

ノート

二波長分光光度法による脱脂粉乳中の 微量ココア分の定量

佐藤 宗 衛, 出 来 三 男*

1 緒 言

脱脂粉乳にごく少量のココアを添加したものから、ココア分を定量する方法は、ココアの特有成分であるテオブロミンが微量であるため多くの困難がある。

従来、この種の分析については、ココアの特有成分であるテオブロミンを抽出後、薄層クロマトグラフィー¹⁾、カラムクロマトグラフィー及び吸光度法^{2), 3)}などにより分離定量し、その定量値からココア分の含有量を算出している。しかし、これらの方法は共存成分の分離に長時間を要し、比較的多量の試料を必要とするなどの難点がある。

二波長分光光度法は定量成分と共存成分の吸収スペクトルの極大吸収が近接している場合にも、二波長の組み合わせにより、共存成分の吸収を消去できるので、共存成分の分離などの予備的操作を必要としない特徴がある。

ここでは、脱脂粉乳に少量含まれるココア分を二波長分光光度法により、直接定量する条件について検討した。

2 実験方法

2・1 試料

実験に用いた標準試料は、次のとおりである。

ココア：森永製ココア粉末

脱脂粉乳：雪印製脱脂粉乳

2・2 波長測定条件

微分スペクトル： $\lambda_1 - \lambda_2 = 2 \text{ nm}$, Band Pass：2 nm
Scan Speed：60nm/min., Range：Absorbance 0.1～1.0, 使用機器：日立 356 型二波長自記分光光度計。

ココア及びココアと脱脂粉乳との混合試料は 0.1N NaOH 溶液に溶かし、ろ過後、ろ液について、1cm の石英セルを使用し、400～220nm の波長範囲を測定した。また、セルの固定位置による吸光度の変動を防ぐために、

セルの洗浄及び試料の交換は注射器を用いて行った。

3 結果及び考察

3・1 微分スペクトルによるココア分の定量

脱脂粉乳、ココア及びこれらの混合試料の 0.1N NaOH 溶液における吸収スペクトルを Fig.1 に示す。

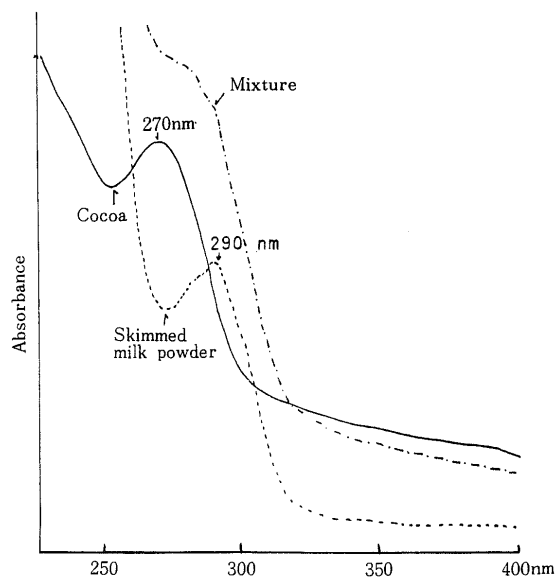


Fig.1 UV absorption spectra of cocoa and skimmed milk powder in 0.1N NaOH

Operation mode： $\lambda_1 = \lambda_2$
Slit；band Pass：2nm
Range：0～1.0,
Concentration；cocoa：15mg/100ml
Skimmed milk powder：100mg/100ml

脱脂粉乳は、283nm 及び 290nm にたんぱく質の吸収を示し、ココアは 270nm にテオブロミンによる吸収を示す。ココアの吸収が脱脂粉乳の吸収と近接していることから、

