

市販ミルク入り紅茶飲料缶詰中のカフェインの定量

隅谷 栄伸, 末兼 幸子, 中谷 文, 達家 清明

Quantitative Determination of Caffeine in Commercially Canned Black Tea Drink with Milk

Hidenobu Sumitani, Sachiko Suekane, Aya Nakatani and Kiyooki Tatsuka

A method was developed for determining caffeine in canned black tea with milk by high performance liquid chromatography (HPLC). After dilution by acetonitrile, caffeine was separated by using a reversed phase C₁₈ column and a programmed gradient of two mobile phases of phosphoric acid-acetonitrile-N, N-dimethylformamide (0.1%+0.1%+5%) and acetonitrile. Caffeine was quantitated at 280 nm by a UV detector. The recoveries of caffeine were within the range of 93.8-104.1%. A sterilization at 121°C for 6min had no effect on the recoveries.

Key words: caffeine, canned black tea drink with milk, HPLC.

茶及び紅茶飲料及びココア調製品中のカフェインの定量法については、ガスクロマトグラフ(GC)法及び高速液体クロマトグラフ(HPLC)法を用いた多くの研究報告がある。伊奈らは、茶葉中のカフェインをトリメチルシリール誘導体化してGC分析を行った¹⁾。Kreiserら及びZoumasらはココア調製品を石油エーテルによる脱脂後、蒸留水抽出液からカフェインをHPLCで定量する方法を確立した^{2) 3)}。De Vriesらは、脱脂工程を省略した方法で好結果を得ている⁴⁾。その後、HPLC法でカフェインを定量する方法がいくつか報告されている⁵⁻⁸⁾。TeradaらはセップバックカートリッジC₁₈を用いて分析前処理を簡便化している⁹⁾。池ヶ谷は茶中のカテキン類を除去後、カフェインをHPLCで定量した¹⁰⁾。桑野らは池ヶ谷の試料調製法にセップバックカートリッジC₁₈を組み合わせて更にカフェイン回収率を向上させている¹¹⁾。寺田らは緑茶、半発酵茶、紅茶浸出液中のカフェイン及びカテキン類の同時定量をHPLC法で行っている¹²⁾。また、久延らはHPLC法による茶飲料中のカフェインとカテキンの同時定量について詳しく報告している¹³⁾。しかし、乳成分共存下で加熱殺菌処理された紅茶飲料缶詰中のカフェインの定量法についての報告は見当たらない。

本研究の目的は乳成分の共存および乳成分共存下での加熱殺菌処理が、カフェインの定量値に及ぼす影響を調査し、ミルク入り紅茶飲料缶詰中のカフェイン定量法を確立することである。

実 験 方 法

1. 試 薬

1) カフェイン標品

無水カフェイン：和光純薬工業(株)、特級。

2) HPLC分析用試薬

アセトニトリル, N, N-ジメチルホルムアミド, リン酸 (85%)：和光純薬工業(株)。

3) その他

ろ紙：アドバンテック(株)製，No2.

非水系メンブランフィルター：アドバンテック(株)製，ディスポーザブルシリレンジフィルター PTFE，直径 25mm，孔径 0.5 μ m.

水：超純水製造装置，Elgastat UHQ (Elga Ltd., Lane End, U. K.) で精製.

紅茶葉（ダージリン）及び生乳（無脂乳固形分9.3%以上，乳脂肪分3.5%以上）は市販品を用いた.

2. 高速液体クロマトグラフ装置及び分析条件

1) HPLC装置：LC-6Aシステム（島津製作所製）.

システムコントローラ：SCL-6B.

オートインジェクタ：SIL-6B.

カラムオープン：CTO-6A（カラム温度：43℃）.

紫外可視検出器：SPD-6AV（検出波長：280nm，AUF S：0.01）.

送液ポンプ：LC-6AD 2台.

ヘリウム脱気ユニット：DGU-1A.

データ処理：クロマトパック C-R 4 A.

2) カラム及びガードカラム：GLサイエンス(株)製 Inertsil ODS-2，粒径5 μ m（4.6mm ϕ ×250mm）及びOSタイプ，粒径5 μ m（4.0mm ϕ ×10mm）.

3) 移動相：（A液）0.1%アセトニトリル及び5% N,N-ジメチルホルムアミド含有の0.1%リン酸溶液，（B液）アセトニトリル.

4) グラジエント：全流量 1ml/分.

分析開始と共にB液濃度1%からグラジエントし，20分後に10%，30分後にB液は100%とする．その後カラム洗浄のために10分間B液を100%流す．次の試料を分析する前に，20分間B液を1%流した．

5) 分析試料注入量：10 μ l.

