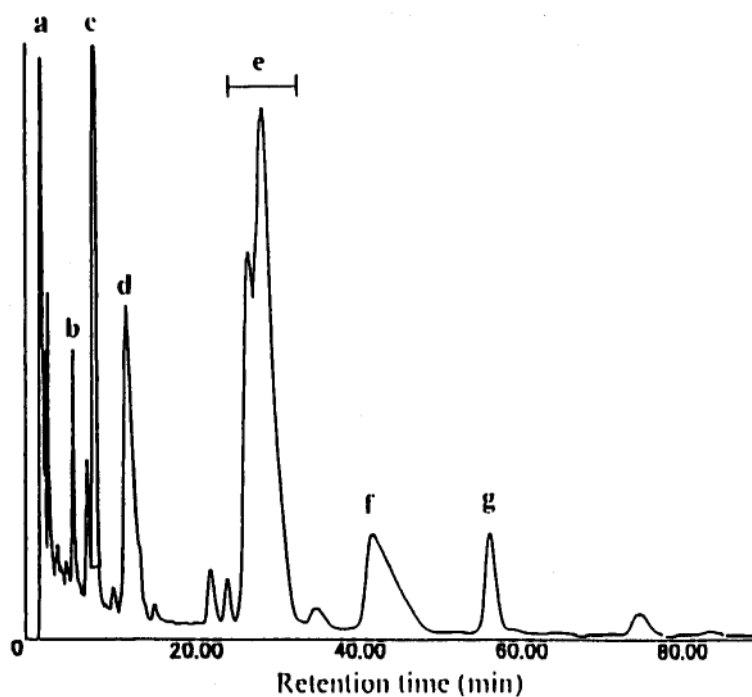


Fig. 2. HPLC Chromatogram of Coffee Extract with Boiling Water

HPLC conditions: Column: Mightysil RP-18 (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm), Mobile phase: methanol/0.07 M acetic acid (pH 3.0)  $=10/90$ , Flow rate: 1.0 ml/min, column temp.: 30°C, Detector: UV/photodiode array (at 250 nm), Injection volume: 10  $\mu\text{l}$ .

においては活性が (-) であった (Table 2).

4. 活性画分の構造解析 お茶などには、タンニンをはじめとしたフェノール化合物が多く含まれる。Chlorogenic acid もその1つとしてあげられ、その抗菌性はよく知られている。焙煎コーヒー抽出物の抗菌性に関して同成分の関与が十分考えられることから、chlorogenic acid とその加水分解や開裂によって生成する類縁化合物を中心に構造解析の検討を始めた。<sup>6,7)</sup>

これらのピーク画分について、UV/フォトダイオードアレイ検出器を用いて 200-400 nm における

UVの吸収パターンを測定した。一方、コーヒー中に一般的に含有される chlorogenic acid の標準品を用い、そのUV吸収パターンを対照として各ピークを比較した結果 (Fig. 4), ピーク2のパターンとほぼ一致することがわかった。また、ピーク2のLC-MSを測定し、マススペクトルを Fig. 5 に示した。マススペクトルから  $m/z$  353 に (M-1) 疑似分子イオン種が認められ、ピーク2のマススペクトルは分子量が354の chlorogenic acid のスペクトルとよく一致した。また、ピーク2の<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>C-NMRスペクトルデータをそれぞれ Table 3及び Table 4 に示した。これらは chlorogenic acid の

Table 1. Antibacterial Activities against *L. pneumophila* of 7 Fractions Separated from Coffee Beverage by HPLC

Fraction No.	Antibacterial activities	Range (mm)
peak a	-	0
peak b	-	0
peak c	+	18.0
peak d	-	0
peak e	+	19.0
peak f	-	0
peak g	-	0

Estimation of activities. 0 mm : (-), 1~9 mm : (+), 10~19 mm : (+#), 20 mm~ : (##).

Table 2. Antibacterial Activities against *L. pneumophila* of Fraction of Peak 1, and Peak 2~4 Separated from Fraction of Peak e

Fraction No.	Antibacterial activities	Range (mm)
peak c [=peak 1]	+	18.0
peak e	+	19.0
[peak 2]	+	16.0
[peak 3]	+	19.0
[peak 4]	-	0

Estimation of activities. 0 mm : (-), 1~9 mm : (+), 10~19 mm : (+#), 20 mm~ : (##).

