

ノート

ココア調製品中テオブロミンの分光光度法による定量と無脂肪無水ココア分の決定

石 黒 昌 孝*

1. 緒 言

関税率表第 17.04 号, 第 18.06 号, 第 19.02 号等の分類にあたって食品中のココア分の定量方法が問題となる。既に川端¹⁾はココアの特長成分であるテオブロミンの定量について検討し, テオブロミンの値からココア分を定量する方法について考察している。

ココアは通常の場合, アルカロイドとしてテオブロミンとカフェインを約 2.5%含有していることはよく知られている。その他にもテオフィリンが含まれているという報告もあるが含有量はわずか 0.0002%であり無視できる。また, ココアバターの中にテオブロミンとカフェインが溶存していることが考えられるが, その量はこん跡程度であることが明らかにされている。したがって, テオブロミンとカフェインは無脂肪無水ココア中の特有の成分と考えてよい。Hadorn²⁾は無脂肪無水ココア中のアルカロイド含有量は 3.2%であると報告している。このことから試料中のアルカロイドを定量することにより, 無脂肪無水ココアの含有量を求めることができると考える。

アルカロイドの定量方法として, いろいろな方法が報告されており, 川端¹⁾はクロロホルム抽出液の紫外吸収スペクトルからアルカロイドを確認し, 更に, 薄層クロマト法によりテオブロミンとカフェインを分離検出する方法について報告している。Hadorn²⁾は適当な抽出法によりアルカロイドを分離し, ケールダール法により定量する方法を報告しており, 最も信頼できる方法ではあるが, 複雑であり, 分析に長時間を要する欠点がある。Hadorn, Zurcher³⁾の吸光光度法では紫外部領域の吸収が未知成分の妨害によって高い数値を示す傾向がある。すなわち, 無脂肪無水ココア中の平均アルカロイド含有量を 3.5%としており, この値は実際の平均含量 3.2

%より 0.3%上廻っているので, 正常な値とはいえない。

ここでは, Schiitz⁴⁾らが報告した方法により, テオブロミンとカフェイン及び総アルカロイドの定量方法について検討を行ない, 無脂肪無水ココア分の定量について有益な知見が得られたので報告する。

2. 実験方法

2・1 試薬

酢酸鉛液; 30g の酢酸鉛を 110ml の水に溶解する。

塩化アンモニウム 特級

1 規定塩化アンモニウム液

4 規定硫酸

4 規定かせいソーダ液

Celite 545

重炭酸ソーダ

水飽和クロロホルム; クロロホルムを分液漏斗にとり水で 2 回ふり分離層をとる

2・2 器具

クロマトカラム; 上部に漏斗をつけ, 長さ 25cm で直径 2.2cm のもの

分光光電光度計

2・3 抽出後の調製

よく混合し均一にした試料をアルカロイド含量によって次の量を精ひょうする。

ココア粉 1 g

ココアマス 1.5g

チョコレート 3 g

チョコレートビスケット 5 g

試料は三角フラスコに上述の基準で精ひょうして Ag ひょう取した後, 沸石を入れて全重量をはかり Bg とする。これに 90ml の水を加えて湯浴上でおだやかに 5 分間沸騰させる。

* 東京税関分析室 東京都港区港南 5-5-30

次に酢酸鉛液を 4.0ml 加え、よくかくはんし、冷却し、室温とする。水を加えて全重量を $Bg+101g$ とする。この場合チョコレートなどで水の量がかかなりあるときは水の量 Cg を差し引いて $Bg-Cg+101g$ とする。よくかくはんして静置後ろ紙でろ過し、ろ液に重炭酸ソーダ 0.5g を添加し、再びろ紙でろ過する。このろ液をクロマト操作に用いる。

2・4 総アルカロイドの定量

クロマトカラムの下部をガラスウールでふさぎ、その上に celite 545 を 2g 及び 1 規定塩化アンモニウム液 2ml を混合したものをカラムに入れ、ガラス棒で良く押えて平らにしておく。

100ml のビーカーに 2・3 で得られた抽出液 10ml をピペットで移し入れる。次に、塩化アンモニウム 0.5g を加えて溶解し、更に celite 545 を 10g 加えてよく混合する。完全に混合したものをカラムに移し、ガラス棒で良く押える。次に、ビーカーに celite 545 を 1g 加えて内容物を全部カラムに移し入れ、その上をガラスウールでふたをする。

