

ノート

高分解能NMRによる粗カフェイン中の カフェインの定量

前田 宏 , 入江隆夫 , 早野弘道

1. 緒 言

精製カフェインの製造原料として粗カフェインが米国, 西ドイツ, フランス等よりわが国に輸入されているが, 関税定率法の規定により, カフェイン無水物の含有量が乾燥状態における無水物として計算した全重量の 94% 以下のものと, 94% をこえるものでは税率等輸入上の取扱いを異にする。

カフェインはコーヒー豆, 茶, コーラの実から抽出するか, または合成によって得られるが, わが国に輸入される粗カフェインは, 淡カッ色, カッ色, または黒カッ色の粗粉末, 小塊, あるいは小塊を混じた粗粉末であり, 製造方法については明らかでない。

カフェインの定量方法は多数報告されており, これらのうちの多くは医薬として用いるアスピリン, フェナセチン及びカフェイン混合物¹⁾⁻³⁾を対象としたものである。そのほか, 精製カフェイン⁴⁾, 粗カフェイン⁵⁾, コーヒー,⁵⁾⁶⁾ 茶⁶⁾, 非アルコール性飲料等⁷⁾を対象としたものもある。定量手段としては, 沈殿剤⁵⁾あるいはカラムクロマトグラフィー¹⁾によりカフェインと他成分を分離したのち, 紫外部吸光光度法によるもの, カフェインとリンモリブデン酸により生ずる沈殿をアセトンに溶解したのち, 可視部吸光光度法²⁾⁷⁾によるもの, クロロホルム抽出物の窒素を定量⁶⁾するもの, NMR 測定³⁾によるもの, 非水溶媒中で過塩素酸滴定⁴⁾するもの等多種にわたっている。

粗カフェイン中のカフェインの迅速定量の必要性を考慮し, これら多数の方法のうちから NMR による定量を検討した。粗カフェインを乾燥したのち, クロロホルムに溶解し, 定量用内部標準物質物として一定量の p - ニトロトルエンを添加する。この混合溶液をろ過したのち, NMR スペクトルを測定し, 2.45ppm の p - ニトロトルエンのメチル基のシグナルと 4.0ppm のカフェインの 7 位の窒素に結合したメチル基のシグナルの相対強度から, 検量線を描く必要もなく,

迅速に粗カフェイン中のカフェインの定量を行なうことができた。この方法による実際の測定の際の標準偏差は 1% 程度であった。

2. 実 験

2・1 装 置

高分解能核磁気共鳴装置は(株)日立製作所製 R - 20 形を使用した。測定は 34 で行ない, スペクトルは掃引速度 2.4Hz/sec で記録した。

2・2 試薬及び試料

標準カフェイン: 局方カフェインを昇華したのち, 70 ° ± 5 で 9 時間真空乾燥した。

p - ニトロトルエン: 試薬特級。

クロロホルム: 試薬特級品を 1/2 容の水で 6 回抽出したのち, 濃硫酸及び五酸化リンで順次脱水し, さらに蒸留して安定剤として添加してあるエタノールを除去した。

分析試料として米国より輸入された粗カフェイン 3 点, 西ドイツより輸入された粗カフェイン 1 点を使用した。

2・3 カフェインの分析

2・3・1 NMR スペクトル

標準カフェインの重クロロホルム溶液(100mg/ml), p - ニトロトルエンのクロロホルム溶液(1 g/ml)及び標準カフェインと p - ニトロトルエン混合溶液(250mg + 250mg/3ml) の NMR スペクトルを Fig.1 に示す。

Donald P.Hollis³⁾の検討した NMR によるアスピリン, フェナセチン及びカフェイン混合物中のカフェインの定量的場合と異なり, 粗カフェイン中にはクロロホルムに不溶で, しかもクロロホルム中に浮遊する不純物が存在し, そのため試料をクロロホルムに溶解し直ちに NMR スペクトルを測定することはできない。したがって, NMR スペクトル測定に先立って不純物

