

ノート

## 内部標準法を用いた高速液体クロマトグラフィーによるココア分の定量

伊藤 聡美, 古賀 哲, 笹川 邦雄\*

### High Performance Liquid Chromatographic Determination of Cocoa Content using Internal Standard Method

Satomi ITO, Satoshi KOGA and Kunio SASAKAWA  
Central Customs Laboratory, Ministry of Finance  
Iwase 531, Matsudo city, Chiba pref, 271 - 0076 Japan

It was determined theobromine and caffeine contents by HPLC in cocoa preparations, and calculated as "fat - free dry cocoa content" from theobromine and caffeine contents obtained this analysis.

Treatment method of sample solution for HPLC was improved by using internal standard method combined with deproteinizing and heating process. New improved method was simpler and rapider than the old one.

The measurement result of theobromine and caffeine contents using the present improved method was close to that of the existent method.

#### 1. 緒 言

ココア製品は、関税率表第 18 類及び第 19 類に分類されており、この分類において用いられる「完全に脱脂したココア」とは、テオブロミン及びカフェインの含有量の合計に 31 を乗じた値を用いることが関税率表解説第 19 類総説において規定されている。

現在、この規定の対象となるココア製品については、参考分析法 26「ココア分の定量分析法」により分析を行っているが、絶対検量線法であるため、液体クロマトグラフ注入量のばらつきにより繰り返し精度が悪く、変動誤差が大きい、また個人差にも左右されやすい

分析の対象とされるココア製品は、ココアと乳製品、ココアと調製油脂及びしょ糖などの調製品であるが、現在の分析法には、液体クロマトグラフへの検液調製に除たんぱく工程が盛り込まれていないため、カラムへの負荷が大きい

分析試料の前処理において、脱脂工程、定容操作など煩雑な部分が多く難点がある

といった問題がある。

今回、我々はこれら問題点を解決するため、内部標準法を用いて迅速且つ正確な定量分析法への改良を試み、さらに、新しい分離条件について検討したので報告する。

#### 2. 実 験

##### 2. 1 試料及び試薬

THEOBROMINE (SIGMA)

CAFFEINE (SIGMA)

THEOPHYLLINE (SIGMA) : 内部標準

- HYDROXYETHYLTHEOPHYLLINE (SIGMA) : 内部標準

除たんぱく剤 (A 及び B)

A ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  水溶液 (1.8% (W / V))

B ;  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  水溶液 (2 % (W / V))

ココアパウダー 3 点

ココアを含有する調製食料品 4 点

##### 2. 2 装置及び測定条件

遠心分離器 (ローター式のもの)

HPLC : HP1100 (HP)

カラム : L - column ODS 4.6 mm I.D. × 250 mm (化学品検査協会製)

検出器 : UV 273nm

カラム温度及び流速 : 25 , 1.0ml / min

移動相 : アセトニトリル : 水 = 15 : 85

\*大蔵省関税中央分析所 〒271 - 0076 千葉県松戸市岩瀬 531

### 2.3 内部標準の選択

内部標準としては、Delbeke らの方法<sup>1)</sup>を参考に、テオフィリン、 $\beta$ -HYDROXYETHYLTHEOPHYLLINE について検討する。標準物質のテオブロミン及びカフェインと内部標準のテオフィリン及び  $\beta$ -HYDROXYETHYLTHEOPHYLLINE の混合溶液と、ココアの水抽出物を 2.2 の分離条件で分離し、比較検討する。

### 2.4 検量線

テオブロミン 2~20  $\mu\text{g/ml}$ 、カフェイン 0.4~4  $\mu\text{g/ml}$ 、内部標準 8  $\mu\text{g/ml}$  を含む水溶液を調製し、HPLC に 20  $\mu\text{l}$  注入し、濃度比とクロマトグラムの面積比より検量線を作成する。

