ガスクロマトグラフィーによる食品中の テオブロミンの定量

(昭和 60 年 5 月 27 日受理)

石田 裕* 関根 展子*
木村 茂* 関谷 茂二*

Gas Chromatographic Determination of Theobromine in Foods

Hiroshi ISHIDA, Hiroko SEKINE, Shigeru KIMURA
and Shigeji SEKIYA

(Food Research Laboratory, Tokyo Food Sanitation Association:
1-19-10, Tokumaru, Itabashi-ku, Tokyo, Japan)

Theobromine in foods was determined by gas chromatography (GC). The following procedure was used to clean up samples. The homogenized sample was boiled in alkaline aqueous media, then fat was extracted with *n*-hexane. The aqueous layer was acidified with diluted hydrochloric acid and sodium chloride was added. Theobromine was extracted from this treated aqueous solution with dichloromethane and the extract was evaporated to dryness. The residue was redissolved in dichloromethane containing internal standard. GC analysis was performed on a column packed with 1% cyclohexane dimethanol succinate on Gaschrom Q, with FID.

In this method, the average recoveries were 99-101%, the coefficient of variation was less than 3% and the limit of determination for theobromine in foods was about 0.005%.

(Received May 27, 1985)

Key words: テオブロミン theobromine; ココア cocoa; チョコレート chocolate; ガスクロマトグラフィー (FID) gas chromatography (FID)

テオブロミンはチョコレート、ココアなどのカカオ製品に多く含まれるカフェインと同様のプリン塩基である。生理活性もカフェインと類似し、中枢神経の興奮、強心、利尿作用等を有している。しかし一般にはカフェインがよく知られているため、テオブロミンの存在については必ずしも留意されていない。このことから、その存在及び含有量を把握することは意義があると思われる。

現在、食品中のテオブロミンの定量法としては重量法¹⁾、薄層クロマトグラフィー^{2)~4)}、紫外外部吸収測定法^{2)~9)}、液体クロマトグラフィー^{10)~11)} (以下 HPLC) が、また純品の定量法 (主に薬剤に対して) としてガスクロマトグラフィー^{12)~14)} (以下 GC) が報告されているが、GC による食品中のテオブロミンの定量についての報告は見当たらない。GC によるテオブロミン定量の利点として機器の普及率及び分析精度が高いこと、短時間での分析が可能なことなどがあげられる。これらのことから GC による食品中のテオブロミンの定量を試み、良好な

* (社)東京都食品衛生協会、東京食品技術研究所: 東京都板橋区徳丸 1-19-10

結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

都内の小売店より購入した輸入ココア2点、国産ミルクココア2点、ビターチョコレート3点、ミルクチョコレート3点及び小児向けチョコレート菓子6点を用いた。

2. 薬

テオブロミンは東京化成工業(株)製試薬特級、炭酸水素ナトリウム、塩酸、塩化ナトリウム、ピレン、無水硫酸ナトリウム、及び有機溶媒はすべて和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。

テオブロミン標準溶液: テオブロミンをジクロロメタン(以下 DCM と略)に溶解し、0.05~0.25 mg/ml の標準溶液を調製した。

内部標準溶液: ピレン 12.5 mg を DCM 100 ml に溶解して調製した。

3. 装置

ガスクロマトグラフ: (株) 島津製作所製. GC-9A 型

(FID 付)

ガスクロマトグラフ 質量分析計: (株) 島津製作所製 GC-MS 6020 型

4. 試験溶液の調製

乳鉢で磨砕した試料 2~10 g に水 150 ml と消泡の目的でイソアミルアルコール 0.5 ml、炭酸水素ナトリウム 0.5 g を加え、弱く煮沸し、45分間還流抽出を行う。冷後遠心分離し、上澄液を 250 ml のメスフラスコに移す。さらに沈殿を 50 ml の水で2回洗浄、遠心分離を行い、その上澄液を先のメスフラスコに合せ水で定容後、この液 40 ml を遠沈管にとり *n*-ヘキサン 10 ml ずつで2回洗浄、脱脂する。次いでここに得た水層の 5 ml を分液漏斗に採り 1 N 塩酸で pH 1~2 に調整し、塩化ナトリウム 1 g を溶解させた後、DCM 40 ml ずつで3回テオブロミンの抽出を行う。この抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥後 50~60° 減圧下溶媒を除去し、得られた蒸発残留物に DCM 4 ml、内部標準溶液 1 ml を加え溶解し、試験溶液とした。それらの操作を Scheme 1 に示した。

