

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（第2報）

早乙女 航*, 池田 英貴*, 小川 浩史**, 馬越 秀一**, 松本 啓嗣**

Quantitative analysis of theobromine and caffeine in cocoa preparations (the second report)

SOUTOME Wataru*, IKEDA Hideki*, OGAWA Hirofumi**, UMAKOSHI Shuichi**, MATSUMOTO Yoshitsugu**

*Yokohama Customs Laboratory 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 examined improvements of the analysis method for theobromine and caffeine content in cocoa products. It was found that using sodium hydrogen carbonate buffer (pH11) as an extraction agent, hexane as a degreasing agent and ammonium hydrogen carbonate as a deproteinization agent proved to be an efficient sample preparation method in a single step. By using an Erlenmeyer flask instead of a centrifuge tube, stable extraction rates were attained.

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同表第19類に分類される。同表第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、水を抽出溶媒としてテオブロミン及びカフェインを同時に定量しているが、テオブロミンを完全に溶解させるためには試料量を少なくする必要がある。しかし、カカオ中のカフェインは含有量が少ないため、テオブロミンの溶解度に合わせて試料調製を行うと検液中のカフェイン濃度が非常に低くなることから、正確な定量が困難となるおそれがある。

二点目は、抽出過程において、二度の加熱操作が必要なことである。現行法では、ココア分を加熱抽出した後に除たんぱく剤を加えているが、この際に溶解したテオブロミンも共沈し定量性が悪くなることから、再度の加熱抽出が必要となっている³⁾。

三点目は、高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」という。）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。一般

的な逆相カラムでは、テオブロミンとカフェインの保持力に大きな差があるため、アイソクラティック法では、両者を適切なピーク形状を保ちつつ分離検出することが困難である。

このような背景から、第1報⁴⁾ではHPLCの分離条件並びにテオブロミン及びカフェインの新たな抽出方法の検討を行った。その結果、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Sunnest RP-AQUAを使用し、移動相溶液に50 mmol/L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エント法を用いることにより、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できることがわかった。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0.1 mol/Lりん酸緩衝液(pH12.1)を用いることで、より高濃度に抽出できることが判明した。また、脱脂剤をヘキサンに、除たんぱく剤を1 mol/L炭酸水素アンモニウム水溶液に各々替えて抽出操作を行うことで、現行法より簡便な操作でテオブロミン及びカフェインの検液の調製を目指した。

一方で、内標準物質であるβ-Hydroxyethyltheophylline及びカフェインは強塩基性条件下で分解すること、第1報の改良法にて調製した試料の検液は測定値のばらつきが大きいことが問題となつた。

そこで本研究では、チョコレート等市販のココア製品を用い、安定してテオブロミン及びカフェインを抽出できる条件の検討を行ったので報告する。

2. 実 験

* 横浜税関業務部 〒221-0031 神奈川県横浜市神奈川区新浦島町2-1-10

** 財務省税関中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

2.1 試薬及び試料

2.1.1 試薬

テオプロミン（東京化成工業）

カフェイン（富士フィルム和光純薬）

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)

50 mmol/L りん酸緩衝液 (pH2.7)

りん酸二水素カリウム 5.44 g 及びりん酸 0.68 mL を 1000 mL の水で溶解する。

100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH10.5)

炭酸水素ナトリウム 8.4 g に水 950 mL を加え、30%水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を調整したのち、1000 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容する。

100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH11)

炭酸水素ナトリウム 8.4 g に水 950 mL を加え、30%水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を調整したのち、1000 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容する。

1 mol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液

炭酸アンモニウム 7.91 g を 100 mL の水で溶解する。

2.1.2 試料

カカオマス 2 種 (Cocoa mass)

ココアパウダー 4 種 (Cocoa powder)

チョコレート製品 3 種 (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 : 273 nm

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)

検出波長 : 273 nm

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 (化学物質評価研究機構)

カラム温度 : 25 °C

移動相 : 水 : アセトニトリル = 85 : 15

流速 : 1.0 mL/min

注入量 : 20 μL

2.2.2 (2) 改良法のカラム及び移動相 (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)

