報 文

HPLC による食品中のカフェイン、テオブロミン及び
テオフィリンの同時分析法

(平成 7 年 6 月 24 日受理)

守安 貴子*¹ 齊藤 和夫*² 中里 光男*¹
石川 ふさ子*¹ 藤沼 賢司*¹ 二島 太一郎*²
田村 行弘*¹

Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine
and Theophylline in Foods by HPLC

Takako MORIYASU, Kazuo SAITO, Mitsuo NAKAZATO, Fusako ISHIKAWA,
Kenji FUJINUMA, Taichiro NISHIMA and Yukihiro TAMURA

(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan)

A method was developed for the simultaneous determination of caffeine (CF), theobromine (TB) and theophylline (TP) in various kinds of foods by HPLC.

Solid foods except chewing gum were dialyzed for 1 hour against hot water, then for 5 hours against water at room temperature. CF, TB and TP in chewing gum were extracted with a blender into hot water. Liquid samples were diluted with 1% phosphoric acid.

The test solutions described above were each passed through a BAKERBOND spe (SO₃H) cartridge. The cartridge was washed with water and CF, TB and TP were eluted with a mixture of 2% ammonium solution-15% aqueous sodium chloride solution-MeOH (1:1:2). The three compounds were separated on a Cosmosil 5C18-AR column with a mobile phase of MeCN-0.01 M phosphate buffer (pH 3.5) (1:9). Detection was done at 275 nm.

The recoveries of CF, TB and TP added to various kinds of foods were 90~98%, 98~104%, 90~103%, respectively. The determination limits of CF, TB and TP were 10 µg/g.

(Received June 24, 1995)

Key words: カフェイン caffeine; テオブロミン theobromine; テオフィリン theophylline; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 透析 dialysis; 固相抽出 solid phase extraction

緒 言

茶葉、コーヒー豆、カカオ豆などに含まれ、中枢神経興奮、強心利尿作用などの生理活性を有するカフェイン (CF)、テオブロミン (TB) 及びテオフィリン (TP) は、我が国においては CF 及び TP が日本薬局方¹⁾ に収載され、諸外国では TB も医薬品として用いられている²⁾。また、我が国においては CF 及び TB は、苦味剤として

使用量の制限もなく、自由に添加することができる食品添加物である。

近年、食生活が多様化し、健康への関心が高まり、その結果、種々の茶飲料やいわゆる健康志向飲料、眠気防止効果などの生理作用を強調した菓子類など、新しいタイプの食品が市販されている。こうした食品の中にはこれらの化合物が含まれ、あるいは添加されたものも多い。また、クッキーの中に茶葉を入れたり、緑茶そのものを食するなど、従来の食用の仕方と全く異なった食べ方も見受けられる。このような食品を喫食することによ

*¹ 東京都立衛生研究所: 〒169 東京都新宿区百人町 3-24-1

*² 東京都立衛生研究所多摩支所: 〒190 東京都立川市柴崎町 3-16-25

り、CF、TB 及び TP を過剰に摂取し、不眠、動悸などの弊害が生じることも考えられる。そこで著者らは、このような様々な食品中の CF、TB 及び TP の含有量調査を行う目的で、多種類の食品に適用できる分析法を検討した。

食品中の CF、TB 及び TP の分析法には、GC^{3)~7)}、HPLC^{8)~15)} などが報告されている。しかし、これらの分析法は CF 及び TB についてのものが多く、食品中の TP の分析法について報告しているものは少ない。TP の生理活性は 3 種の中でも比較的強く、また、紅茶やその他の発酵茶の一部には TP を含有するという報告^{12), 14)} もある。近年、茶葉そのものを食することがあることを考えると CF 及び TB とともに TP の食品中の含有量を明らかにすることは重要である。すでに報告されている分析法を見ると、多種類の食品を対象として分析するには難点が多く、特に GC では TP を誘導体化して測定しなければならず、3 種を同時に分析するのは極めて難しい。HPLC では 3 種を同時に測定する報告もあるが、分析対象食品が限られていたり^{11), 12)}、前処理操作が煩雑である¹²⁾ と考えられた。そこで、多種類の食品を簡便、迅速に分析するため、前処理に透析及び固相抽出によるクリーンアップを組み合わせ、HPLC による定量を試みたところ 3 種を一斉分析できる、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試 薬