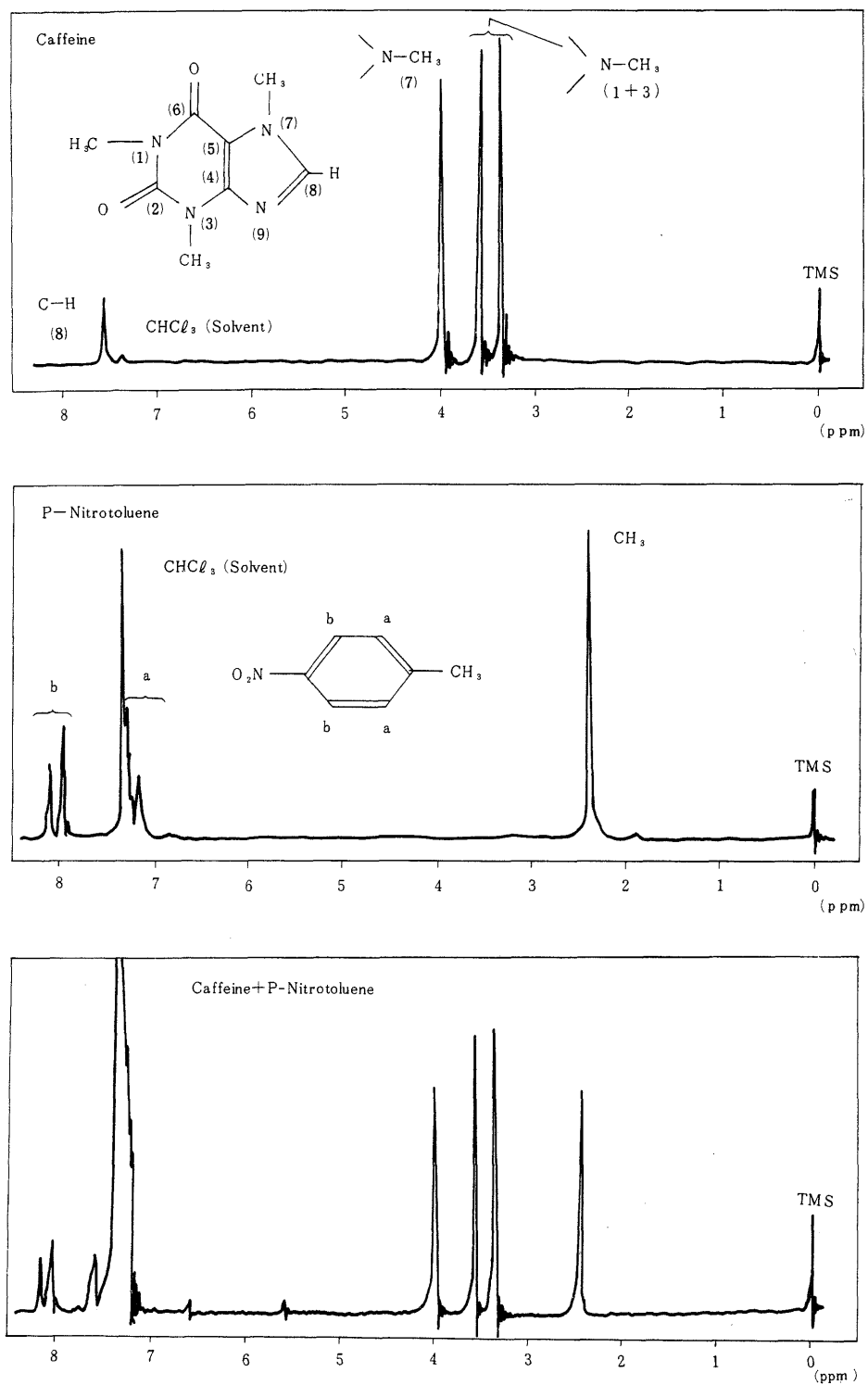


Fig.1 NMR Spectra of Caffeine, p-nitrotoluene , and mixture

をろ過する必要があるが、クロロホルムが揮発し易いため試料液が濃縮される傾向がみられ、Donald P. Hollis の方法のように濃度既知のカフェイン標準溶液と試料溶液の NMR スペクトルを同条件で測定し、カフェイン標準溶液中のカフェイン量と標準溶液及び試料溶液のプロトンシグナル強度比から試料中のカフェイン量を求めることはできない。

そこで、試料のクロロホルム溶液に一定量の内部標準物質を添加したのちろ過し、ろ液の NMR スペクトルを測定して内部標準物質とカフェインのプロトンシグナル強度比からカフェイン量を求めることにより、クロロホルムの揮発による濃縮に起因する誤差を除くこととした。