カラム温度 : 40 °C

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)

流速 : 1.0 mL/min

注入量 : 10 μL

2.3 実験

2.3.1 テオプロミンの溶解性試験

100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH10.5) 及び 100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH11) にテオプロミン試薬を過剰に加えて約 30 分間攪拌しながら溶解させ、室温での溶解度を紫外可視分光光度計で測定した。

2.3.2 pH11 における安定性試験

テオプロミン、カフェイン及び内標準物質を各々の濃度が 200 ppm となるように 100 mmol/L りん酸緩衝液 (pH7) 及び 100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH11) に溶解した溶液を調製した。これを 2.2.2(2) の条件で HPLC で測定し、各化合物の濃度の経時変化を、試料調製した日から 1 日ごとに 6 日間確認した。

2.3.3 テオプロミン及びカフェインの新たな抽出法の決定

2.3.1 の結果を元に、テオプロミン及びカフェインの新たな抽出法を、以下のように決定した。

分析試料を 100 mL 三角フラスコに正確に量り取り、これに 100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH11) 5 mL, ヘキサン 30 mL を加え 50 °C の振とう恒温水槽で 20 分間攪拌し、油脂を溶解させた。三角フラスコを恒温水槽から取り出し、100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH11) 35 mL を加え、室温で 10 分間攪拌し、テオプロミン及びカフェインの抽出を行った。三角フラスコに内標準原液 10 mL を加えた後、ヘキサンを傾斜法により除去した。次に、三角フラスコに 1 mol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液 50 mL を加え、よく振り混ぜた後にしばらく静置し、孔径 0.45 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。

2.3.4 検量線の作成

テオプロミン約 150 mg を 25 mL 容三角フラスコに正確に量り取り、100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH11) 15 mL を加えた。これを 200 mL 容メスフラスコに移し入れ、25 mL 三角フラスコの内部を水で洗浄し、洗液を 200 mL 容メスフラスコに合わせた。これに水を加えて定容したものをテオプロミン標準原液とした。

カフェイン約 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カフェイン標準原液とした。

内標準物質約 200 mg を 200 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内標準原液とした。

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 及び 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 2.2.2(2)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、税関分析法に従い検量線を作成した。

2.3.5 除たんぱく剤の影響の検証

現行法及び改良法について、除たんぱく剤を用いない検液を以下のように調製した。

現行法は、税関分析法 No. 112 の 5. 検液の調製に規定されている、除たんぱく質剤 A 及び B を各 10 mL ずつ加える操作を、水 20 mL を加える操作に変更することにより、検液を調製した。

改良法は、2.3.3に示した手順にある、1 mol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液 50 mL を加える操作を、水 50 mL を加える操作に変更することにより、検液を調製した。

3. 結果及び考察

3.1 テオブロミン溶解性試験結果

100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH10.5) 及び 100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH11) によるテオブロミン溶解性試験結果を Table 1 に示す。

Table 1 Solubility of theobromine.

	Solubility (%)
100 mmol/L sodium hydrogen carbonate buffer (pH10.5)	0.65
100 mmol/L sodium hydrogen carbonate buffer (pH11)	0.91

テオブロミンは、100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH10.5) には 0.65 %、100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH11) には 0.91 % 溶解することが分かった。第1報で使用した 0.1 mol/L りん酸緩衝液 (pH12.1) における 1.62 % と比較すると溶解性は低下しているが、水における約 0.05 % と比較すると大きく溶解性が向上していた。

3.2 pH11 における安定性試験結果

安定性試験の結果を Fig. 1 に示す。pH11 の塩基性条件下において、テオブロミンでは分解はほぼ見られなかった一方で、カフェイン及び内標準物質では若干の分解が確認された。しかし、その分解率は 6 日間で 1 % 以下であり、pH12 の塩基性条件下で検討された第1報の 7 日間で約 20 % という分解率と比較すると、大きく改善されていることが確認された。

