

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 3 報）

田平 奈津美*, 小川 浩史*, 南館 正知*, 松本 啓嗣*

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

TABIRA Natsumi*, OGAWA Hirofumi*, MINAMIDATE Yoshitomo* and MATSUMOTO Yoshitsugu*

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

In this study, we examined the method of extraction of theobromine and caffeine for quantitative analysis with high precision and accuracy. We improved the extraction process proposed as the improved analysis method in the second report. It was found that theobromine and caffeine were determined with high precision and accuracy by stirring in a shaking bath at 80 rpm, 50 °C for 10 minutes, instead of stirring at room temperature, omitting the n-hexane removal operation, gathering the aqueous layer, and filtering with a membrane filter of pore size 0.45 µm.

1. 緒 言

ココア含有食料品は主に関税率表第 18 類に分類されるが、穀物、穀粉、ミルク等を含有する調製品の場合は一定の条件を満たせば第 19 類に分類される。その条件の一つが「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「無脂ココア分」という。）である。関税率表解説第 19 類総説には、無脂ココア分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と規定されている。そのため、貨物の組成次第では税表分類を行うためにテオブロミン及びカフェインの正確な定量が必要となる。

ココア含有食料品中のテオブロミン及びカフェインの定量分析法は税関分析法 No.112「ココアの定量分析法」（以下「現行法」という。）に定められている。現行法の実験手順を Fig. 1 に示す。この現行法はいくつかの改善が望まれる点がある。まず、現行法ではテオブロミンの水への溶解度が 0.5 g/L¹⁾と低いことなどから 2 度同じ操作を行う必要がある等、抽出操作が煩雑であることに加え、検液調製の際にテオブロミンの溶解度に合わせて検液を調製すると、一般的にカカオ中の含有量がテオブロミンよりも少ないカフェインの濃度が非常に低くなり正確かつ精度よく定量することが困難となるおそれがある。つぎに、加熱時の沸騰浴中での操作を行う際に、ウォーターバス内でのフラスコの転倒や火傷の危険性があること、除たんぱく剤に重金属元素を含む劇物を使用することといった点に安全面、環境負荷への懸念がある。さらに、高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」という。）には、テオブロミン及びカフェインのカラムへの保持力に差があるため、現行法で定められているアイソクラティック法では同時に適切なピーク形状を保ちつつ分離検出を行うことが困難である。

上記の課題を改善するために、過去 2 年間にわたり研究を実施した^{2), 3)}。その結果、抽出溶媒に 100 mmol/L 炭酸緩衝液 (pH11) を用いることにより、カフェインや β-Hydroxyethyltheophylline (以

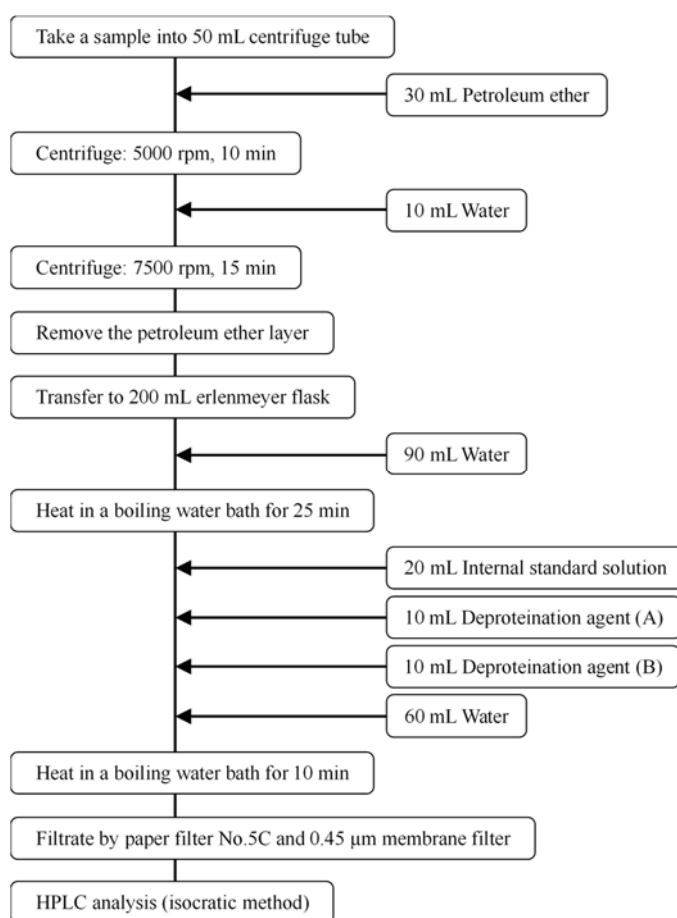


Fig. 1 Flowchart of the current analysis method.

