

ノート

高速液体クロマトグラフィーによるチョコレート類 中のテオブロミン、カフェインの分析

浅 野 成 子 , 井 上 昭 朗*

Quantitative Determination of Theobromine and Caffeine in Chocolate Products by High Performance Liquid Chromatography

Shigeko ASANO and Teruo INOUE*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance,
531, Iwase, Matsudo-Shi, Chiba-Ken, 271 Japan

Theobromine and caffeine were analysed by high performance liquid chromatography. Analytical conditions were as follows: column - Lichrosorb NH₂, 10 μ m particle size, 45cm \times 21mm, mobile phase - underlayer of dichloromethane. ethanol. water (1872: 94: 34 v/v), flow rate, 0.5ml/min. detect - UV detector, 275nm. Resorsin was used as the internal standard. The relationships between the weight ratio of theobromine or caffeine to resorsin and peak area ratio of then to resorsin were linear. For quantitative determination of them in practical samples, they were deffatted with petroleum ether, and then dried. The fat-free residue was extracted with water, and aliquot of the water extract was injected into chromatograph. This method was more convenient to the analysis of chocolate products than the Shutz method, but the results obtained by both method was the same order.

- Received Sep. 4, 1981 -

1 緒 言

関税率表上、ココア分やチョコレート分の定量が必要とされる例は多く(税番第 18.06 号, 第 19.02 号), その基礎資料としてココアの特有成分であるテオブロミンの定量が求められる。従来、税関や当所においても、その定量法については様々な試みがなされてきた^{1) - 3)}。現在は Schutz の方法によって定量が行われているが、この方法は長時間を要し、また有害な酢酸鉛や多量のクロロホルムを必要としている。ここでは、

より簡易にテオブロミン及びカフェインを定量する方法の 1 つとして、高速液体クロマトグラフィーについて検討したので報告する。

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

レゾルシン：メルク

* 大蔵省関税中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

2・2 実際試料

市販のココア及びチョコレート類、ガラナ種子粉末
(輸入品)

2・3

装置

島津 PRP-1 型定流量ポンプ, SPD-1 型紫外可視検
出器

測定条件

カラム: ステンレス, 45 cm × 2.1 mm

充填剤: Lichrosorb NH₂, 粒径 10 μm

展開溶媒⁴⁾: ジクロルメタン・エタノール・水
(1872: 94: 34, v/v) の下層

流速: 0.5 ml/min

検出: UV, 275 nm

3 結果及び考察

3・1 分離条件及び内部標準

クロマトグラフィーに用いる充填剤と展開液の組合せとして, μ-Bondapak C₁₈ (溶剤: メタノール・酢酸・水系, メタノール・水系), Zorbax Sil (溶剤: メタノール・水系), Lichrosorb NH₂ (溶剤: ジクロルメタン・エタノール・水系) などについて検討したが, Lichrosorb NH₂ とジクロルメタン・エタノール・水の系を用い, 流速 0.5 ml/min の条件がテオブロミン, カフェインの相互の分離が最も良く, ピークの形もほぼ対称形であった。そこでこの条件で以後の実験を行ったが, カラムの含水量によってピークの形が変動するので, 定量に際してはピーク面積法によった。また, 実際試料について定量時の操作の簡便さを考慮して, 内部標準を用いた。

内部標準としては, 薄層クロマトグラフィーによる定量法で用いているフェナセチンの他, アミノアンチピリンやプロカイン, レゾルシンについて検討したが, レゾルシンがテオブロミンの後に溶出し, 両者の分離も良かったのでレゾルシンを用いた (Fig. 1)。この場合, レゾルシンは未封切の新しい着色をしていないものを使用し, 再結晶などは特に行わなかった。