3.3 テオブロミン及びカフェインの新たな抽出法の決定

第1報では脱脂剤をヘキサンに、除たんぱく剤を 1 mol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液に各々変更し、遠沈管を用いて抽出作業を行った。その結果、試料添加回収試験は現行法よりも高いテオブロミン回収率であり、チョコレートを用いた試料測定では測定値のばらつきは少なかった。しかし、カカオマス及びココアパウダーを用いた試料測定では測定値のばらつきが大きく、現行法より低い定量値を示した。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が考えられる。

そこで今回は、遠沈管を用いず 100 mL 三角フラスコで脱脂と抽出を行うこととし、これまでの結果を踏まえ、改良法の試料調製を 2.3.3 に示した手順のようを行った。

実験手順を Scheme 1 に、示す。

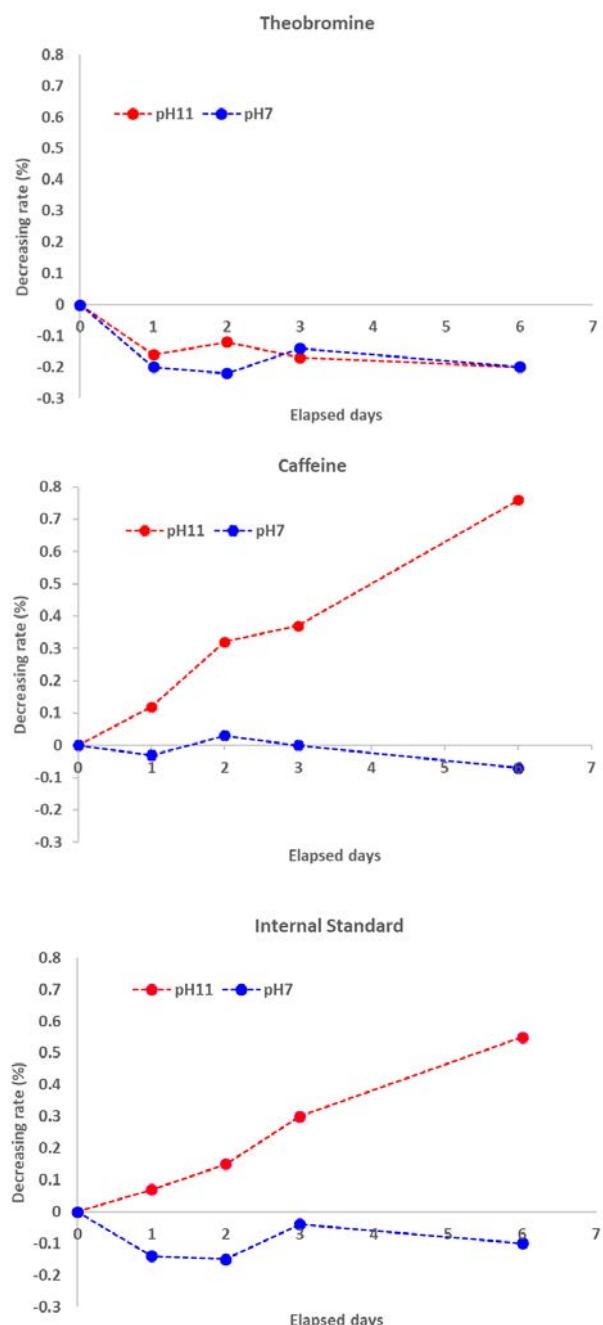
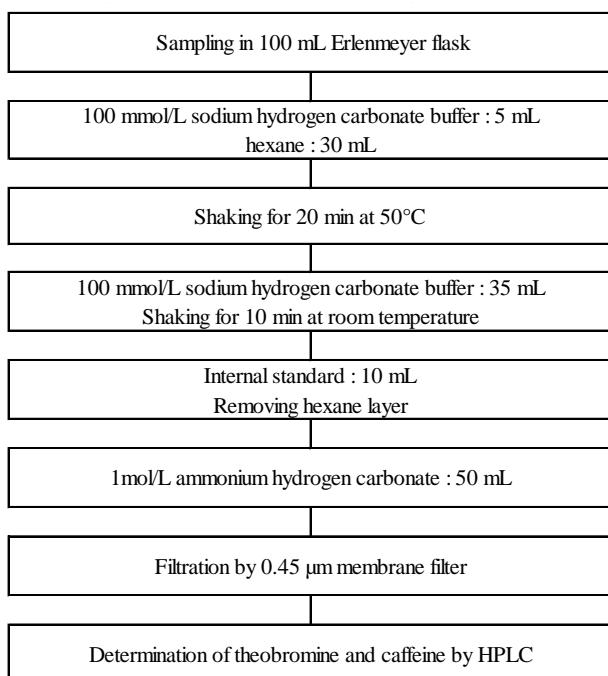


