

食品中の塩基成分の非水電気化学に関する研究： Ⅰ. カフェインの非水電気化学分析

松本, 清
九州大学農学部食品分析学教室

立石, 理世子
九州大学農学部食品分析学教室

箴島, 豊
九州大学農学部食品分析学教室

<https://doi.org/10.15017/23258>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 32 (4), pp.153-159, 1978-03-30. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

食品中の塩基成分の非水電気化学に関する研究

I. カフェインの非水電気化学分析

松本 清・立石理世子・箴島 豊

九州大学農学部食品分析学教室

(1977年11月19日受理)

Studies on the Non-aqueous Electrochemistry of Bases in Foods

Part I. Non-aqueous Electrochemical Analysis of Caffeine

KIYOSHI MATSUMOTO, RIYOKO TATEISHI
and YUTAKA OSAJIMA

Laboratory of Food Analysis, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-09, Fukuoka 812

緒 論

容量分析法としての酸・塩基滴定は従来主に水溶液中で行なわれ終点判定には電位差測定法が広く用いられてきたが、解離定数がきわめて小さい場合には滴定終点付近での電位飛躍が小さいため定量法として不向きであるとされてきた。しかしながら、近年水以外の適当な溶媒を媒体として用いることによつて定量可能範囲が著しく拡大され、従来不可能かあるいは困難であつた弱酸、弱塩基の滴定すら可能とみなされるようになった。

一般に非水溶媒滴定においては、弱塩基には酸性溶媒、弱酸には塩基性溶媒を用いることによつてそれぞれ強塩基、強酸に変え滴定を可能ならしめているが、きわめて弱い酸・塩基の場合にはなお不十分であるためこれらの溶媒をベースとして第2、第3の溶媒との混合による2元あるいは3元混合溶媒系の適用を必要とすると考えられる。

著者らは食品中の酸成分について電導度法に基礎をおく新しい電気化学的分析法ならびに装置を完成し(箴島ら, 1976, 1977a, 1977b), さらにその応用分野を広げるため非水あるいは混合溶媒系への拡張を進めて来た。本研究においては食品中の塩基成分の電気化学的定量に非水分析法の導入を試みるため、まず嗜好飲料に含まれるカフェインの定量を目的として電位差法および電導度法の適用を検討し一応の成果を得

たので報告する。

実 験 方 法

1. 装置

電位差滴定: メトローム社製自動記録式電位差滴定装置 E 436 を使用した。ガラス電極は Ag/AgCl 照合電極を内蔵した複合型ガラス電極 EA 125 (メトローム社製)を用いた。

電導度滴定: メトローム社製コンダクトスコープ E 365 B を前記の自動記録式電位差滴定装置 E 436 に連結して用いた。電導度セルは EA 645-2 (セル定数 1.996 cm^{-2}) を使用した。また、直接電導度を測定するセルとしては EA 608-0.1 (セル定数 0.096 cm^{-2}) を用いた。

温度調節装置: 東洋製作所製クールメイト TE-104S を用いた。

2. 試薬と測定条件

酢酸: 半井化学製非水滴定用酢酸を用いた。

フタル酸水素カリウム: 精製水(古谷, 1967)で2回再結晶したものを 110°C で5時間乾燥し硫酸デシケータ中で放冷して使用した。

過塩素酸/酢酸滴定液: 市販特級過塩素酸(60%)を大容量の水酢酸に滴下した後その水分に見合う量の無水酢酸を滴下した。この過塩素酸/酢酸溶液を密栓して $18\sim 25^{\circ}\text{C}$ に一昼夜放置後、水酢酸で希釈し規定液を調製した。

Table 1. Solvent systems for potentiometric titration method.

Titrant	Solvent systems
HClO ₄ /Dioxane	CHCl ₃ -AA-Benzene CHCl ₃ -AA-MIBK
HClO ₄ /MIBK	CHCl ₃ -AA-Dioxane CHCl ₃ -AA-Benzene CHCl ₃ -AA-Acetone CHCl ₃ -AA-MIBK
HClO ₄ /HOAc	CHCl ₃ -AA-Toluene CHCl ₃ -AA-Cyclohexane CHCl ₃ -AA-Benzene

AA: Acetic anhydride

MIBK: Methyl *iso*-butyl ketone.

