

## ココアの定量分析法

この定量分析法は、ココアを含有する調製食料品で、関税定率法別表第 19 類注 3 及び第 19.01 項に規定されているココア分（完全に脱脂したココアとして計算したココア含有量）を定量する必要があるものに適用する。

**1. 試験方法の概略** この試験方法は、ココアを含有する食品中のテオブロミン及びカフェインを定量する場合に適用するものであり、定量の手順は次のとおりである。

ココアを含有する食品中から、アルカロイド類の抽出  
高速液体クロマトグラフィーによるテオブロミン及びカフェインの定量  
ココア分（完全に脱脂したココアとして計算したココア含有量）の算出

## 2. 試薬

（１） -Hydroxyethyl theophylline (1,3-Dimethyl-7-[2-hydroxyethyl]xanthine)

（２） 除たんぱく質剤

A：硫酸亜鉛（ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ）2g を水に溶かし100ml としたもの

B：水酸化バリウム [ $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ] 1.8g を水に溶かし100ml としたもの

## 3. 検量線用標準溶液の調製

（１） 標準テオブロミン原液

テオブロミン約100mg を正確に量り取り、水で1,000ml 容褐色メスフラスコに移し入れて溶かし、水を加えて定容する。これを標準テオブロミン原液とする。

（２） 標準カフェイン原液

カフェイン約50mg を正確に量り取り、水で1,000ml 容褐色メスフラスコに移し入れて溶かし、水を加えて定容する。これを標準カフェイン原液とする。

（３） 内標準原液

-Hydroxyethyl theophylline 約100mg を正確に量り取り、水で1,000ml 容褐色メスフラスコに移し入れて溶かし、水を加えて定容する。これを内標準原液とする。

（４） 検量線用標準溶液

200ml 容褐色メスフラスコ 6 本に標準テオブロミン原液 5、10、15、20、30 及び50ml をそれぞれホールピペットで正確に量り取る。さらに、標準カフェイン原液をそれぞれホールピペットで正確に1、2、4、6、8 及び10ml ずつ加える。これらにそれぞれ内標準原液をホールピペットで正確に20ml 加えたのち、水を加えて定容する。これを検量線用標準溶液とする。

**4. 試料の調製** 分析試料は、試料の形状に応じて縮分法等適当な方法により調製する。チョコレート等の固形試料は冷蔵庫等で冷やして固めたものを粉碎又は削って粉末とし、ペースト状又は湿っぽい試料は乳鉢で均一にしたものを分析試料とする。いずれの場合も、比較的多量の試料を無作為に採取し、混合、粉碎し均一にしなければならない。

**5. 検液の調製** 4.で調製した試料を大型の遠沈管（50ml 以上の容量を有するもの）に正確に量り取り<sup>(1)</sup>石

油エーテル30ml を加えてよくかくはんしたのち、5,000rpm (約2,800G) で10 分間遠心分離する。この後更に水10ml を加えて7,500rpm (約6,300G) で15 分間再度遠心分離する。遠心分離後、上層の石油エーテルを駒込ピペットなどで取り除く<sup>(2)</sup>。

下層である遠沈管の内容物は、200ml 容三角フラスコに移し入れ、水で内容物を十分に洗い流して洗液はすべて三角フラスコに移し入れる。こののちに水を加えて内容量を約 100ml にする。

これを 100 の湯浴中で時々かくはんしながら 25 分間加熱する。

加熱後冷却し、ホールピペットで正確に内標準溶液20ml 加え混合する。更に、除たんぱく質剤A 及びB を各10ml ずつ加え混合する。しばらく静置後、水を加えて全量を約200ml にする。

約200ml となった溶液を、再度100 の湯浴中で時々かくはんしながら10 分間加熱後、温かいうちにろ紙 (例えばろ紙JIS P 3801 5 種 (No.5) ) でろ過し、更にポアサイズ0.45 µm のメンブランフィルターでろ過したものを高速液体クロマトグラフ用検液とする。

注 1) テオブロミンは水に溶けにくいいため、検液中のテオブロミン濃度は0.5mg/ml 以下になるようにする。試料の採取量は概ね次表のとおりである。その他の調製食料品については、ココア含有量から逆算して試料採取量を決定する。

品名	試料採取量(g)
ココア粉末	0.1
カカオマス	0.2
チョコレート	0.3
ミルクチョコレート	0.3
チョコレートサンド	0.5
チョコレートミルク	1.0
チョコレートアイスクリーム	1.0

