コーヒーに含まれるトリゴネリンと カフェインの簡易同時定量法

中 林 敏 郎*・政 野 光 秋*

Simple Method for the Simultaneous Determination of Trigonelline and Caffeine in Coffee

Toshio NAKABAYASHI* and Mitsuaki MASANO*

* Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka-shi 422

A simple method is reported for the simultaneous determination of trigonelline and caffeine in coffee. Trigonelline and caffeine are separated fully by Sephadex G 15 column (1.65×40 cm). Polyamide adsorbs the almost polyphenolics which influence the ultraviolet absorption spectrophotometry. Chromatography is carried out with distilled water on the single column packed with 3.2 g of polyamide placed on Sephadex G 15. The eluate is monitored at 270 and 300 nm. The quantification is achieved from the difference between the these absorbances of two peaks correspondent to trigonelline and caffeine on the elution chromatogram.

(Received Feb. 22, 1986)

コーヒー豆に含まれる塩基にはカフェインの他に、ニコチン酸の *N*-メチルペタインであるトリゴネリン ($C_7H_7NO_3$) が約 1% 含まれている。カフェインは熱に安定でコーヒー豆を焙煎してもその殆どが残留するのに対して、トリゴネリンは熱に不安定で焙煎の進行に伴って熱分解し、その一部はナイアシンに¹⁾、他の一部は焙煎コーヒーの焦臭を構成するピリジン系やピロール系などの揮発成分に変化することが知られている²⁾。従って焙煎コーヒーの品質、特にその焙煎の程度との関係を明らかにするためには、トリゴネリンとカフェインの両者を同時に測定できることが望ましい。この同時定量法としてはペーパークロマトグラフ法³⁾と HPLC 法⁴⁾⁵⁾が報告されているが、著者らは HPLC 用の特定装置を用いないですみ定量法を検討した結果、簡便な同時定量法を考案したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料

コーヒー豆は市販品を、トリゴネリン、カフェイン、テオフィリン、テオブロミンは試薬特級(東京化成工業)

を使用した。カラムクロマトグラフィーの充填剤のポリアミドはカラムクロマト用ポリアミド C 200 (和光純薬工業)を、セファデックス G はカラムクロマト用 (Pharmacia Fine Chemicals) を使用した。

2. カラムクロマトグラフィー

直径 1.65 cm、長さ 60 cm のガラスカラムに蒸留水を用いて充填剤を詰め、5 ml/10 分間の速度で蒸留水で展開溶出し、フラクションコレクターで 5 ml ずつ分画採取して紫外部の吸光度 (島津製作所 UV 200 S 使用) を測定した。

実験結果および考察

1. 検量線

検品のトリゴネリンとカフェインの吸収スペクトルの λ_{max} は、図 1 に示すようにそれぞれ 264.5 nm と 273 nm であるが、測定には両者共通の波長として 270 nm を使用することにした。また後述の理由から 270 nm と 300 nm の吸光度の差から作製した検量線は図 2 の通りで、吸光度 1 以下で直線を示した。

* 静岡大学農学部 (〒 422 静岡市大谷 836)

図1 トリゴネリン (T) とカフェイン (C) の紫外外部吸収スペクトル

図2 トリゴネリン (T) とカフェイン (C) の検量線

2 セファデックス G カラムクロマトグラフィー

AMORIM ら⁶⁾はコーヒー豆抽出液をセファデックス G 15 のカラムクロマトグラフィーにかけるとトリゴネリンとカフェインが分離溶出されることを報告しているので、これを両者の分離定量に応用することにした。

まず各種のセファデックス G の 20 cm カラムを用い、トリゴネリン 0.47 mg とカフェイン 0.71 mg を含む水溶液 1 ml を加えて展開溶出した。その結果、図 3 にみられるように分離は G 15 が最もよかった。次に両者のピーク間隔を広げるために、30 cm と 40 cm の G

図3 各種セファデックス G カラム (20 cm) によるトリゴネリン (T) とカフェイン (C) の分離

---- セファデックス G 10
 ———— “ G 15
 - - - - - “ G 25
 “ G 50

図4 セファデックス G 15 カラムの長さによるトリゴネリン (T) とカフェイン (C) の分離の相違

---- カラム長 20 cm ———— カラム長 40 cm
 - - - - - “ 30 cm

15 カラムで試験を行ない、図 4 の結果から 40 cm カラム (V_0 23.0 ml) を使用することにした。この条件でトリゴネリンとカフェインは完全に回収されることを確か