Fig. 1 Stability test results for pH7 and pH11 of theobromine, caffeine and internal standard.



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

3.4 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. 2 に示すように良好な直線性を示した。

3.5 試料測定

カカオマス 2 種、ココアパウダー 4 種及びチョコレート製品 3 種について、各々現行法及び改良法による定量分析を行った。カカオマスを改良法で測定したクロマトグラムを Fig.3 に、各製品の測定結果を Table 2 に示す。

改良法での測定値はばらつきも少なく、すべての試料において安定してココア分の定量ができることがわかった。現行法と改良法の測定結果を比較すると、改良法におけるテオブロミンの定量値は現行法よりも高い値を示した。

現行法及び改良法による測定結果に差が出た理由として、現行

法で用いている除たんぱく剤が影響しているのではないかと考えた。

3.6 除たんぱく剤の影響の検証

伊藤らの報告³⁾によると、現行法では除たんぱく操作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ることにより、テオブロミンの定量値が低くなるとしている。そのため現行法では、除たんぱく剤を加えたたんぱく質を凝集させた後、再度溶液を加熱することでテオブロミンを再溶解させる操作が必要である。この再加熱の段階で、テオブロミンが完全に再溶解していないことが、テオブロミンの定量値に差が生じる原因ではないかと考えた。そこで、除たんぱく剤の有無がテオブロミンの定量に与える影響を検証した。

また同時に、改良法で用いている除たんぱく剤である炭酸水素アンモニウム水溶液の有無による、テオブロミンの定量値への影響も検証した。

カカオマス、ココアパウダー及びチョコレート製品各 1 種について、現行法による検液、改良法による検液及びそれぞれの除たんぱく剤を用いない検液を調製し、現行法による検液は 2.2.2(1)の、改良法は 2.2.2(2)の条件により測定した結果を、Table 3 に示す。

現行法では、除たんぱく剤を用いない検液の方がテオブロミンの定量値が高い値を示した。また、改良法についても同様に、除たんぱく剤を用いない検液の方がテオブロミンの定量値が高い値を示す傾向がみられた。この結果より、現行法と改良法の双方において除たんぱく剤を用いない検液の方が測定値が高い値を示したことから、たんぱく質を沈殿させる除たんぱく法ではテオブロミンも共沈し、ココア分の定量値に影響する可能性が示唆された。また、現行法及び改良法の除たんぱく剤を用いない検液の結果を比較すると、3.5 の結果と同様に、改良法の検液の方がテオブロミン値が高い値を示した。この結果より、3.5 の結果でみられた現行法と改良法の測定値の差は除たんぱく剤の影響ではなく、その他の原因であることが示唆された。その他の原因としては、抽出溶媒に塩基性の炭酸緩衝液を用いたことでテオブロミンの溶解度が向上したことが考えられる。

