

ココア含有調製食料品中のテオブロミン及びカフェインの定量分析法について

佐藤 晴紀*, 岩崎 智子*, 増田 靖子**, 徳島 將光**, 五十嵐 智大**, 松本 啓嗣**

Quantitative analysis of theobromine and caffeine in cocoa preparations

SATO Haruki*, IWASAKI Tomoko*, MASUDA Seiko**, TOKUSHIMA Masamitsu**,
IGARASHI Tomohiro**, MATSUMOTO Yoshitsugu**

*2-1-10, Shin-urashima-cho, Kanagawa-ku, Yokohama, Kanagawa 221-0031 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-0882 Japan

In this study, we investigated a new analytical method to identify theobromine and caffeine in cocoa-containing preparations. For the extraction method, the solubility of theobromine was increased by using phosphate buffer (pH 12.1). In addition, using hexane as a degreasing agent and ammonium bicarbonate as a deproteinizing agent aided efficient sample preparation. In the HPLC analysis, each peak was well separated by the gradient method. The results of the HPLC analysis were highly accurate and reproducible.

1. 緒 言

ココア及びその調製品は主に関税率表第18類に分類されるが、ココアを含有する穀物類及びベーカリー製品等は第19類に分類される。第19類への分類は「完全に脱脂したココアとして計算したココアの含有量（以下「ココア分」という。）」により判断されることとなるが、ココア分にはテオブロミン及びカフェインの含有量の合計に換算係数31を乗じた値を用いることが同表解説第19類総説に規定されている。したがって、調製食料品中のテオブロミン及びカフェインの含有量を定量することは関税分類上重要なである。

ココア分の定量分析法は、税関分析法No.112「ココアの定量分析法」¹⁾（以下「現行法」という。）に定められているが、次の三点について改善が望まれる。

一点目は、テオブロミンの水への溶解度が0.5 g/L²⁾と低いことである。現行法では、テオブロミンとカフェインを同時に定量しているが、水を抽出溶媒する本法では、テオブロミンが完全に溶解するよう、試料量を少なくして検液を調製しなければならない。しかしながら、カフェインはカカオ中の含有量が少なく、例えばチョコレート製品中のカフェイン含有量はテオブロミンの1/5～1/10程度³⁾である。そのため、テオブロミンの溶解度に合わせて検液を調製すると、検液中のカフェイン濃度が非常に低くなってしまい、正確な定量が困難となっている。

二点目は、抽出過程において、煮沸を二度行わなければならぬことである。伊藤らの報告⁴⁾によると、脱脂した試料からテオブロミンを煮沸抽出した後、除たんぱく剤を加えるが、この際溶解したテオブロミンも共沈してしまい、定量性が悪くなることか

ら再度煮沸抽出を行う必要がある。

三点目は、高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」とする。）のカラム選択及び分析条件に改善の余地があることである。現行法では、Zorbax ODS 4.6×250 mm またはこれと同等のカラムを使用し、移動相を水：アセトニトリル=85:15としたアイソクラティック法によりテオブロミン及びカフェインを定量することとされている。この分離条件では、逆相分配クロマトグラフィーによるものであるが、テオブロミンは保持力が弱いのに対し、カフェインの保持力が強い。テオブロミンと分析試料中の夾雜成分を分離するために移動相中の水の混合割合を高くすると、カフェインの保持時間が大きくなり、分析に長時間を要する。さらに、ピークがブロードになりS/N比が低下し、微量のカフェインの定量結果が悪くなると考えられる。移動相中のアセトニトリル混合割合を高くすると、カフェインのピークはシャープになり分析時間は短縮するが、テオブロミンを十分に保持することができず、分析試料中の夾雜成分と分離できない可能性がある。

そこで本研究では、上記の問題点について、テオブロミン及びカフェインの溶解性等を確認した上で新たな抽出方法及びHPLCの測定条件等を検討し、現行のココアの定量分析法の改良の可否について検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試薬及び試料

2.1.1 試薬

テオブロミン（東京化成工業）

カフェイン（富士フィルム和光純薬）

* 横浜税関業務部

** 財務省関税中央分析所

〒221-0031 神奈川県横浜市神奈川区新浦島町2-1-10

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

β -Hydroxyethyltheophylline (1,3-Dimethyl-7-[2-hydroxyethyl]xanthine) (以下「内標準物質」という。) (東京化成工業)
 テオフィリン (東京化成工業)
 50 mmol/L りん酸緩衝液 (pH2.8)
 (りん酸二水素カリウム 5.44 g 及びりん酸 0.68 mL を 1 L の水で溶解)
 134 mmol/L りん酸緩衝液 (pH12.1)
 (水酸化ナトリウム 1.34 g 及びりん酸水素二ナトリウム・12水和物 11.99 g を 250 mL の水で溶解)

2.1.2 試料

薄力粉 (Flour)
 全粉乳 (Whole milk powder)
 カカオ脂 (Cacao butter)
 乳児用粉ミルク (Milk powder for infants)
 クリーミングパウダー (Creaming powder)
 製菓用ミックス粉 (2種) (Mixed powder for confectionery, A and B)
 カカオマス (Cocoa paste)
 ココアパウダー (Cocoa powder)
 チョコレート製品 (Chocolate)