注 2) 油脂を含まない試料、石油エーテルに分散しない試料の場合には、この操作は省略してもよい。

## 6. 装置及び測定条件

### 6.1 高速液体クロマトグラフ

紫外吸光光度検出器 (UV) を備えたもの。

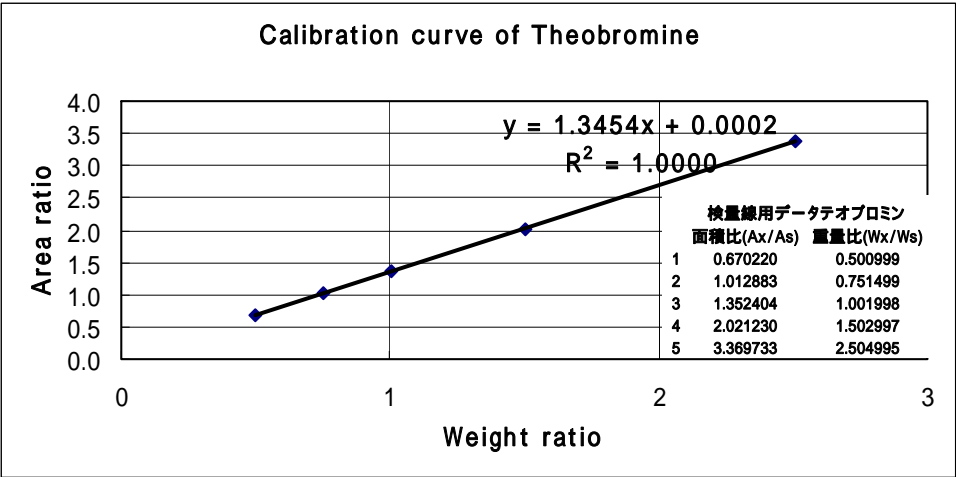
### 6.2 測定条件<sup>(3)</sup>

- ( 1 ) 分離カラム Zorbax ODS 4.6mm I.D. × 250mm 又はこれと同等のもの。
- ( 2 ) カラム温度 25
- ( 3 ) 移動相 水：アセトニトリル ( 85 : 15 )
- ( 4 ) 流速 1.0ml/min
- ( 5 ) 検出波長 UV 273nm
- ( 6 ) 注入量 20 µl

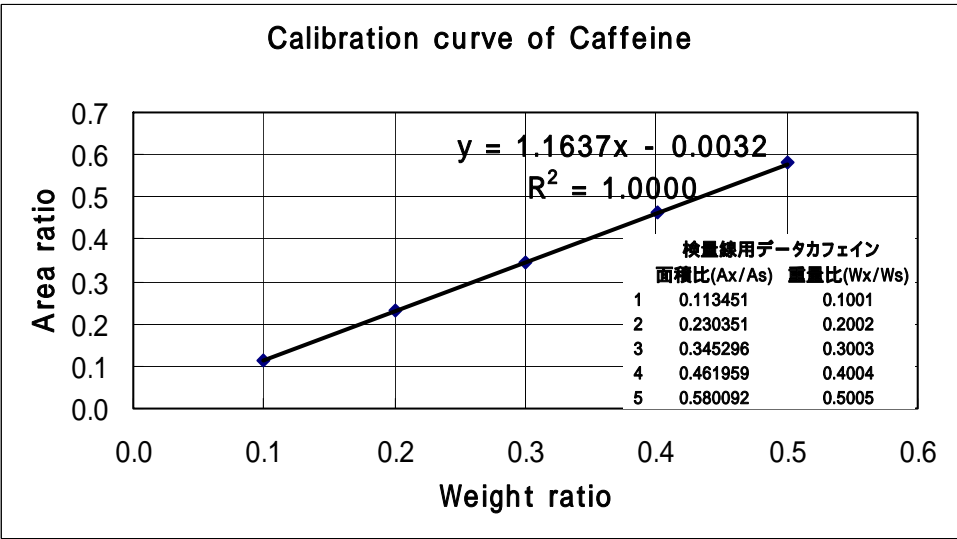
注 3) カラム温度、移動相、流速等は使用するカラムなどにより変更してもよい (例えば、同等のカラムで、移動相：水 - テトラヒドロフラン (100 : 1)、カラム温度 45 、流速 1.5ml/min など)。

7. 検量線の作成 3.で調製した検量線用標準溶液を 20μl ずつ、6.の条件に設定した高速液体クロマトグラフに注入する。得られたクロマトグラムよりテオブロミン、カフェイン及び内標準物質のピーク面積を求める。

各成分と内標準物質との重量比 (W<sub>x</sub>/W<sub>s</sub>) 及び各成分のピーク面積 (A<sub>x</sub>) と内標準物質のピーク面積 (A<sub>s</sub>) との比 (A<sub>x</sub>/A<sub>s</sub>) からテオブロミン及びカフェインの検量線を作成する (グラフ 1 及び 2 参照)。



グラフ 1 テオブロミンの検量線



グラフ 2 カフェインの検量線

8. 試料検液中のテオブロミン及びカフェインの定量 5.で調製した検液 20μl を、6.の条件に設定した高速液体クロマトグラフに注入する。得られたクロマトグラムから各成分のピーク面積を求め、内標準物質とテオブロミン及びカフェインとのピーク面積比を計算する。7.で作成した検量線から内標準物質とテオブロミン及びカフェインとの重量比を算出する。

試料中のテオブロミン及びカフェインの含有量は次式により算出する。

$$\text{テオブロミン及びカフェインの含有量 (\%)} = \frac{(W_x / W_s) \times M_s}{S \times 1,000} \times 100$$

ただし、 $W_x/W_s$  : 検量線より求めたテオブロミン及びカフェインの重量比

$M_s$  : 内標準溶液 20ml 中の内標準物質重量 (mg)

$S$  : 試料採取量 (g)

9. **無脂ココア分の算出** 試料中の無脂ココア分は次式により算出する。

$$\text{無脂ココア分 (\%)} = (T + C) \times 31$$

ただし、 $T$  : 8.により求めた試料中のテオブロミン含有量 (%)

$C$  : 8.により求めた試料中のカフェイン含有量 (%)