### 2.5 除たんぱく剤の影響

ココアの水抽出物に除たんぱく剤 A 及び B を各 5, 10, 15, 20ml 加え、従来法により試料調製を行ったものについて 2.2 の分離条件により分離を行う。各クロマトグラムよりテオブロミン及びカフェインの含有量を算出し、除たんぱく剤の影響について調査する。

### 2.6 新たな HPLC 分析条件の提案（移動相の検討）

HPLC の分離条件については、2.2 の条件で良好な分離が得られている。

しかし、カラム温度をさらに高く設定することにより気温の高い地域でも、安定した結果を得られるような条件を新たに検討する。又、有機溶媒の使用量をより少なくし、更に、2.2

の移動相が早急に準備できないことにも対応できるように検討する。

Delbeke らの方法<sup>1)</sup>を参考に、有機溶媒としてテトラヒドロフランを選択し、混合比、カラム温度、流速について変化させ検討する。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 内部標準の選択

標準物質のテオブロミン及びカフェインと内部標準のテオフィリン及び  $\beta$ -HYDROXYETHYLTHEOPHYLLINE のクロマトグラムとココアのクロマトグラム (Fig. 1) を比較すると、テオフィリンのピークは、ココアのクロマトグラムにおいて、爽雜物ピークと重なるため、 $\beta$ -HYDROXYETHYLTHEOPHYLLINE が最適な内部標準であると判断した。