Scheme 1. Analytical procedure for theobromine in food

5. GC 及び GC-MS 測定条件

(1) GC

カラム管: 3 mm×1 m, ガラス製

充てん剤: 1% cyclohexane dimethanol succinate,
on Gaschrom Q 80~100 mesh

カラム温度: 220°

注入口及び検出器温度: 250°

キャリアー: 窒素 50 ml/min

注用量: 2 µl

検出器: FID

(2) GC-MS

カラム管: 2 mm×1 m, ガラス製

充てん剤: (1) に同じ

カラム温度: 200°

注入口温度: 230°

イオン源温度: 270°

セパレーター温度: 250°

キャリアー: ヘリウム 18 ml/min

Fig. 1. Gas chromatograms of theobromine in foods (effect of treated with dichloromethane for cleanup)

A: bitter chocolate

B: chocolate cake

C: milk cocoa

D: cocoa powder

I: treated with dichloromethane

II: not treated with dichloromethane

a: caffeine

b: internal standard (pyrene)

c: theobromine

エレクトロンエネルギー: 20/70 eV

トラップカレント: 60 μ A

6. 定性及び定量

定性は内部標準物質 (以下 I.S. と略) との相対保持時間の比較により行った. また定量はピーク面積測定法により行った.

結果及び考察

1. 抽出条件

テオブロミンは弱アルカリ性で水に対する溶解度が増加することから炭酸水素ナトリウムを加え弱アルカリ性にして抽出を行った. 抽出温度については水に対する溶解度は高温ほど増加することから煮沸抽出を行うこととした. 抽出時間については, 弱く煮沸し15分から60分まで15分ごとに抽出液を作成し, テオブロミンを定量, 抽

出率の比較を行った.

ココア (A) については30~60分までは定量値が $1.96 \pm 0.03\%$ とほぼ一定であったが, 15 分間抽出における測定値は 1.79% であった. またビターチョコレート (A) では15分から60分まで $0.42 \pm 0.02\%$, チョコレート菓子 (A) では $0.18 \pm 0.01\%$ とほぼ一定であった. このことから抽出時間は45分とした.

2. GC 分析上の妨害物質の除去

ココアやチョコレートには脂質が多く, GC 分析上の妨害となるため, 水層を弱アルカリ性に保ち, *n*-ヘキサンで脂質の除去を行った. また, この操作のみでは妨害物質の除去が不十分なため, 塩酸で pH を 1~2 に調整し, 食塩濃度を 20% にした後, DCM への転溶によるクリーンアップを試みた. その結果 Fig. 1 に示すよう

Fig. 2. Mass spectra of theobromine

A: standard

B: sample (chocolate)

Table 1. Recovery of Theobromine in Foods

Sample	Theobromine (mg)			Recovery (%)
	Contents	Added	Found	
Cocoa powder A	49.0	20.0	69.8	101.2
Bitter chocolate A	21.1	20.0	40.8	99.3
Chocolate cake A	17.9	20.0	37.7	99.5

2.5 g of cocoa powder, 5.0 g of bitter chocolate and 10.0 g of chocolate cake were used

に、良好なクロマトグラムが得られ、定量性が向上した。

3. GC 充てん剤と I.S の検討

充てん剤は SE-30, OV-17, PEG-20M, DEGS, NPGS, 及び cyclohexane dimethanol succinate について、また I.S についても種々検討した結果、充てん剤は Gaschrom Q を担体とした 1% cyclohexane dimethanol-succinate を、I.S は テオブロミンとの間に良好なピークが得られることからピレンを用いることとした。なお相対保持時間はピレンを 1.0 とすると テオブロミンは 1.5 であった。

4. GC-MS による分析結果

ココア及びチョコレートからの抽出物質とテオブロミン標準品についてマススペクトルを測定した結果、Spi-teller らと同様に分子イオン M^+ (M/e 180) 及び主要なフラグメントピーク 137, 109, 82, 67, 55 が検出され、テオブロミンと同定した。

5. 回収率、再現性及び定量限界

ココアは 2.5 g, ビターチョコレートは 5.0 g, チョコレート菓子は 10.0 g を抽出用フラスコに入れ、これにテオブロミンを 20.0 mg ずつ加えた後 Scheme 1 に従いそれぞれ 3 回ずつ添加回収試験を行った結果、いずれの試料においても 99~101% の回収率が得られた。また変動係数 ($n=5$) については輸入ココア (A) では 1.3%, ビターチョコレート (A) では 2.5%, チョコレート菓子 (A) では 1.3% と良好な結果が得られた。なお本法における定量限界は 50 $\mu\text{g/g}$ であった。