めた。なおテオブロミンとテオフィリンもカフェインと同じ位置に溶出される。

3. ポリアミド処理

コーヒーにはクロロゲン酸類や褐色色素など 270 nm に強い吸収を示すポリフェノール成分が多く含まれ、しかもこれらはセファデックス G 15 カラムクロマトグラフィーでトリゴネリンやカフェインに近接して溶出されるので、これらを除くためにポリアミド処理を行なうことにした。まずトリゴネリンとカフェインを単独または混合してポリアミドカラム (ポリアミド 12.8 g, 長さ 20 cm) にかかけ、水で溶出して両者とも完全に回収されることを確かめた。次に後述のコーヒー生豆および焙煎豆の抽出液をポリアミドカラムにかかけ、溶出液の吸収スペクトルを検討した結果、ポリフェノール成分の殆んどがカラムの上端約 1 cm のところに留まることから、ポリアミド量を 3.2 g (長さ 5 cm) に定めた。このポリアミドカラムはその都度 200 ml の蒸留水で洗浄すれば 3 回まで連続使用できる。

4. ポリアミド-セファデックス G 15 カラム

上述のようにコーヒー豆抽出液はセファデックス G 15 カラムにかける前にポリアミド処理が必要なので、操作を簡易化するために図 5 のようにセファデックス G 15 カラム (40 cm) の上にポリアミドカラム (5 cm) を重ねた 1 本のカラムを使用することにした。

コーヒー焙煎豆抽出液をこのカラムにかかけ、270 と 300 nm の吸光度を測定しながら蒸留水で展開溶出して図 6 の結果を得た。図 6 で 270 nm 吸光度にみられる 2 個の大きなピーク (T, C) は、その溶出位置と吸収スペクトルとがそれぞれトリゴネリンとカフェインとに一致した。しかし図 6 にはトリゴネリンやカフェイン (図 1)

には無い 300 nm での弱い吸収が全般に認められた。その原因を確かめるために図 6 の a, b, c の 3 個所の吸収スペクトルを測定したところ、図 7 に示したようにポリアミド処理で除去されない数種の黄色色素が少量ではあるが溶出していることが判った。しかし c を除けば a

図 6 焙煎コーヒー豆抽出液の溶出クロマトグラム

— E_{270nm} --- E_{300nm}
T: トリゴネリン C: カフェイン

図 5 ポリアミド-セファデックス G 15 カラム

図 7 黄色色素 (図 6, a, b, c) の吸収スペクトル

表1 添加したトリゴネリンとカフェインの回収率

試料	添加量 (mg/100 ml)		実測値 (mg/100 ml)		回収率 (%)	
	トリゴネリン	カフェイン	トリゴネリン	カフェイン	トリゴネリン	カフェイン
コーヒー抽出液	0	0	4.39	4.52		
同上にトリゴネリン とカフェイン添加	2.00	0	6.37	4.50	99	
	0	2.00	4.40	6.57		103
	4.00	4.00	8.48	8.45	102	98

表2 コーヒーのトリゴネリンとカフェイン含量の測定例

試料	トリゴネリン (%)		カフェイン (%)	
	本法	本法	公定法	
コーヒー生豆 (ブラジル)	1.09	0.90	0.88	
メディアムロースト (ブラジル)	0.88	1.24	1.31	
インスタントコーヒー	0.39	3.11	3.23	
コーヒー若芽 (風乾物)	1.73	1.85	1.79	
コーヒー成葉 (風乾物)	0.86	0.89	0.88	

と b では 270 と 300 nm の吸光度が近似しておりその値も小さいことから、便宜上黄色色素による 270 nm の吸光度を 300 nm のそれで代用することにした。そこでトリゴネリンとカフェインのピークに混在している黄色色素の影響を差し引くために、270 と 300 nm の吸光度の差から図 2 を用いてトリゴネリンとカフェイン量とを求めることにした。

またこのカラムについて同一検液を用いて繰返し測定を行なった結果、3 回毎にポリアミドを更新すると共に、毎回 500 ml の蒸留水でカラムを洗浄すれば 10 回は連続使用できることを確かめた。

5. 定量法

コーヒー豆をステンレス製乳鉢で粉碎、得られた微粉末 1 g を蒸留水で 3 回 (20, 10, 10 ml) 煮沸抽出、布でろ過、冷後ろ液を 50 ml とした後、ろ紙でろ過して検液とする。検液 1 ml をポリアミド-セファデックス G15 カラムにかけて蒸留水で展開、溶出画分の 270 と 300 nm の吸光度の差からトリゴネリンとカフェイン量を算出する。

本法による回収率を確かめるために、焙煎コーヒー豆抽出液の 1/2 希釈液に各種濃度のトリゴネリンとカフェインを加えて測定した結果、表 1 に示したように添加されたトリゴネリンとカフェインはほぼ完全に回収された。