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 紫外可視分光光度計

装置 : UV-1850 UV-VIS spectrophotometer (島津製作所)
 測定波長 : 273nm

2.2.2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

装置 : LC-20 システム (島津製作所)
 検出器 : 紫外可視分光検出器 (SPD-20)

2.2.2 (1) 現行法のカラム及び移動相

分離カラム : L-Column ODS 4.6×250 mm
 (Zorbax ODS 4.6×250 mm カラムは廃版。同等であるオクタデシル基修飾カラムを使用。)

移動相 : 水 : アセトニトリル = 85 : 15

2.2.2 (2) 検討したカラム及び移動相 (アイソクラティック法)

分離カラム : Sunniest RP-AQUA, 250 mm×4.6 mm I.D.,
 粒径 5 μm (クロマニックテクノロジーズ)
 (オクタコシル基修飾カラムを使用)

移動相 : りん酸緩衝液 : アセトニトリル

2.2.2 (3) 検討したカラム及び移動相 (グラジェント法)

分離カラム : Sunniest RP-AQUA, 250 mm×4.6 mm I.D.,
 粒径 5 μm (クロマニックテクノロジーズ)
 移動相 : (A) りん酸緩衝液 : アセトニトリル = 25 : 75
 (B) りん酸緩衝液
 A : B = 6.6 : 93.4 (0 分) - 33.4 : 66.6 (15 分)
 - 100 : 0 (20 分, 10 分保持) - 6.6 : 93.4 (30 分, 15 分保持)

2.3 実験

2.3.1 HPLC の分離条件の検討

テオプロミン、カフェイン、テオフィリン及び内標準物質の試薬混合液を、2.2.2 (1)から(3)の条件で設定した HPLC で分析を行った。このとき(2)及び(3)にて使用した移動相溶液の水系溶媒は、テオプロミンの酸解離定数 ($pK_a = 9.9^2$) より十分に酸性である 50 mmol/L りん酸緩衝液 (pH2.8) を選択した。この移動相溶液中のアセトニトリル濃度を変化させ、最適な分離条件を現行法と比較しながら検討した。

2.3.2 テオプロミンの溶解性試験

テオプロミンは水酸化アルカリ、酸性溶液、20 %りん酸三ナトリウム水溶液等に可溶である^{2,5}ことから、水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH)、塩酸 (HCl) 及びりん酸緩衝液 (pH12) について、それぞれ 0.05 mol/L, 0.1 mol/L 及び 0.2 mol/L の濃度の溶液を調製 (HCl については、0.2 mol/L のみ) し、テオプロミン試薬を過剰に加えて約 30 分間時々搅拌しながら溶解させ、室温での溶解濃度を紫外可視分光光度計で測定した。

2.3.3 様々な pH における安定性試験

テオプロミン、カフェイン、テオフィリン及び内標準物質を 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム (pH13), 0.1 mol/L りん酸緩衝液 (pH12), 0.1 mol/L ほう酸緩衝液 (pH9.5) 及び 0.1 mol/L りん酸緩衝液 (pH7.0) に、各化合物の濃度が 100 ppm となるように溶解した溶液を調製した。これを 2.3.1 の条件に設定した HPLC で測定し、各化合物のピーク面積値の経時変化を確認した。

2.3.4 新たなテオプロミン及びカフェインの抽出法の決定

2.3.2 及び 2.3.3 の結果から、新たなテオプロミン及びカフェインの抽出方法 (以下「改良法」とする。) を決定した。

2.3.5 検量線の作成

テオプロミン 150 mg を 200 mL 容メスフラスコに正確に量り取り、134 mmol/L りん酸緩衝液 (pH12.1) 20 mL を加えて溶解した。これに水約 100 mL を加え、さらに 50 mmol/L りん酸緩衝液 (pH2.8) 50 mL を加えたのち、水を加えて定容したものを標準原液とした。カフェインは 50 mg を 500 mL 容メスフラスコに正確に量り取り、水を加えて定容したものを標準原液とした。内標準物質は 500 mg を 500 mL 容メスフラスコに正確に量り取り、水を加えて定容したものを作成した。

100 mL 容メスフラスコ 5 本にテオプロミン標準原液及びカフェイン標準原液をそれぞれ 2, 10, 15, 20, 30 mL ずつ加えた。これに内標準原液を 10 mL 加えた後、水を加えて定容したものを検量線用試料溶液とした。これらを 2.3.1 にて決定した HPLC の分離条件で測定を行い、改良法によるテオプロミン及びカフェインの検量線を作成した。

現行法については、規定どおりに検量線を作成した。

2.3.6 試薬の添加回収率試験

薄力粉、全粉乳及びカカオ脂各 0.2 g にそれぞれテオプロミン 20 mg 及びカフェイン 0.5 mg 添加した試料を改良法により抽出し、2.3.1 にて決定した HPLC の分離条件で測定を行い、テオプロミン及びカフェインの回収率を求めた。また、薄力粉、全粉乳及びカカオ脂各 0.1 g にそれぞれテオプロミン 10 mg 及びカフェイン 0.25

mgを添加した試料を現行法に従い抽出、測定し、テオブロミン及びカフェインの回収率を求め、改良法の結果と比較した。

2.3.7 試料測定及び混合試料回収率試験

カカオマス、ココアパウダー及びチョコレート製品について、改良法及び現行法によりカカオ分を求めた。次に製菓用ミックス粉（2種）及びクリーミングパウダーにカカオマスまたはココアパウダーを約50%（w/w）含有するように添加した混合試料計6種並びに乳児用粉ミルクにココアパウダーを約6%（w/w）含有するように添加した混合試料について、改良法及び現行法によりカカオ分を求め、先に求めたカカオマス及びココアパウダーのカカオ分から回収率を求めた。これらの試料について、改良法及び現行法の結果を比較した。