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

下「内標準物質」という.)を分解させることなく、水よりもはるかに高濃度にテオブロミン抽出を行うことができた。また、HPLCの測定条件については移動相に50 mmol/L りん酸緩衝液 (pH2.7) 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で、テオブロミン、カフェイン及び内標準物質を良好に分離検出することが可能となった。前2報において示された、新たに構築した検液調製法 (以下「改良法」という.)の実験手順を Fig. 2 に示す。しかしながら、市販ココア粉等の無脂ココア分を定量したところ、現行法と改良法ではカフェイン定量値がほぼ一致するものの、テオブロミン定量値は改良法の方が高くなり、現行法及び改良法のいずれにおいても、除たんぱく操作を行うことによりテオブロミン定量値が低下することが判明した。その原因として、第2報では、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する可能性があることを報告している。

そこで、本研究では、テオブロミン溶解度を向上させるために抽出温度等の条件を若干変更したうえで、テオブロミンの添加回収試験等を実施することにより、現行法及び改良法に除たんぱく操作の有無を組み合わせた4種類の抽出方法のいずれが最も正確かつ精度よく無脂ココア分を定量することが可能か検証したので報告する。

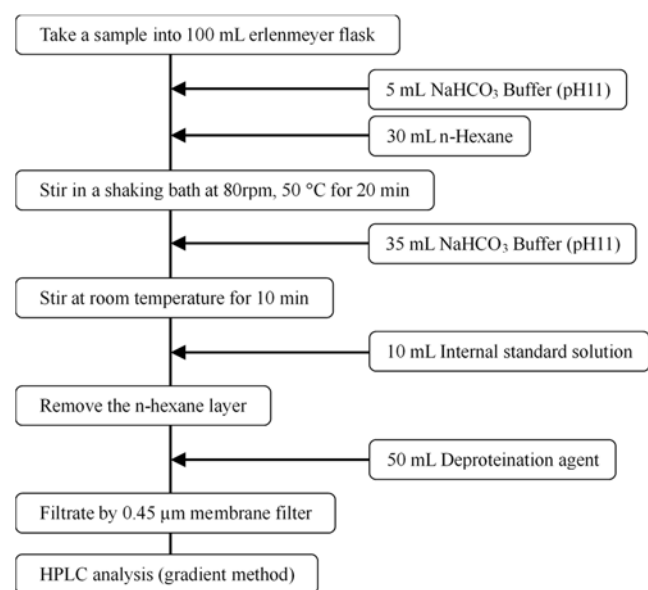


Fig. 2 Flowchart of the improved analysis method.

2. 実験

2.1 試薬及び試料

2.1.1 試薬

テオブロミン、内標準物質、リグニン (以上、東京化成工業)、カフェイン、大豆たんぱく質、セルロース (以上、富士フィルム和光純薬)、カカオ色素 (トーヨーケム)

2.1.2 試液

①現行法テオブロミン標準原液

テオブロミン約 100 mg を 1000 mL 容メスフラスコに量り取り、水を加えて定容した。

②現行法カフェイン標準原液

カフェイン約 50 mg を 1000 mL 容メスフラスコに量り取り、水を加えて定容した。

③現行法内標準原液

内標準物質約 100 mg を 1000 mL 容メスフラスコに量り取り、水を加えて定容した。

④現行法除たんぱく剤

A 液: 硫酸亜鉛水和物 2 g を水 100 mL で溶解した。

B 液: 水酸化バリウム水和物 1.8 g を水 100 mL で溶解した。

⑤50 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 を水 1000 mL で溶解した。

⑥100 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 を調整した後、1000 mL 容メスフラスコに移し入れ、水を加えて定容した。