* 大蔵省関税中央分析所 千葉県松戸市岩瀬 531

通常の吸光度法によるココア分の定量は困難である。そこで、微分スペクトル、二波長測光による定量法を検討した。

Fig.2 は、脱脂粉乳及びココアについて微分スペクトル

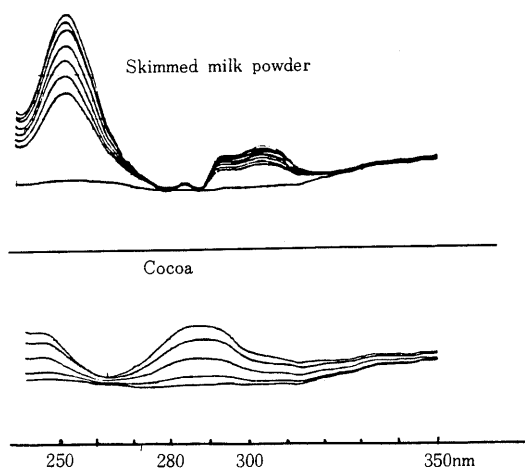


Fig.2 Differential spectra of cocoa and skimmed milk powder

Operation mode : $\lambda_1 - \lambda_2 = 2 \text{ nm}$
 Slit ; band PAS : 2 nm
 Concentration ; cocoa : 2–20mg/100ml,
 Skimmed milk powder : 50–100mg/100ml
 Solvent : 0.1N NaOH

ルを測定したものである。脱脂粉乳はアルカリ溶液中で、305, 293, 284 及び 253nm 付近に吸収を示す。305, 293 及び 253nm 付近の吸収は脱脂粉乳の濃度とともに増

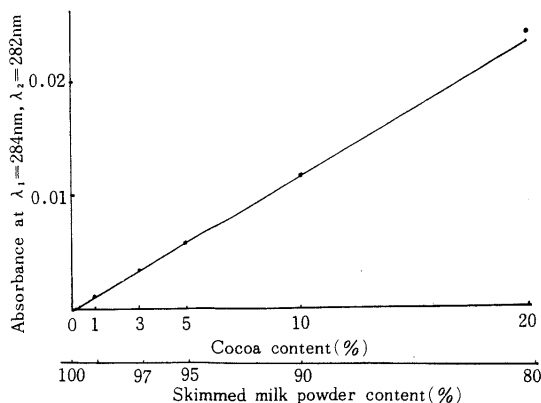


Fig.3 Calibration curve

加するが、284nm の吸収はある濃度範囲で吸光度は一定である。

一方、ココアは 284nm に吸収を示し、この吸収はココアの濃度とともに変化する。Fig.3 は、 $\lambda_1=284\text{nm}$, $\lambda_2=282\text{nm}$ における吸光度をココアの濃度に対してプロットして得られた検量線である。Fig.3 からこの二波長における吸光度とココアの濃度との間には直線関係があり、0.8%以上のココア分を含むものは、この二波長の吸光度を測定することにより定量が可能と考えられる。しかし、この二波長の吸光度は脱脂粉乳の濃度の増加とともにわずかに増加するが、これは、添加したココア分が 1% 以下の吸光度を測定する場合、吸光度のフルスケールを 0.1 程度の高感度のレンジにする必要があるために、脱脂粉乳のわずかな吸光度の変化がココアの定量値に大きい誤差を与えることが考えられる。そこでこのような微量のココア分を定量する方法として、二波長測光による