3. 結果及び考察

3.1 HPLCの分離条件の検討について

3.1.1 アイソクラティック法によるHPLC分析結果

テオブロミン、テオフィリン、カフェイン及び内標準物質試薬混合液を現行法における分析条件（2.2.2(1)）で測定した。HPLC測定結果をFig.1及びTable 1に示す。9分までにすべてのピークが出ており、短時間で測定されるものの、全体的にピークがブロードであり、特にその傾向はカフェインで顕著に見られた。また、試料に夾雑物としてテオフィリンが存在すると、内標準物質とピークが重なり、定量に支障をきたすことがわかる。

次に、テオブロミン、カフェイン及び内標準物質試薬混合液について、オクタコシル基修飾カラムを用いた2.2.2(2)の条件（以下「改良条件」とする。）で測定した結果をそれぞれFig.2及びTable 2に示す。移動相溶液中のアセトニトリル濃度は現行法と同じ15%のものに加え、10.5%及び4.5%の3種類の濃度で測定した。

Table 1 Results measured by current analytical methods for retention time (RT) and number of theoretical plates (NTP) of theobromine, caffeine, and internal standard.

Theobromine		Theophylline		Internal Standard		Caffeine	
RT	NTP	RT	NTP	RT	NTP	RT	NTP
4.30	3558	5.25	3654	5.60	3232	7.91	4223

Table 2 Results measured by improved analytical methods at each acetonitrile (AcCN) concentration in the mobile phase, retention time (RT) and number of theoretical plates (NTP) of theobromine, caffeine, and internal standard.

	Theobromine		Internal Standard		Caffeine	
	RT	NTP	RT	NTP	RT	NTP
AcCN 15%	4.15	14197	5.58	18022	7.50	14795
AcCN 10.5%	5.70	15325	9.57	21338	13.71	18792
AcCN 4.5%	15.68	21633	39.61	20382	58.62	21516

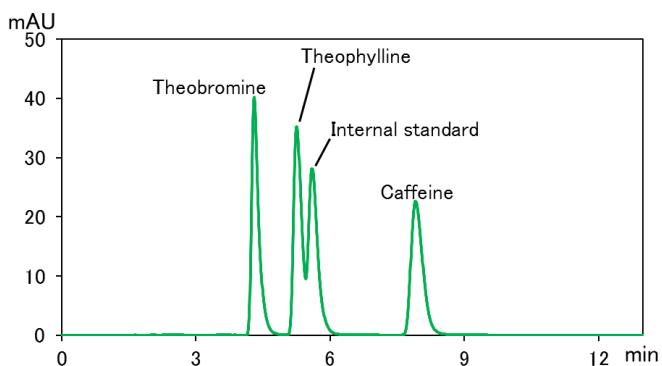


Fig. 1 Chromatograms of theobromine, caffeine, internal standard, and theophylline by current analytical methods.

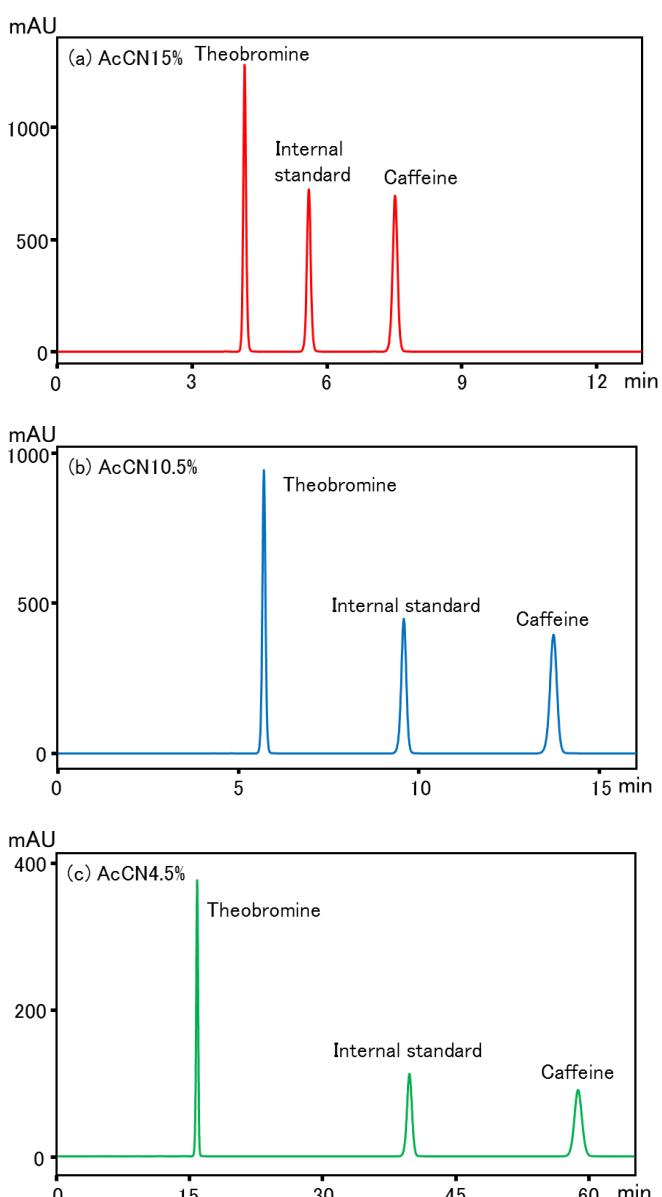


Fig. 2 At each acetonitrile (AcCN) concentration in the mobile phase, chromatograms of theobromine, caffeine, and internal standard by current analytical: (a) AcCN 15 %, (b) AcCN 10.5 %, and (c) AcCN 4.5 %.