⑦改良法テオブロミン標準原液

テオブロミン約 150 mg を 25 mL 容三角フラスコに量り取り、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、水を加えて定容した。

⑧改良法カフェイン標準原液

カフェイン約 50 mg を 500 mL 容メスフラスコに量り取り、水を加えて定容した。

⑨改良法内標準原液

内標準物質約 200 mg を 200 mL 容メスフラスコに量り取り、水を加えて定容した。

⑩改良法除たんぱく剤

炭酸アンモニウム 7.91 g を 100 mL の水で溶解した。

2.1.3 試料

薄力粉

脱脂粉乳

製菓用ミックス粉

カカオマス

ココア粉

2.2 装置及び測定条件

装置 : LC-20 システム (島津製作所)

検出器 : フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M40)

測定波長 : 273 nm

カラム : Sunniest RP-AQUA, 250mm×4.6mm 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

現行法移動相 : 水/アセトニトリル (85/15)

改良法移動相 :

(A) りん酸緩衝液/アセトニトリル (25/75)

(B) リン酸緩衝液

A % : 6.6 % – 33.4 % (15 min) – 100 % (20 min – 30 min)
– 6.6 % (30.01 min – 45 min)

流速 : 1.0 mL/min

注入量 : 10 μ L

2.3 実験

改良法の検量線用検液については次のとおり調製した。

100 mL 容メスフラスコ 5 本に改良法テオブロミン標準原液及び改良法カフェイン標準原液をそれぞれ 2, 10, 15, 20 及び 30 mL ずつ正確に量り取った。これに改良法内標準原液 10 mL を正確に量り取った後、水を加えて定容した。

現行法の検量線用検液については、税関分析法に従い次のとおり調製した。

200 mL 容メスフラスコ 6 本に現行法テオブロミン標準原液をそれぞれ 5, 10, 15, 20, 30 及び 50 mL 正確に量り取った。さらに、現行法カフェイン標準原液をそれぞれ 1, 2, 4, 6, 8 及び 10 mL 正確に量り取った。これに現行法内標準原液 20 mL を正確に量り取った後、水を加えて定容した。

2.3.1 を除き現行法及び改良法の検量線用検液を、改良法移動相を使用した HPLC により測定し、それぞれの検量線を作成した。

また、改良法の検液調製手順において、テオブロミン溶解度を向上させるために、室温で 10 分間かくはんする操作は 50 $^{\circ}$ C の振とう式恒温水槽中で 10 分間かくはんするように変更し、抽出操作をより簡便なものとするために、n-ヘキサン層を除去する操作は省略して、水層を採取して孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過するように変更し、以降の試験における改良法の操作手順は、全て変更後の手順に従った。変更後の操作手順を Fig. 3 に示す。

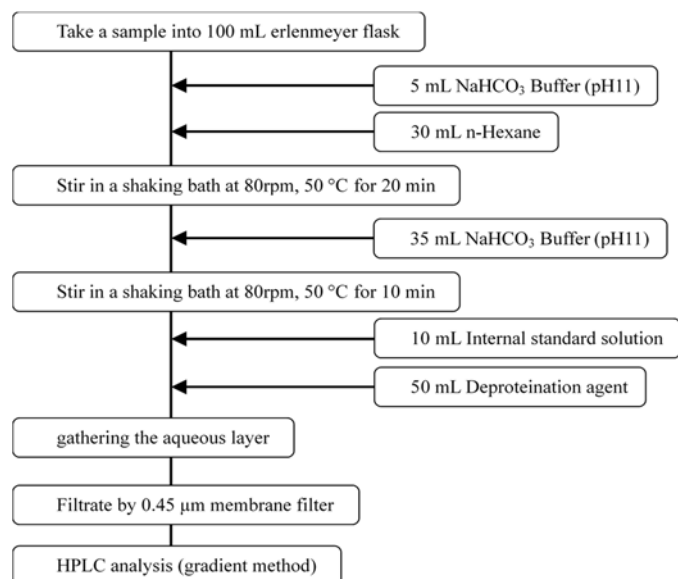


Fig. 3 Flowchart of the improved analysis method (2).

