

報 文

ガスクロマトグラフィーによる粗カフェイン 中のカフェインの分離定量

佐 藤 宗 衛, 大 野 幸 雄*

ガスクロマトグラフィーにより、カフェイン原料として輸入される粗カフェイン中のカフェインの分離定量法について検討した。カフェインは2%シリコーン OV-17 を充てん剤とする4m ガラスカラム、カラム温度 225 の条件下で、テオブロミン、テオフィリンなどのプリン塩基成分及び他の共存成分から完全に分離することができた。内部標準物質はモル感度の近接するフェナセチンが適当であり、フェナセチンに対するカフェインの重量比と面積比の間には直線関係が成立した。本法のくり返し精度は、変動係数として1%以下で、再現性は良好であった。追加法によるカフェインの回収率は99~100%であり、添加量と回収量との間に有意差は認められなかった。

本法を輸入粗カフェイン中のカフェインの定量に応用し、満足すべき結果が得られた。

1 緒 言

茶葉、コーヒー及びココアなどに存在するカフェインは、これらの食品の嗜好的価値を付与する成分の一つであり、また、カフェインは各種の薬理作用を利用して医薬品製剤としても広く用いられる。

主に医薬品の原料として輸入されているカフェインは純粋な形で輸入される場合は少なく、80~95%程度のカフェインを含有する粗カフェインの形で輸入されている。これらのものはカフェイン含有量により関税率が異なるため、純度の確認が必要となっている。

従来、植物体を起源とするカフェインの分析は、薄層クロマト法¹⁾、カラムクロマト法²⁾などで、カフェインと他の成分、とくにテオブロミン、テオフィリンなどのプリン塩基成分を分離して分光学的に定量する方法が最も一般的であり、対象とする試料に応じた種々の報告がなされている。

しかし、これらの方法の多くは、少量のカフェインを含有する試料を対象としたもので、比較的多量のカフェインを含有する試料中のカフェインの定量法は少なく、Donald³⁾や前田⁴⁾らのNMR法が報告されているほかは、非水滴定法⁵⁾が利用されているにすぎない。これらの方法は簡易且つ迅速性を特長とし、多数の試料の分析には

優れた方法と考えられる。しかし、非水滴定法は、粗カフェインのような着色試料に対しては終点の判別に熟練を要し、さらに、テオブロミンやテオフィリンなどのプリン塩基類が共存するときはこれらの含量として定量されるため問題があった。最近、ガスクロマト法の利用が検討され、微量のカフェイン分の定量法も報告されている。^{6), 7), 8)}

著者らは、ガスクロマトグラフィーにより粗カフェイン中のカフェインを、他のプリン塩基成分の共存下で分離定量する方法について検討し、良好な結果が得られたので報告する。

2 実 験 方 法

2・1 試料

実験に用いた試薬及び輸入試料は次のとおりである。

標準カフェイン：メルク製品を昇華法により精製し、昇華前後の純度を比較したが、差がないので、80 の真空乾燥で2時間乾燥したものを標準として使用した。この乾燥条件で、カフェインは無水物となるので、輸入試料の乾燥もこの条件で同様に行なった。

フェナセチン：キシダ化学製（元素分析用）

アンスロン：和光純薬製（特級）

テオブロミン：東京化成製（特級）

ベンジル：東京化成製（特級）

* 大蔵省関税中央分析所 千葉県松戸市岩瀬 531

プロカイン (塩基): シグマ社製。

テオフィリン: 東京化成製 (特級)

輸入試料: 米国, 台湾, 西ドイツ, フランスの各国で製造, 輸入された粗カフェインを, 乾燥, 粉碎後, さらに, 80 °C で 2 時間真空乾燥したものをそのまま用いた。

2・2 ガスクロマトグラフ及びインテグレーターの測定条件

機種: 島津 GC - 5 APF

カラム充填剤: 2 % シリコン OV - 17, クロモソルブ GAW, DMCS, 80 ~ 100 メッシュ

4 m ガラスカラム

カラム温度: 225 °C, 注入口温度: 290 °C

キャリアーガス: He: 60ml/min., H₂: 45ml/min.

Air: 0.8l/min., 検出器: FID

インテグレーター: 島津 ITG - 2 A. Threshold: ∞, Delay: 0, Peak Detector: 30μv/min.