現行法と、移動相溶液中のアセトニトリルが15%の改良条件を比較すると、いずれも溶離時間が同等であったが、改良条件の方は理論段数が高いことがわかった。比較的プロードであったカフェインのピーク形状もシャープになり、現行法のHPLC分離条件より改良条件の方が精度の高い定量を行えると考えられる。

改良条件において、移動相溶液中のアセトニトリル濃度別の測定結果をそれぞれ比較すると、アセトニトリル濃度が高い場合、テオブロミンの理論段数が大きく低下し、内標準物質の理論段数も低下することから、精度の低下が懸念される。これに加え、テオブロミンの保持時間が小さくなるため、保持時間が短い分析試料由来の夾雑成分との分離が難しくなる。一方、アセトニトリル濃度が低くなると、カフェインのピーク高さが低くピーク形状がプロードとなり、低濃度のカフェインを検出することが難しくなる。また、カラムへの保持が強いため保持時間が大きくなり、分析時間が長くなる。

以上の結果から、今回用いたカラムは現行法で指定されているものより精度及び分離能が高いことがわかったが、テオブロミン及びカフェインの同時定量を高精度に行うことは、アイソクラティック法では難しいと言える。そこで、分析中に移動相溶液中のアセトニトリル濃度を変化させながら各成分の溶出を行うグラジェント法を検討した。

3.1.2 グラジェント法によるHPLC分析結果

テオブロミン、テオフィリン、カフェイン及び内標準物質の試薬混合液について、グラジェント法による分析条件(2.2.2(3))での測定結果をFig.3及びTable 3に示す。

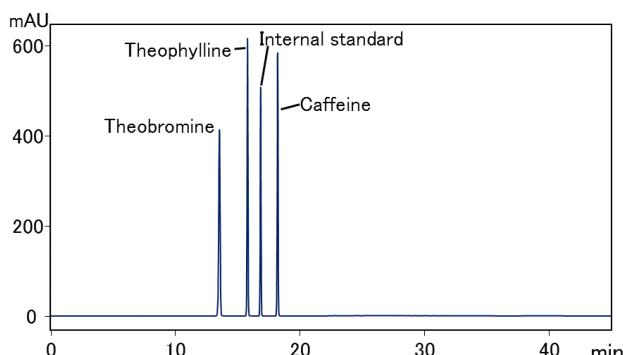


Fig. 3 Chromatograms of theobromine, caffeine, internal standard, and theophylline by gradient method.

Table 3 HPLC measurement results of theobromine, caffeine, internal standard, and theophylline by gradient method.

Theobromine		Theophylline		Internal Standard		Caffeine	
RT	NTP	RT	NTP	RT	NTP	RT	NTP
13.53	60896	15.79	177020	16.84	238685	18.20	254457

分析試料をカラムへ注入後、最初はアセトニトリル濃度が低い状態から始め、徐々に濃度を高くしていくことで、テオブロミン及びカフェインの溶出時間差を小さくすることに成功した。また、現行法では十分に分離することができないテオフィリン及び内標準物質を含め、4種の化合物のいずれもが良好なピーク形状及び理論段数を示し、分離も十分であった。以上のことから、この分離条件を改良法として用いることとした。

3.2 テオブロミン溶解性試験結果

水酸化ナトリウム水溶液(NaOH)、塩酸(HCl)りん酸緩衝液(pH12)のテオブロミン溶解性試験結果をTable 4に示す。

Table 4 The solubility of theobromine in each solvent.

	Concentration (mg/mL)	Solubility
0.2mol/L NaOH	37.61	3.76%
0.2mol/L Phosphate buffer	27.84	2.78%
0.2mol/L HCl	0.35	0.04%
0.1mol/L NaOH	19.18	1.92%
0.1mol/L Phosphate buffer	16.22	1.62%
0.05mol/L NaOH	9.81	0.98%
0.05mol/L Phosphate buffer	8.32	0.83%

0.2 mol/L HClへのテオブロミン溶解度は、水への溶解度と大きな差はなかったものの、0.2mol/L NaOHには水の約110倍以上の3.76%(w/v)溶解することがわかった。また、0.05 mol/L NaOHでも約1%テオブロミンは溶解する。一方、0.1 mol/Lりん酸緩衝液(pH12)もテオブロミンは1.62%溶解することがわかった。