内部標準を添加したココアのクロマトグラムにおいて、テオブロミン、内部標準及びカフェインの 3 つのピークは良好に分離した。

### 3.2 検量線

テオブロミン、カフェインの検量線は、Fig. 2 に示すように良好な直線性を示した。

### 3.3 除たんぱく剤の影響

各クロマトグラムより算出したテオブロミン及びカフェイン

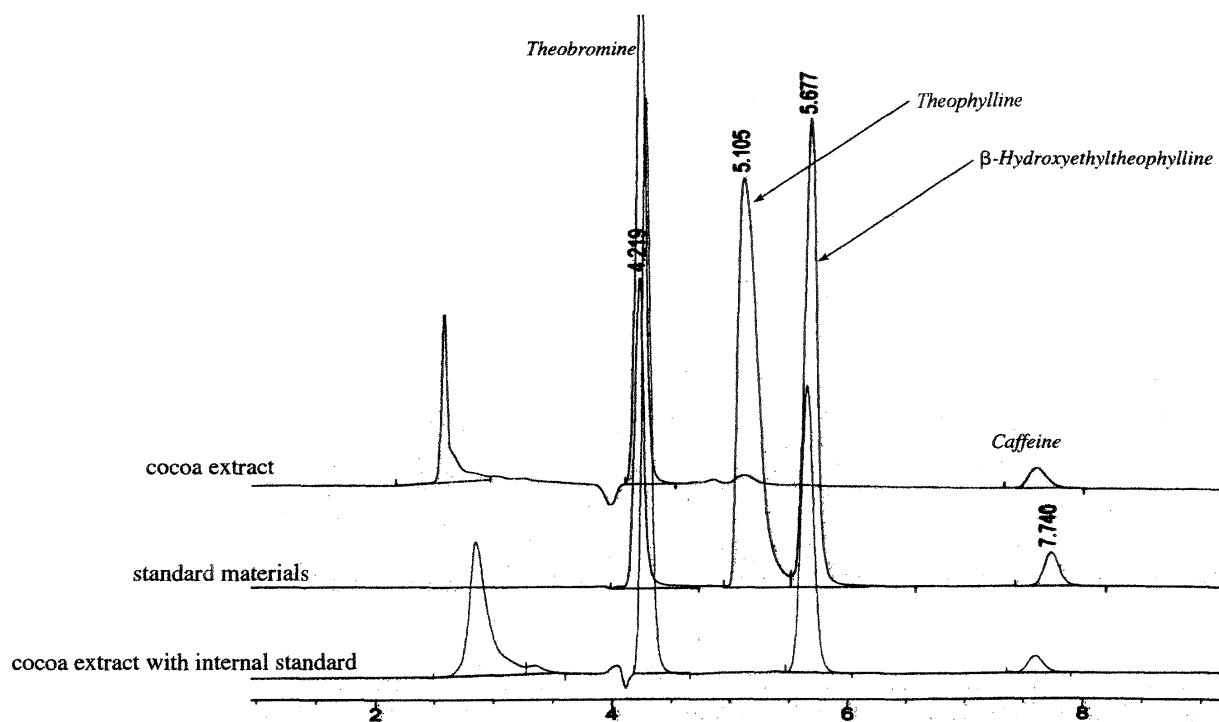


Fig.1 Liquid chromatograms of cocoa extract, standard materials and cocoa extract with internal standard.

Mobile phase;  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$  (15 : 85), Column; L - Column ODS 4.6 mm I.D.  $\times$  250 mm

Column temperature and flow rate; 25  $^\circ\text{C}$ , 1.0ml / min, Detector; UV 275nm

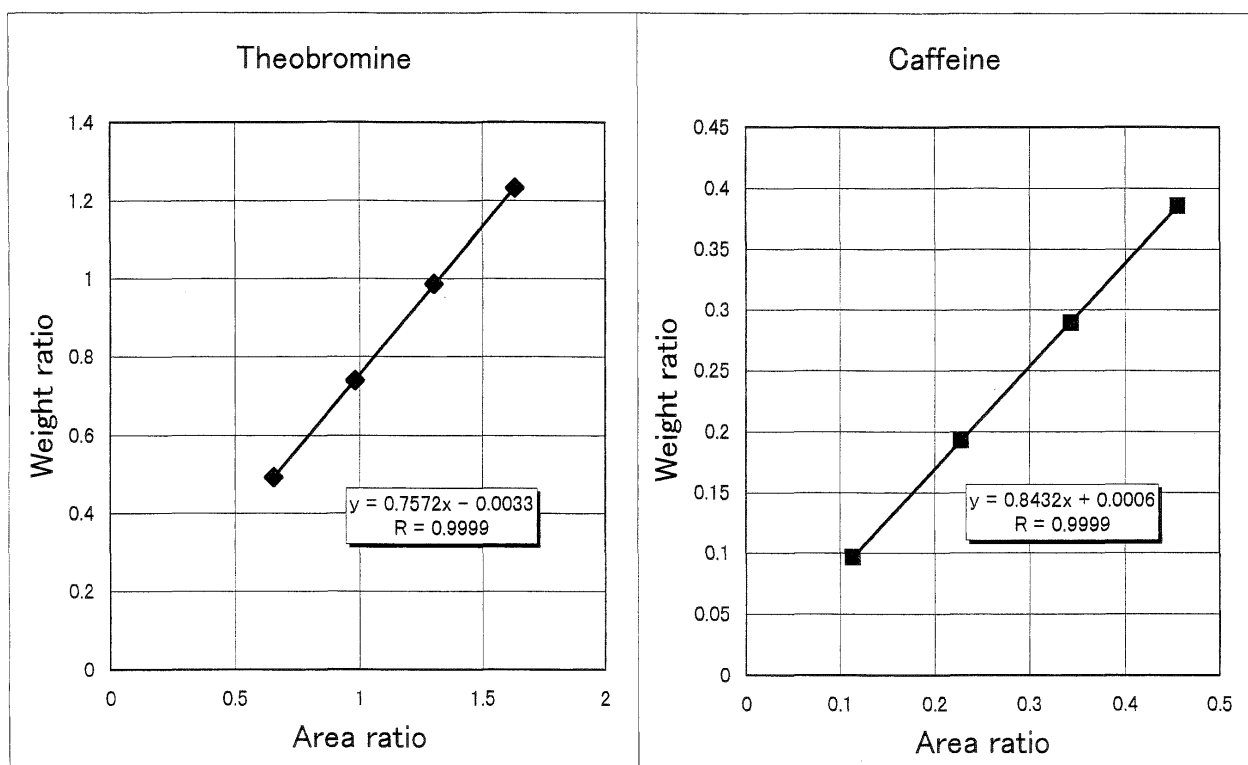


Fig.2 Calibration curve of Theobromine and Caffeine (n=3)