1) 混合標準原液：テオブロミン（東京化成工業（株）製試薬特級）50 mg を、約 80 ml の水に必要に応じて加温しながら溶解する。これに、テオフィリン（東京化成工業（株）製試薬特級）及びカフェイン（和光純薬工業（株）製）を各々 50 mg 加えて溶解し、全量を 100 ml としたものを混合標準原液とした。

2) 透析膜：透析膜 36/32（平面幅 43 mm、直径 27 mm、膜厚 0.0203 mm、Viskase 社製）

3) 前処理用カートリッジカラム：BAKERBOND spe (SO₃H)（充てん量 500 mg、J. T. Baker 社製）は使用前に MeOH 5 ml 及び水 5 ml で洗浄した。

4) 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 3.5): 0.01 M リン酸二ナトリウム 488 ml に 0.01 M リン酸 512 ml を加え、pH 3.5 付近に調整した。

5) その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. 装 置

高速液体クロマトグラフ：日本分光工業（株）製 880-PU 型ポンプ、同 875-UV 型検出器、（株）島津製作所製 CR-5A 型データ処理装置及びレオダイナ社製 7125 型インジェクターにより構成した。

3. HPLC 測定条件

カラム：Cosmosil 5C₁₈-AR (5 µm, 250×4.6 mm i.d.)、移動相：MeCN-0.01 M リン酸緩衝液 pH 3.5 (1:9) 混

液、流速：1.0 ml/min、検出波長：275 nm、注入量：20 µl

4. 試験溶液の調製

1) ガムを除く固形食品：試料 2~10 g をひょう取し、これに水 20 ml を加えて水浴上で 20 分間加温後、少量の温水で透析膜に充てんし、上端を密封した。これを、あらかじめ 80°以上の温水約 100 ml を入れた 200 ml のメスシリンダー中に入れ、全容量を約 200 ml とした後、メスシリンダーを沸騰水浴中で 1 時間加熱した。加熱後及び冷後全量を 200 ml とし、時々揺り動かしながら室温で 5 時間透析し、その透析外液を試料溶液とした。

2) ガム：試料 10 g をひょう取し、これに水 40 ml を加えて沸騰水浴上で 20 分間加温後ブレンダーによりホモジナイズし、上澄液を分取した。更に残渣に水 40 ml を加え、同様の操作を行って得られた抽出液を合わせ、冷後全量を 100 ml とした後、ろ紙ろ過し、試料溶液とした。

3) 液状食品：試料を 1% リン酸溶液で 5 倍希釈し、必要に応じてろ紙ろ過したものを試料溶液とした。

4) 試験溶液の調製：各々の試料溶液 5 ml を、BAKERBOND spe (SO₃H) カートリッジカラムに毎分 3~4 ml で負荷し、次いで水 5 ml で洗浄した後、2% アンモニア水-15% 塩化ナトリウム溶液-MeOH (1:1:2) 混液で溶出し、全量を 5 ml としたものを HPLC 用試験溶液とした。

5. 検量線の作成

混合標準原液を水で希釈し、1, 5, 10, 50 及び 100 µg/ml の混合標準溶液を調製し、その 20 µl を高速液体クロマトグラフに付し、ピーク面積法により検量線を作成した。

結果及び考察

1. 食品からの抽出

CF、TB 及び TP を食品から抽出する際の抽出溶媒として、Wesley ら^{7), 8)} は CF 及び TB を熱水で、石田ら⁹⁾ は TB を熱水抽出後、ジクロロメタンで抽出している。そこで、これらの分析法を参考に、抽出溶媒として熱水及びジクロロメタンを選び、ホモジナイザーによる直接抽出について検討した。なお、試料には、あらかじめ CF 1,300 µg/g 及び TB 4,800 µg/g を含有し、TP を含有しないことを確認した市販のチョコレートに、TP を 500 µg/g となるように添加したものをを用いた。その結果、熱水ではいずれの化合物においても 94% 以上の回収率が得られたが、ジクロロメタンでは CF が 80%、TB 及び TP が 20% と低かった。これは TB 及び TP の有機溶媒への溶解性が極めて低く、熱水には比較的良く溶解するためであると思われる¹⁰⁾。また、単に熱水で抽出しただけでは、固形成分との分離や後のクリーンアップ操作が煩雑になることが考えられたので、溶媒抽