3.3 様々なpHにおける安定性試験結果

安定性試験の結果をFig.4に示す。テオブロミンは、いずれのpHにおいてもピーク面積値の変動がほとんどなく、安定であることがわかった。

一方、カフェイン及び内標準物質のピーク面積値は、pH13の溶液中において時間経過とともに減少することが判明した。具体的な要因と分解反応の過程は不明であるが、強塩基性溶液中においてはカフェイン及び内標準物質が急速に分解されることが確認されたため、水酸化ナトリウム水溶液を抽出溶媒として用いるのは不適であると考えられる。これと比較すると、pH12の溶液中においてはピーク面積値の減少が少なく、pH7ではピーク面積値はほとんど変化しなかった。

テオブロミンの溶解度は塩基性が強いほど高くなる一方で、カフェイン及び内標準物質は塩基性が強くなるほど分解しやすくなるため、テオブロミン及びカフェインの抽出溶媒には0.1 mol/Lりん酸緩衝液(pH12.1)を選択した。

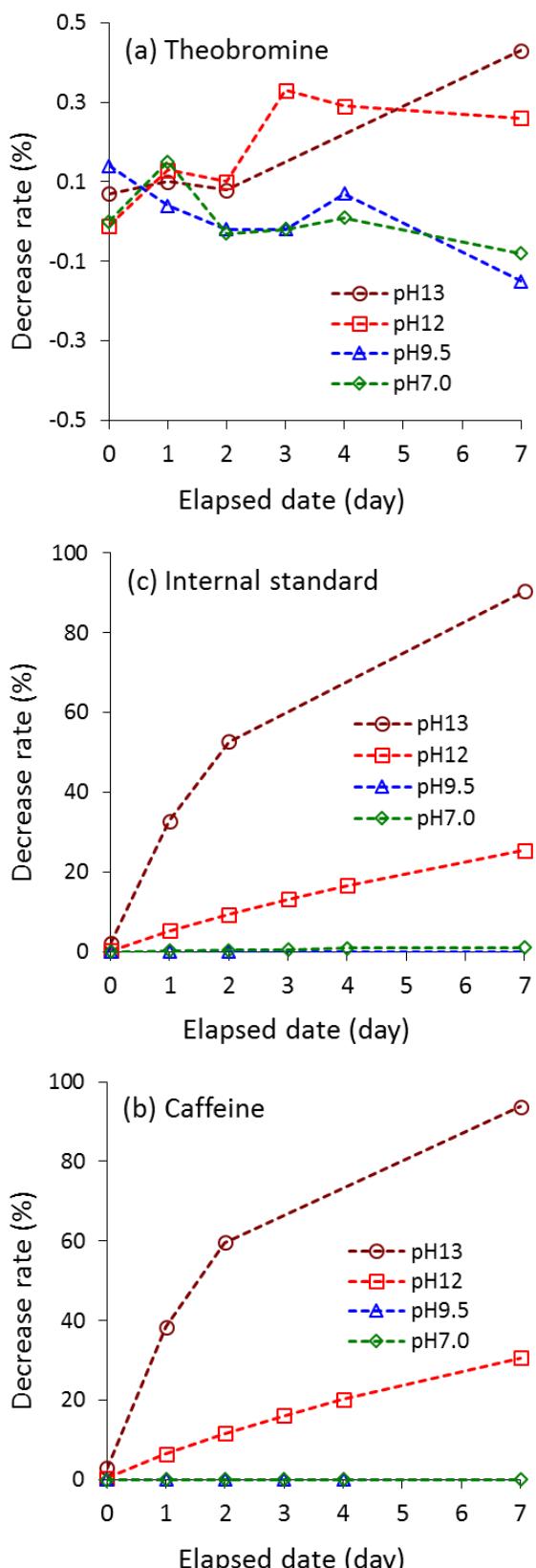


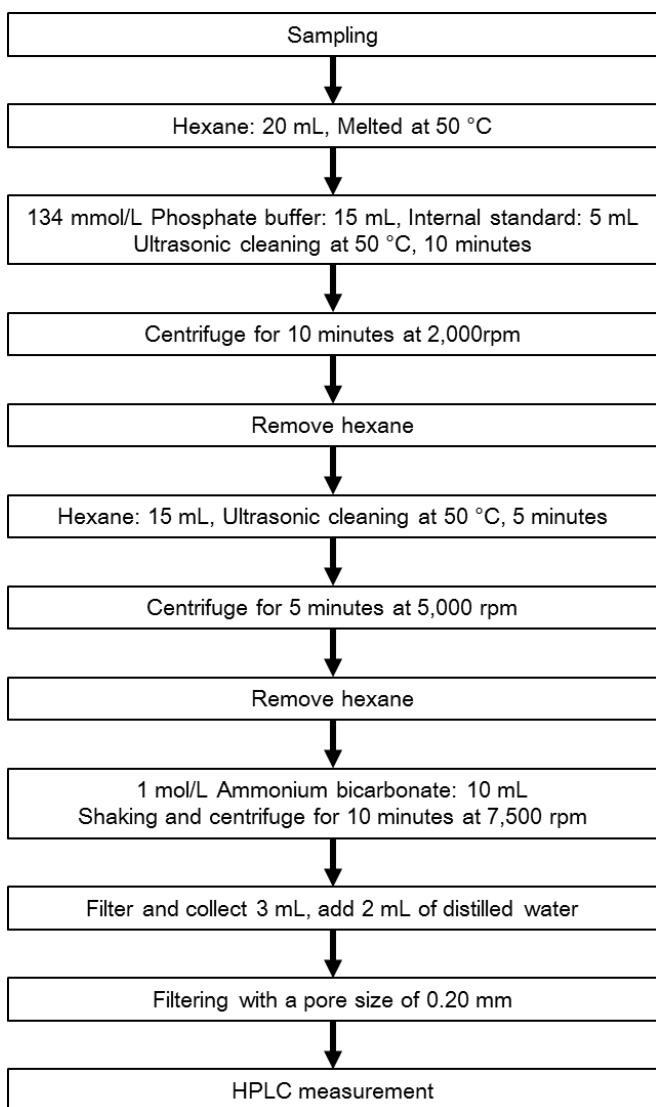
Fig. 4 Stability test results for each pH of (a) theobromine, (b) caffeine, and (c) internal standard.