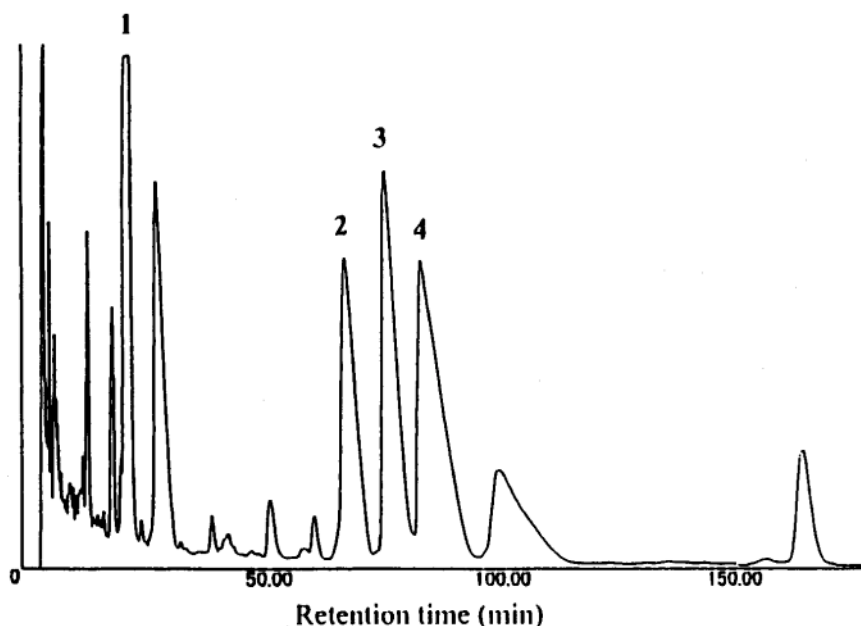


Fig. 3. HPLC Chromatogram of Coffee Extract with Boiling Water

HPLC conditions; Column: Mightysil RP-18 GP (6.0 mm i.d.×250 mm), Mobile phase: methanol/0.07 M acetic acid (pH 3.0)=10/90, Flow rate: 1.0 ml/min, column temp.: 30°C, Detector: UV/photodiode array (at 250 nm), Injection volume: 20 µl.

The fraction of peak 1 corresponded to the peak c in Fig. 2. The fractions of peak 2, 3 and 4 were separated from the peak e in Fig. 2.

スペクトルとよく一致し、さらに文献値<sup>8)</sup>との比較によりピーク 2 は既知物質の chlorogenic acid (MW=354.31) と同定された。ピーク 1 及びピーク 3, 4 の <sup>1</sup>H-NMR 及び <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータを同様に Table 3 及び Table 4 に示した。ピーク

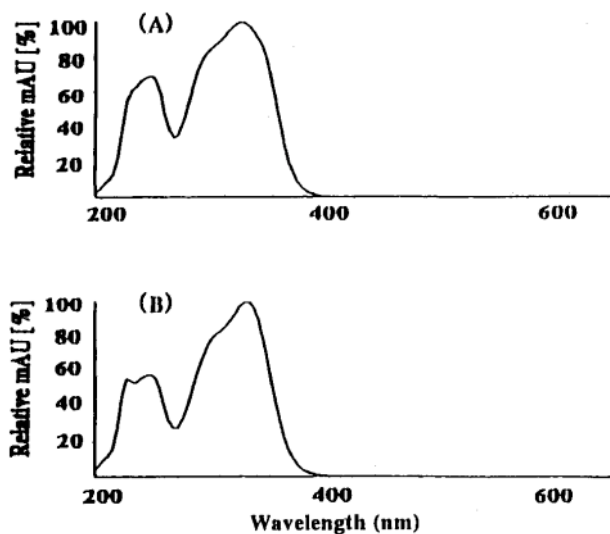


Fig. 4. UV Spectra of Peak 2 and Chlorogenic Acid  
(A): peak 2, (B): chlorogenic acid.