2・3 実験操作

検量線用の標準液は標準カフェイン 0.1g ~ 0.4g を 10ml のメスフラスコに正確にはかり, これに内部標準物質 0.1g を加え, クロロホルムを加えて溶かし, 定容して調製した。試料溶液は乾燥した試料 0.2 ~ 0.3g を正確にはかり, 内部標準物質 0.1g を加え, クロロホルムを加えて定容後, ろ過し, ろ液について分析した。ガスクロマトグラフへの注入量はいずれも 1μl ある。カフェイン及び内部標準物質のピーク面積はデジタルインテグレーターにより求めた。試料中の無水カフェイン分は内部標準物質とカフェインとのピーク面積比から検量線により重量比を求め, 次式により算出した。

$$\text{無水カフェイン分} = \frac{R \times I_w}{S_w} \times 100$$

ただし, R はフェナセチンに対するカフェインの面積比より求めた重量比, I_w は内部標準物質の採取量 (g) S_w は乾燥試料の採取量 (g)

3 結果及び考察

3・1 カフェインの分離条件

粗カフェインには主成分のカフェインのほか, テオブロミン, テオフィリンなどのプリン塩基類, 炭化水素, 油脂及び脂肪酸などの脂質成分, さらに, 各種の糖質, アミノ酸類も少量存在しており, カフェインを正確に定量するには, これらの共存成分とくにプリン塩基類相互の分離条件を選択する必要がある。

カラム充填剤としては, 一般に高沸点化合物の分離に適したシリコン OV - 101 (5 %, 2 m ガラスカラム) Dexsil 300GC (2 %, 2 m ガラスカラム) 及びシリコン OV - 17 (2 %, 4 m ガラスカラム) などのシリコン系無極性または微極性液相のものを検討した結果, これらの充填剤のうち, プリン塩基類の相互の分離に優れているのは 2 % シリコン OV - 17 であり, 以下の実験はすべてこのカラム充填剤を用いて行なった。

2 % シリコン OV - 17, 4 m ガラスカラムを用いたときの, プリン塩基成分のガスクロマトグラムを Fig.1 に示した。このカラムでは, カフェインのピークにテーリング現象がほとんどみられず, また, 保持時間の近接したテオブロミンとの分離も良好であり, 定量の目的に充分使用できることが判明した。

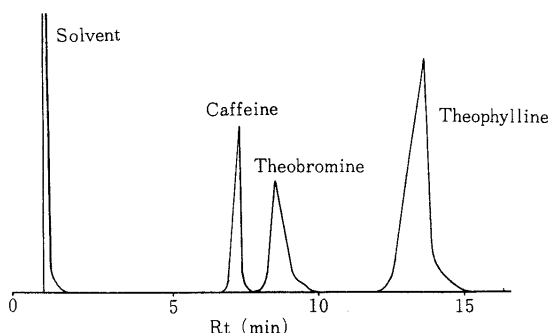


Fig.1 Gas chromatogram of purine bases
Column: Silicon OV - 17(2%) on chromosorb
GAW DMCS, 4m glass column
Temp: Column, 225 °C, Inj., 290 °C

3・2 内部標準物質の選択

ガスクロマトグラフィーにより微量のカフェイン定量用の内部標準物質として, 既に, ジオクチルフタレート⁶⁾, プロカイン⁷⁾あるいは 5 - アミノキノリン⁸⁾などを利用した報告がみられるが, 著者らは, 高純度で入手しやすい内部標準物質として, アンスロン, ベンジル, プロカイン及びフェナセチンについて, カフェイン及び共存成分との分離性, カフェインとの相対重量感度などを検討した。

Fig.2 は 2 % シリコン OV - 17 (4 m カラム) をカラム充填剤として用いたときのカフェイン及びこれらの内部標準物質のクロマトグラムを示したものであり, また, カフェインに対する相対重量感度を Table. 1 に示した。

ベンジルのピークはテーリングもなく, 保持時間が約 5.5 分で, カフェインのピークと近接しており, 内部標準物質として適したものと考えられたが 相対重量感度が

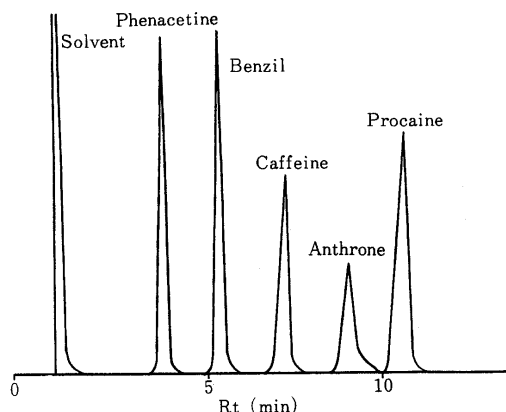


Fig.2 Gas chromatogram of caffeine and internal standard substances

GC conditions are the same as cited in Fig.1

Table 1 Relative weight response of internal standard substance to caffeine

Internal standard substance	Relative weight response.
Phenacetine	1.77
Benzil	2.80
Anthrone	2.11
Procaine	1.44