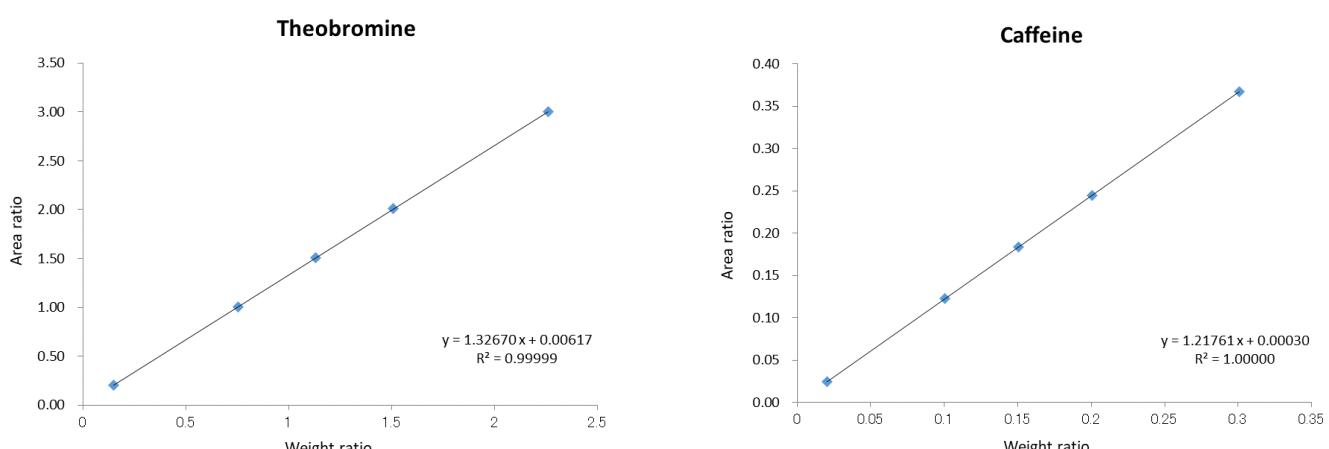


Fig. 2 Calibration curve of theobromine and caffeine.

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、より簡便で安定的にココア分を抽出する方法を検討した。

抽出液に炭酸緩衝液(pH11)を、除たんぱく剤に炭酸水素アン

モニウム水溶液を、脱脂剤にヘキサンを各々用い、三角フラスコ中で脱脂と抽出を同時に行うことで、様々なサンプルで現行法と比較し簡便かつ安定的にココア分を抽出できることがわかった。

