

テオブ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ブ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ナー (試料側 270nm, 対照側 320nm) によるデンシトグラム作成。この条件により, テオブロミン 1.6 ~ 8 µg の範囲で, テオブロミンとフェナセチンの重量比とデンシ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ブロミン含量をこの方法により定量し, 良好な結果が得られた。

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ブロミンを定量し, この値からココア分を算出している。テオブ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, ココア中のテオブロミンを抽出後, 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, テオブロミン, カフェイン及び総アルカロイ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ブロミンを分離し, 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ブ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ブ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

テオブロミン: 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

テオブ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 - ブタノール(1:1 v/v) の混合溶剤を用いて加熱(100 °)溶解した場合, テオブロミンの溶解度は約 0.2%であった。したがって, ココア中のテオブロミン含量

*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 $2\text{g} / 100\text{ml}$ 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、テオブ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ブロミン、カフェイン及びフェナセチンの分離条件

テオブロミン、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、そのデンストグラムもほぼ対称形であった。

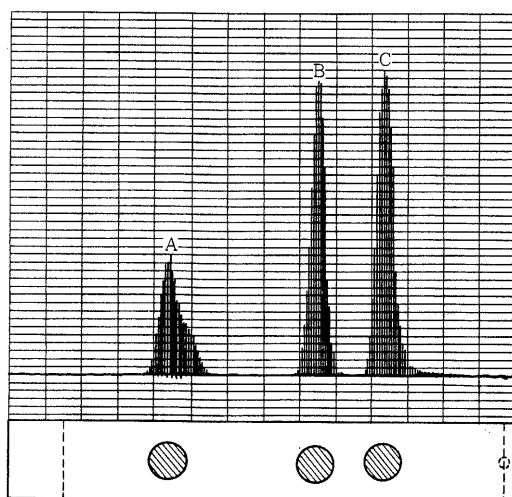


Fig. 1 TLC chromatogram and UV absorption profile
Solvent system : Acetone-chloroform-ethanol (6 : 4 : 1v/v) .
A : Phenacetine, B : Caffeine, C : Theobromine

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。このようにテオブロミンでは 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。テオブロミンとカフェインの極大吸収は近接しているため、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。デンストグラムの測定は、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、テオブロミン、カフェイン及びフェセチンの吸光度は 0.0 である。

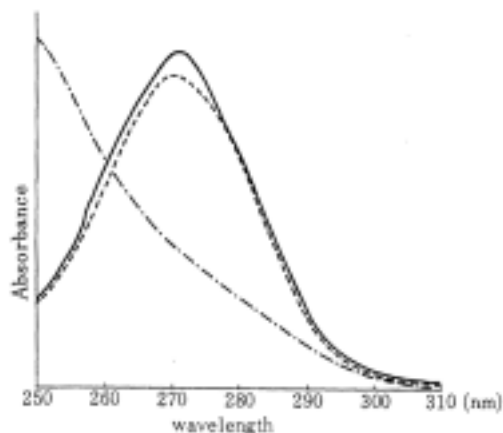


Fig. 2 UV absorption spectra on a thin-layer chromatogram of theobromine, caffeine and phenacetine
Theobromine, Caffeine, - - - Phenacetine

3・3 テオブロミンの検出限界

テオブロミン、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 で測定したデンストグラムを Fig.3 に示した。デンストグラムに示したように、0.1 μg のテオブ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

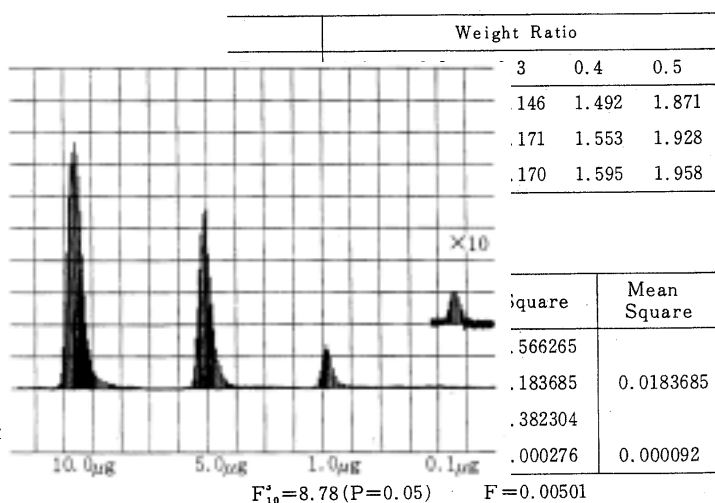


Fig. 3 Detection limit of the obromine method

3・4 検量線の作成

各種濃度のテオブロミンについて、フェナセチンを用いての重量比とデンス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 におけるデンストグラムを作図し、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	0.3	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なように、フェナセチンを用いての重量比と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 におけるデンストグラムを作図し、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、

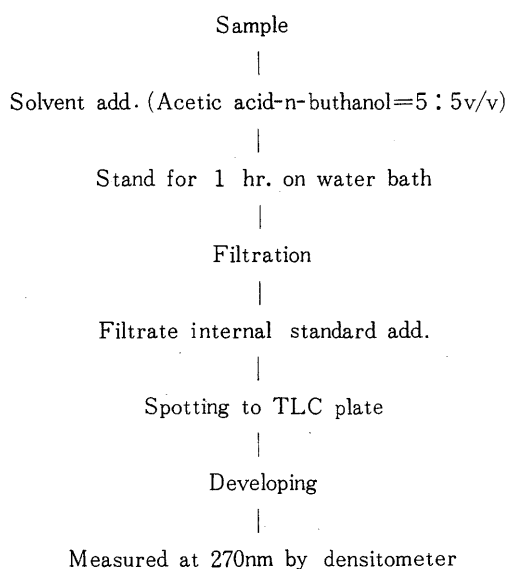


Fig. 4 Scheme of sample preparation

3・5 ココア製品中のテオブロミンの定量

ココア製品中のテオブ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 μ g 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、デンス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ブ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 法よりやや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ブロミンの分離は、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ス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、テオブロミンの含量とデンス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、高い精度でテオブロミンを定量できることを明らかにした。テオブロミンは酢酸 - 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ば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ブ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ブ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 μ 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