約3倍もあるため、実際、定量精度に問題があった。アンスロンは保持時間が約9分で、カフェインのピークに近接しているが、本条件下では僅かにテーリング現象がみられること、相対重量感度もカフェインと著しく異なることから内部標準物質として適当でない。含窒素化合物であるプロカインのピークはテーリング現象のない良好な分離を示しており、相対重量感度もカフェインにより近似している。しかし市販のプロカインにはカフェインに近接する未同定の不純物が少量含まれ、カフェイン

のピークに一部重なるため純度の点で直ちに用いることができなかった。一方、同じ含窒素化合物であるフェナセチンはプロカインに比較して、相対重量感度はやや大きい、カフェイン、テオブロミン及びテオフィリンなどのプリン塩基類との相互分離は完全であり、また純度、入手の容易さなどを考慮すると、これらの内部標準物質のうち最も優れていた。従って、以下の実験はフェナセチンを内部標準物質に用いて行った。

3・3 検量線

フェナセチンを内部標準物質として、2・3の方法により調製した検量線用標準液を用い、それぞれ1μlずつガスクロマトグラフに注入してクロマトグラムを測定し各濃度におけるカフェインとフェナセチンとの面積強度比を求めた結果をTable 2に示した。各濃度の5回のくり返し注入における標準偏差は0.014、変動係数として、0.7%以下であり、くり返し精度は良好であった。各濃度における面積比の平均値を重量比に対してプロットして作成した検量線をFig.3に示した。最小二乗法により求めたこの検量線の回帰式は $y = 0.5598x - 0.012$ 、回帰からの標準偏差は0.0102である。切片(a)について、t検定を行った結果、 $t_a = 0.47$ であり、この値は、危険率5%、自由度3のt分布表のt値(3.18)より小さく、回帰線は原点を通るものと考えられる。また、一元配置法による分

Table 3 Table of analysis of variance

Source of variation	D. F*	Sum of squares	Mean square
General	24	5.80990058	
Within class	20	0.00102	0.000051
Regression	1	5.80843695	
Remainder	3	0.00044363	0.0001479

Fo = 2.90

Fo(3, 20 : 0.05) = 2.90 < F(3, 20 : 0.05) = 3.10

*DF : Degrees of Freedom .

Table. 2 Data for calibration curve .

Caffeine / Phenacetine (Weight ratio)	Caffeine / Phenacetine (area ratio)							C. V. (%)
	1	2	3	4	5	$\bar{x}$	σ	
1.0154	0.5586	0.5562	0.5558	0.5616	0.5599	0.5584	0.0025	0.44
2.2415	1.2416	1.2296	1.2344	1.2381	1.2369	1.2361	0.0045	0.36
2.5325	1.4108	1.4038	1.4185	1.4137	1.4110	1.4116	0.0053	0.38
2.9618	1.6393	1.6462	1.6408	1.6389	1.6412	1.6413	0.0029	0.18
3.6069	2.0333	2.0028	2.0089	1.9969	2.0092	2.0102	0.0139	0.69

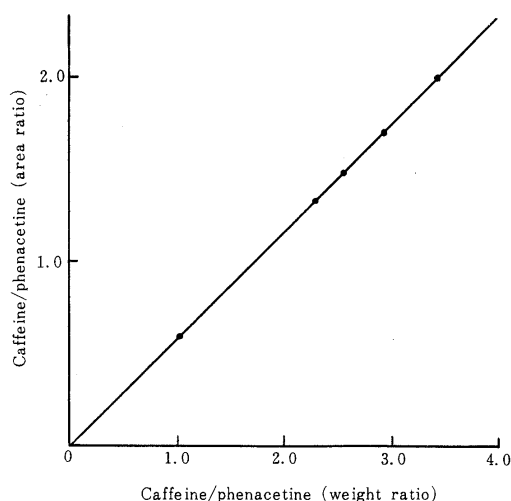


Fig.3 Calibration curve

散分析を行ない、重量比と面積比との直線性を検討した結果は、Table 3 に示すように、 $F_{\alpha}(3, 20; 0.05) = 2.90$ となり、危険率 5% における F 分布表の値(3.10)より小さく重量比 1.0 ~ 3.6 の範囲では重量比と面積比との間には直線関係があり、検量線として、十分使用できることが明らかとなった。