その他の試薬：市販特級品を用いた。

測定条件：滴定用ビュレットシリンダーは10 ml 容量のものを用い、滴定速度は0.1 ml/min に設定した。電位差滴定は室温で行ない、温度による容量変化を補正した (West, 1960)。電導度滴定は25±0.1°C の恒温で行なつた。

実験結果

1. 非水電位差滴定

1.1. 溶媒および組成の検討

カフェイン ($K_b \approx 1 \times 10^{-14}$) のように解離定数の極めて小さい塩基の場合には混合非プロトン溶媒が有効と考えられること、ならびにカフェインがクロロホルムによく抽出されるところからクロロホルム、無水酢酸、ベンゼン、アセトニトリル、アセトン、ジオキサン、メチルイソブチルケトン (MIBK)、トルエン、シクロヘキサンの各種溶媒を種々の比 (2成分あるいは3成分) で混合し、カフェインの定量に及ぼす影響を検討し、定量可能な溶媒系として Table 1 を得た。

定量に適した適定曲線は曲線の立ち上がりが明確でかつ電位飛躍が大きいものが望ましい。Table 1 の系から最も良好な溶媒組成比としてクロロホルム：無水酢酸：トルエン=2:5:15, クロロホルム：無水酢酸：シクロヘキサン=5:5:12, クロロホルム：無水酢酸：ベンゼン=1:2:4 を、また滴定溶液として過塩素酸/酢酸を決定し、カフェイン濃度に対する滴定量の比例性と適定曲線の電位飛躍幅を検討した。Fig. 1 から明らかのように3つの系における比例性には大差なく良好な直線性を示すが、中でもクロロホルム—無水酢酸—ベンゼン (1:2:4) 系は最も精度が高く電位飛躍幅も他の2つの系よりも大きかつた。従つて以後の実験における溶媒系としてクロロホルム—無水酢

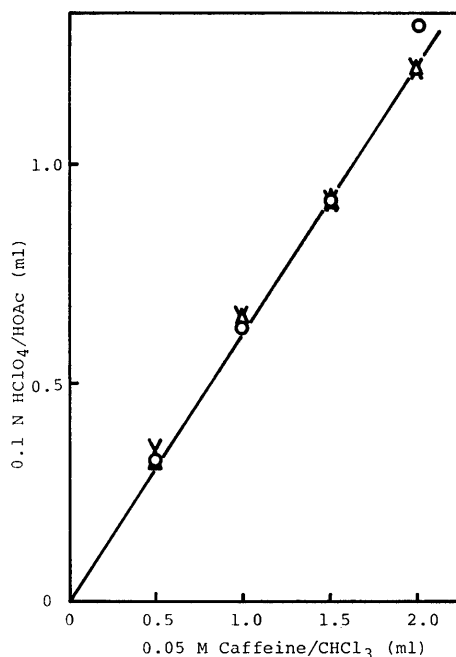


Fig. 1. Linearity in a few solvent systems. —○— CHCl₃-AA-Toluene (2:5:15); —×— CHCl₃-AA-Cyclohexane (5:5:12); —△— CHCl₃-AA-Benzene (1:2:4). 0.1N HClO₄/HOAc ($f=0.815$).

酸—ベンゼン系を用いた。

1.2. 検出限界および水の影響

カフェイン濃度および過塩素酸濃度を低くして滴定可能範囲を検討した。溶媒系としてクロロホルム—無水酢酸—ベンゼン系を例にとり 0.01N 過塩素酸/酢酸, 0.002N 過塩素酸/酢酸で滴定した結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 から 0.002M カフェイン/クロロホルムを滴定した場合の電位飛躍幅は約 100 mV 程度であるから十分定量可能である。ちなみにこの溶液は 0.39 mg/ml (無水カフェイン) であるから約 0.2 mg/ml まで定量可能である。

一方、非水溶媒滴定においては混在する水分が適定曲線、特に電位飛躍幅に多大の影響を及ぼすといわれているが (田中・中川, 1966), 食品成分を分析する目的上水分のある程度の混入はまぬがれ得ない。そこで、水飽和クロロホルム (0.072 g H₂O/100 g CHCl₃, 23°C) (John and Emory, 1955) を用いた場合と純粋のクロロホルムを用いた場合さらに水飽和クロロホルムを用いて調製した被滴定液を一昼夜密栓放置した場合 (この場合にはクロロホルム中の水分が無水酢酸と反応すると考えられる) について滴定量の直線性な