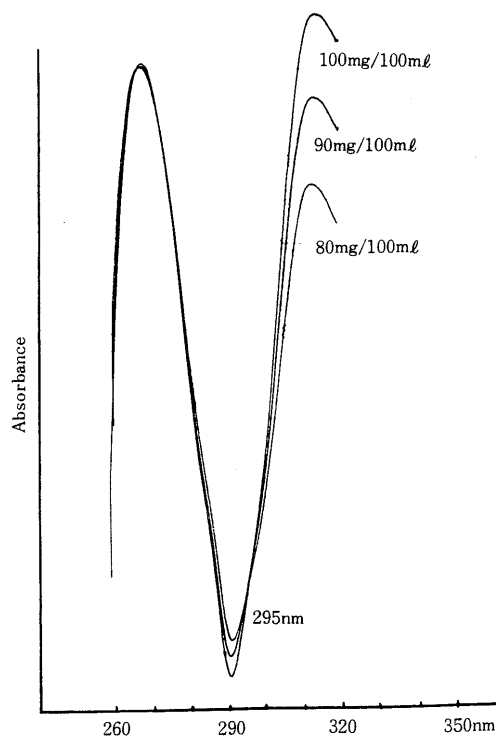


Fig.4 Selection of dual wave length for masking of skimmed milk powder

Operation mode : dual wave length spectra
 one wave length, fixed ($\lambda_2=272\text{nm}$)
 one wave length : scan
 Slit ; band pass 2 nm
 Range : Absorbance, 0–0.3

脱脂粉乳の影響をマスキングする方法について検討した。

3・2 二波長測光によるココア分の定量

共存成分である脱脂粉乳の吸収を消去するための二波長は、ココアの定量波長 (λ_2) における吸光度と同程度の吸光度を示す波長 (λ_1) を選び、脱脂粉乳については、 $A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1} = 0$ 、ココアについては、 $A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1} = \Delta A$ という条件を満足する波長の選択が必要である。

ココアの定量波長は、ココアの極大吸収に近く、脱脂粉乳の極大吸収よりできるだけ離れていることを考慮し、272nm とした。次に λ_1 の波長選択を行った。

Absorbance	295nm		295.5nm		295.5nm		296nm		296.5nm		297nm	
	100mg/100ml	80mg/100ml	100mg/100ml	80mg/100ml	100mg/100ml	80mg/100ml	100mg/100ml	80mg/100ml	100mg/100ml	80mg/100ml	100mg/100ml	80mg/100ml
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A, 0.1			A, 0.3		A, 0.1		A, 0.1		A, 0.1		A, 0.1	

Fig.5 Determination of dual wave length for masking of skimmed milk powder

Operation mode : $\lambda_2 = 272\text{nm}$, fixed
 $\lambda_1 = \text{change}$
 Slit ; band pass : 2nm

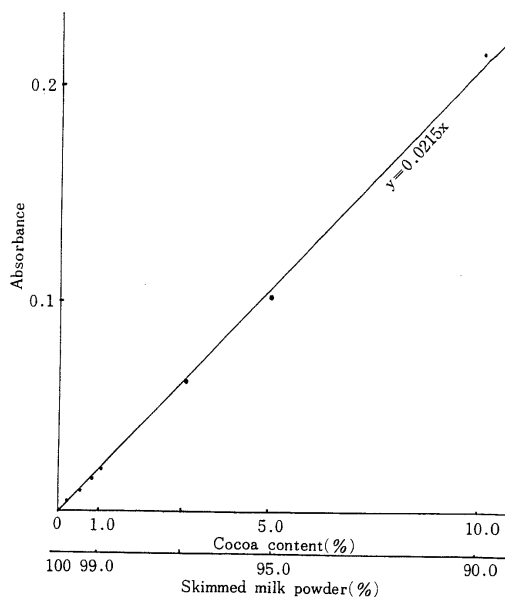


Fig.6 Calibration curve

Fig.4 に各種の脱脂粉乳の濃度について、 $\lambda_2 = 272\text{nm}$ を固定し、 λ_1 を走査する一波長固定・一波長走査法による等差吸収点の選択を示した。Fig.4 より脱脂粉乳の λ_2 に対する等差吸収点 (λ_1) は 296~295nm 付近にあることがわかる。さらに厳密な λ_1 を選択するために、 λ_2 を固定し、 λ_1 を 0.5nm ずつ走査し、脱脂粉乳の濃度に無関係に等しい吸光度を示す λ_1 を選んだ結果、 λ_1 は 295.5nm であった (Fig.5)。以上のことから、脱脂粉乳の存在下でココア分を定量するに必要な二波長は $\lambda_1 = 295.5\text{nm}$ 、 $\lambda_2 = 272\text{nm}$ と決定した。