一方、抽出液の代わりに 10ml の水を用いて全く同様の手順で対照 (Blank) のカラムを用意する。

試料及び対照の両カラムの上部より、それぞれ水飽和したクロロホルムを流し洗浄する。流出液は 100ml のメスフラスコに集める。流出速度は 1 分間に 1ml とする。

得られたクロロホルム抽出液をブランクを対照として次の波長で吸光度を測定する。吸光度は 245nm で最小 276nm で最高となる。

240nm, 245nm, 250nm, 265nm,
270nm, 276nm, 282nm, 307nm,
計算

$$\text{アルカロイド}\% = \frac{1.838 \times (E_{276} - E_{307})}{A(g)}$$

$$\text{無脂肪無水ココア分}\% = \frac{\text{アルカロイド}\% \times 100}{3.20}$$

ただし、 E_{276} 及び E_{307} はそれぞれ 276nm 及び 307nm の吸光度、 A は試料ひょう取量 g。

定数 1.838 はココア粉の中にある平均的含有割合のテオブロミンとカフェインの標準調製液の吸光度より算出されたものである。また、3.20 は今までの無脂肪無水ココア粉中のアルカロイドの平均的定量値より算出した。

2・5 テオブロミンとカフェインの定量

クロマトカラムの下部をガラスウールでふさぐ。次に、4 規定硫酸 5ml と celite 545 を 5g ビーカーにとってよく混合したものをカラムに移し入れ、ガラス棒で良く押えておく。

100ml のビーカーに 2・3 で得られた抽出液 10ml をピペットでとり、塩化アンモニウム 0.5g を加えて溶解した後、10g の celite 545 を加えて完全に混合する。

この混合物をカラムに移し入れ、ガラス棒で良く押えておく。更に、ビーカーに celite 545 1g を入れ、カラムに移す。ガラス棒で押えた後、ガラスウールで上部をふたする。一方、別に抽出液 10ml の代わりに水 10ml を用いて全く同様の操作により対照 (Blank) のカラムをつくる。

抽出液及び対照の両方のカラムに上部から水飽和のクロロホルムを流下させる。流出速度は 1 分間に 1ml とする。

最初のフラクションを 50ml メスフラスコに集める。

これはカフェインを含んでいる。次に、第 2 のフラクションを 15ml メスフラスコに集める。この中にはアルカロイドを含んでいない。一応 276nm での吸収をみるが、吸収はみられないはずである。次に、第 3 のフラクションを 250ml メスフラスコに集める。このフラクションにはテオブロミンを含有している。最後に、第 4 のフラクション約 15ml を別の試験管にとり、一応 276nm の吸収を調べる。第 4 のフラクションはアルカロイドを含んでいないはずである。

2・5・1 カフェインの定量

前述の方法で得られたフラクション (1) に 4 規定かせいソーダ液 2ml と celite 545 2g を混合したものを加えて良く振る。静置してからガラスフィルターでろ過する。このろ液の最初の 1ml は捨てる。このろ液を用いて全く同様の処理をしたブランクを対照として吸光度を測定する。測定波長は 2・4 で述べた総アルカロイドと同じであるが、定量には 276nm と 307nm の吸光度を用いる。

2・5・2 カフェインの計算

$$\text{カフェイン}\% = \frac{2.028 \times 0.5 \times (E_{276} - E_{307})}{A(g)}$$

A はサンプル重量 g, E_{276} 及び E_{307} はそれぞれ 276nm 及び 307nm の吸光度、定数 2.028 は標準のカフェインより算出した定数である。

2・5・3 テオブロミンの定量

前述の方法で得られたフラクション (3) は精製することなく、そのまま別に同じようにして得られたブランクを対照として吸光度を測定する。測定波長は総アルカロイドと同じ波長で行ない、定量値は 276nm と 307nm を用いて計算する。245nm が最小値で 276nm が最大値の吸光度を示さなければならない。

ノート ココア調製品中のテオブロミンの分光光度法による定量と無脂肪無水ココア分の決定

2・5・4 テオブロミンの計算

$$\text{テオブロミン}\% = \frac{2.5 \times 1.827 \times (E_{276} - E_{307})}{A \text{ (g)}}$$

Aはサンプル重量g, E_{276} 及び E_{307} はそれぞれ276nm及び307nmの吸光度, 恒数1.827は標準のテオブロミン液の吸光度より算出された定数である。

2・5・5 無脂肪無水ココア分の計算

$$\text{無脂肪無水ココア}\% = \frac{\text{テオブロミン}\% \times 100}{3.07}$$

$$\text{無脂肪無水ココア}\% = \frac{(\text{テオブロミン}\% + \text{カフェイン}\%) \times 100}{3.18}$$