3.4 新たなテオブロミン及びカフェインの抽出法の決定

新たなテオブロミン及びカフェインの抽出方法について検討する際に、脱脂・除たんぱくの方法についても検討した。試料中に脂肪分が含まれていると、これに内包されているテオブロミン等は抽出溶媒に溶解しにくくなり、さらに水系溶媒に粉末試料は分散しにくい。このため現行法では、遠沈管に採取した試料に石油エーテルを加えて脱脂したのち、試料を三角フラスコに移したうえでテオブロミン及びカフェインの抽出を行う二段階の手法をとっている。一方、J. B. Thomas らの報告⁹では、試料にヘキサンを加えた後、抽出溶媒である水を加え、50 °C に加温しながら超音波洗浄を行い、脱脂と同時にテオブロミン等の抽出操作を行っている。本実験では当報告を参考に、加温しながら試料の脱脂及び抽出操作を一段階で行うこととした。脱脂剤は複数の沸点を有する石油エーテル（沸点 30–60 °C）から単一でかつ加温温度より高沸点であるヘキサン（沸点 68 °C）に変更した。

除たんぱくの方法に関しては、現行法は、硫酸亜鉛及び水酸化バリウムを加えてたんぱく質を析出させているが、同時にテオブロミンの一部が析出するため、そのままろ過して沈殿物を取り除くと、テオブロミンの定量値が低下してしまう。そのため、ろ過の前に再度煮沸によるテオブロミンの再溶解を行わなければならず、操作が煩雑で時間を要する。また、改良法では抽出溶媒が塩基性であるため、硫酸亜鉛及び水酸化バリウムを加えても十分に沈殿が生じず、たんぱく質を完全に除去することができない。そこで、ホフマイスター系列に着目し、たんぱく質を析出させることを試みた。吉澤らの報告⁷によると、陰イオンでは炭酸イオン (CO_3^{2-})、陽イオンではアンモニウムイオン (NH_4^+) がたんぱく質を塩析させる効果が強いことから、1 mol/L 重炭酸アンモニウム (NH_4HCO_3) を除たんぱく剤として使用することとした。

以上の脱脂剤及び除たんぱく剤の変更に加え、3.2 及び 3.3 の結果を踏まえ、改良法の試料調製を次のように行った。分析試料を 50 mL 容の遠沈管に正確に量り取り、これに n-ヘキサン 20 mL を加え 50 °C の温浴中で軽く攪拌し、油脂を溶解した。この遠沈管を温浴から取り出し、134 mmol/L りん酸緩衝液 (pH12.1) 15 mL を加え、続いて内標準原液 5 mL を正確に加えた後、試料が溶液に分散するよう軽く振とうさせ、50 °C で 10 分間超音波抽出を行った。抽出後の遠沈管を 2,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上層のヘキサン層を駒込ピペット等で除去した。次に、遠沈管に再度ヘキサン 15 mL を加え、50 °C で 5 分間超音波抽出し、5,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上層のヘキサン層を駒込ピペット等で除去した。さらに、遠沈管に 1 mol/L 重炭酸アンモニウム水溶液 10 mL を加えて振り混ぜた後、遠沈管を 7,500 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を定量用ろ紙 (JIS P 3801 に規定する 5 種 A, 5 種 B 又は 6 種規格) でろ過した。ろ液の 3 mL を 15 mL 容のスクリューバイアルに取り、水 2 mL を加えて振り混ぜた後、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過したものを分析試料の検液とした。本実験は、検液中のテオブロミン及びカフェイン濃度は現行法より高く、重金属を使用せず除たんぱくを行える点がメリットである。以上の実験手順を Scheme 1 に示す。



Scheme 1 Flowchart of the improved extraction method for theobromine and caffeine.

3.5 検量線の作成

改良法によるテオブロミン及びカフェインの検量線は、Fig. 5 に示すように良好な直線性を示した。

3.6 試薬添加回収試験

テオブロミン及びカフェイン試薬を添加した模擬試料について、現行法及び改良法による定量分析を行った。測定結果を Table 5 に示す。

両法の回収率は 100 %付近であったため、実験操作による損失は少ないと言える。カカオ脂のカフェイン濃度が他の試料より高い結果については、カカオ脂に残留していたカフェインの影響によるものと考えられる。

3.7 試料測定及び混合試料回収率試験

カカオマス、ココアパウダー及びチョコレート製品並びにカカオマスまたはココアパウダーを製菓用ミックス粉等に添加した混合試料について、現行法及び改良法による定量分析を行った。これらの測定結果を Table 6 に示す。また、チョコレート製品の改良法におけるクロマトグラムを Fig. 6 に示す。