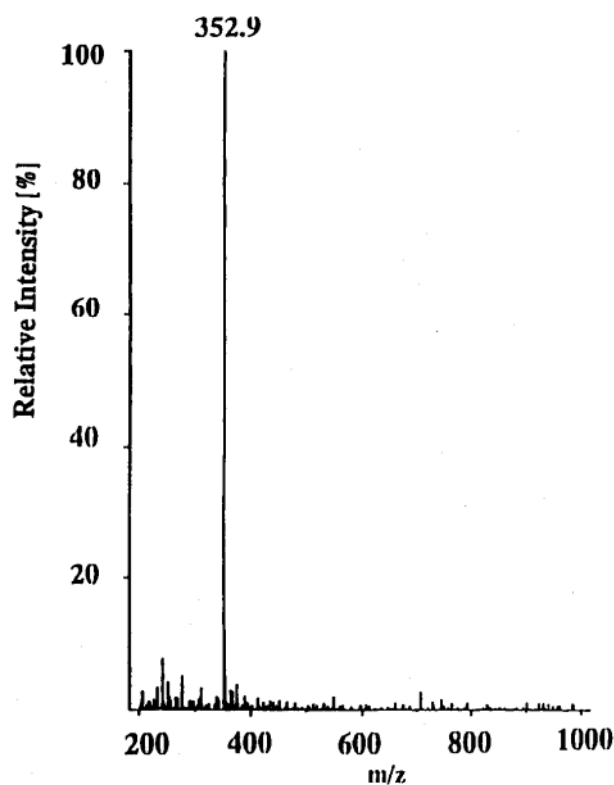


Fig. 5. LC-MS Spectrum of Peak 2

Table 3. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz) Spectral Data for Compounds in Coffee Extract

H. No.	Peak 1		Peak 2		Peak 3		Peak 4	
	$\delta$ ppm	$J$ in Hz	$\delta$ ppm	$J$ in Hz	$\delta$ ppm	$J$ in Hz	$\delta$ ppm	$J$ in Hz
2	7.42	d, 2.0			7.01	d, 2.0		
2a			2.13	dd, 7.6, 13.1				
2b			2.18	dd, 4.0, 13.1				
3			5.27	ddd, 7.6, 4.0, 7.6				
4			3.74	dd, 7.6, 3.3				
5	6.80	d, 8.3	4.14	ddd, 3.3, 7.0, 3.7	6.74	d, 8.3		
6	7.41	dd, 2.0, 8.3			6.95	dd, 2.0, 8.3		
6a			2.00	dd, 7.0, 13.8				
6b			2.20	dd, 3.7, 13.8				
7					7.40	d, 15.9		
8					6.15	d, 15.9	8.41	s
10							3.34	s
11							3.54	s
12							4.05	s
2'			7.05	d, 1.8				
5'			6.79	d, 8.6				
6'			6.94	dd, 1.8, 8.6				
7'			7.52	d, 15.9				
8'			6.22	d, 15.9				

<sup>1</sup>H-NMR Spectra were recorded in 0.2%DCI·CD<sub>3</sub>OD (1, 2 and 4), DMSO-d<sub>6</sub>(3), using the CD<sub>3</sub>OD or DMSO-d<sub>6</sub> signals as internal reference (3.30 ppm, 2.49 ppm).

Table 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) Spectral Data for Compounds in Coffee Extract and Observed HMBC Correlations

C. No.	Peak 1		Peak 2		Peak 3		Peak 4			
	$\delta$ ppm	$\delta$ ppm	HMBC (H to C)		$\delta$ ppm	HMBC (H to C)		$\delta$ ppm	HMBC (H to C)	
1	123.1	75.8	H-2, H-3, H-6		125.7	H-5, H-8				
2	117.7	37.8	H-6		114.7	H-6, H-7		152.6	H-10, H-11	
3	146.0	72.1	H-2, H-4		145.6	H-2, H-5				
4	151.5	72.5	H-3, H-6		148.2	H-2, H-5, H-6		146.4	H-8, H-11	
5	115.8	70.3	H-6		115.8			108.7	H-8, H-12	
6	123.9	38.0	H-2		121.2	H-2, H-7		156.1	H-10	
7	170.2	175.5	H-6		144.6	H-2, H-6				
8					115.1			141.6	H-12	
9					168.0	H-7, H-8				
10								28.5		
11								30.8		
12								35.0	H-8	
1'		127.6	H-5', H-8'							
2'		115.1	H-6', H-7'							
3'		146.8	H-2', H-5'							
4'		149.6	H-2', H-5', H-6'							
5'		116.6	H-6'							
6'		123.0	H-2', H-7'							
7'		147.2	H-6'							
8'		115.0								
9'		168.3	H-7', H-8'							

$^{13}\text{C}$ -NMR Spectra were recorded in 0.2%DCI·CD<sub>3</sub>OD (1, 2 and 4), DMSO-d<sub>6</sub>(3), using the CD<sub>3</sub>OD or DMSO-d<sub>6</sub> signals as internal reference (49.0 ppm, 39.5 ppm).

