

報 文

テオプロミンとカフェインの分離定量

水 城 勝 美, 出 来 三 男*

シリカゲル薄層クロマトグラフィーによるテオプロミンとカフェインの分離定量法について検討した。定量条件は次のとおりである。展開溶剤: アセトン - クロロホルム - エタノール, 6 : 4 : 1 (v/v), 内部標準試薬: フェナセチン (16 µg), 二波長クロマトスキャンナー (試料側 270nm, 対照側 320nm) によるデンシットグラム作成。この条件により, テオプロミン 1.6 ~ 8 µg の範囲で, テオプロミンとフェナセチンの重量比とデンシットグラムによるスポットの面積比の間には, 直線関係がある。実際試料として, 数種のココア製品中のテオプロミン含量をこの方法により定量し, 良好的な結果が得られた。

1 緒 言

ココアを含有する食品のうち関税率表, 分類上問題となる点は, 粉乳, ココアマスの混合物及び粉乳, ココアマス, 砂糖からなる混合物中のココア含有量であると考えられる。

ココア分の算出にあたっては, ココア分の特殊成分であるテオプロミンを定量し, この値からココア分を算出している。テオプロミンの定量法については多数報告されているが, 一般には, ココア中のテオプロミンを抽出後, 吸光度法¹⁾⁻⁶⁾ より定量する方法が行われている。これらの方法はいずれも操作が煩雑であり, また, 分析時間も長時間を要するなどの欠点がある。

Schutz ら^{4),5)} の方法は, テオプロミン, カフェイン及び総アルカリドの定量方法としては操作が簡便ですぐれた方法の一つであるが, 酢酸鉛及び多量のクロロホルムを使用し, 分析時間も長時間を要する等の問題がある。

Senanayake ら⁷⁾ は, 薄層クロマトグラフィーによりテオプロミンを分離し, 比較的迅速に定量できることを報告している。ここでは, 分析法の簡便化のため, 薄層クロマトグラフィーによるテオプロミンの定量法について検討し, さらに, 実際試料からのテオプロミンの抽出法についても検討を加えた。

2 実験方法

2・1 試薬

テオプロミン: 和光純薬
カフェイン: メルク社製品
フェナセチン: キシダ化学

2・2 実際試料

各種ココア製品: 大東ココア製

2・3 装置及び条件

デンシトメーター: 島津 CS - 910, 波長; 試料側, 270nm, 対照側, 320nm, シグザグスキャン(リニアライザー) 照射光束; 1.25 × 1.25mm, スキャンスピード; 20mm/min.

薄層クロマト板: Kieselgel 60F₂₅₄ メルク社製品, 200mm × 200mm, 厚さ, 250 µm.

展開溶剤: アセトン - クロロホルム - エタノール (6 : 4 : 1 v/v)

2・4 試料の調製と内部標準

テオプロミンは有機溶剤に難溶であるので, 各種溶剤に対する溶解性について検討した結果, 酢酸 - n - プタノール (1 : 1 v/v) の混合溶剤を用いて加熱(100 °C) 溶解した場合, テオプロミンの溶解度は約 0.2% であった。したがって, ココア中のテオプロミン含量

*大蔵省関税中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

は、平均約2%であるので実際試料の採取量は2g/100mlとした。試料は室温に放置すると結晶が析出するので、使用時に加温する必要がある。内部標準として、各種試薬について検討した結果、テオプロミン及びカフェインのスポットと完全に分離したスポットを与えるフェナセチンを、内部標準とした。

3 結果及び考察

3・1 薄層クロマトグラフィーによるテオプロミン、カフェイン及びフェナセチンの分離条件

テオプロミン、カフェイン及び内部標準のフェナセチンを混合し、酢酸-n-ブタノール(1:1v/v)に溶解した検体を薄層板にスポット後、各種溶剤を用いて展開し、分離性を検討した。Fig.1に示したように、アセトン-クロロホルム-エタノール(6:4:1v/v)の展開溶剤では、各スポット相互の分離もよく、比較的円形のスポットを示しており、そのデンシトグラムもほぼ対称形であった。

