

嘉南藥理大學 110 年度 研究計畫成果報告

計畫名稱：特色農產品之保健功效暨產品開發，子計畫 1-咖啡豆葫蘆巴鹼成分及安定性分析

重點(整合型)研究計畫

與業界廠商合作之研究計畫

執行期間：110年01月01日至12月31日

總計畫主持人:吳明娟

本(子)計畫主持人:林翠品

中華民國 111 年 02 月 08 日



(一)摘要

葫蘆巴鹼(Trigonelline)是一種生物鹼，是一種能對神經系統引起作用的成分，特別具有提高腦神經活性的效果，能活化統御長期記憶區的大腦部位海馬迴，替隨著年齡增長死去的腦細胞建立起新的網絡，可改善健忘、預防癡呆以及阿茲海默症。咖啡中富含葫蘆巴鹼，因此，推測咖啡中葫蘆巴鹼可能具有預防或治療熱中暑的損傷反應以及延緩失智之功效。為了探討咖啡中葫蘆巴鹼是否能保護熱中暑導致的細胞傷害，進而開發消暑飲品，需更了解何種品種咖啡豆含有高濃度葫蘆巴鹼及放置時間對葫蘆巴鹼穩定度的影響，因此本計畫建立萃取咖啡中葫蘆巴鹼最適模式，以高效能液相分析儀分析不同品種咖啡豆及不同時間放置的葫蘆巴鹼含量；以獲得從咖啡獲取高濃度高葫蘆巴鹼的萃取條件，得到含葫蘆巴鹼高濃度的咖啡品種及了解高濃度高葫蘆巴鹼咖啡的穩定度。結果顯示 X 廠牌編號 3 及 4，葫蘆巴鹼含量高於星巴克咖啡豆；X 廠牌編號 3 耳掛式濾泡咖啡放置不同時間對葫蘆巴鹼含量，結果顯示放置於室溫第 12 個月葫蘆巴鹼含量顯著下降。

(二)研究動機與研究問題

咖啡是全球最受歡迎的飲料之一。咖啡除富含葫蘆巴鹼，也還含有咖啡因，咖啡酸，綠原酸，二萜和蛋白黑素。葫蘆巴鹼是一種生物鹼，具抗發炎作用能保護神經系統，能活化統御長期記憶區的大腦部位海馬迴，替隨著年齡增長死去的腦細胞建立起新的網絡，可改善健忘、預防癡呆以及阿茲海默症。因此，推測咖啡中葫蘆巴鹼可能具有預防或治療熱中暑的損傷反應以及延緩失智之功效。為了探討葫蘆巴鹼是否能保護熱中暑導致的細胞傷害及消暑飲品開發，需更了解那一品種咖啡，及其不同溫度，溶劑及時間萃取條件，不同放置時間處理對葫蘆巴鹼穩定度的影響，因此本計畫將進行葫蘆巴鹼穩定度分析。

(三)文獻回顧與探討

植物中發現的生物鹼，例如葫蘆巴種子和具有神經保護潛力的咖啡豆都存有葫蘆巴鹼，它是治療神經退行性疾病的有利藥劑。也具有抗糖尿病，抗氧化和抗炎作用。在 Fahanik-Babaei 等人研究葫蘆巴鹼對阿茲海默症大鼠的影響。發現口服給予葫蘆巴鹼劑量為 100 mg/kg 明顯改善 Y 迷宮的空間識別記憶和新物體識別任務的表現，減輕海馬區丙二醛 (MDA)，蛋白質羰基，乳酸脫氫酶 (LDH)，改善粒線體膜及認知，並且能夠通過抑制氧化壓力，星形膠質細胞活性和發炎反應，並透過保持粒線體膜完整性來減輕神經元損失⁽¹⁾。

腦炎症與認知功能障礙有關，尤其是老年人。在 Khalili 等人研究發現葫蘆巴鹼改善脂多醣 (LPS) 誘導認知下降。口服給予葫蘆巴鹼持續一周(劑量為 20,40 或 80mg / kg / 天)，腹膜內注射 500µg / kg 的脂多醣劑量誘導神經炎症後 1 小時分析在 Y 迷宮認知能