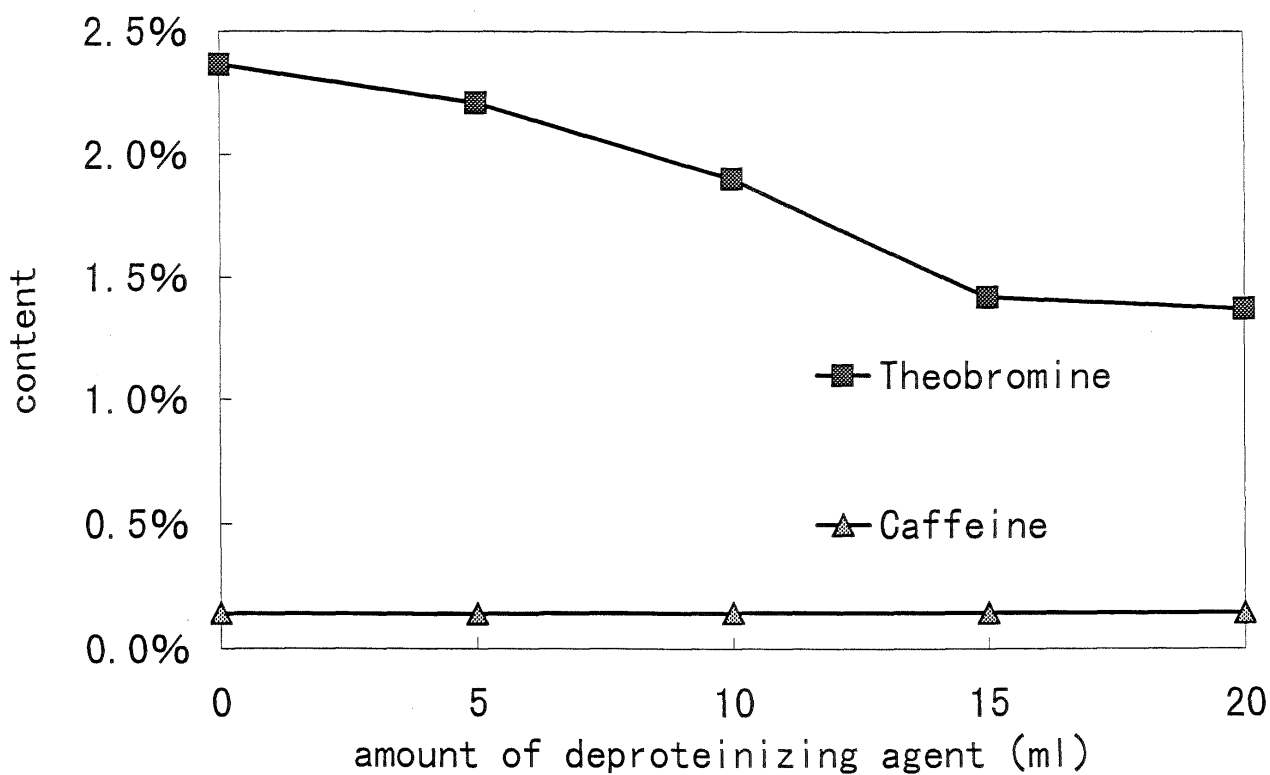


Fig.3 Influence of deproteinizing agent

の含有量について、比較したところ、Fig. 3 に示すように除たんぱく剤の添加量に伴って、テオブロミンの含有量が低く回収された。これは、除たんぱく剤によって凝集したたんぱく質にテオブロミンが取り込まれてしまうためと考えられる。

そこで、除たんぱく剤の影響を受けない方法として、除たんぱく剤添加後に溶液を加熱し、温かいうちにろ過する方法を検討した。この方法で、テオブロミン、カフェインを定量したところ、除たんぱく剤を添加しない場合と同等の回収率が得られた。

