コーヒーの品質に関する化学的研究

(第2報) 焙煎コーヒー中のクロロゲン酸類の新定量法

中 林 敏 郎*・真 野 三 蔵*

Chemical Studies on the Quality of Coffee

Part II. New method for determination of chlorogenic acids in roast coffee

TOSHIO NAKABAYASHI* and Sanzo MANO*

A new method for determination of unchanged chlorogenic acids in roast coffee was established based on the specific green coloration of caffeic acid esters in ammonia alkalinity.

A. Two ml of 1M NH_4Cl - NH_4OH buffer solution (pH 9.1) was added to 10 ml of the extract. After shaking for 7 hours at 30°, the optical density at 620 nm was measured.

B. The optical density at 620 nm on the mixture of 2 ml of 0.5 M Na_2HPO_4 - Na_2CO_3 buffer solution (pH 9.1) and 10 ml of the extract was measured by the same procedure.

The difference of absorption between A and B was in linear with concentration of chlorogenic acid to 70 mg/100 ml. But the absorption with isochlorogenic acid was twice as much as chlorogenic acid, resulting that the content of chlorogenic acids in roast coffee was equal to 0.72 times the content calculated as chlorogenic acid.

Percentages of unchanged chlorogenic acids in the various roast coffee determined by this method were as follows; Medium roast, av. 3.66, French roast, 2.75, Italian roast, 0.16.

(Received June 16, 1975)

現在、クロロゲン酸の定量法としては Folin-Denis 法¹⁾、ジアゾ法²⁾、あるいは紫外外部吸収法³⁾などが採用されており、生コーヒー豆の場合はいずれの方法を用いても信頼できる値を得ることができる。

しかし焙煎コーヒーでは前報⁴⁾でも述べたように、褐色色素もまたこれらの定量法に反応するために、浸出液を直接測定した場合のクロロゲン酸含量は未変化の真の含量よりも過大となる。従って焙煎中のクロロゲン酸量の変化と褐色色素生成との関係を明らかにするためには、褐色色素の妨害を受けない定量法を採用しなければならない。

そのような定量法として MOORES ら⁵⁾はコーヒー浸出液からクロロゲン酸を酢酸鉛で沈澱除去した前後の 324 nm の吸光度の差を利用する方法を報告しており、また MABROUK ら⁶⁾もシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離定量法を発表している。しかし前者では褐色色素の一部も酢酸鉛で沈澱して誤差を生じ、後者は操作が容易でなく、多数の試料を速やかに測定するには適し

ない。

クロロゲン酸がアンモニアアルカリ性で緑色を呈する現象はよく知られており、この呈色反応は植物組織中のクロロゲン酸の検出に利用されている。瓜谷ら⁷⁾はその発色機構を検討して、これがクロロゲン酸のようなコーヒー酸エステルに特異的な反応であることを明らかにした。

従ってこの呈色反応を定量に利用できれば、褐色色素の影響を受けることなく焙煎コーヒー中の未変化のクロロゲン酸量を測定することが可能であろうと期待された。そこで定量化に必要な安定な発色と測定条件を検討した結果、アンモニア発色法と名づけた新しい定量法を確立することができたので報告する。

実験方法

1. 供試材料

コーヒーは市販の各種生豆と焙煎コーヒーを使用し、その粉碎物 1g を 60% メタノールで 3 回煮沸抽出、抽

* 静岡大学農学部 (静岡市大谷 836)

Faculty of Agriculture, Shizuoka University. Ohya, Shizuoka-shi.

出液を濾過、減圧濃縮して 200 ml の水溶液としたものを検液とした。標準のクロロゲン酸とイソクロロゲン酸は SONDHEIMER ら⁷⁾の報告に従ってコーヒー豆から単離したものを使用した。

2. 発色試薬

A液: 1M の $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液 (pH 9.1)

B液: 1/2M の $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液 (pH 9.1)

なお Folin-Denis 法は常法¹⁾によった。

3. 振とう

本呈色反応には充分な酸素の供給が必要なので、検液と発色試薬の混液を 1.8×18 cm の試験管に入れ、試験管振とう培養機 (振幅 2 cm, 毎分 220 往復, 試験管角度 10°, K Kいわしや製) を用いて振とうした。