力，發現葫蘆巴鹼處理改善空間識別記憶，在新物體辨別測試中的辨別率，以及在被動迴避範例中的保留和回憶。此外，葫蘆巴鹼降低海馬丙二醛（MDA）和乙醯膽鹼酯酶（AChE）活性，並改善超氧化物歧化酶（SOD），過氧化氫酶和穀胱甘肽（GSH）。抑制發炎因子 NF- κ B，TLR4 和 TNF α 。其作用優於常規使用的抗炎藥地塞米松⁽²⁾。在 Pravalika 等人發現 100 mg/kg 劑量的葫蘆巴鹼，以腹膜內注射方式提供給缺血性腦中風的大鼠，發現能提供神經保護，同時改善運動和神經缺陷。此外，還發現葫蘆巴鹼增強了內在的抗氧化狀態，並顯著抑制了皮質腦區域中還原型穀胱甘肽介導的髓過氧化物酶表現⁽³⁾。葫蘆巴鹼也是一種具有潛在抗糖尿病活性的生物鹼。Folwarczna 等人研究葫蘆巴鹼對實驗性糖尿病引起的大鼠骨骼系統疾病的影響。在 3 個月大的雌性 Wistar 大鼠中研究了給予葫蘆巴鹼（50mg / kg 每日口服 4 週）的作用，在施用葫蘆巴鹼開始前兩週，以 streptozotocin (60 mg/kg i.p.) 誘發糖尿病。研究進而分析血清骨轉換標誌物，骨礦化和機械性質。研究發現葫蘆巴鹼顯著增加 BMD 並且傾向於改善鬆質骨強度⁽⁴⁾。

咖啡是全球最受歡迎的飲料之一。咖啡除富含葫蘆巴鹼，還含有咖啡因，咖啡酸，綠原酸，二萜和蛋白黑素。在動物模型和人類細胞培養物中顯示出潛在的抗癌作用，並且可能對結腸直腸癌起到保護作用⁽⁵⁾。在 2019 年 Ciaramelli 等人研究發現生物活性化合物的含量和咖啡樣品的抗氧化活性，這取決於它們的種類，如阿拉比卡和羅布斯塔，地理來源和提取程序（水醇，濃咖啡和摩卡）。就低分子量化合物，如綠原酸的產率而言，以水醇提取是最有效的方法，而摩卡提取提供最高量的蛋白黑素(melanoidins)。此外，阿拉比卡咖啡中健康給予化合物（綠原酸，葫蘆巴鹼和膽鹼）與咖啡因之間的比例更高⁽⁶⁾。

Febvay 等人也發現咖啡焙燒最終溫度（ $\sim 1^{\circ}\text{C}$ ）或總焙燒時間（ $\sim 25\text{s}$ ）的微小變化也會檢測到咖啡因，咖啡酸，綠原酸，葫蘆巴鹼，二萜和蛋白黑素等化學組成的變化⁽⁷⁾。Hirioshi 等人研究也發現葫蘆巴鹼加熱至 180°C 以上時，甲基會脫離，將其轉化為菸鹼酸。儘管轉化率低，但由於咖啡豆中高含量的葫蘆巴鹼，在烘焙咖啡豆期間形成了營養上顯著量的菸鹼酸。若在 220°C 加熱 20 分鐘就可以發現菸鹼酸形成⁽⁸⁾。

(四)研究方法與步驟

1. 材料

(1) X 廠牌咖啡豆，淺焙：編號 1(160 g)，編號 2 (120 g)，測試豆 (64.14 g)(含有 *Coffea arabica var. javanica* 和 *Coffea arabica var. caturra*)，編號 3 (48 g)，編號 4 (48 g)，編號 3 耳掛式濾泡咖啡(10 g/1 包)

(2) 星巴克咖啡豆(72 g)。

(3) 一般飲用水：150 毫升或 300 毫升；溫度：90-95 $^{\circ}\text{C}$ 。

2. 方法

(1) 聰明濾杯沖泡



- A. 將咖啡豆稱重 24 g 後，以電動研磨機研磨。每次按壓電動研磨機開關 10 秒後放開，再按壓 10 秒，共 5 次，合計 50 秒。停用間隔忽略不計。
- B. 將 24 g 咖啡粉放入已預熱(80°C 熱水) 聰明咖啡杯中，咖啡濾紙同時濕潤。以 300 ml 熱水(90-95°C)水在 10 秒內注入咖啡粉中，接著計時 90 秒，使咖啡粉浸潤熱水中。
- C. 90 秒時間到後，將聰明杯放置咖啡壺上釋放咖啡液 250 ml，將咖啡液倒入 1,000 ml 濃縮瓶，後將濃縮瓶放上濃縮系統架上。
- D. 4 小時後，濃縮後的咖啡液(濃稠狀似奶昔)，轉倒入血清瓶(約 20 ml)，放上冷凍溫度 -20°C 的預凍機，直至冷凍液凍結在瓶壁上。
- E. 將凍結濃縮液放上已暖機(溫度：-40°C；真空 1.40pb)的冷凍乾燥機上，開始冷凍乾燥。
- F. 冷凍乾燥 8 小時後，將咖啡萃取物改以離心瓶(50 ml)封裝，放入 -20°C 冰箱冷凍。