6. 市販食品中のテオブロミンの含有量

市販のカカオ製品についてテオブロミンの含有量の測定を行った結果、輸入ココアは、1.85~1.96%, ミルクココアはいずれも 0.34%, ビターチョコレートは 0.32~0.42%, ミルクチョコレートは 0.09~0.16%, チョコレート菓子は 0.12~0.18% であった。

7. GC によるテオブロミンの定量について

テオブロミンの定量法は種々報告されているが、現在では紫外部検出器を用いた HPLC が発展してきている。HPLC の利点として GC に比べ検出感度が高いことや、前処理の簡便さがあげられ、GC の利点として機器の普及率が高いこと、機器及びカラムが安価であること、自己充てんやカラムコンディショニングが容易なこと、GC-MS のような確認に適する機器の整備がなされてい

Table 2. Theobromine Contents in Commercial Food Samples

Sample		Net weight (g)	Theobromine contents (%)
Cocoa powder	A	100	1.96
	B	200	1.85
Milk cocoa	A	150	0.34
	B	200	0.34
Bitter chocolate	A	60	0.42
	B	38	0.39
	C	38	0.32
Milk chocolate	A	78	0.09
	B	38	0.10
	C	38	0.16
Chocolate cake	A	78	0.18
	B	51	0.12
	C	48	0.21
	D	63	0.14
	E	49	0.14
	F	15	0.12

ること等があげられる。以上のようなことから HPLC だけでなく GC による測定法も発展させてゆく必要があろう。

8. 食品中のテオブロミンについて

カカオ製品は主に甘味を付して喫食されるため小児に好まれる食品の一つである。テオブロミンはカフェインと同様、メチルキサンチン系の物質であり、中枢神経興奮性 (カフェインに較べかなり弱い)、心血管系への影響、利尿作用などの生理活性を有することが報告^{16)~21)}されている。最近では特に小児向けに加工されたチョコレート菓子が多く市販されており、薬剤に対する感受性が一般的に大人より強い小児が摂取する機会が多いことから、生理活性を有する物質については、その含有量について把握しておくことは意義があろう。

文 献

- 1) Moores, R. G., Campbell, H. A.: Anal. Chem. 20, 40 (1948).
- 2) Luedy, T. F.: Pharm. Acta. Helv. 45, 254~

- 260 (1970).
- 3) Heftmann, E., Sigmund, S.: J. Chromatogr. **59**, 214~215 (1971).
- 4) Franzke, C. L., Grunert, K. S.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **139**, 85~87 (1969).
- 5) Hadon, H., Kleinert, J.: Rev. Int. Choc. **22**, 312~319 (1967).
- 6) Newton, J. M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **62**, 705~708 (1979).
- 7) Newton, J. M.: *ibid.* **52**, 653~656 (1969).
- 8) Newton, J. M.: *ibid.* **52**, 1133~1134 (1969).
- 9) Somorin, O.: J. Food Sci. **41**, 458~460 (1976).
- 10) Wildanger, W.: Deut. Lebensm. Rundschau. **72**, 160~161 (1976).
- 11) Kreiser, R. W. Martin, A. R.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **61**, 1424~1427 (1978).
- 12) Parker, D. K., Fontan, C. R., Kirk, P. L.: Anal. Chem. **35**, 356~359 (1963).
- 13) Jain, C. N., Kirk, P. L.: Microchem. J. **12**, 229~241 (1967).
- 14) Rader, B. R., Aranda, E. S.: J. Pharm. Sci. **57**, 847~851 (1968).
- 15) Spiteller, G., Friedmann, M.: Mh. Chem. Bd. **93**, 632~638 (1962).
- 16) 日本薬局方注解, 第七版第一部(南江堂) p. 352~354, p. 809~813 (1965).
- 17) 田所作太郎, 樋口洋一郎, 大橋京一, 柴崎道子: 臨床薬理 **7**, 383~392 (1976).
- 18) 田中 潔: “現代の薬理学” 第11版 p. 142~147 (1981) 金原出版.
- 19) Goodman, L. S., Gilman, A.: “薬理書・第5版(上)—薬物治療の基礎と臨床—” p. 458~471 (1980) (株)広川書店.
- 20) 田所作太郎: “薬物と行動” p. 329~341 (1980) ソフトサイエンス社.
- 21) Beer, B., Chasin, M., Clody, D. E., Vogal, J. R., Horovitz, Z. P.: Science **176**, 428~430 (1972).