### 3.4 試料調製

内部標準法、除たんぱく工程を検討した結果、次のような試料調製を行った。

試料を 50ml 容遠沈管に精秤し、石油エーテル 30ml を加えて分散した後、5,000rpm (約 2,800 G) で 10 分間遠心分離する。この後さらに水 10ml を加えて 7,500rpm (約 6,300 G) で 15 分間再度遠心分離する。遠心分離後、ピペットで上層の石油エーテルを取り除く。(石油エーテルに分散しない試料については、この操作は省略した。)

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、水で内容物を洗い、洗液はすべて三角フラスコに移し入れる。この後に水を加えて全量を約 100ml にする。

これを 100 の湯浴中で時々攪拌しながら 25 分間加熱する。加熱後冷却し、これに内部標準溶液を添加し混合する。更に、

除たんぱく剤 A 及び B を各 10ml 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。

この溶液を再度 100 の湯浴中で時々攪拌しながら 10 分間加熱後、ただちに温かいうちにろ紙でろ過し、放冷後 0.45 µm のメンブランフィルターでさらにろ過したものを HPLC 用の検液とした。

従来法では、石油エーテルのみで遠心分離を行っていたため、上澄み液が透明にならない場合には、遠心分離の回転数及び回転時間を調整する工夫が必要であった。今回、水を加えて遠心分離を行うことにより、エーテル不溶分は下層の水層部に沈降するため、遠心分離の条件を工夫する必要はなくなった。また、分析試料採取量から考えて、従来 2 回行っていた脱脂工程は、1 回 30ml で十分であると判断した。

従来は加熱工程の後メスフラスコに移し定容する操作を行っていたが、内部標準法に改良したことにより、三角フラスコのまま全量を約 200ml にすることで操作を簡便にすることができた。

この方法で行うことにより検液調製の時間を約半分に短縮することができた。

### 3.5 定量結果

ココア粉 3 点、実試料としてココアと粉乳の調製品 3 点及び調製香料として用いられるチョコレートペースト 1 点についての定量結果を Table 1 に示す。

Table1 The measurement result of fat - free dry cocoa content

	existent method	improved method			
		Ave.	RSD	CV	(n)
cocoa powder a	—	77.42%	0.3771	0.49%	(12)
b	—	69.10%	0.7980	1.15%	(42)
c	—	69.31%	0.0987	0.14%	(4)
sample a	19.19%	19.50%	0.1140	0.58%	(4)
		19.97%	0.4749	2.38%	(4)
b	20.30%	20.37%	0.2430	1.19%	(4)
		20.86%	0.4173	2.00%	(4)
c	—	10.79%	0.0636	0.59%	(4)
chocolate paste	4.5%	4.48%	0.0186	0.41%	(8)

sample a ; whey 15%、skimmed milk 20%、malt dextrin 35%、  
cocoa powder 15%、other 15%

sample b ; whey 15%、skimmed milk 25%、malt dextrin 35%、  
cocoa powder 15%、other 15%