定数の3.18及び3.07はそれぞれテオブロミン及びアルカロイドの含量の平均値より算出した。

3. 結果と考察

3・1 標準試料による実験結果

この方法の正確性を判断するために、試薬特級のテオブロミンとカフェイン及びその混合物より成る標準試料を作成し、定量を行ない、調合した標準品の回収割合について検討を行なった。

3・1・1 テオブロミンの回収率

特級テオブロミンを粉乳及び穀粉と砂糖をベースとして、それぞれ0.5%～3.0%までの含有割合の標準試料をつくり、定量した結果を示したのがTable 1である。粉乳は森永の全粉乳を用い、小麦粉は日清製粉の試料を用い、砂糖は試薬特級を用いて標準試料を調製した。

Table 1 Recovery of theobromine in standard preparation.

Base of standard preparation	Content of Theobromine	1st test recovery	2nd test recovery	Average
Whole milk	0.5 %	0.49 %	0.50 %	0.495 %
—ditto—	1.0 %	1.01 %	0.98 %	0.995 %
—ditto—	1.5 %	1.48 %	1.49 %	1.485 %
—ditto—	2.0 %	1.99 %	1.99 %	1.99 %
—ditto—	3.0 %	2.98 %	2.99 %	2.985 %
Wheat flour & sucrose (1:1)	1.0 %	1.00 %	0.99 %	0.995 %
—ditto—	2.0 %	2.01 %	2.00 %	2.005 %

Table 1で明らかなように、粉乳及び小麦粉、砂糖に混合したテオブロミンは99%以上回収されて、定量できることになり、本方法がすぐれていることを示している。

3・1・2 カフェインの回収率

次にカフェインについても、同様の定量を行ない、0.5%～1.5%までの標準試料を調製し、定量した結果をまとめたのがTable 2である。標準試料のベースとしては森永の全粉乳を用いた。

Table 2 Recovery of caffeine in standard preparation

Base of standard preparation	Content of caffeine	Recovery of No. 1 test	Recovery of No. 2 test	Average
Whole milk	0.5 %	0.50 %	0.49 %	0.495 %
—	1.0 %	0.99 %	0.99 %	0.99 %
—	1.5 %	1.50 %	1.49 %	1.495 %

Table 2で明らかなように、粉乳中に混合したカフェインは99%以上が回収されて定量できる。

3・1・3 テオブロミン・カフェインの回収率

次に、ココア粉中のテオブロミンとカフェインの含有割合（普通テオブロミン94：カフェイン6）に近い割合に調製したアルカロイドの回収率を定量した。わかりやすくするためテオブロミン90%カフェイン10%の比率で混合した。粉乳と砂糖各50%のベースに対して1.0%から3.0%の割合にこのアルカロイドを混合して、定量を行なった結果を示したのがTable 3である。

このTable 3で明らかなように、標準試料に対して、回収率は総アルカロイドで99%以上の回収率、テオブロミンで98.8%以上の回収率、カフェインで97%以上の回収率が得られる。したがって、本方法により定量することは可能であることがわかった。

3・2 定量結果の再現性

次に本実験方法による定量値の再現性について、検討を行なった。

試料としてはVan hauten のcocoa powderを用いた。このココア粉の分析値は脂肪分23.0%、水分3.9%であり、したがって、無脂肪無水ココア分は73.1%となる。

実験方法としては、ココア粉そのままを試料として定量する方法とアルカロイド2.0%（テオブロミン1.8%カフェイン0.2%）を添加したココア粉を試料としたものの二通りについて5回にわたり定量を行なった。その結果を示したのがTable 4及びTable 5である。

Table 4では同一のココア粉中の総アルカロイド分及びテオブロミンの定量結果はいずれも標準偏差が0.1及び0.12であり、良好な定量値を示すことがわかる。

Table 5ではアルカロイド2%を混合したココア粉

Table 3 Recovery of total alkaloid, theobromine, caffeine in standard preparation

(Mixed base is whole milk & sucrose(50 : 50))

Content of total alkaloid	Content of theobromine	Content of coffeine	Recovery of total alkaloid	Recovery of theobromine	Recovery of caffeine
1.0 %	0.9 %	0.1 %	0.99%	0.90%	0.10%
1.5 %	1.35%	0.15%	1.51%	1.33%	0.15%
2.0 %	1.8 %	0.2 %	1.99%	1.79%	0.21%
3.0 %	2.7 %	0.3 %	2.99%	2.70%	0.29%