2.3.1 HPLC 測定条件変更による影響の有無の確認

現行法の手順によりココア粉及びカカオマスを試料として調製した検液並びに検量線用検液を、現行法、改良法それぞれの移動相を使用した HPLC により測定し、テオブロミン及びカフェインを定量した。

2.3.2 テオブロミン添加回収試験

2.3.2(1) 除たんぱく剤のテオブロミン回収率への影響の確認

水 75 mL に現行法テオブロミン標準原液 25 mL を正確に加えたものについて、現行法の沸騰水浴上での抽出以降の操作手順により検液（除たんぱく剤添加）を調製するとともに、除たんぱく剤に代わり等量の水を加えた検液（除たんぱく剤無添加）を調製した。また、100 mmol/L 炭酸緩衝液 35 mL に改良法テオブロミン標準原液 4 mL を正確に加えたものについて、改良法の内標準物質添加以降の操作手順により検液を調製（除たんぱく剤添加）するとともに、除たんぱく剤の代わりに等量の水を加えた検液（除たんぱく剤無添加）を調製した。これらを改良法移動相を使用した HPLC により測定し、テオブロミン回収率を求め、結果を比較した。

2.3.2(2) 除たんぱく操作のテオブロミン回収率への影響確認

大豆たんぱく質約 20 mg を 200 mL 三角フラスコに採取し、現行法テオブロミン標準原液 25 mL を正確に加えた後、水 75 mL を加えたものについて、現行法の沸騰水浴上での抽出以降の操作手順により検液（除たんぱく操作あり）を調製するとともに、除たんぱく剤に代わり等量の水を加えた検液（除たんぱく操作なし）を調製した。また、大豆たんぱく質約 20 mg を 200 mL 三角フラスコに採取し、改良法テオブロミン標準原液 4 mL を正確に加えた後、100 mmol/L 炭酸緩衝液 35 mL を加えたものについて、改良法の内標準物質添加以降の操作手順により検液（除たんぱく操作あり）を調製するとともに除たんぱく剤の代わりに等量の水を加えた検液（除たんぱく操作なし）を調製した。これらを改良法移動相を使用した HPLC により測定し、テオブロミン回収率を求め、結果を比較した。

2.3.2(3) 混合試料における除たんぱく操作のテオブロミン回収率への影響確認

リグニン、セルロース、大豆たんぱく質及びカカオ色素をそれぞれ 15 mg, 6 mg, 20 mg 及び 5 mg 量り取って混合し、これに現行法テオブロミン標準原液 15 mL を正確に加えた後、水 85 mL を加えたものについて、現行法の沸騰水浴上での抽出以降の操作手順により検液を調製した。また、上記 4 種類の化合物をそれぞれ 90 mg, 36 mg, 120 mg 及び 30 mg 量り取って混合し、これに改良法テオブロミン標準原液 4 mL を正確に加えた後、100 mmol/L 炭酸緩衝液 35 mL を加えたものについて、改良法の 10 分間かくはんする操作以降の操作手順により検液（除たんぱく操作あり）を調製するとともに、除たんぱく剤の代わりに等量の水を加えた検液（除たんぱく操作なし）を調製した。これらを改良法移動相を使用した HPLC により測定し、テオブロミン回収率を求め、結果を比較した。

2.3.3 テオブロミン定量試験

石油エーテルを用いたソックスレー抽出により、脱脂したココア粉及びカカオマスとを調製した。次に、それぞれにしょ糖を、重量割合で80%含有するように添加し、混合試料を調製した。これらの脱脂ココア粉、脱脂カカオマス及び混合試料について、改良法及び現行法の手順により検液（除たんぱく操作あり）を調製するとともに、改良法については除たんぱく剤の代わりに等量の水を加えた検液（除たんぱく操作なし）を調製した。これらの検液を改良法移動相を使用したHPLCにより測定し、テオブロミン含有量を求め、結果を比較した。