実験結果

1. 測定波長

クロロゲン酸水溶液 (50 mg/100 ml) およびイソクロロゲン酸水溶液 (25 mg/100 ml), ならびに生豆, メディアムローストおよびイタリアンロースト豆の抽出検液のそれぞれ 10 ml に, 発色試薬 A 液または B 液を 2 ml ずつ加え (それぞれ A, B とする), 30° で 7 時間振とうすれば, A は緑〜緑褐色に, B は黄〜褐色になる。図 1, 2 に示したこれらの吸収スペクトルから, 620 nm における A, B 両吸光度の差を用いれば, 褐色色素の影響を避けてクロロゲン酸類に基く吸光度を測定できることがわかる。

2. 発色条件

温度の影響をみるために, クロロゲン酸水溶液 (50 mg

図 1. アンモニア発色法における吸収スペクトル

- A: クロロゲン酸+ $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液
- B: クロロゲン酸+ $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液
- C: イソクロロゲン酸+ $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液
- D: イソクロロゲン酸+ $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液

/100 ml) 10 ml に発色試薬 A 液 2 ml を加え, 各温度で振とうしながら 620 nm の吸光度の変化を測定した。図 3 の結果から 30° を採用することにした。

次に, 発色試薬を加えて 30° で振とうした時の, クロロゲン酸水溶液 A, B の 620 nm の吸光度および両者の差の経時変化は図 4 の通りで, 7 時間振とうすればよいことがわかる。

図 2. アンモニア発色法におけるコーヒー豆抽出液の吸収スペクトル

- A: コーヒー生豆抽出液+ $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液
- B: コーヒー生豆抽出液+ $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液
- C: メディアムロースト抽出液+ $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液
- D: メディアムロースト抽出液+ $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液
- E: イタリアンロースト抽出液+ $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液
- F: イタリアンロースト抽出液+ $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{Na}_2\text{CO}_3$ 緩衝液

図 3. アンモニア発色法に及ぼす温度の影響 (クロロゲン酸+ $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{NH}_4\text{OH}$ 緩衝液 620nm)

3. 検量線と補正係数

上述の条件で測定したクロロゲン酸の検量線は図5にみられるように 70 mg/100 ml までは直線となった。

この検量線を用いて、8種の生コーヒー豆のクロロゲン酸類の含量をクロロゲン酸として測定した結果を、Folin-Denis 法(検量線、図6)による測定結果と共に表1に示した。

この表から、アンモニア発色法による値は Folin-Denis 法による値に比べて約 1.4 倍高い。その原因として、コーヒー豆にはクロロゲン酸、ネオクロロゲン酸などのモノカフェイルキナ酸の他に、イソクロロゲン酸のようなジカフェイルキナ酸も含有されており、このようなジカフェイルキナ酸では発色の強さが異なるのではないかと考え、イソクロロゲン酸の検量線を作製した。

その結果、図5、6に示したように、クロロゲン酸と

イソクロロゲン酸の吸光度は Folin-Denis 法ではほぼ等しい。従って Folin-Denis 法による測定値はクロロゲン酸類の含量を正確に表わしていると考えられるのに対して、アンモニア発色法ではイソクロロゲン酸はクロロゲン酸の約2倍の吸光度となっており、これが表1で

図5. アンモニア発色法による検量線

図4. アンモニア発色法に及ぼす時間の影響
(30°, 620nm)

A: クロロゲン酸+ NH_4Cl - NH_4OH 緩衝液
B: クロロゲン酸+ Na_2HPO_4 - Na_2CO_3 緩衝液

図6. Folin-Denis 法による検量線

表1 コーヒー生豆のクロロゲン酸類含量 (%)

品 種	Folin-Denis 法 (A)	アンモニア発色法 (B)	A/B	アンモニア発色法の補正值 (B×0.72)
ジャワ	9.60	12.16	0.79	8.76
キリマンジャロ	7.20	10.03	0.71	7.22
ガテマラ	7.64	11.29	0.68	8.13
マンデリン	7.23	10.03	0.77	6.76
ブラジル	6.80	9.62	0.71	6.93
コロンビア	7.20	10.13	0.71	7.29
モカ	6.95	9.76	0.71	7.03
ブルーマウンテン	7.79	11.56	0.67	8.32
平 均			0.72	