3. 検量線用カフェイン標準溶液の調製

検量線試料はカフェイン10，50，100，300及び500ppm水溶液5点をそれぞれ2.5mlとり，アセトニトリルで全量を10ml定容とした．

4. カフェイン添加回収試験用紅茶試料及び加熱殺菌処理試料の調製

市販の紅茶葉40gに約1.6 ℓ の沸騰水を加え，3分間攪拌しながら抽出後，20メッシュのフィルターで紅茶葉を除去し，抽出液をNo2ろ紙でろ過．ろ液を放冷後，砂糖200gを加え，2 ℓ 定容として紅茶原液とした．

Table 1 に示すとおり容量に紅茶原液と生乳を混合し，水で定容にしてM0，M10及びM50の3種の添加回収用紅茶試料を調製した．各紅茶試料90mlに2.5mg/mlのカフェイン水溶液0ml，2ml，4ml及び8mlを添加後，水で100ml定容とした．

加熱殺菌処理の影響を調べるために，定容とした試料の約1/2を耐熱ガラスびんに充填後，オートクレーブ内温度121℃で6分間処理した．すべての試料は分析に供するまで2～3℃で保存した．

Table 1. Preparation of experimental tea samples

Tea Type	Volume (ml), mixed		Total volume ^{a)} (ml)
	Tea infusion with sugar ^{a)}	Whole milk	
M 0	250	0	500
M10	250	50	500
M50	250	250	500

a) Water was added to the total volume.

5. 分析用試料溶液の調製

試験用紅茶あるいは市販紅茶飲料2.5mlをアセトニトリルで10ml定容にした。その溶液をメンブランフィルター濾過し、分析試料とした。

6. 添加回収試験用標準試料のカフェインの定量

生乳及びカフェイン無添加で加熱殺菌処理していない添加回収試験用試料について5回測定し、その平均値をカフェイン回収率試料の基準とした。

結果及び考察

乳成分を含む紅茶中のカフェインの分離、定量法を確立した。10、50、100、300及び500ppmのカフェインの標準溶液を分析試料の調製法と同様にアセトニトリルで希釈し、各溶液を分析後、カフェインのピーク面積から、最小自乗法により求めた回帰式は $Y = 2522.24X + 3644.75$ で、相

Table 2. Recovery of caffeine from black tea drinks with or without milk

Tea Type ^{a)}	Caffeine added (ppm)	Non-sterilized		Sterilized ^{b)}	
		Found (ppm)	Recovery (%)	Found (ppm)	Recovery (%)
M 0	0	215.7 ^{c)}	—	211.3	—
M10	0	210.6	—	213.2	—
M50	0	212.4	—	225.4	—
M 0	50	267.6	103.8	263.3	95.2
M10	50	263.7	96.0	263.5	95.6
M50	50	266.1	100.8	262.6	93.8
M 0	100	316.7	101.0	313.1	97.4
M10	100	315.8	100.1	316.9	101.2
M50	100	316.3	100.6	310.0	94.3
M 0	200	421.9	103.1	415.1	99.7
M10	200	409.1	96.7	419.7	102.0
M50	200	423.9	104.1	417.1	100.7

a) Preparation procedures were shown in Table 1.

b) Samples were sterilized at 121°C for 6min.

c) Average value of five measurements.