また数種のコーヒー試料について本法を用いて測定した結果を表 2 に示した。なお比較のためにカフェインについては別に公定法⁷⁾による測定も行なった。その結果、本法によるカフェインの測定値は公定法による値とよく一致しており、またトリゴネリン含量も既報⁸⁾の値の範囲内にあった。従って本法はコーヒーのトリゴネリンとカフェインの簡易同時定量法として適切と考えられ、現在、本法を用いてコーヒー豆焙煎中のトリゴネリンとカフェイン含量の変化、および両者の比と焙煎の程度との関係を検討中である。

要 約

コーヒーに含まれるトリゴネリンとカフェインの簡便な同時定量法を検討し次のような結果が得られた。

(1) トリゴネリンとカフェインはセファデックス G15 カラムクロマトグラフィー (1.65×40 cm) でよく分離された。

(2) 測定を阻害するポリフェノール成分の殆んどはポリアミド処理で除去された。

(3) 少量溶出する黄色色素の影響を除くために、溶出液の 270 と 300 nm の吸光度の差を測定し、同様に作製した検量線から含量を算出することにした。

(4) 上記の結果に基づいて、セファデックス G15 の上にポリアミド (3.2 g) を重ねた 1 本のカラムに、コ

ーヒー豆抽出液 1 ml をかけ、蒸留水で展開溶出し、溶出画分の 270 と 300 nm の吸光度の差からトリゴネリンとカフェイン量を測定する簡易同時定量法を確立した。

文 献

- 1) TEPLY, L. J. and PRIER, R. F.: *Agric. Food Chem.*, **5**, 375 (1957).
- 2) VIANI, R. and HORMAN, I.: *J. Food Sci.*, **39**, 1216 (1974).
- 3) KOGAN, L., DICARLO, F. J. and MAYNARD, W. E.: *Anal. Chem.*, **25**, 1118 (1953).
- 4) VAN DUIJN, J. and VAN DER STEGEN, G. H. D.: *J. Chromatogr.*, **179**, 199 (1979).
- 5) TRUGO, L. C., MACRAE, R. and DICK, J.: *J. Sci. Food Agric.*, **34**, 300 (1983).
- 6) AMORIM, H. V. and JOSEPHSON, R. V.: *J. Food Sci.*, **40**, 1179 (1975).
- 7) *Methods of Analysis—A. O. A. C.—(Twelfth Edition)*: p. 249, **15,048** (1975).

(昭和 61 年 2 月 22 日受理)

新 刊 紹 介

Modern Dairy Technology Volume 1 Advances in Milk Processing

ROBINSON, R. K. 編

乳製品製造工場の多くは近代的大規模自動化工場であり、製品の高品質を維持するため厳格な品質管理を行っている。本書は最新の製造技術を紹介するもので、全 2 巻のうちの第 1 巻である。

本書の内容は以下に示す通りである。

1. Advances in the Heat Treatment of Milk
2. Developments in Cream Separation and Processing
3. Production of Butter and Dairy-based Spreads
4. Drying of Milk and Milk Products
5. Modifications to the Composition of Milk
6. Utilisation of Milk Components: Whey
7. Utilisation of Milk Components: Casein
8. Automation in the Factory

本書は乳製品製造の最新装置、操作、新しい製品について、豊富な図や写真を用いて解説している。乳業にたずさわる研究者、技術者、最新の乳業に関心のある人々にとって好著である。

22×14.4 cm, 438 頁, 44 ポンド

Elsevir Applied Science Publisheres Ltd.
Crown House, Linton Road, Barking, Essex
1 G 11 8 JU, England

Modern Dairy Technology Volume 2 Advances in Milk Products

ROBINSON, R. K. 編

本書は最新乳製品製造技術の第 2 巻である。内容は以下に示す通りである。

1. Recent Developments in Yoghurt Manufacture
2. Modern Cheesemaking: Hard Cheeses
3. Modern Cheesemaking: Soft Cheeses
4. Developments in Frozen-products Manufacture
5. Physical Properties of Dairy Products
6. Modern Laboratory Practice-1: Chemical Analyses
7. Modern Laboratory Practice-2: Microbiological Analyses
8. Technology for the Developing Countries

第 1 巻と同様、豊富な図や写真を用いて、最新の乳加工技術と製品を紹介している。乳製品の品質管理に重要な化学的分析法、微生物検査法についても最新の自動測定法を含めて記述してある。最新とは言えないが、開発途上国の乳加工技術が紹介されており、興味深い。乳業にたずさわる人々にとって好著である。

22×14.4 cm, 440 頁, 44 ポンド

Elsevir Applied Science Publisheres Ltd.
Crown House, Linton Road, Barking, Essex
1 G 11 8 JU, England