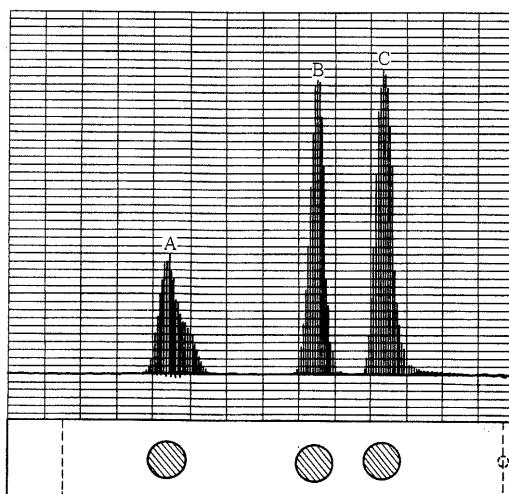


Fig. 1 TLC chromatogram and UV absorption profile
Solvent system : Acetone-chloroform-ethanol (6:4:1v/v) .
A : Phenacetine, B : Caffeine, C : Theobromine

3・2 測定波長の選択

薄層クロマトグラフィーで分離したスポットの検出に顕色試薬による方法があるが、呈色の安定性、均一性の面から、定量誤差の要因となるので、ここでは紫外吸収による検出法を行った。薄層板上の各スポットについて、直接吸収曲線を測定した結果をFig.2に示した。このようにテオプロミンでは272.5nm、カフェインでは271nmそれぞれ極大吸収を示しており、フェナセチンの極大吸収は245nm付近にある。テオプロミンとカフェインの極大吸収は近接しているので、270nmを測定波長とした。この波長でのフェナセチンの吸光度は、極大値の約60%まで減少する。デンシトグラムの測定は、320nmを対照とした二波長測定で行った。この対照側の波長320nmでは、テオプロミン、カフェイン及びフェセチンの吸光度は0.0である。

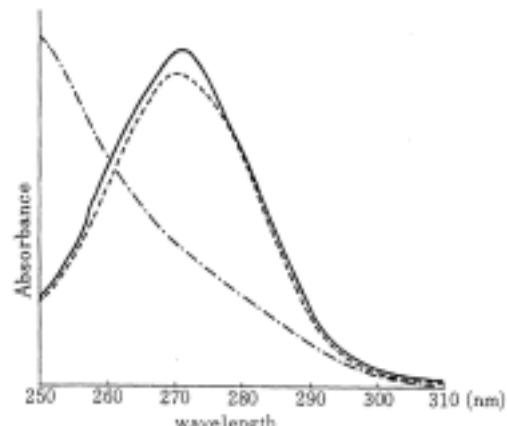


Fig. 2 UV absorption spectra on a thin-layer chromatogram of theobromine, caffeine and phenacetine
Theobromine,.....Caffeine, · · Phenacetine

3・3 テオプロミンの検出限界

テオプロミン、0.1, 1.0, 5.0, 10.0 μgをそれぞれスポットして、アセトン-クロロホルム-エタノール(6:4:1v/v)の展開溶剤で展開した後、270nmで測定したデンシトグラムをFig.3に示した。デンシトグラムに示したように、0.1 μgのテオプロミンでも明瞭なクロマトグラムを示しており、この範囲までは十分に定量が可能であると考えられる。定性的検出限界は0.01 μgである。