改良法における測定結果は、ほとんどの試料においてばらつきが大きく、現行法の結果より低い定量値を示した。試薬添加回収試験の結果は良好であったことに加え、HPLC による分離において、Fig. 6 に示すとおりテオブロミン、カフェイン及び内標準物質のいずれも試料由来の夾雑成分による影響が小さいことから、このような結果となった原因是、底部が円錐状で尖っている遠沈管内で試料の脱脂及び抽出操作を行ったため、底部に沈着した試料の溶媒への分散が不十分であったことと考えられる。したがって、今後は試料の脱脂及び抽出操作を見直すことが重要である。

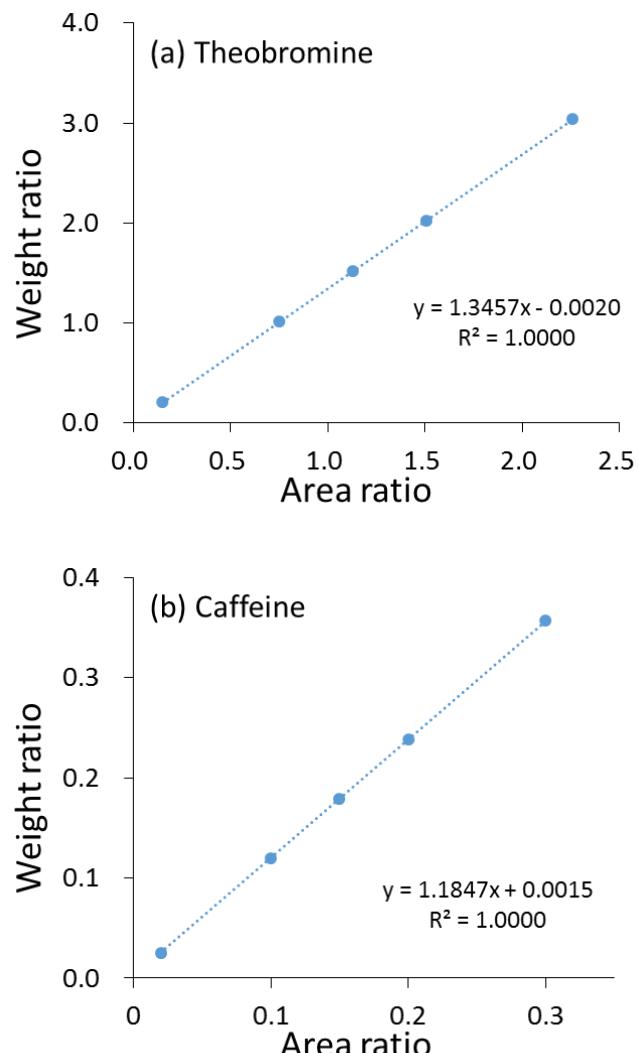


Fig. 5 Calibration curve of (a) Theobromine, and (b) Caffeine.

4. 要 約

ココア含有調製食料品中に含まれるテオブロミン及びカフェインの定量分析法について、現行法である税関分析法 No.112「ココアの定量分析法」の改善可能な点を検討し、新たなテオブロミン及びカフェインの抽出方法並びに HPLC の分離条件を検討した。

抽出方法については、水に難溶性であるテオブロミンの抽出にりん酸緩衝液 (pH12.1) を用いることで、水より飛躍的に高濃度に抽出できることが判明した。これに加え、脱脂剤を n-ヘキサン、除たんぱく剤を重炭酸アンモニウムに替えて抽出操作を行うこと

で、現行法より単純な操作で高濃度のテオブロミン及びカフェインの検液を調製できることがわかった。以上の結果から、脱脂及び抽出操作を再検討することにより、現行法を改善する可能性が示唆された。

HPLC の分離条件については、カラムにオクタコシル基修飾された Sunniest RP-AQUA を使用し、移動相溶液に 50 mM りん酸緩衝液 (pH2.8) 及びアセトニトリルを使用したグラジェント法により、テオブロミン、カフェイン及び内標準物質である β -Hydroxyethyltheophylline を良好に分離することが可能であり、現行法を改善する可能性が示唆された。

Table 5 Measurement results of reagent addition recovery test. The values are average value measured by sampling 3 times each.

	Current analytical method (No. 112)				Improved analytical method			
	Theobromine		Caffeine		Theobromine		Caffeine	
	Recovery Rate (%)	Fluctuation value (%)	Recovery Rate (%)	Fluctuation value (%)	Recovery Rate (%)	Fluctuation value (%)	Recovery Rate (%)	Fluctuation value (%)
Flour	99.71	0.08	100.04	0.06	101.46	0.17	98.80	0.11
Whole milk powder	99.09	0.02	99.48	0.02	101.24	0.09	99.64	0.15
Cacao butter	98.97	0.31	104.71	0.22	102.16	0.29	104.91	0.11

Table 6 Measurement results of cocoa paste, cocoa powder, chocolate, and mixed sample recovery results. The values are average value measured by sampling 3 times each.

(a) Measurement results of theobromine and caffeine contained in cocoa paste, cocoa powder, and chocolate, respectively.