3・2 検量線の作成

テオブロミン及びカフェイン無水物約 100 mg を精秤

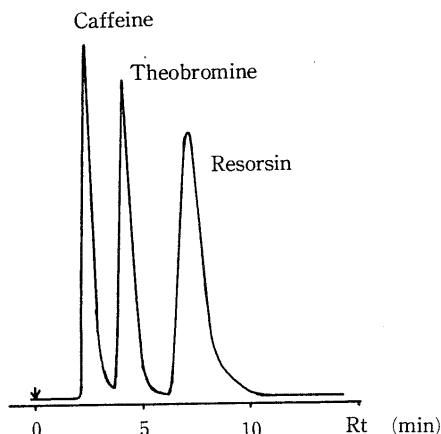


Fig. 1 Separation of caffeine, theobromine and internal standard

して各々 1:1 にメスアップしたものを 10:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:10 の比率で混合した液に対し, レゾルシン約 1 g を精秤して 100 ml にメスアップした液を一定量加え, これを検体として高速液体クロマトグラフィーを行った。得られたクロマトグラムの面積を半値巾法で求めた。5 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 に示す。また, テオブロミンについて F-検定を行った結果を Table 2 に示す。

この結果から, テオブロミンについて重量比と面積比の間には原点を通る直線関係が認められ, 回帰式は $Y = 3.037X \times 0.005$ であった。一方, カフェインにつ

Table 1 Regression analysis of theobromine and caffeine

	Theobromine		Caffeine	
	WT/WR	AT/AR	WC/WR	AC/AR
	0.0406	0.146	0.0402	0.118
	0.1014	0.302	0.1004	0.226
	0.2029	0.620	0.2009	0.510
	0.3043	0.934	0.3013	0.700
	0.4058	1.236	0.4018	0.982
X	0.2110	Y 0.6476	0.2089	0.508
	$Y = 3.037X + 0.005$		$Y = 2.375X + 0.011$	
	R : 0.9998		R : 0.9979	

ノート 高速液体クロマトグラフィーによるチョコレート類中のテオブロミン、カフェインの分析

Table 2 Regression analysis of theobromine

	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square
Total	24	4.08946	
In class	20	0.08924	0.004462
Regression	1	3.99815	
Residue	3	0.00207	0.000690

$$F(3.20, 0.01) = 4.94$$

$$F = 0.155$$

いても同様の結果が得られ、回帰式は $Y = 2.375X + 0.011$ であった。

これらのことから、レゾルシンを内部標準として高速液体クロマトグラフィーにより、テオブロミン及びカフェインを精度よく定量できることが示された。

3・3 チョコレート類中のテオブロミン及びカフェインの定量

実際試料からの検体の調製は以下の方法で行った⁹⁾。

試料(ココア粉末では 0.1mg~0.3g, ミルクチョコレートでは 3~4g, ブラックチョコレートでは約 1g を細かく砕いて遠沈管で秤量する。これに石油エーテル 30ml を加えてよく混合した後, 2500r.p.m で 10 分間遠心分離し, 上澄液を捨てる。この操作を 2 回繰り返す。乾燥させた残渣を蒸留水約 95ml で 200ml 容三角フラスコに移し入れ, 沸とう浴上で 25 分間加熱した後, 冷却する。これに内部標準として正確に秤り取ったレゾルシン約 50mg を加え, 2,500r.p.m. で 5 分間遠心分離し, 上澄液を 0.45 μ m メンブランフィルターでろ過したものを検体とした。

実際試料として, チョコレート類 3 種及びココア粉末についてテオブロミンを, ガラナ種子粉末についてカフェインを定量した際のクロマトグラムを Fig. 2~4 に, 定量結果を Table 3 に示す。