内部標準物質としては、精製が容易であり、クロロホルムに対する溶解性が大きく、揮発性が無いもので、さらにカフェイン及びクロロホルムのプロトンシグナルと重ならないプロトンシグナルを持ち、カフェインとの間に相互作用が無いものが望ましい。このような観点に立って検討した数種の化合物中で p - ニトロトルエンが上記のいずれの条件も満足した。

カフェインの 3 本のメチルプロトンシグナルのうちから 4.0ppm の 7 位の窒素に結合したメチルプロトンシグナルを選んだ理由は、他のメチルプロトンシグナルに比べて Wiggle が弱く p - ニトロトルエンのメチルプロトンシグナルに近い形をしており、他のメチルプロトンシグナルと十分に分離独立しており、またテオフィリン(後述)のプロトンシグナルと重ならないことによるものである。

2・3・2 分析方法

試料約 1g を約 80℃ で 2 時間真空乾燥したのち、乾燥試料の重量を記録する。乾燥試料に 1.000g の p - ニトロトルエン及びクロロホルム 8 ml を加え溶解する。クロロホルム 8 ml は試料が 100% の無水カフェインである場合にもカフェイン及び p - ニトロトルエンを完全に溶解するに足る量である。試料及び p - ニトロトルエンの溶解は、クロロホルムを約 40℃ に加温することにより早められるが、28kc あるいは 400kc の超音波をあてることにより、非常にすみやかに、かつ完全に行なわれる。次にこの溶液をろ紙(東洋ろし No.7 を使用した)でろ過し NMR 測定に供する。

NMR スペクトルから粗カフェイン中に含まれる無水カフェイン量を求めるには、p - ニトロトルエン添加量にカフェインの 4.0ppm のメチルプロトンシグナルの積分強度を p - ニトロトルエンの 2.45ppm のメチルプロトンシグナルの積分強度で除した数、及び無水カフェインの分子量を P - ニトロトルエンの分子

量で除した数を乗ずればよい。乾燥試料中の無水カフェイン含有率(%)は次式によって求められる。

$$x = p \times \frac{S_c}{S_p} \times \frac{M_c}{M_p} \times \frac{1}{W} \times 100$$

ただし、 x 乾燥試料中の無水カフェイン含有率(%)

P : p - ニトロトルエン添加量(g)(一定)

S_c : カフェインの 4.0ppm のメチル
プロトンシグナルの積分強度

S_p : p - ニトロトルエンのメチルプロトン
シグナルの積分強度

M_c : 無水カフェインの分子量

M_p : p - ニトロトルエンの分子量

w : 乾燥粗カフェイン試料重量(g)

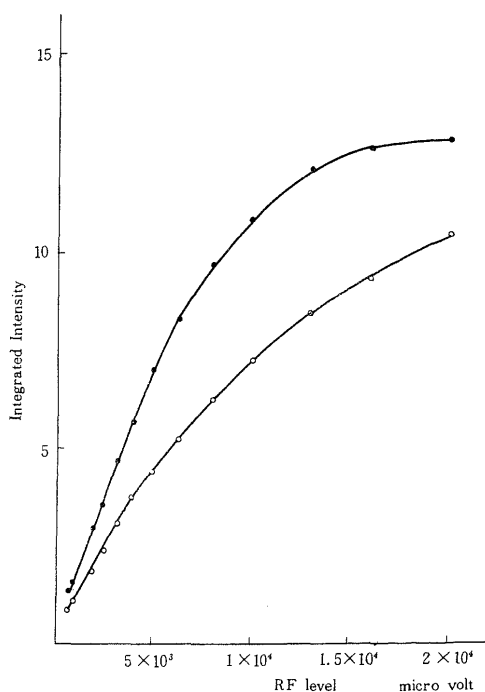


Fig.2 Relationship between RF Level and integrated intensity of methyl proton of p-nitrotoluene and caffeine
— ○ — caffeine
— ● — p-nitrotoluene

2・3・3 RF レベルの選定

NMR による定量分析でピーク面積の積分強度を比較する場合には、ピーク面積の積分強度がプロトン数に比例することが必要で、飽和の起こらない測定条件を選定しなければならない。そこでカフェイン及び - p ニトロトルエンについて NMR スペクトル測定条件のうち RF レベルのみを変化させて測定し、飽和の影響を調べた。その結果を Fig.2 に示す。この結果から測定条件として、RF レベル 4×10^3 micro volt を選定した。