3 は chlorogenic acid のキニン酸部位，ピーク 1 ではキニン酸部位並びにプロペニル酸部位がそれぞれ脱落した構造を有する化合物であることが推定された。さらにピーク 3 において， $^{13}\text{C}$ -NMR からカルボニル炭素が確認され，caffeic acid である可能性が強く示唆された。次いで，ピーク 3 は caffeic acid の  $^1\text{H}$ -NMR 及び  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルの測定結果及び文献値<sup>9)</sup>ともよく一致したことから，caffeic acid (MW=180.16)と同定した。また，ピーク 1 は protocatechuic acid あるいは hydroxy hydroquinone などの化合物であることが推測された。ピーク 3 の場合と同様に， $^{13}\text{C}$ -NMR からカルボニル炭素のシグナルが確認されたことから，protocatechuic acid (MW=154.12) であると強く示唆された。次いで，protocatechuic acid の  $^1\text{H}$ -NMR 及び  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル測定結果並びに文献値<sup>10)</sup>を比較し，ピーク 1 によく一致したことから protocatechuic acid と同定した。また，protocatechuic acid には 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- 及び 3,5-dihydro-

xybenzoic acid のような異性体が存在するが，本抗菌成分は 3,4-dihydroxybenzoic acid のスペクトルデータと最も一致することがわかった。

しかしながら，*L. pneumophila* に対して抗菌活性が認められなかったピーク 4 は，各種の分光学的データや文献値<sup>11)</sup>から caffeine (MW=194.19) と同定された。

以上より，*L. pneumophila* に対して抗菌性を示した化合物はいずれも chlorogenic acid 及びコーヒー豆の焙煎時に生じると考えられる chlorogenic acid の分解物<sup>6)</sup>に由来する既知のフェノール化合物であった。今回検出された抗菌成分はいずれも焙煎コーヒー由来の天然物であり，元来は嗜好飲料として経口摂取されるものゆえに健康上の問題は一般的に考えにくい。近年，特に抵抗力が低下した老人を中心として循環式浴槽水などを原因とした *Legionella* 症の感染例なども報告されているが，肌や体調に影響の少ないことからこれら抗菌成分を用いた入浴剤などが一例となるように，これらの感染

症予防対策の1つに、浴槽水の殺菌清浄などの衛生用材として実用的な活用も十分期待できると考える。

### 要 約

コーヒー中の *L. pneumophila* に対する抗菌活性物質を HPLC で分画し、分画成分を LC-MS 分析並びに  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル測定によって構造解析を行った結果、抗菌活性物質は protocatechuic acid (ピーク 1), chlorogenic acid (ピーク 2) 及び caffeic acid (ピーク 3) であり、焙煎したコーヒー豆に多く含まれるフェノール化合物であることがわかった。抗菌活性の作用機序などについては未だ不明の部分はあるが、*L. pneumophila* 感染予防対策の1つに入浴剤や殺菌剤等として有効利用が期待できるものと考ええる。

### REFERENCES

- 1) Furuhashi K., Sugiyama J., Dogasaki C., Fukuyama M., *Bokin-Bobai*, **28**, 87-91 (2000).
- 2) Shimamura T., *Chiryō*, **79**, 120-121 (1997).
- 3) Horiuchi Y., Toda M., Okubo Y., Hara Y., Shimamura T., *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, **66**, 599-605 (1992).
- 4) Chosa H., Toda M., Okubo Y., Hara Y., Shimamura T., *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, **66**, 606-611 (1992).
- 5) Takahashi T., Taguchi Y., Yamaguchi H., Osaki K., Sato S., Kamei M., Hashizume S., Kamiya S., *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, **73**, 694-700 (1999).
- 6) Nakabayashi T., Osajima Y., Honma S., Nakabayashi Y., "Chemistry and Technology of Roasted Coffee Beans," Kogaku Publishing Company, Kanagawa, 1995, pp. 52-68.
- 7) Toda M., Okubo Y., Ikigai H., Shimamura T., *Nippon Saikingaku Zasshi*, **45**, 561-565, (1990).
- 8) Pauli G. F., Kuczkowiak U., Nahrstedt A., *Magn. Reson. Chem.*, **37**, 827-836 (1999).
- 9) Yinrong Lu, Yeap Foo L., *Food Chemistry*, **59**, 187-194 (1997).
- 10) Griffith W. P., Nogueira H. I. S., Parkin B. C., Sbeppard R. N., White A. J. P., Williams D. J., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1775-1781 (1995).
- 11) Sitkowski J., Stefaniak L., Nicol L., Martin M. L., Martin G. J., Webb G. A., *Spectrochimica Acta.*, **51A**, 839-841 (1995).