2.3.4 模擬試料における無脂ココア分の比較

ココア粉又はカカオマスにしょ糖を約80%含有するよう添加した模擬試料、ココア粉に薄力粉又は製菓用ミックス粉を約50%含有するよう添加した模擬試料及びココア粉に脱脂粉乳を約90%含有するよう添加した模擬試料を調製した。これらの模擬試料について、現行法及び改良法の手順により検液（除たんぱく操作あり）を調製するとともに、改良法については除たんぱく剤の代わりに等量の水を加えた検液（除たんぱく操作なし）を調製した。これらの検液を改良法移動相を使用したHPLCにより測定し、模擬試料中に含まれるココア粉及びカカオマス中のテオブロミン含有量、カフェイン含有量及び無脂ココア分を求め、結果を比較した。

3. 結果及び考察

3.1 HPLC 測定条件変更による定量値への影響の有無の確認

定量値をTable 1に示す。

テオブロミン及びカフェインの定量値に、HPLC 測定条件の相違による明確な差異は見られなかった。したがって、HPLC の測定条件を変更することによる定量値への影響はないと考えられる。

Table 1 Comparison of HPLC results between current analysis method and improved analysis method

Sample	Method	Theobromine		Caffeine	
		Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)
Cocoa powder	C	2.00	0.04	0.17	0.59
	I	2.00	0.10	0.18	0.58
Cocoa mass	C	1.16	0.08	0.12	0.48
	I	1.16	0.07	0.12	0.75

Method C: Current analysis method; Method I: Improved analysis method

3.2 テオブロミン添加回収試験

3.2.1(1) 除たんぱく剤のテオブロミン回収率への影響確認

試験結果をTable 2に示す。

現行法及び改良法ともに除たんぱく操作の有無によらず、除たんぱく剤の添加による回収率の明確な低下を確認しなかったため、除たんぱく剤自体がテオブロミンを析出させることはないと考えられる。

Table 2 Comparison of measurement result of theobromine addition recovery testing between with and without deproteinization agent addition

Method	Current analysis method		Improved analysis method	
	addition	non addition	addition	non addition
Theobromine (%)	99.30	99.45	99.56	100.11
RSD (%)	0.01	0.08	0.05	0.26

3.2.1(2) 除たんぱく操作のテオブロミン回収率への影響確認

回収率をTable 3に示す。

現行法及び改良法ともに除たんぱく操作の有無によらず回収率の明確な低下を確認しなかったため、大豆たんぱく質のみが共存する場合は、その変性に伴う回収率への影響はほとんどないと考えられる。

Table 3 Comparison of measurement results of theobromine addition recovery testing between with and without deproteinization operation in soy peptone

Method	Current analysis method		Improved analysis method	
	done	non	done	non
Theobromine (%)	99.03	99.23	98.98	99.41
RSD (%)	0.02	0.02	0.01	0.01

3.2.1(3) 混合試料における除たんぱく操作のテオブロミン回収率への影響確認

回収率をTable 4に示す。

改良法では除たんぱく操作による回収率の明確な低下を確認しなかったため、大豆たんぱく質の変性に伴う回収率への影響はほとんどないと考えられる。また、3.2.1(1)～(3)により、改良法において除たんぱく操作を行わなかった場合の回収率が99.41～100.11%であったことから、除たんぱく操作を行わない改良法によって、試料中のテオブロミンをほぼ完全に抽出できるものと考えられる。

一方、現行法では改良法と比較して、除たんぱく操作を行わなくても回収率が若干低下し、除たんぱく操作を行うことにより回収率は更に低下していた。一般に、たんぱく質を高温で加熱すると熱変性して凝集、沈殿するが、たんぱく質と同時に目的成分も共沈することがあり⁴⁾、現行法でも沸騰水浴中での加熱の際に、変性したたんぱく質とテオブロミンが共沈した可能性が考えられる。さらに、除たんぱく操作を行うことにより、大豆たんぱく質の変性及びテオブロミンの共沈が進み、回収率が更に低下したも

Table 4 Comparison of measurement result of theobromine addition recovery testing between with and without deproteinization operation in mixed samples

Method	Current analysis method		Improved analysis method	
	done	non	done	non
Theobromine (%)	88.44	96.02	99.42	99.66
RSD (%)	0.68	0.15	0.16	0.80