(2) 掛耳式沖泡

取出編號 3 耳掛式濾泡咖啡內濾袋，依濾袋上箭頭標示方向撕開，將濾紙雙面的耳掛拉開緊密掛在杯子上兩側的邊緣，先注入少量 90°C 熱水濕潤咖啡粉待 20 秒後，以少量多次注入熱水至濾袋，每包約 150 mL 熱水(90°C)沖泡。

(3) 乾燥濾液的製備方法

沖泡 3 包「耳掛式濾泡咖啡」，共 30 克耳掛式濾泡咖啡粉，將所沖泡的濾液收集，進行真空減壓濃縮 (EYELA rotary evaporator N-100) 及冷凍乾燥，並計算濾液乾重及萃取率。萃取率公式 = 沖泡後濾液乾重 (g) / 耳掛式濾泡咖啡粉重 (g) × 100%。沖泡後所得的乾燥濾液粉進行葫蘆巴鹼檢測。

(4) 試驗類型：一般儲存條件：25°C ± 2°C / 60% ± 5% RH。試驗間隔：第 0、1、2、3、6、8 及 12 個月。

(5) 葫蘆巴鹼分析條件

經由高效能液相分析儀進行分析，使用 Mightysil RP-18GP (250 × 4.6 mm, 5 μm) 分離管柱，分析葫蘆巴鹼的移動相為含有 1% 醋酸的甲醇溶液及 1% 醋酸溶液，所使用條件：含有 1% 醋酸的甲醇 (濃度 0-55 min, 10-100%)；流速：1.0 ml/min；偵測波長：280 nm。

(五) 結果與討論

1. 不同品種咖啡豆萃取率

X 廠牌編號 1，編號 2，測試豆，編號 3，編號 4，編號 3(2019 生豆)，X 廠商編號 3(2019 生豆)耳掛式濾泡咖啡，星巴克咖啡豆，萃取率(%)分別為 13.51、16.44、11.35、16.94、15.56、17.4、16.53 及 18.28。

2. 不同品種咖啡豆葫蘆巴鹼含量分析

每克 X 廠牌編號 1，編號 2，測試豆，編號 3，編號 4，星巴克咖啡豆，葫蘆巴鹼含量分別為 6.35、7.88、5.24、11.7、10.36、9.92 毫克。從結果說明編號 3 及 4，葫蘆巴鹼含量高於星巴克咖啡豆。



3. 探討高濃度高葫蘆巴鹼咖啡的穩定度

(1) 高濃度高葫蘆巴鹼 X 廠牌編號3 耳掛式濾泡咖啡萃取率

X 廠牌編號3 耳掛式濾泡咖啡，第0 個月(t₀)萃取率(%) 分別為 23.33，19.73 及 19.17。第1 個月(t₁)萃取率(%) 分別為 18.47，19.87 及 19.33。第2 個月(t₂)萃取率(%)分別為 18.93，20.50 及 18.20。第3 個月(t₃)萃取率(%)分別為 20.20，19.83 及 18.63。第6 個月(t₆)萃取率(%)分別為 20.57，19.70 及 18.60。第8 個月(t₈)萃取率(%)分別為 20.60，19.40 及 20.33。

(2) X 廠牌編號3 耳掛式濾泡咖啡放置不同時間對葫蘆巴鹼含量安定性分析

X 廠牌編號3 耳掛式濾泡咖啡葫蘆巴鹼含量優於聰明濾杯沖泡方式，進一步以 X 廠牌編號3 耳掛式濾泡咖啡分析葫蘆巴鹼安定性。第0 個月(t₀)，每克耳掛式濾泡咖啡，葫蘆巴鹼含量分別為 24.09、16.23、18.24 毫克，平均值為 19.52 毫克，標準差(SD)為 4.08 毫克。

第 1 個月(t₁)，每克耳掛式濾泡咖啡，葫蘆巴鹼含量分別為 14.81、16.72、18.74 毫克，平均值為 16.76 毫克，標準差(SD)為 1.97 毫克。

第 2 個月(t₂)，每克耳掛式濾泡咖啡，葫蘆巴鹼含量分別為 20.68、19.22、18.84 毫克，平均值為 19.58 毫克，標準差(SD)為 0.97 毫克。

第 3 個月(t₃)，每克耳掛式濾泡咖啡，葫蘆巴鹼含量分別為 21.02、22.88、22.06 毫克，平均值為 21.99 毫克，標準差(SD)為 0.93 毫克。

第 6 個月(t₆)，每克耳掛式濾泡咖啡，葫蘆巴鹼含量分別為 20.78、21.38、17.96 毫克，平均值為 20.04 毫克，標準差(SD)為 1.83 毫克。