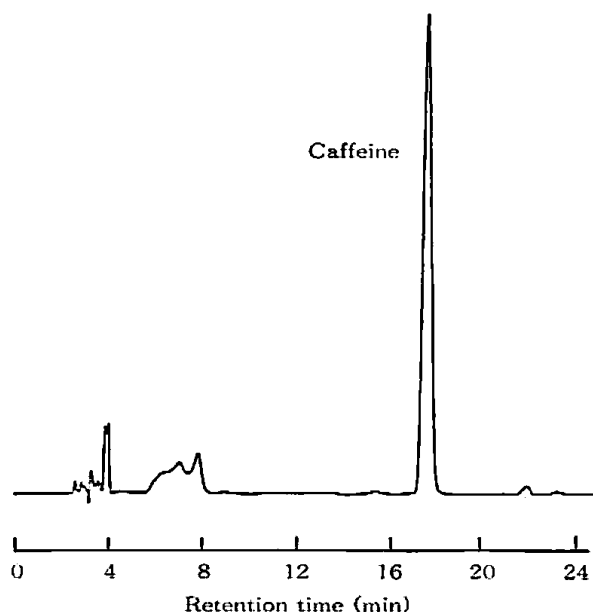


Fig. 1. HPLC profile of commercially canned black tea drink with milk

関係数 (γ) は0.9999であった。試験用に紅茶及びミルク入り紅茶を調製したが、添加回収試験を行うためにはその紅茶に元々含まれているカフェイン量を求める必要がある。そこで生乳及びカフェイン無添加で加熱殺菌処理を施していない添加回収試験用紅茶試料を5回測定した結果、紅茶中のカフェイン量は平均215.7ppm、変動係数は1.7%であった。この平均含有量を基準として各種の調製紅茶からのカフェイン添加回収率を計算することによって分析値の正確さを検討した。Table 2 に各種の紅茶中のカフェイン量及びカフェイン添加回収率を示した。加熱殺菌処理していない試料の回収率は96.0~104.1% (平均100.7%) であった。加熱殺菌処理した試料の回収率は93.8~102.0% (平均97.8%) であった。また、生乳無添加試料M0、生乳添加試料M10及びM50の回収率の平均値はそれぞれ100.0%、98.6%及び99.0%であった。以上の結果はミルクの共存及びミルクの共存下の加熱殺菌処理がカフェインの定量値に影響を与えないことを示している。

Fig. 1 に本方法によって分析した市販ミルク入り紅茶飲料缶詰について測定した液体クロマトグラムの一例を示す。

このように市販のミルク紅茶飲料のような乳成分を含むものでも、その一定量をアセトニトリルに希釈し、メンブランフィルターを通すという簡単な前処理だけで、HPLC法で定量できることがわかった。Table 3 に4社から発売されている市販紅茶飲料缶詰中のカフェインの定量結果を示した。ミルク入り紅茶飲料のカフェイン含量はミルク入りでないものと比べて可成り高い値を示している。

Table 3. Caffeine content in commercially canned black tea drink

Brand	Caffeine (ppm)	
	Black tea	Black tea with milk
A	191.8	312.6
B	129.7	160.6
C	145.0	161.4
D	117.0	182.5

要 約

HPLC法によるミルク入り紅茶飲料缶詰中のカフェイン定量法を確立した。

分析試料2.5mlをアセトニトリルで10ml定容にし、その溶液をメンブランフィルター濾過し、10 μ lをHPLCに注入した。

カラムは Inertsil ODS-2 (粒径5 μ m, 4.6mm ϕ ×250mm) にガードカラムOS-タイプ (粒径5 μ m, 4.0mm ϕ ×10mm) を装着し、移動相はA液として0.1%アセトニトリル及び5%N,N-ジメチルホルムアミド含有の0.1%リン酸溶液、B液としてアセトニトリルを用いた2相グラジエント、流速1ml/分で分離し、280nmでUV検出した。

無水カフェイン10~500ppmの水溶液の濃度範囲内で直線性のよい検量線が得られた。紅茶試料のカフェイン回収率は、93.8~104.1% (平均99.2%) と良好な精度で定量することができた。ミルク共存及びミルクの共存下の加熱殺菌処理がカフェインの定量値に影響なく、本法が市販ミルク入り紅茶飲料缶詰中のカフェイン定量法として実用的な方法である。

文 献

- 1) 伊奈和夫、森下はるみ：日食工誌、16、525-528 (1968)。
- 2) Kreiser, W. R., Martin, R. A. Jr.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61, 1424-1427 (1978)。
- 3) Zoumas, B. L., Kreiser, W. R.: *J. Food Sci.*, 45, 314-316 (1980)。
- 4) De Vries, J. W., Johnson, K. D., Heroff, J. C.: *J. Food Sci.*, 46, 1968-1969 (1981)。
- 5) Ashoor, S. H., Seperich, G. J., Monte, W. C., Welty, J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 606-609 (1983)。
- 6) Blauch, J. L., Tarka, S. M. Jr.: *J. Food Sci.*, 48, 745-750 (1983)。
- 7) 福原克治、松木容彦、南原利夫：食衛誌、26, 208-212 (1985)。
- 8) Dulitzky, M., De La Teja, E.: *J. Chromatogr.*, 317, 403-405 (1984)。
- 9) Terada, H., Sakabe, Y.: *J. Chromatogr.*, 291, 453-459 (1984)。
- 10) 池ヶ谷賢次郎：日食工誌、32, 61-66 (1985)。
- 11) 桑野和民、三田村敏男：農化、60, 115-117 (1986)。
- 12) 寺田志保子、前田有美恵、増井俊夫、鈴木裕介、伊奈和夫：日食工誌、34, 20-27 (1987)。
- 13) 久延義弘、朝賀昌志、松田良子、原京子、末松伸一、小松美博：東洋食品工短大・東洋食品研究所研究報告書、19, 69-77 (1992)。