のと考えられる。以上から、現行法では沸騰水浴中での操作があることから、たんぱく質を凝集、沈殿させることなく検液を調製することは不可能であるため、以降の試験での現行法においては、除たんぱく操作なしの検液の調製は実施せず、除たんぱく操作ありの検液のみを調製し試験を実施した。

3.3 抽出方法の違いによるテオブロミン定量値の比較

脱脂ココア粉及び脱脂カカオマスの定量値を Table 5 に、これらとシロ糖を混合した混合試料におけるココア粉及びカカオマス中の定量値を Table 6 に示す。

改良法では除たんぱく操作により定量値がわずかに低下し、現行法では改良法と比較して定量値が若干低下していた。したがっ

Table 5 Result of defatted cocoa powder and cocoa mass

Sample	Cocoa powder			Cocoa mass		
	C	I		C	I	
Method	C	done	non	C	done	non
Deproteination	done	done	non	done	done	non
Theobromine (%)	2.24	2.40	2.41	1.84	2.01	2.05
RSD (%)	0.60	0.44	0.36	0.70	0.12	0.39

Table 6 Result of defatted cocoa powder and cocoa mass, mixed with sugar, theobromine, caffeine and defatted cocoa content in the defatted cocoa mass or cocoa powder

Sample	Cocoa powder			Cocoa mass		
	C	I		C	I	
Method	C	done	non	C	done	non
Deproteination	done	done	non	done	done	non
Theobromine (%)	1.98	2.36	2.39	1.86	2.02	2.05
RSD (%)	3.86	0.16	0.07	0.28	0.26	0.13

て、現行法及び改良法のいずれにおいても、除たんぱく操作により定量値は低下するが、その影響は現行法よりも改良法の方が小さいことを確認した。

3.4 模擬試料における無脂ココア分の比較

ココア粉及びカカオマス中のテオブロミン定量値、カフェイン定量値及び無脂ココア分を Table 7 に示す。

カフェイン定量値は、いずれの方法でもほぼ一致した。

カカオマスとシロ糖を混合した模擬試料のテオブロミン定量値はいずれの方法でもほぼ一致した。3.3 では、除たんぱく操作の影響を受けてテオブロミン定量値が低下していたが、ここではほぼ一致した原因として、3.3 ではカカオマスをソックスレー抽出により脱脂したうえで検液調製時の脱脂操作を行わなかったこと又は 3.3 とは異なるカカオマスを使用したことによる影響が考えられる。

ココア粉を使用した模擬試料において、除たんぱく操作を行わない改良法によるココア粉中のテオブロミン定量値は 1.99～2.01 % であった。3.2.1(3)に記載したとおり、この値は試料中のテオブロミンをほぼ完全に抽出した結果だと考えられる。除たんぱく操作を行う改良法による定量値は 1.98～1.99 % であり、除たんぱく操作を行わない場合よりわずかに低下していた。しかし、その低下量は、前報において除たんぱく操作を行うことによる低下量より縮小しており、除たんぱく操作を行わない改良法と遜色ない定量値が得られることを確認した。この理由として、抽出温度を室温から 50 °C に変更したことによりテオブロミン溶解度が向上したことが考えられる。現行法による定量値は、シロ糖と混合した模擬試料においては除たんぱく操作を行う改良法による定量

Table 7 Result of mixture sample, theobromine, caffeine and defatted cocoa content in the cocoa mass or cocoa powder

Sample	Method	Theobromine		Caffeine		Cocoa content (%)
		Content (%)	RSD (%)	Content (%)	RSD (%)	
Cocoa mass + sucrose	C	1.16	2.52	0.11	0.59	39.37
	I (d)	1.17	0.65	0.12	0.62	39.99
	I (n)	1.16	0.21	0.11	0.11	39.37
Cocoa powder + sucrose	C	1.98	1.56	0.14	1.41	65.72
	I (d)	1.98	0.70	0.14	0.49	65.72
	I (n)	2.01	0.34	0.14	0.42	66.65
Cocoa powder + flour	C	1.92	0.21	0.13	0.38	63.55
	I (d)	1.99	0.68	0.15	0.38	66.34
	I (n)	2.00	0.15	0.14	0.91	66.34
Cocoa powder + mixed powder	C	1.91	0.84	0.13	0.44	63.24
	I (d)	1.98	0.45	0.15	0.44	66.03
	I (n)	2.01	1.87	0.14	1.13	66.65
Cocoa powder + skim milk powder	C	1.94	0.26	0.15	0.46	64.79
	I (d)	1.98	0.67	0.16	0.46	66.34
	I (n)	1.99	1.06	0.16	1.77	66.65