Table 2 Analytical data of the obromine

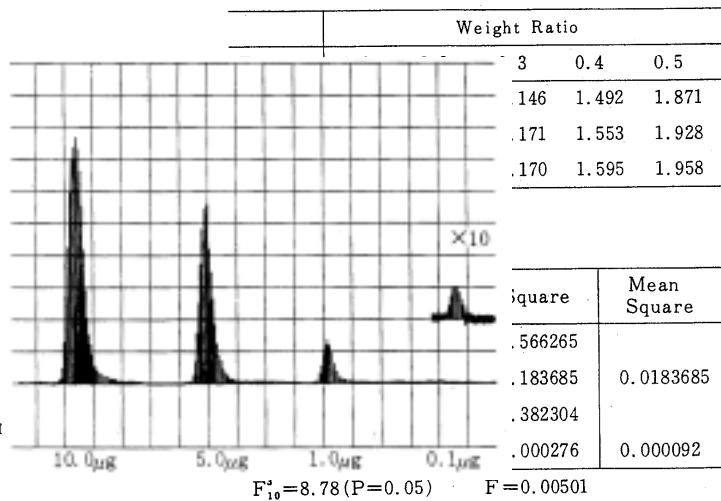


Fig. 3 Detection limit of the ob method

3・4 検量線の作成

各種濃度のテオブロミンについて、フェナセチンを内部標準に用いての重量比とデンシトグラムから得られたスポットの面積比との関係について検討した。すなわち酢酸 - n - ブタノール (1 : 1v/v) に溶かしたテオブロミンをそれぞれ 1.6 ~ 8 μg の範囲で分取し、これにフェナセチン 16 μg を加え、これを検体としてアセトン - クロロホルム - エタノール (6 : 4 : 1v/v) の展開溶剤で分離し 270nm におけるデンシトグラムを作図し、インテグレーターの数値を用いて、各クロマトグラムの面積を求めた。3 回の繰り返し測定によって得られた平均値について回帰分析を行った結果を、

Table 1 Regression analysis of the obromine and caffeine

Theobromine		Caffeine	
W _T /W _P	A _T /A _P	W _C /W _P	A _C /A _P
0.1	0.396	0.1	0.314
0.2	0.771	0.2	0.623
0.3	1.162	0.3	0.964
0.4	1.547	0.4	1.238
0.5	1.919	0.5	1.567
\bar{X}	0.3	\bar{y}	1.159
			0.941
$\hat{Y} = \bar{y} + \frac{\sum xy}{\sum x^2} (X - \bar{x})$			
$Y = 3.822X - 0.0124$		$Y = 3.121X + 0.005$	

Table 1 及び 2 に示した。テオブロミンについての分散分析の結果から、重量比と面積比との間には原点を通る直線関係があり、回帰式は、 $Y = 3.822X - 0.0124$ であった。一方、カフェインについても同様な結果が得られ、回帰式は、 $Y = 3.121X + 0.005$ であった。

これらの結果から明らかのように、フェナセチンを内部標準として薄層クロマトグラフィーにより、高い精度でテオブロミンを定量することができた。

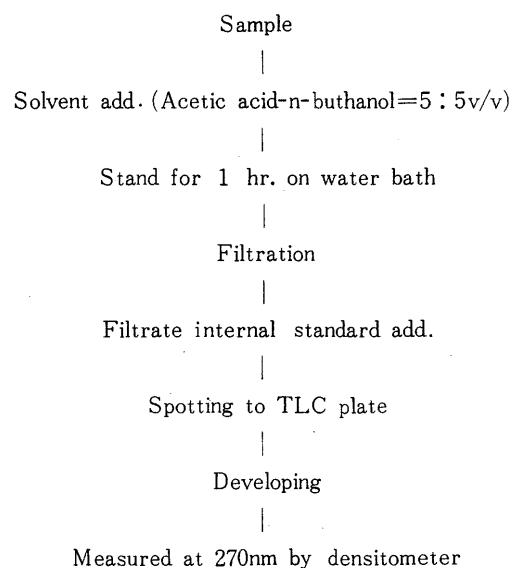


Fig. 4 Scheme of sample preparation

3・5 ココア製品中のテオプロミンの定量

ココア製品中のテオプロミンを定量する場合の操作方法の概要を Fig.4 に示した。すなわち、試料 2g を採取して溶剤(酢酸 - n - ブタノール, 1 : 1v/v) 80ml を加えて湯浴上で 1 時間加温し、室温に戻してから、さきの溶剤で 100ml に標定後ろ過した。ろ液 10ml にフェナセチンの内部標準液 2ml (16mg) を加えて、薄層板に約 5 µg ずつスポットした。薄層板をあらかじめ展開溶剤(アセトン - クロロホルム - エタノール, 6 : 4 : 1 (v/v)) で飽和させた容器にセットし、上昇法で約 17cm 程度展開した。薄層板を風乾後、分離されたスポットを試料側 270nm, 対照側 320nm の波長を用いて、ジグザグスキャン(リニアライザー)により、デンシトグラムを測定した。実際試料として、各種ココア製品についてテオプロミンを定量した結果は Table3 に