出法及び透析法を組み合わせる方法について検討した。その結果、熱水抽出と溶媒抽出を組み合わせた方法では、溶媒にジクロロメタンを用いて検討したところ、CF及びTPの抽出率はそれぞれ86%、88%と比較的高かったのに対して、TBの抽出率は65%と低く有効ではなかった。一方、透析時に沸騰水浴中で一定時間加温して抽出する、熱水抽出と透析法を組み合わせた方法では3種の化合物とも回収率が94%以上と高く、夾雑

Fig. 1. Effect of heating time on the recoveries of caffeine, theobromine and theophylline by dialysis

Sample: Theophylline was added to chocolate.

■—■, caffeine; ●—●, theobromine;
▲—▲, theophylline

物との分離も良好であった。透析が成立するためには物質が溶解した状態でなければならないことから、この方法では透析の初期に沸騰水浴中で加熱し、TBを熱水に溶解することにより、透析を可能とした。次に、この加熱に必要な時間を明らかにするため、加熱時間と3種の化合物の回収率について検討した。なお、透析外液は加熱後及び冷後にメスアップを行い、その後5時間透析したものを分析した。その結果、Fig. 1に示したように加熱した場合は加熱しない場合に比べ、いずれの化合物も回収率が明らかに高かった。加熱時間については、3種の化合物の回収率がいずれも45分で最大となったため、1時間とした。また、加熱後の透析時間については、透析初期に加熱することにより、透析効率が良くなり、チョコレートなどでも加熱後2～3時間の透析で十分であったため、透析時間は5時間とした。しかし固形食品のうち、ガムについて透析法による添加回収実験を行ったところ、40～60%と回収率が低かった。これはガムの固形成分が透析時に分散せず、透析液と接触できない部分が多いため、抽出率が低かったものと考えられる。そこで、ガムについて熱水を用い、ブレンダーによる直接抽出を行ったところ、90%以上の回収率が得られた。従って、ガムはこの方法により、抽出することとした。また、液状食品は水で希釈したものを試料溶液としたところ、コーヒーなどの一部の試料で、クリーンアップ操作時に食品中の成分が析出してカート

Fig. 2. High performance liquid chromatograms of canned coffee cleaned up by BAKERBOND spe cartridges
(A) BAKERBOND spe (C₁₈), (B) BAKERBOND spe (SO₃H)

リッジが目詰まりを起こし、回収率が低下するものがあった。これらの試料の pH はすべて pH 6 以上であったが、一部の試料は pH 6 以上でも目詰まりを起こさないことから、原因は試料の pH と試料成分の双方にあるものと考えられる。そこで、希釈液の pH と成分の析出の関係について検討したところ、pH を 4 以下にすると成分の析出を防げることが分った。そこで、希釈液に、これら 3 種の化合物のイオン交換系カートリッジへの保持に影響を及ぼさないリン酸を用いることとし、その濃度について検討した。その結果、試料を確実に pH 4 以下にできる 1% リン酸で希釈したところ、目詰まりすることなく、回収率も良くクリーンアップできた。以上の結果から、液状食品は 1% リン酸で 5 倍希釈することとした。