また、除たんぱく剤の有無がテオブロミンの測定値に影響する可能性が示唆されたため、今後は、除たんぱく操作を含め、最適な抽出方法の更なる検討が必要である。

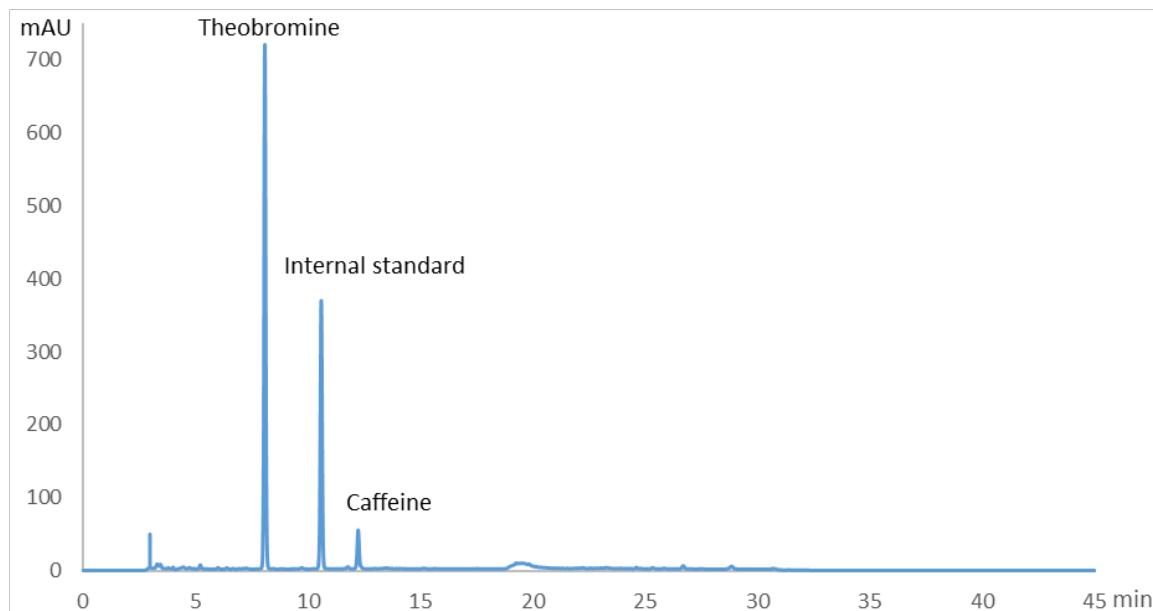


Fig. 3 Liquid chromatogram of cocoa mass by the improved method.

Table 2 Measurement results of cocoa masses, cocoa powders and chocolates.

	Current analytical method						Improved analytical method					
	theobromine		caffeine		defatted cocoa content		theobromine		caffeine		defatted cocoa content	
	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)
cocoa mass 1	1.20	0.10	0.11	0.65	40.54	0.09	1.23	0.49	0.12	0.62	41.75	0.49
cocoa mass 2	1.19	0.62	0.12	0.52	40.70	0.60	1.21	0.25	0.13	0.27	41.58	0.25
cocoa powder 1	2.14	0.99	0.19	0.95	72.16	0.99	2.22	0.32	0.19	1.53	74.53	0.41
cocoa powder 2	1.95	1.21	0.17	1.09	65.64	1.20	2.02	0.41	0.17	0.49	68.02	0.41
cocoa powder 3	1.90	0.17	0.19	0.15	64.82	0.17	1.94	0.30	0.18	0.24	65.69	0.29
cocoa powder 4	1.91	0.16	0.14	0.53	63.71	0.16	1.97	0.10	0.14	0.08	65.57	0.09
chocolate 1	0.64	0.31	0.12	0.18	23.57	0.29	0.66	0.22	0.12	0.37	24.24	0.21
chocolate 2	0.43	0.06	0.05	0.27	14.93	0.08	0.45	0.05	0.05	0.16	15.51	0.03
chocolate 3	0.18	0.31	0.02	0.96	6.34	0.37	0.19	0.06	0.03	0.44	6.57	0.01

Table 3 Comparison of results between deproteinization method and non-deproteinization method.

	Current analytical method						non-deproteinization method							
	deproteinization method				non-deproteinization method				theobromine		caffeine		defatted cocoa content	
	theobromine		caffeine		defatted cocoa content		theobromine		theobromine		caffeine		defatted cocoa content	
average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	
cocoa mass 1	1.20	0.10	0.11	0.65	40.54	0.09	1.22	0.02	0.12	0.18	41.68	0.03		
cocoa powder 1	2.14	0.99	0.19	0.95	72.16	0.99	2.20	0.28	0.18	0.22	73.80	0.27		
chocolate 1	0.64	0.31	0.12	0.18	23.57	0.29	0.65	0.03	0.12	0.27	23.93	0.07		

	Improved analytical method						non-deproteinization method							
	deproteinization method				non-deproteinization method				theobromine		theobromine		defatted cocoa content	
	theobromine		caffeine		defatted cocoa content		theobromine		theobromine		theobromine		defatted cocoa content	
average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	average (%)	RSD (%)	
cocoa mass 1	1.23	0.49	0.12	0.62	41.75	0.49	1.27	0.08	0.12	0.68	42.92	0.06		
cocoa powder 1	2.22	0.32	0.19	1.53	74.53	0.41	2.29	0.29	0.18	0.28	76.53	0.29		
chocolate 1	0.66	0.22	0.12	0.37	24.24	0.21	0.66	0.16	0.12	0.16	24.09	0.16		

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)
(参照 2021-03-05)
- 2) THE MERCK INDEX 13th EDITION, 9353-9354, MERCK & CO., INC.
- 3) 伊藤聰美, 古賀 哲, 笹川邦雄: 関税中央分析所報, **38**, 31 (1998).
- 4) 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: 関税中央分析所報, **60**, 35 (2020).