Table 3 Analytical results of commercial samples

	Theobromine (%)		Fat (%)
	TLC method	Schutz method	
Cocoa beans	1.40	1.11	47.4
Cocoa powder	2.67	1.87	22.3
Cocoa mass	1.38	1.22	55.7
Cocoa mass	1.44	1.00	50.1
Bitter chocolate	2.18	1.12	54.5
Cocoa powder	2.30	1.72	9.7
Cocoa powder	1.63	1.88	21.6

示した。本法で得られた結果と Schutz の吸光度法により得られた結果を比較すると、本法では、Schutz 法よりも高い値を示している。

4 要 約

薄層クロマトグラフィーによるテオプロミンの分離は、展開溶剤にアセトン - クロロホルム - エタノール (6 : 4 : 1v/v) を用いると、共存成分であるカフェインとの分離もよく 270nm の波長を用いることにより良好なデンシトグラムが得られた。この条件でフェナセチンを内部標準とすると、テオプロミンの含量とデンシトグラムによるスポットの面積との間には直線関係があり、高い精度でテオプロミンを定量できることを明らかにした。テオプロミンは酢酸 - n - ブタノール (1 : 1v/v) 混合溶剤により熱時に約 0.2% 溶解するので、この溶剤を用いてココアパウダー、ココアマスなどの実際試料からの抽出を行った。一般にココア製品には比較的多量のたんぱく質が含まれているが、この方法の特徴は、従来の Schutz の方法などのように、抽出操作に酢酸鉛や多量のクロロホルムを使用する必要がなく、酢酸 - n - ブタノール混合溶剤を用いることにより、かなり除去することができるのでテオプロミンの定量に好都合である。また、比較的迅速に多数の試料を定量することができる。この方法を数種のココア製品中のテオプロミン含量の定量に応用し、良好な結果を得ることができた。

文 献

- 1) D. T. Englis and J. W. Miles : *Anal. Chem.* , 26 , 1214 (1954) .
- 2) A. J. Shingler and J. K. Carlton : *Anal. Chem.* , 31 , 1679 (1959) .
- 3) 川端欣吾 : 本誌 , No. 5 , 31 (1967) .
- 4) G. P. Schutz, A. J. Prinsen and A. Pater : *Rev. Int. Choc.* , 25 , 7 (1970) .
- 5) 石黒昌孝 : 本誌 , No. 13 , 39 (1973) .
- 6) Oyin Somorin : *J. Food sci.* , 41 , 458 (1976) .
- 7) U. M. Senanayake and R. O. B. Wijesekera : *J. Chromatogr.* , 32 , 75 (1968) .

The Quantitative Determination of Theobromine and Caffeine

Katsumi MIZUKI, Mitsuo DEKI*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271 Japan

Quantitative determination of theobromine and caffeine on thin-layer chromatograms, using densitometer for measurement of UV absorption, were investigated. A Shimadzu CS-910 dual-wavelength scanner equipped with linearizer was used with following setting conditions : scanning speed, 5mm/min with zig-zag scanning; reflection mode; slit for measurement, 1.25×1.25 .mm Phenacetine was used as the internal standard. For the measurement of the UV absorption intensities of the spots of the obromine, caffeine and phenacetine on the chromatogram, sample and reference beams were set at 270nm and 320nm, respectively. Thin-layer chromatography was carried out on $25 \mu\text{m}$ layers of Kieselgel 60 F254 (E. Merk, Darmstadt, G.F.R.) . The solvent system used for development was acetone-chloroform-ethanol (6 : 4 : 1v/v) . After development, the plate was dried in a room condition. The relationship between the weight ratio of theobromine to phenacetine and area ratio of them was linear, The present method was applied to the quantification of theobromine and caffeine in commercial cocoa products.

Received Sept. 30, 1977