本法で得られた結果と Schutz 法で得られた結果について t-検定を行ったところ, 危険率 5% で有意差は認められなかった。

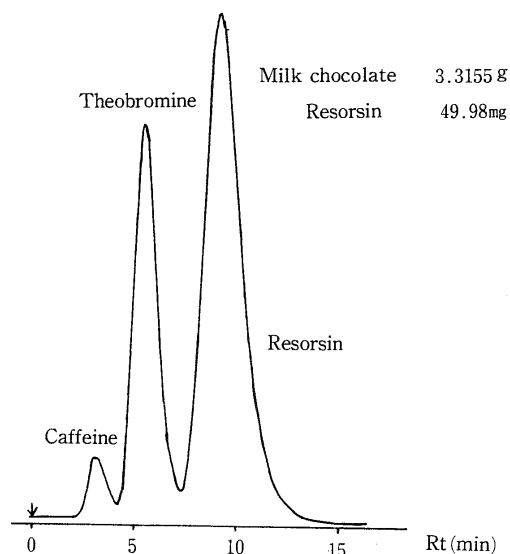


Fig. 2 HPLC of milk chocolate

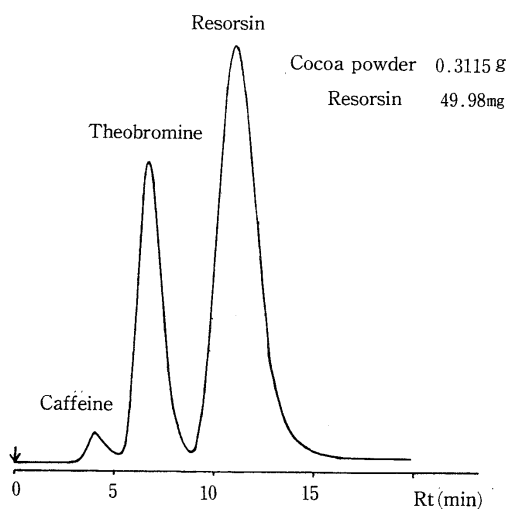


Fig. 3 HPLC of cocoa powder

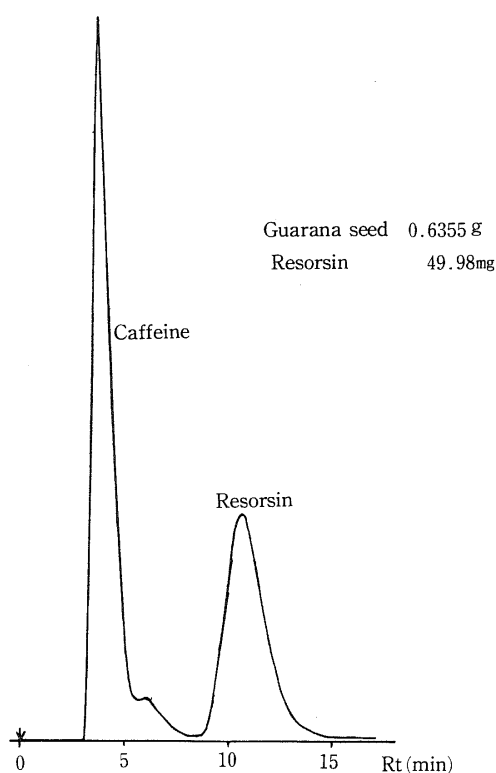


Fig. 4 HPLC of guarana

Table 3 Analytical results of commercial samples

	Theobromine (%)	
	HPLC method	Shütz method
Milk chocolate	0.24	0.22
Black chocolate	0.38	0.39
Associate chocolate	0.22	0.24
Cocoa powder	2.10	2.04
	Caffeine (%)	
Guarana powder	4.59	4.53

4 要 約

テオブロミン及びカフェインの高速液体クロマトグラフィーはカラムの充てん剤に Lichrosorb NH₂ , 展開液にジクロロメタン・エタノール・水 (1872 : 94 : 34 , v/v) の下層を用い , 275nm での吸光度を測定することにより良好的な結果が得られた。さらに , レゾルシンを内部標準とすると , テオブロミン及びカフェインの含量とピーク面積の間には直線関係があり , 高い精度で定量できることを示した。また , 実際試料の定量については , 脱脂後 , 熱水抽出して遠心分離 , メンブランフィルターでろ過したものをそのままカラムに注入することにより , 従来の Schutz 法に比べて , 迅速 , 簡易に多数の試料について定量でき , 従来の方法による定量値との間に有意差は認められなかった。

文 献

- 1) 川端欣吾 : 本誌 , 5 , 31 , (1967)
- 2) 石黒昌孝 : 本誌 , 13 , 39 , (1973)
- 3) 水城勝美 , 出来三男 : 本誌 , 18 , 53 , (1978)
- 4) W . Wildanger : J . Chromatogr . , 114 , 480 , (1975)
- 5) W . R . Kreiser , R . A . Martin , Jr : J . ASSOC . OFF . ANL . CHEM . , 63 , 591 , (1980)