

ノート

DMSOによるココア粉中のテオブロミン及び カフェインの抽出方法の検討（最終報）

前 川 仁*, 水 城 勝 美**

Extraction of Theobromine and Caffeine in the Cocoa Powder by DMSO (Final Report)

Hitoshi MAEKAWA*, Katsumi MIZUKI**

*Hakodate Customs Laboratory

24-4, Kaigan-cho, Hakodate-shi, 040 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

531, Iwase, Matsudo-shi, Chibaken, 270 Japan

At before report, We found about 98% of Theobromine were collected by those technique compared for HPLC.

But, We could not take away big tailing due to by DMSO on the Gas Chromatography.

So, this time we studied about choice of column, and Gas Chromatographs condition.

We understood, we can not completely take away about tailing due to by DMSO at the packed column.

If we need clean chromatograph with out tailing, we must use for Capillary Column.

And also, we understood the "Big Tailing" has not gave effect for the quantitative analysis. Cause data processing system has computing automatically about tailing.

We understood Gas Chromatograph oven condition was given sharp peaks at high temprature, better than low temprature.

1 緒 言

前回の報告で、DMSOにより、各関に配置されているガスクロマトグラフを用いた、簡便で迅速なココア粉中のテオブロミン及びカフェインの抽出法について報告した。

この中でHPLCと較べて遜色のない高い率でテオブロミン・カフェインを検出することが出来たものの、テオブロミン等のピークがDMSOの大きなテーリングの上に現われることや、ピークがブロードになることから、定量結果に影響を与えるのではないか等課題を残した。

これらのことから今回は、カラムの選択及びガスクロマトグラフの条件や前回手で行っていた抽出を機械化できないか等の検討を行ったので報告する。

2 実 験

(1) 標準溶液の調整

テオブロミン及びカフェイン（ナカライ製、特級）をDMSOに溶解させ（テオブロミン＝5mg/1ml、カフェイン＝10mg/1ml）標準溶液とし、検量線の作成にあたっては、適宜希釈して使用した。

(2) 内部標準溶液の調整

フェナセチン（ナカライ製、特級）をDMSOに溶解させ、（10mg/1ml）内部標準溶液とした。

*函館税関業務部分析部門 〒040 函館市海岸町24-4

**関税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬531

(3) カラムの選択

シリコン OV 系の OV-17 と OV-101 について検討した。

(4) ガスクロマトグラフィーの条件の検討

主にオープン温度について検討した。

(5) 試料中のテオブロミンとカフェインの抽出

市販の純ココア粉（無糖、無ミルク成分）をソックスレー抽出器で約 12 時間エチル・エーテルにより脂肪分を除去し、105℃にて乾燥させた後、遠沈管に約 1g を正確に計り採り、20ml の DMSO で 60℃ に保持、

- ① レシプロシェーカーで 1 時間振とうする。
- ② ハンドミキサーブレードで 1 時間攪拌する。
- ③ 従来通り手で攪拌する。

抽出後 10,000rpm で 20 分遠心分離し、上澄液を 25ml 溶メスフラスコに 15ml 採り、内部標準液 1ml を加え DMSO にてメスアップし、検液とした。

(6) ガスクロマトグラフィーによる定量

下記の条件でフェナセチンを内部標準とし、標準溶液により検量線を作成し（2 点検量線法）、上記検液についてテオブロミン及びカフェインの定量を行った。

装置：ガスクロマトグラフ 島津 15-A

カラム：シリコン OV-17 2% クロモソブ AW-DMCS
メッシュ 60/80 長さ 4.1m

検知器：FID

データ処理装置：島津 C-R4A

条件：オープン温度 250℃ 定温

FID 及びインジェクター 290℃

キャリアーガス N₂ 60ml/1min

試料注入量 1.0 µl

(7) HPLC による定量

第 1 報と同じロットの製品を使用したので、先の定量値を用いた。

3 結果及び考察

(1) カラムの選択については、極性が小さいか、或いは無極性のカラムが有効ではないかという考えに基づき、ガスクロメーカの技術者の協力を得て、OV 系、スクアレン系のパックドカラムを物色したが、いずれも DMSO のテーリソグを除くことは難しいとの結論に達した。

そこで、前回使用した OV 系カラムについて、条件を変えることにより、よりシャープなピークを得ることが出来ないか検討した結果、Fig. 1~4 に示すとおり、分離状況等において、OV17 カラムがよい結果を得ることができた。