2. クリーンアップ

固形食品では透析液を直接、液状食品ではフィルター処理を行ったのみで HPLC 分析すると、特にコーヒーなどでは保持時間の早い部分で夾雑物が多く、目的物を正確に定性、定量分析できない場合が多かった。また、チョコレートや一部の固形食品では、夾雑物の長時間の溶出により分析時間がかかるなどの問題もあった。そこで、これらの問題を解決するため、簡便なカートリッジカラムを用いた固相抽出による前処理方法について検討した。すなわち、逆相系の C_{18} カートリッジ及びイオン交換系の陽イオン交換カートリッジ (SO_3H) を用いてクリーンアップの効果について比較検討した。試料には夾雑物の多い缶コーヒーを用いた。結果は Fig. 2 に示したように、イオン交換系のカートリッジを用いてクリーンアップした方がその効果は顕著であった。特に、逆相系では TB, TP のように HPLC のクロマトグラム上で保持時間の早い部分において、夾雑物が多く検出され、定性定量が不可能であった。それに対し、イオン交換系ではこの付近の夾雑ピークは極めて少なく、TB 及び TP の定性定量が可能であった。また、紅茶においても TP のピーク付近に出現する夾雑物がイオン交換系では除去でき、誤認を防ぐことが可能となった。これら以外の試料についても同様に良好なクリーンアップ効果が得られたため、前処理用カートリッジとしては、イオン交換系カートリッジである BAKERBOND spe (SO_3H) を用いることとした。

カートリッジからの溶出液について希塩酸、希アンモニア水及びこれらと MeOH との混合液を用い、検討を行った。その結果、2% アンモニア水と MeOH 混液の混合比を 1:2 としたときの回収率が最も良好であった。しかし、溶出率は 90% 前後であり完全に溶出させることができなかった。そこで、更に溶出率を上げるため、溶出液に塩化ナトリウム溶液を加えることとした。塩化ナトリウム溶液の濃度と混合比について検討したところ、2% アンモニア水-15% 塩化ナトリウム溶液-

Fig. 3. High performance liquid chromatogram of mixture standard solution of caffeine, theobromine and theophylline

HPLC conditions; column: Cosmosil 5C₁₈-AR (4.6 mm×250 mm), mobile phase: MeCN-0.01 M phosphate buffer pH 3.5 (1:9), flow rate: 1.0 ml/min, detection: UV 275 nm

MeOH (1:1:2) 混液で溶出率が 95% 以上と最も良好であったため、溶出液はこの混液を用いることとした。また、溶出液量は 4 ml で 95% 以上が溶出したため、5 ml とした。

3. HPLC 条件の検討

カラムについては、逆相系の Finepack SIL C18T-5 と Cosmosil 5C₁₈-AR (いずれも 5 μ m, 250×4.6 mm i.d.) について検討した。その結果、いずれのカラムにおいても 3 種の化合物の分離は可能であったが、ピークの形状及び定量性の点から Cosmosil 5C₁₈-AR を用いることとした。移動相については、HPLC 用の試験溶液の pH が 11 と強アルカリ性であるため、カラムへの悪影響が懸念された。そこで移動相の pH を酸性に保つため、リン酸緩衝液を用い、これと MeOH あるいは MeCN との混液について検討した。その結果、MeCN-0.01 M リン酸緩衝液 (1:9) 混液が最適であり、緩衝液の pH を 3~4 としたとき、TB の保持時間は 5 分、TP は 7 分、CF は 12 分であり、HPLC の分析時間は約 15 分と短時間で終了できた。従って移動相には MeCN-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 3.5) (1:9) 混液を用いることとした。

Table 1. Recoveries of Caffeine, Theobromine and Theophylline from Foods

Sample	Recovery* ¹ (%)		
	Caffeine (100 $\mu\text{g/g}$)	Theobromine (100 $\mu\text{g/g}$)	Theophylline (20 $\mu\text{g/g}$)
Coffee	98.3 $\pm$ 1.4	103.5 $\pm$ 3.2	101.6 $\pm$ 2.4
Green tea	97.4 $\pm$ 2.0	98.3 $\pm$ 1.6	99.0 $\pm$ 0.7
Chocolate	97.8 $\pm$ 1.7	98.6 $\pm$ 2.8	98.9 $\pm$ 1.4
Cookie	90.4 $\pm$ 3.2	100.7 $\pm$ 4.1	90.3 $\pm$ 2.3
Chewing gum	95.4 $\pm$ 1.9	99.1 $\pm$ 4.6	99.9 $\pm$ 1.1

*¹ Average of three trials

Fig. 4. High performance liquid chromatograms of sample extracts
 (A) coffee, (B) black tea, (C) icecream, (D) chocolate, (E) candy, (F) chewing gum
 HPLC conditions were the same as described in Fig. 3.