sample c ; skimmed milk 85%、cocoa powder 15%

従来法と新法の定量結果を実試料 a, b 及びチョコレートペーストと比較すると、ほぼ同じ値を示した。

また、実試料 a, b について、複数の分析者により実験を行った結果、標準偏差及び変動係数はともに小さな値を示した。

### 3.6 新たな HPLC 分析条件の検討

#### 3.6.1 分離条件

テトラヒドロフランを用いて、混合比、カラム温度、流速について変化させ検討した結果、分析時間としては 28 分程度かか

るものの、カフェイン、テオブロミン及び内部標準の分離が良好で他の成分ピークに影響を受けない条件として、

カラム温度及び流速；45℃，1.5ml/min

移動相；テトラヒドロフラン：水 = 1：100

が最適であった。

この分離条件におけるクロマトグラムを、Fig. 4 に示す。カフェイン、テオブロミン及び内部標準は良好な分離を示した。

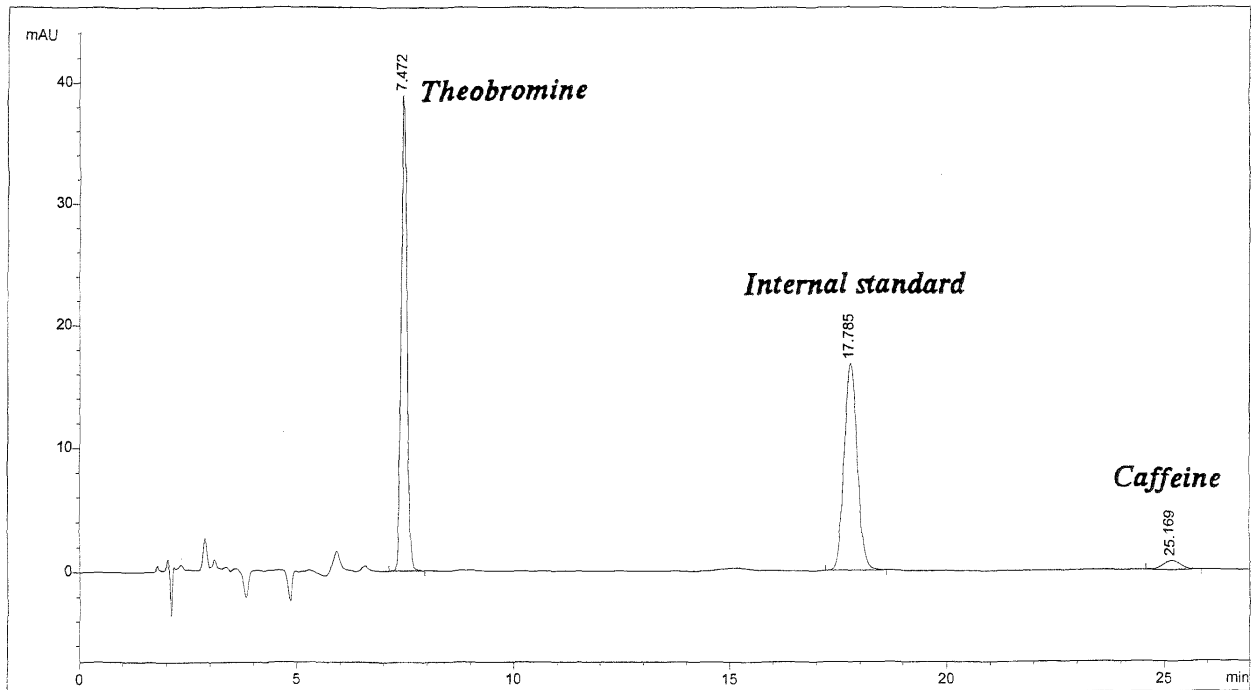


Fig.4 Liquid chromatogram of cocoa extract with internal standard.  
Mobile phase ; THF : H<sub>2</sub>O (1 : 100), Column ; L - Column ODS 4.6 mm I.D. × 250 mm  
Column temperature and flow rate ; 45℃ , 1.5ml / min, Detector ; UV 273nm

Table2 The measurement result of fat - free dry cocoa content by new HPLC condition

		existent condition	new condition			
			Ave.	RSD	CV	(n)
sample	a	19.74%	19.04%	0.2065	1.08%	(4)
	b	20.65%	20.54%	0.1734	0.84%	(4)

sample a ; whey 15%、skimmed milk 20%、malt dextrin 35%、  
cocoa powder 15%、other 15%

sample b ; whey 15%、skimmed milk 25%、malt dextrin 35%、  
cocoa powder 15%、other 15%