Table 1 Analytical data for calibration curve

A	99.8	99.5	99.2	99.0	97.0	95.0	90.0
B	0.2	0.5	0.8	1.0	3.0	5.0	10.0
1	0.0045	0.0095	0.0152	0.0190	0.0600	0.1020	0.2205
2	0.0052	0.0100	0.0155	0.0193	0.0585	0.1005	0.2200
3	0.0050	0.0100	0.0155	0.0195	0.0610	0.1005	0.2190
4	0.0050	0.0100	0.0155	0.0195	0.0600	0.1020	0.2190
5	0.0050	0.0102	0.0155	0.0200	0.0610	0.1020	0.2175
$\bar{X}$	0.00494	0.00994	0.01544	0.01946	0.0601	0.1014	0.2192
σ	0.00023	0.00023	0.00012	0.00033	0.00092	0.00074	0.0010
C. V. (%)	4.72	2.35	0.78	1.68	1.52	0.72	0.47

A = Content of skimmed milk powder(%)

B = Content of cocoa(%)

各種のココア濃度について、 $\lambda_1=295.5\text{nm}$ 及び $\lambda_2=272\text{nm}$ における吸光度を繰返し測定した結果は、Table 1 に示すとおりである。

5回の繰返し精度の変動係数は、ココア含有量が0.2%の微量領域ではやや高く、4.7%程度であるが、ココア含有量が0.5%以上のものについては2%前後である。

各吸光度の平均値を用いて、ココア濃度に対してプロットして得られた検量線は、Fig.6 に示すように、吸光度とココア濃度との間には直線関係がある。Fig.7 は、Fig.6 の検量線のココア濃度 1%以下の低濃度のものについて拡大したものである。

4 要 約

二波長分光法により、多量の脱脂粉乳と共存する微量のココア分を定量する方法について検討した結果、0.1N NaOH 溶液中で $\lambda_1=295.5\text{nm}$ 、 $\lambda_2=272\text{nm}$ における吸光度とココアの濃度との間には直線関係がある。脱脂粉乳にココア分が 0.2%以上含有する場合、この方法によりココア分を定量できるものと考えられる。

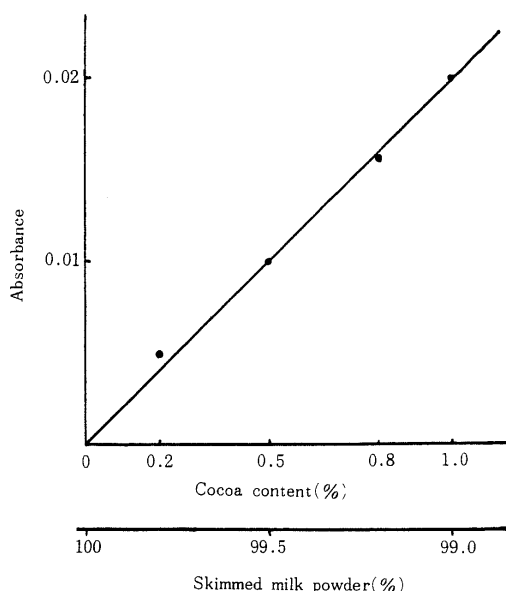


Fig.7 Calibration curve

文 献

- 1) U. M. Senanayake, R. O. B. Wijesekera : *J. Chromatog.*, **32**, 75~86 (1968).
- 2) 川端欣五 : 本誌, No. 5, 31 (1967).
- 3) G. P. Schütz, A. J. Prinsen, A. Pater : *Rev. Int. Choc. (RIC)*, **25**, 7~11 (1970).

Determination of Cocoa in Skimmed Milk Powder Containing Small Amount of Cocoa by Dual Wave Length Spectrophotometry

Soei SATO, Mitsuo DEKI

Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, Japan

—Received Sep., 14, 1974—