4. 検量線及び検出限界

混合標準原液を水で希釈し、検量線の直線性について検討したところ、0.1~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線性を示した。また、本法における定量限界は、試料中濃度としていずれも 10 $\mu\text{g/g}$ であった。なお、標準品のクロマトグラムを Fig. 3 に示した。

5. 添加回収実験

市販のコーヒー (CF 500 $\mu\text{g/g}$ 含有)、緑茶 (CF 160 $\mu\text{g/g}$ 含有)、チョコレート (CF 1,100 $\mu\text{g/g}$ 及び TB 4,500 $\mu\text{g/g}$ 含有)、クッキー及びガムの 5 種類の食品に 1 g 当たり CF 及び TB を 100 μg 、TP を 20 μg 添加し、本法に従って操作し、各々 3 回ずつ添加回収実験を

行った結果を Table 1 に示した。回収率は CF で 90～98%，TB で 98～104% 及び TP で 90～102% と良好な結果が得られた。なお、試料のクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。いずれの試料においても、3 種の化合物の保持時間付近に夾雑物のピークは認められなかった。

ま と め

種々の食品に適用できる CF, TB 及び TP の同時分析法について検討した。

1) ガムを除く固形食品の試料溶液の調製には、抽出率が高く、クリーンアップ効果もある透析法を用いた。また、抽出率及び透析効果を高めるため沸騰水浴中で 1 時間加熱した。ガムは、熱水による直接抽出を行い、液状試料は 1% リン酸溶液で 5 倍希釈した。

2) 試料溶液は、イオン交換モードの BAKERBOND spe (SO₃H) カートリッジカラムで前処理することにより、夾雑物を除去することができ、広範囲な食品の分析が可能となった。

3) 本法における定量限界は、各々 10 µg/g であった。

4) コーヒー飲料、チョコレートなどに CA 及び TB を 100 µg/g, TP を 20 µg/g 添加した際の回収率は、いずれの化合物においても 90% 以上であった。

文 献

- 1) 日本公定書協会編: “第 12 改正日本薬局方解説書” C-799～805, C-1,477～1,482 (1991) 金原出版。
- 2) The Pharmaceutical Society of Great Britain: “British

Pharmaceutical Codex” p. 500～501 (1973).

- 3) Strahl, N. R., Lewis, H., Fargen, R.: J. Agric. Food Chem. **25**, 233～235 (1977).
- 4) Lowry, J. D., Williamson, L. J., Raisys, V. A.: J. Chromatogr. **143**, 83～88 (1977).
- 5) Chambers, R. E.: *ibid.* **171**, 473～477 (1979).
- 6) 広末トシ子, 川井英雄, 細貝祐太郎: 食工誌. **31**, 798～804 (1984).
- 7) 石田 裕, 関根展子, 木村 茂, 関谷茂二: 食衛誌. **27**, 75～80 (1986).
- 8) Madison, B. L., Kozarek, W. J., Damo, C. P.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **59**, 1,258～1,261 (1976).
- 9) Kreiser, W. R., Martin, R. A. Jr.: *ibid.* **61**, 1,424～1,427 (1978).
- 10) Zoumas, B. L., Kreiser, W. R., Martin, R. A. Jr.: J. Food Sci. **45**, 314～316 (1980).
- 11) Terada, H., Sakabe, Y.: J. Chromatogr. **291**, 453～459 (1984).
- 12) 福原克治, 松木容彦, 南原利夫: 食衛誌. **26**, 208～212 (1985).
- 13) 功刀 彰, 青木智子, 功刀禎子: 同上. **29**, 136～140 (1988).
- 14) 寺田久屋, 鈴木晃世, 田中治夫, 山本勝彦: 同上. **33**, 347～354 (1992).
- 15) 渡部伸夫, 寺田久屋, 一色賢司: 食工誌. **39**, 907～912 (1992).
- 16) Budavari, S. ed.: “The Merck Index” 11th Ed. p. 1,460～1,462 (1989), Merck & CO., Inc., Rahway.