Table 4 Content of total alkaloid and theobromine in the same cocoa powder

Sample No.	Content of total alkaloid	As fat-free dry cocoa	Content of theobromine	As fat-free dry cocoa
No. 1	2.30 %	71.9 %	2.21 %	72.0 %
No. 2	2.35 %	73.4 %	2.24 %	73.0 %
No. 3	2.34 %	73.1 %	2.20 %	71.7 %
No. 4	2.34 %	73.1 %	2.25 %	73.3 %
No. 5	2.31 %	72.2 %	2.20 %	71.7 %
Average	2.33 %	72.8 %	2.22 %	72.3 %
	0.012 %		0.012 %	

Table 5 Recovery of total alkaloid and theobromine in cocoa powder with 2 % alkaloid

Sample No.	Content of total alkaloid	Content of theobromine
No. 1	4.31 %	4.00 %
No. 2	4.29 %	4.03 %
No. 3	4.35 %	3.99 %
No. 4	4.30 %	4.03 %
No. 5	4.32 %	4.04 %
Average	4.314 %	4.018 %
	0.017 %	0.018 %

でも総アルカロイド分及びテオブロミンの含量は標準偏差 0.017 及び 0.018 で、いずれも良好な定量値を示すことがわかる。

二つの実験結果より本法は再現性が良く、したがって、定量法としてすぐれていることが明らかとなった。

Table 6 Content of total alkaloid in imported cocoa product

Sample	Content of total alkaloid	As fat-free dry cocoa	Remarks
Hershey's cocoa powder	2.41 %	75.3 %	Fat 16.8 %
Van hauten cocoa powder	2.35 %	73.4 %	Fat 23.6 %
Milk chocolate crumb CM 5	0.09 %	2.9 %	
Instant protein with cocoa	0.23 %	7.2 %	Prot. 52.5 %
Hershey's chocolate syrups	0.35 %	10.9 %	Cane sugar 43.4 %
Pudding powder chocolate flau.	0.49 %	15.2 %	Starch value 68.5 %
Chocolate crumb (Newzealand)	0.222 %	6.9 %	
Ovaltine	0.352 %	11.0 %	
cocoa preparation	0.23 %	7.2 %	

3・3 本法による分析例

輸入食品について本法により分析した結果を Table 6 に示した。これらの商品はすべてココアを含むものとして分類されたものであるが、無脂肪無水ココア分として約 3 % 程度の商品についても定量できた。関税率表の適用にあたってココア分の定量が要求されるが、この方法は比較的簡便であり税関分析として活用できるものといえる。

4. 総 括

ココア製品中のアルカロイド、テオブロミン、カフェインの定量法について検討を行なった。方法としては Hardon らの方法を改良し、クロマトグラフ法を応用した Schütz の方法により定量を行なった。テオブロミン及びカフェインを粉乳等のベースに混合して回収を行ない定量したが、99%以上の回収率が得られ、極めて良好であった。次に、定量値の再現性について、ココア粉

ノート ココア調製品中のテオブロミンの分光光度法による定量と無脂肪無水ココア分の決定

を用いて、定量を試みたが標準偏差値 0.018 以下で良好な結果が得られた。酸化マグネシウムを用いる従来の方法（川端らの方法）と比較すると所要時間が極めて短縮され誤差も少なく、良い方法といえる。しかも、総アルカロイド分、テオブロミン、カフェインをそれぞれ別個に定量することが可能であり優れた方法といえる。

本法により総アルカロイド分を定量するならば、計算

により無脂肪無水ココア分の算出が可能である。もちろん、テオブロミンの定量値により無脂肪無水ココア分の算出もできるので、他のアルカロイド分やコーヒーなどがはいっている調製品の場合にはテオブロミン含量とカフェイン含量との比率を確かめて算出するならば、より正確な判定が可能である。

文 献

- 1) 川端欣五：本誌, No. 5, P. 31 (1967).
- 2) H. Hadorn : *Mitt Lebensn. U. Hgg.*, **55**, 217 (1964).
- 3) H. Hadorn, K. Ziircher : *Mitt Lebensn Unters. U. Hyg.*, **56**, 491 (1970).
- 4) G. P. Schiitz, A. Z. Prinsen and A. pafer : *Rev. Int. Choc.* **25** (1970).

Spectrophotometric Determination of Theobromine in Cocoa Product and Determination of Fat Free Cocoa

Masataka ISHIGURO

Tokyo Customs Laboratory, 5-5-30, Konan, Minato-ku, Tokyo, Japan.

—Received Sept. 26, 1972—