3・4 共存成分の影響

粗カフェイン中の共存成分を検討するために、各国産の粗カフェインを石油エーテル、エーテル及びクロロホルムなどを用いて溶媒抽出し、抽出物及び抽出残渣をカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー及びペーパークロマトグラフィーで分離し、赤外吸収スペクトルを測定して検索した結果、カフェイン以外のプリン塩基成分としてテオブロミン、テオフィリンが検出され、さらに、炭化水素、油脂、脂肪酸などの脂質成分、グルコース及びオリゴ糖類、各種アミノ酸の存在も確認した。これらの成分は各国産粗カフェイン中にカフェイン含有量の多少に拘らず共通して存在する。つぎに、追加法を用いてこれらの成分が、カフェインの定量値に影響するか否かを検討した。すなわち、これらの共存成分を比較的多量に含む低カフェイン含有量の試料（米国産：カフェイン含有量：58.58%）に各種の濃度になるよう標準カフェインを加えて調製したものをを用い、本法によって定量し、添加したカフェインの回収率を求め、Table 4 に示した。

Table 4 Recovery of caffeine by addition method

No.	Caffeine			
	Added(g)	Added(%)	Total caffeine content(%)	Found(g)
1	0.0787	60.82	83.8	0.0788
2	0.1186	70.26	87.0	0.1174
3	0.2048	80.13	91.9	0.2052
4	0.3002	85.07	93.1	0.2976

$$a = 0.0007, b = 0.9913, t_a = 0.85, t_b = 2.06$$

$$t(2, 0.05) = 4.3$$

Table 4 に示すように、いずれの添加量でも 99 ~ 100%回収される。この場合の標準偏差は 0.00072 で、この値は添加したカフェイン量に対して 0.23 ~ 0.9%に相当する。また、添加量と回収量との相関性を t 検定により検定した結果、 t_a 及び t_b はいずれも危険率 5%，自由度 2 の t 表の値(4.3)より小さく、添加量と回収量との間には有意差がないものと考えられる。また、粗カフェイン中の共存成分は、この条件では、定量値にほとんど影響がなく、本法は粗カフェイン中のカフェインの定量法として、十分に利用できることが判明した。

3・5 輸入粗カフェインの分析

原産地及びカフェイン含有量の異なる数種の輸入粗カフェインの分析に本法を応用し Table 5 に示した。測定は同一試料より 5 検体採取して行なった。この結果から、カフェイン含有量及び産地などの違いに拘らず、同一試料に対する 5 検体の定量精度は標準偏差 0.95、変動係数として 1%程度であり、良好なものと考えられる。

Table 5 Analytical results of imported crude caffeines .

No.	A (W, Germany)	B (U. S. A)	C (France)
1	70.1	94.6	92.4
2	68.8	93.8	90.3
3	69.8	93.0	91.4
4	69.2	93.7	91.5
5	68.4	93.0	92.7
$\bar{x}$	69.3	93.6	91.7
σ	0.70	0.67	0.95
C. V. (%)	1.01	0.72	1.06

本研究を行なうにあたり、実験に御協力いただいた
公害保障保険協会、西田良信氏、また種々の御助言をいた
だいた当所、第3分析室長三輪三郎氏、第2分析室長出

来三男博士に感謝致します。

(本研究の一部は第11回税関分析研究発表会で発表
し、また、分析化学に投稿中のものである。)

文 献

- 1) Um, Sena Nayake, R. O. B Wijesekera : *J. Chromatog.*, **32**, 75, (1968).
- 2) G. P. Schutz, A. J. Prinsen, A. Pater : *Rev. Int. Choc. (RIC)* **25** (1970).
- 3) Donald, P. Hollis : *Anal. Chem.*, **35**, 1682 (1963).
- 4) 前田宏, 入江隆夫, 早野弘道 : 本誌 **9**, 25 (1969)
- 5) 第八改正日本薬局方第一部解説書 : C - 553, 1972 (日本公定書協会).
- 6) Kamei Katsutoshi, Momose Atushi : *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, **21**, (6), 1228 (1973).
- 7) Fogden, E., Urry, S. : *J. Ass. publ. Analysts*, **11**, (4), 104 (1973), *Anal. Asbt.* **27**, 415 (1974).
- 8) Vitzhum, Otto G; Barthels, Manfred, Kwasny, Helmut : *Z. Leben smittelunters. U. Forsch.*, **154**, 135 (1974), *Anal. Abst.*, **27**, 2908 (1974).

Determination of Caffeine in Crude Caffeine by Gas-Liquid Chromatography

Soei SATO, Yukio ONO*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 531, Iwase, Matsudoshi, Chibaken.

A new method for the determination of caffeine in crude caffeine imported as industrial raw material has been developed. Caffeine was separated completely from other purine bases such as theobromine, theophylline by using 4m glass column packed with 2% Silicon OV - 17 on Chromosorb. GAW DMCS at 225.

Calibration curve was obtained by using phenacetine as internal standard substance. The relation between weight ratio of caffeine to phenacetine and its area ratio was showed to be linear by t-test and F-test. The reproducibility of this method was below 1% as coefficient of variation. From the results of the examination by addition method, the relation between the amount of added caffeine and its recovery was not significant.

—Received Sep. 13, 1975—