の過大な値を与えた原因であることがわかる。

イソクロゲン酸以外の異性体の示す吸光度が不明なので、便宜上

(Folin-Denis 法による含量)/(アンモニア発色法による含量)

の平均値 0.72 を補正係数とし、これをアンモニア発色法でクロロゲン酸として測定した値に乗じて、表1の補正值を得た。

この補正値を Folin-Denis 法の値と比べると +6.8% から -8.0% までのバラツキがみられるが、その原因は SONDHEIMER⁸⁾ や BARNES ら⁹⁾ の報告にもみられるように、主にイソクロゲン酸などの異性体の含量がコーヒーの品種によって異なることに基づくと考えられる。

4. 実施法

以上の検討結果からアンモニア発色法の操作を次のように定めた。コーヒー豆粉砕物 1g を 60% メタノールで3回 (200, 120, 100 ml ずつ) 煮沸抽出、全抽出液を合して濾過、減圧濃縮してメタノールを溜去後濾過、濾液を 200 ml とし、その 400 nm の吸光度を測定してこれを褐色度とする。次に抽出液を 10 ml ずつ2個 (A, B) とり、A に発色試薬 A 液 2 ml を、B に発色試薬 B 液 2 ml を加えて、30° で7時間振とう後、両者の 620 nm の吸光度を測定両吸光度の差を求め、図5のク

ロゲン酸の検量線からクロロゲン酸として計算し、これに 0.72 を乗じてクロロゲン酸類含量を算出する。

5. 焙煎コーヒーのクロロゲン酸類含量

品種や焙煎度の異なる各種の市販コーヒーの褐色度と、アンモニア発色法で求めたクロロゲン酸類含量の測定結果を表2に示した。表1, 2 からメディアムロースト中の未変化のクロロゲン酸類の残存率は平均49%で、焙煎が強くなるにつれて急減し、イタリアンローストではほとんど消失していることがわかる。

要 約

焙煎コーヒーに残存する未変化のクロロゲン酸類の含量を褐色色素の妨害を受けることなく簡便に測定する方法として、クロロゲン酸類がアンモニアアルカリ性で特異的に緑色を呈する反応の定量化を検討した結果、新らしくアンモニア発色法を確立した。本法によりメディアムローストでは生豆の約半分のクロロゲン酸類が残存しているが、その量は焙煎が強くなるほど急減して、イタリアンローストではほとんど消失することを明らかにした。

本研究を行なうに当たり、御援助を頂いたソントン食品工業株式会社に感謝する。

文 献

- 1) 中林敏郎: 食品工誌, **15**, 73 (1968).
- 2) 中林敏郎・鶴飼暢雄: 食品工誌, **10**, 211 (1963).
- 3) MOORES, R. G., McDERMOTT, D. L. and WOOD, T. R.: *Anal. Chem.*, **20**, 620 (1948).
- 4) 中林敏郎: 食品工誌, **22**, 507 (1975).
- 5) MABROUK, A. F. and DEATHERAGE, F. E.: *Food Technol.*, **10**, 194 (1956).
- 6) 瓜谷郁三: 農化, **27**, 781 (1952); 瓜谷郁三・星谷磐夫・滝田智久: 農化, **27**, 785 (1952).
- 7) SONDHEIMER, E., SZYMANSKI, C. D. and CORSE, J. W.: *J. Agr. Food Chem.*, **9**, 146 (1961).
- 8) SONDHEIMER, E.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**, 131 (1958).
- 9) BARNES, H. M., FELDMAN, J. R. and WHITE, W. V.: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4178 (1951).

(昭和50年6月16日受理)

表2 市販焙煎コーヒーのクロロゲン酸類含量(%)

焙 煎 度	品 種	クロロゲン酸類含量	褐色度
メディアム ロースト	ジ ャ ワ	4.89	0.567
	キリマンジャロ	4.66	0.590
	ガ テ マ ラ	3.66	0.650
	ホンジュラス	3.46	0.692
	マンデリン	2.90	0.713
	ブラジル	2.48	0.722
	コロンビア	3.80	0.733
	モ カ	3.46	0.762
フレンチ ロースト		2.75	0.913
アイ ス		0.41	1.500
イタリアン ロースト		0.16	1.420