	Current analytical method (No. 112)						Improved analytical method					
	Theobromine		Caffeine		No-fat cocoa content		Theobromine		Caffeine		No-fat cocoa content	
	Average (%)	Fluctuation value (%)	Average (%)	Fluctuation value (%)	Average (%)	Fluctuation value (%)	Average (%)	Fluctuation value (%)	Average (%)	Fluctuation value (%)	Average (%)	Fluctuation value (%)
Paste	1.24	0.30	0.11	0.51	42.09	0.31	1.08	14.99	0.11	13.17	36.89	14.83
Powder	1.98	0.07	0.14	0.19	65.87	0.06	1.59	18.66	0.11	17.91	52.97	18.61
Chocolate							0.12	1.10	0.03	1.24	4.58	1.11

(b) Measurement results of mixed sample recovery results. It is the result of calculating the non-fat cocoa content. The theoretical value is calculated from the result of (a).

	Current analytical method (No. 112)				Improved analytical method			
	No-fat cocoa content (%)		Average (%)	Fluctuation value (%)	No-fat cocoa content (%)		Average (%)	Fluctuation value (%)
	Theoretical Value	Measured Value			Theoretical Value	Measured Value		
MPC*-A + Paste	21.08	20.93	99.29	0.08	18.42	16.82	91.29	15.01
MPC-A + Powder	32.88	33.04	100.50	0.61	26.46	16.62	62.82	11.46
MPC-B + Paste	21.08	20.92	99.24	0.42	18.42	18.61	101.03	4.43
MPC-B + Powder	32.89	33.17	100.86	0.77	26.44	24.39	92.22	14.89
CP** + Paste	20.88	20.67	99.03	0.20	18.45	20.75	112.48	0.45
CP + Powder	32.83	32.90	100.20	0.38	26.44	33.00	124.81	0.54
MPI ***+ Powder(6%)	3.99	4.01	100.59	0.29	3.11	3.17	101.94	3.07

* Mixed powder for confectionery (A and B).

** Creaming powder

*** Milk powder for infants

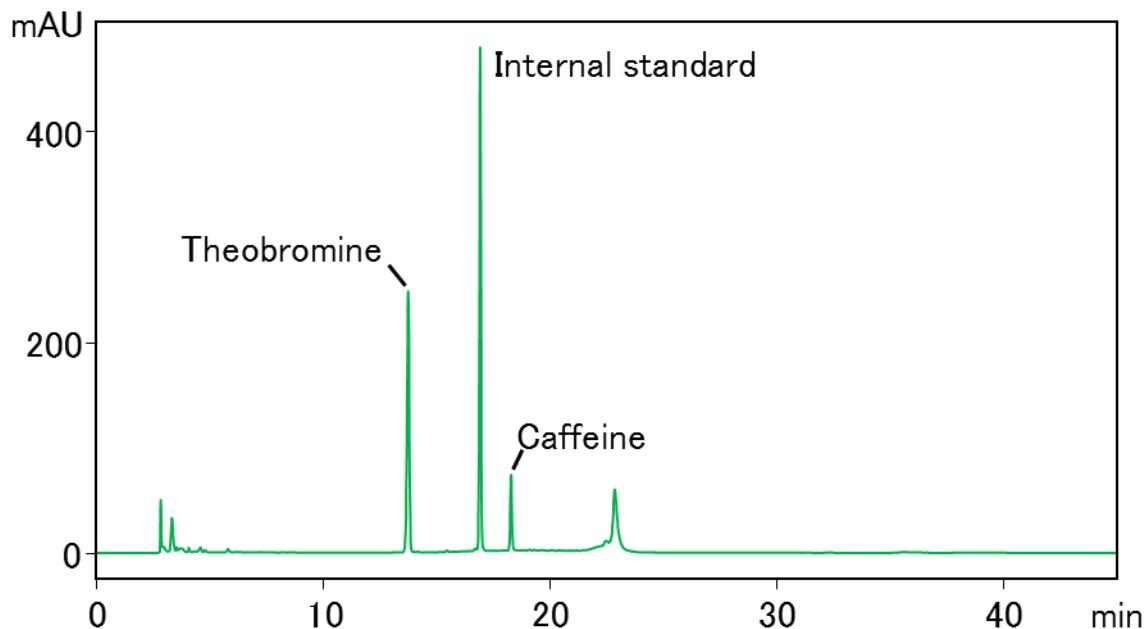


Fig. 6 Chromatograms of chocolate measurement results in the improved method.

文 献

- 1) 関税中央分析所ホームページ「112 ココアの定量分析法」. (http://www.customs.go.jp/ccl_seach/analysis_seach/a_112_j.pdf)
- 2) THE MERCK INDEX 13th EDITION, 9353-9354, MERCK & CO., INC.
- 3) 独立行政法人国民生活センターホームページ「高カカオをうたったチョコレート」. (http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20080206_2.pdf)
- 4) 伊藤聰美, 古賀 哲, 笹川邦雄 : 関税中央分析所報, **38**, 31 (1998).
- 5) 有機合成化学協会編 : 有機化合物辞典, 562, (1985)
- 6) J. B. Thomas, J. H. Yen, M. M. Schantz, B. J. Porter, and K. E. Sharpless : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**, 3259-3263
- 7) 吉澤俊祐, 白木賢太郎 : “タンパク質の凝集剤としての塩・有機溶媒・高分子”, 生物工学第 93 卷, 2015 年第 5 号