また、低温（225℃）より、高温（250℃）のほうがよりシャープなピークを得られることが判った。

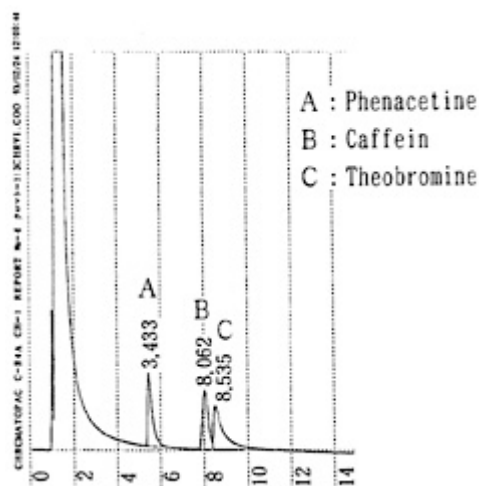


Fig. 1 Gas chromatogram of standard solution column : OV-101

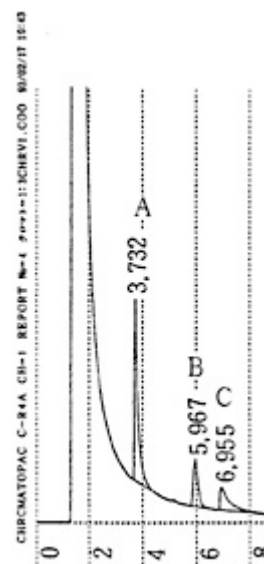


Fig. 2 Gas chromatogram of standard solution column : OV-17

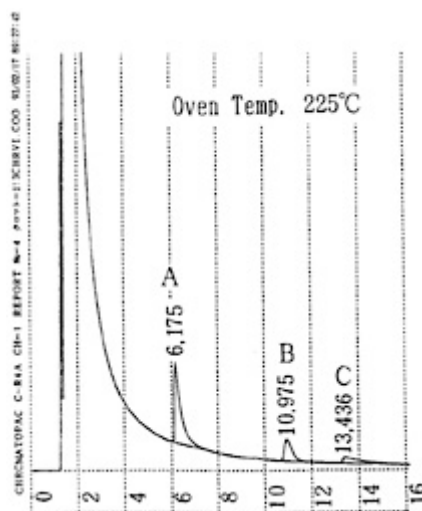


Fig. 3 Gas chromatogram of standard solution column : OV-101

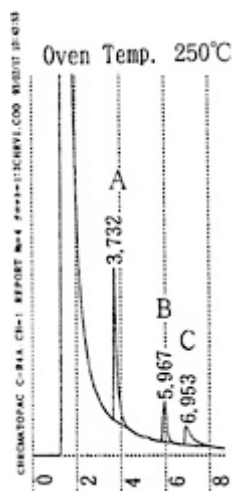


Fig. 4 Gas chromatogram of standard solution column : OV-17

(2) 上記のとおり OV17 カラムを使用して、高温 (250℃) における条件で標準溶液による再現性を考察したところ、カフェインで平均 98.81%, 変動係数 1.02%, テオブロミンで平均 99.71%, 変動係数 0.42%と良い結果を得ることができた。

Table 1 Recovery of standard solution

	Caffein	Theobromin
①	98.85	99.14
②	98.67	99.49
③	98.16	99.71
④	100.48	100.14
⑤	97.88	100.08
AVE.	98.81	99.71
S・D	1.012	0.417
C・V	1.02%	0.42%

(3) 抽出法ではレシプロシェーカー、ハンドミキサーブレード、手による攪拌について検討を行った結果、遠沈管の体積が小さいこともあってか、機械式 2 方法よりも手による攪拌のほうが良い結果を得ることができた。

Table 2 Analytical results of various extraction

1. Extraction by shaking machine

Caffein

	1	2	3	ave.
①	0.104	0.104	0.102	0.103
②	0.129	0.134	0.144	0.136
③	0.132	0.134	0.144	0.137

mean content value 0.13%

Theobromin

	1	2	3	ave.
①	2.324	2.514	2.206	2.348
②	2.590	2.414	2.223	2.409
③	2.461	2.434	2.875	2.590

mean content value 2.45%

Table 3 Analytical results of various extraction

2. Extraction by hand mixer

Caffein

	1	2	3	ave.
①	0.165	0.146	0.159	0.157
②	0.161	0.159	0.158	0.159
③	0.144	0.169	0.147	0.153

mean content value 0.16%

Theobromin

	1	2	3	ave.
①	2.694	2.772	2.659	2.708
②	2.397	2.398	2.458	2.418
③	2.460	2.461	2.567	2.496

mean content value 2.54%

Table 4 Analytical results of various extraction

3. Extraction by shaking hand

Caffein

	1	2	3	ave.
①	0.276	0.271	0.275	0.274
②	0.264	0.273	0.275	0.271
③	0.288	0.276	0.274	0.280

mean content value 0.28%

Theobromin

	1	2	3	ave.
①	2.831	2.799	2.816	2.815
②	2.811	2.825	2.839	2.825
③	2.805	2.829	2.848	2.827

mean content value 2.82%

4 要 約

前回の課題であった、ガスクロマトグラムの DMSO 上のテーリングに各ピークが乗って出てくることについては、パックドカラムでは、これを取り除くことは難しいことが判った。ワイ

ドボアキャピラリーカラム等を使用することにより、よりよいピークを得ることが可能であると思われる。

また抽出法については、試料の定量結果は、HPLC と較べたものが、前回とほとんど同じことから、手による攪拌で十分

な抽出が可能であると思われる。

上記のことからココア粉中のテオブロミン及びカフェインの抽出について、DMSO による方法では短時間（12～14 時間）で簡便に定量することが可能と思われる。