第 8 個月(t₈)，每克耳掛式濾泡咖啡，葫蘆巴鹼含量分別為 19.88、21.85、12.28 毫克，平均值為 18.00 毫克，標準差(SD)為 5.06 毫克。

第 12 個月(t₁₂)，每克耳掛式濾泡咖啡，葫蘆巴鹼含量分別為 13.91、13.80、11.75 毫克，平均值為 13.15 毫克，標準差(SD)為 1.22 毫克。

沖泡二次後再做成耳掛式濾泡咖啡，萃取率 1.18%，葫蘆巴鹼含量只剩 0.40 毫克。

(3) 統計分析

葫蘆巴鹼含量以 SPSS12.0 Repeated measure ANOVA 變異分析 X 廠牌編號3 耳掛式濾泡咖啡放置不同時間對葫蘆巴鹼含量，結果顯示放置於室溫第 12 個月葫蘆巴鹼含量顯著下降。



(六)參考文獻

1. Fahanik-Babaei J, Baluchnejadmojarad T, Nikbakht F, Roghani M. (2019) Trigonelline protects hippocampus against intracerebral A β (1-40) as a model of Alzheimer's disease in the rat: insights into underlying mechanisms. *Metab Brain Dis.* 34:191-201.
2. Khalili M, Alavi M, Esmaeil-Jamaat E, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. (2018) Trigonelline mitigates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairment in the rat due to its anti-oxidative and anti- inflammatory effect. *Int Immunopharmacol.* 61:355-362
3. Pravalika K, Sarmah D, Kaur H, Vats K, Saraf J, Wanve M, Kalia K, Borah A, Yavagal DR, Dave KR, Bhattacharya P. (2019) Trigonelline therapy confers neuroprotection by reduced glutathione mediated myeloperoxidase expression in animal model of ischemic stroke. *Life Sci.* 216:49-58.
4. Folwarczna J, Janas A, Pytlik M, Cegięła U, Śliwiński L, Krivošíková Z, Štefíková K, Gajdoš M. (2016) Effects of Trigonelline, an Alkaloid Present in Coffee, on Diabetes-Induced Disorders in the Rat Skeletal System. *Nutrients.* 8:133.
5. Bułdak RJ, Hejmo T, Osowski M, Bułdak Ł, Kukla M, Polaniak R, Birkner E. (2018) The Impact of Coffee and Its Selected Bioactive Compounds on the Development and Progression of Colorectal Cancer In Vivo and In Vitro. *Molecules.* 23(12).
6. Ciaramelli C, Palmioli A, Airoidi C. (2019) Coffee variety, origin and extraction procedure: Implications for coffee beneficial effects on human health. *Food Chem.* 278:47-55
7. Febvay L, Hamon E, Recht R, Andres N, Vincent M, Aoudé- Werner D. (2019) Identification of markers of thermal processing ("roasting") in aqueous extracts of *Coffea Arabica* L. seeds through NMR fingerprinting and chemometrics. *Magn Reson Chem.*
8. Hirioshi T, Murato S, Y oshihide S. (1985) Trigonelline Content in Coffee Beans and the Thermal Conversion of Trigonelline into Nicotinic Acid during the Roasting of Coffee Beans. *Agri and Biol Chem,* 49:12, 3467-3471



表一、X 廠商與星巴克咖啡豆沖泡濾液萃取率及葫蘆巴鹼含量

品項	沖泡方式	萃取率(%)	TRG/咖啡粉(mg/g)
編號 1	聰明濾杯	13.51	6.35
編號 2	聰明濾杯	16.44	7.88
測試豆	聰明濾杯	11.35	5.24
編號 3	聰明濾杯	16.94	11.70
編號 4	聰明濾杯	15.56	10.36
星巴克	聰明濾杯	18.28	9.92

註: TRG ，葫蘆巴鹼。



表二、X 廠商編號 3 耳掛式濾泡咖啡放置不同時間對葫蘆巴鹼含量

安定性分析

放置時間(月)	萃取率 (%)	TRG /咖啡粉 (mg/g)	TRG/咖啡粉(mg/g) 平均值±標準差(mean ± SD)
0	23.33	24.09	19.52±4.08
	19.73	16.23	
	19.17	18.24	
1	18.47	14.81	16.76±1.97
	19.87	16.72	
	19.33	18.74	
2	18.93	20.68	19.58±0.97
	20.50	19.22	
	18.20	18.84	
3	20.20	21.02	21.99±0.93
	19.83	22.88	
	18.63	22.06	
6	20.57	20.78	20.04±1.83
	19.70	21.38	
	18.60	17.96	
8	20.60	19.88	18.00±5.06
	19.40	21.85	
	20.33	12.28	
12	21.73	13.91	13.15±1.22
	19.77	13.80	
	18.67	11.75	