3. 実験結果及び考察

3・1 不純物の影響

カフェインは合成によらない場合は、コーヒー豆、茶、あるいはコーラの実から抽出されるといわれ、抽出方法のいかんによっては上記原料中に含まれるカフェイン以外の成分が混入してくることが考えられる。カフェインのほかに、コーヒー豆中にはクロロゲン酸、キナ酸及びコーヒータンニン酸が含まれ、茶中にはテオブロミン、テオフィリン及びキサンチンが含まれ、コーラの実にはコラチン及びコラチンが含まれているといわれる。

これらの成分のうち、入手可能であったキナ酸、クロロゲン酸、テオブロミン、テオフィリン及びキサンチンについて、クロロホルム飽和溶液を作り NMR スペクトルを測定した。多くのものはクロロホルムに対する溶解度が低く、プロトンシグナルを示したのはキサンチンとテオブロミンのみであった。テオフィリンは 3.5ppm 及び 3.66ppm にプロトンシグナルを示し、カフェインの 1 位と 3 位の窒素に結合したメチルプロトンシグナルと非常に接近しているが、4.0ppm のカフェインのメチルプロトンシグナル及び 2.45ppm の p - ニトロトルエンのメチルプロトンシグナルと重なるシグナルは認められなかった。

粗カフェインのうちで、フランス産のある種のものは水に不溶でクロロホルムに可溶のカッ色ろう状物質を多量に含み、本法を実施したところクロロホルム溶液の粘度が著しく高くなり、ろ過及び NMR 測定ができなかった。

3・2 分析結果及び考察

米国産粗カフェイン 3 種及び西ドイツ産粗カフェイン 1 種より 4 点ずつ試料をはかりとり、本法によって分析した。

本法によって得た NMR 測定用試料液は、淡カッ色あるいはカッ色に着色していたが、カフェイン、p -

ニトロトルエン及びクロロホルム以外のプロトンシグナルは認められなかった。定量値は同一試料を 5 回繰り返して積分し、得られた積分強度の平均値を用いて算出した。定量の結果を Table に示す。

Table Analytical results of crude caffeine

Sample	Origin	caffeine (%)	average (%)	range (R) (%)	standard deviation (S) (%)
1	U. S. A.	96.61	96.32	1.34	0.51
		96.37			
		96.82			
		95.48			
2	West Germany	98.80	90.18	3.58	1.33
		90.88			
		91.81			
		88.23			
		94.17			
3	U. S. A.	93.84	93.49	3.54	1.36
		94.75			
		91.21			
		93.91			
4	U. S. A.	94.25	94.21	1.52	0.57
		95.09			
		93.57			
		93.57			

本法の精度は Donald P.Hollis¹⁾ の NMR によるアスピリン、フェナセチン及びカフェイン混合物中のカフェインの定量法と同程度で、N.H.Ishler⁵⁾ らの紫外外部吸光度法よりは若干劣るものと考えられる。しかしながら、紫外外部吸光度法が測定にいたるまでの試料の前処理にめんどろな操作と長時間を要するのに反して、本法は試料の乾燥時間も含めて 3 時間程度の比較的短時間内に分析を終えることができるので実用性に富むものと考えられる。

文 献

- 1) T. Higuchi and K. P. Patel, J. Am. Pharm. Assoc., 41, 171 (1952) .
- 2) A. Robert Daoust, J. Am. Pharm. Assoc., 44, 742 (1953) .
- 3) Donald P. Hollis, Anal. Chem., 35, 1682 (1963) .
- 4) U. S. P. (17th ed.).
- 5) N. H. Ishler, T. P. Finucane, and Emanuel Borker, Anal. Chem., 20, 1162 (1948) .
- 6) A. O. A. C., Methods of Analysis-A.O. A.C., p.182, 9th ed. (1960) .
- 7) A. O. A. C., ibid., p.102, 9th ed (1960)

NMR analysis of crude caffeine

Hiroshi MAEDA

Takao IRIE

Hiromichi HAYANO

Central Customs Laboratory

531 Iwase, Matsudo City

— Received Sep.30, 1969 —