Cocoa content: Defatted cocoa content; C: Current analysis method; I (d): Improved analysis method with deproteination; I (n): Improved analysis method without deproteination

値とほぼ一致したが、他は 1.91～1.94 % と若干低下していた。前報においても、現行法によるココア粉の定量値は改良法と比較して若干低下しているのに対し、しょ糖を含有するチョコレートでは低下量がわずかであった。そのため、しょ糖など低分子化合物が比較的多量に存在することにより、除たんぱく操作によるテオブロミンの共沈を軽減する可能性が考えられる。したがって、国内分類例規第 1806.20 号 1.「カカオマスと砂糖から成る粉状のココア調製品の関税分類について」の基準を満たすか否かの分析においては、現行法及び除たんぱく操作を行う改良法のいずれによってもほぼ同等の結果が得られることを確認した。

これまでに実施したテオブロミンの添加回収試験、テオブロミンの定量値及び無脂ココア分の比較を実施した結果を、最初に正確さの観点から比較すると、除たんぱく操作を行わない改良法では、たんぱく質を変性させずテオブロミンが共沈する可能性が極めて低いため他の方法と比較してより正確に定量することができると確認した。除たんぱく操作を行う改良法は、除たんぱく操作を行わない場合に比べてわずかな定量値の低下が見られる場合もあったが、除たんぱく操作を行わない改良法と遜色のない結果が得られることを確認した。したがって、改良法では除たんぱく操作の有無によらず正確にテオブロミンを定量することができる。次に、精度の観点から比較すると、除たんぱく操作を行わない改良法では、一部の模擬試料において精度が若干低下することを確認した。一般に除たんぱく操作を行わないことで検液中に含まれるたんぱく質が HPLC のカラム内で析出するなど、分析の障害となる可能性が懸念される。本研究において除たんぱく操作を

行わない改良法により調製した検液を多数測定した中ではカラム背圧の上昇など装置自体へ悪影響を及ぼすような事象は見られなかったが、精度の低下の原因は検液中のたんぱく質である可能性を否定できないと考えられる。一方、除たんぱく操作を行う改良法では検液中のたんぱく質が分析の障害となる懸念がない。以上から、本研究において、除たんぱく操作を行う改良法が最も正確かつ精度よくテオブロミンを定量することが可能であると考えられる。

4. 要 約

ココア含有調製食料品に含まれるテオブロミン及びカフェインの分析法について、正確かつ精度よく無脂ココア分を定量することが可能な抽出方法を検討した。

第 2 報で示された改良法の検液調製手順から、室温で 10 分間かくはんする操作は 50℃ の振とう式恒温水槽中で 10 分間かくはんすることとする等一部の操作を変更して、テオブロミンの添加回収試験及び模擬試料を用いた定量試験を実施したところ、改良法では除たんぱく操作を行うことによる回収率の明確な低下を確認しなかったが、除たんぱく操作を行わない改良法では一部の試料で若干の精度の低下が見られたため除たんぱく操作を行う改良法が最も正確かつ精度よくテオブロミンを抽出できるものと考えられた。

文 献

- 1) Maryadele J O'Neil, Patricia E. Heckelman, Cherie B. Koch, Kristin J. Roman, Catherine M. Kenny, Maryann R. D'Arecca : "THE MERCK INDEX" 14th EDITION, P.1595, (2006), (MERCK & CO., INC., New jersey)
- 2) 佐藤晴紀, 岩崎智子, 増田靖子, 徳島将光, 五十嵐智大, 松本啓嗣 : 関税中央分析所報, **60**, 35(2020).
- 3) 早乙女航, 池田英貴, 小川浩史, 馬越秀一, 松本啓嗣 : 関税中央分析所報, **61**, 55(2021).
- 4) 中村洋 : "分析試料前処理ハンドブック", P.179(2003), (丸善株式会社).