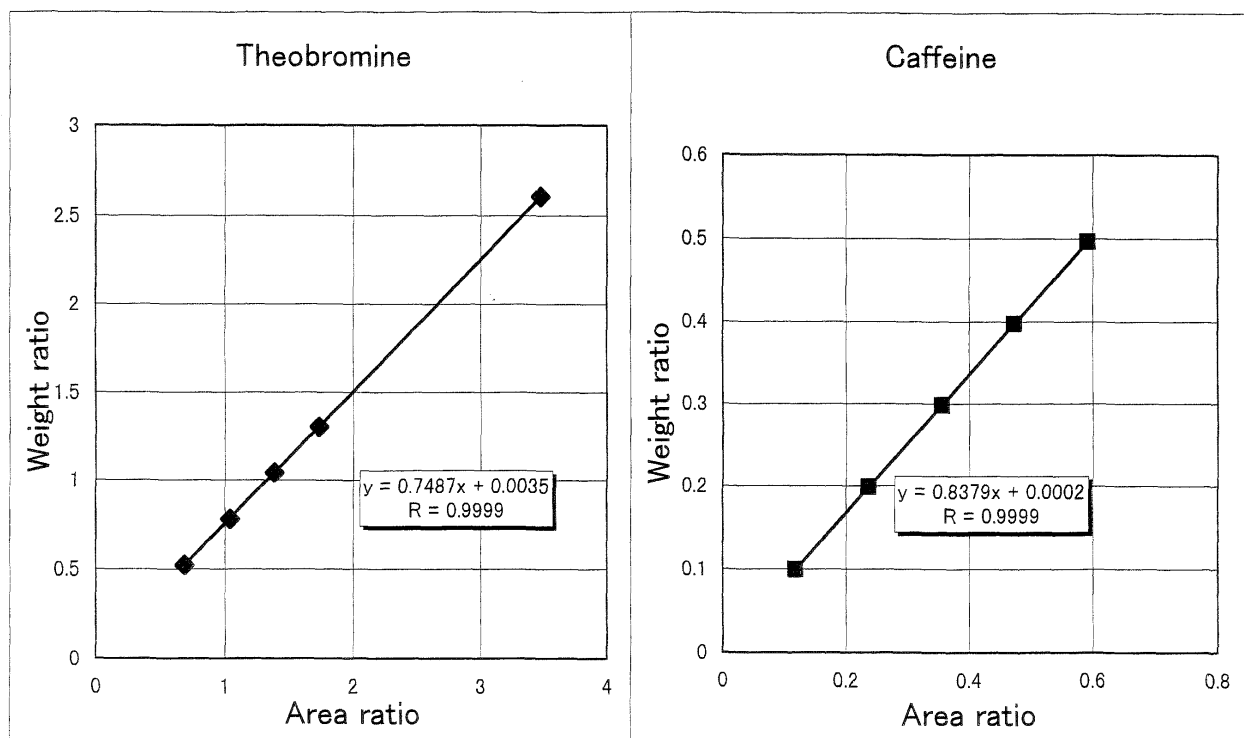


Fig.5 Calibration curve of Theobromine and Caffeine by new condition (n=3)

### 3.6.2 定量結果

無脂肪ココア分の定量結果を Table 2 に示す。テオブロミン、カフェインの検量線 (Fig. 5) は良好な直線性を示し、従来の分離条件での定量結果と比べても遜色のない結果が得られた。

## 4. 要 約

- HYDROXYETHYLTHEOPHYLLINE を内部標準として用いた液体クロマトグラフ法により、ココア分の迅速且つ高精度な定量分析が可能となった。

試料検液の前処理方法は、従来の方法では、煩雑な部分が多かったが、内部標準法に改良することにより、迅速・簡便化することができた。

又、液体クロマトグラフカラムの負荷を軽減するため、除たんぱく剤の添加・影響について検討したところ、除たんぱく剤添加後の試料溶液を加熱することにより、回収率に影響しない方法を確立することができた。

最後に、現在の分離条件が使用できない場合の代替可能な新しい分離条件として、テトラヒドロフランを使用し、有機溶媒の使用率が少ない分離条件を提案した。

## 文 献

- 1) F.T. Delbeke, P. De Backer : Journal of Chromatography B, 687, 247 - 252 (1996)