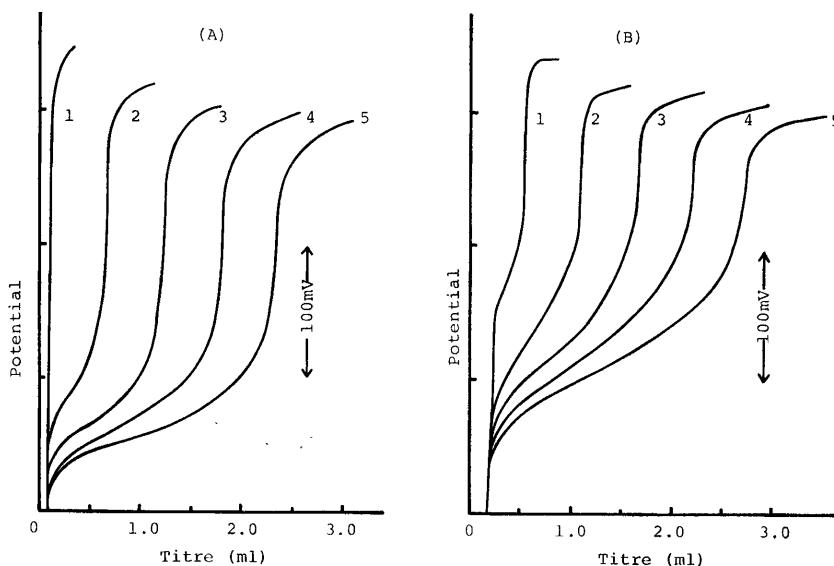


Fig. 2. Potentiometric titration curve of caffeine. (A) Titrant: 0.01 N $\text{HClO}_4/\text{HOAc}$ ($f=0.918$). 0.01 M Caffeine/ CHCl_3 ; 1, Blank; 2, 1 ml; 3, 2 ml; 4, 3 ml; 5, 4 ml. (B) Titrant: 0.002 N $\text{HClO}_4/\text{HOAc}$ ($f=0.918$). 0.002 M Caffeine/ CHCl_3 ; 1, Blank; 2, 1 ml; 3, 2 ml; 4, 3 ml; 5, 4 ml.

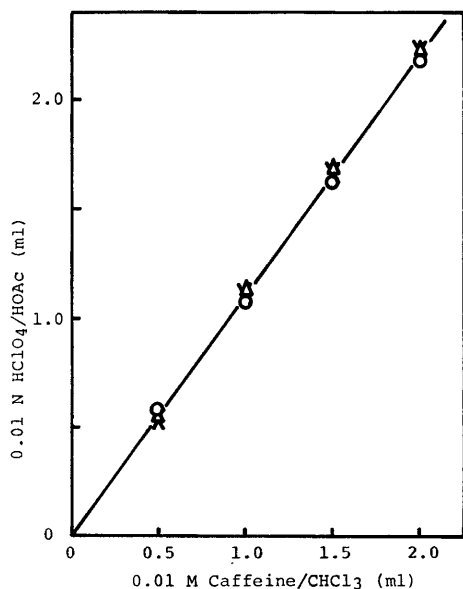


Fig. 3. Effect of H_2O on the linearity of the calibration curve. —○— $\text{CHCl}_3\text{-AA-Benzene}$; —×— H_2O satd. $\text{CHCl}_3\text{-AA-Benzene}$; —△— H_2O satd. $\text{CHCl}_3\text{-AA-Benzene}$ (after 1 day). 0.01 N $\text{HClO}_4/\text{HOAc}$ ($f=0.918$).

らびに滴定曲線の電位飛躍幅の相異を検討した。Fig. 3 から明らかなように直線性に相異は認められなかつ

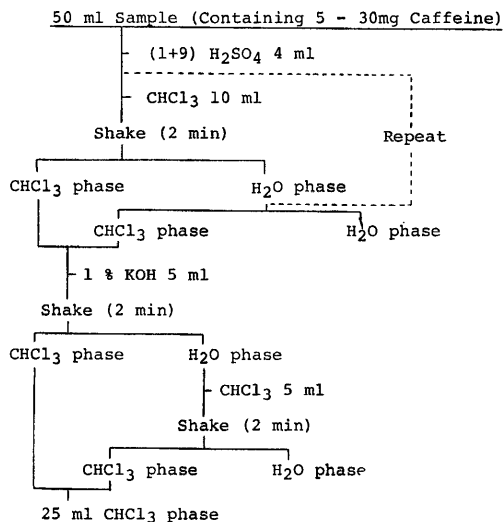


Fig. 4. Schema of modified Bailey-Andrew method.

た。一方、電位飛躍に関しては幾分のバラツキは認められるが水分の存在による電位飛躍幅の低下というような一定の傾向は認められなかつた。

1.3. 抽出と回収率

カフェインの抽出は Bailey-Andrew 法を Fig. 4 のように改良した方法を用いた。抽出クロロホルム相について回収率を求め Table 2 の結果を得た。Table

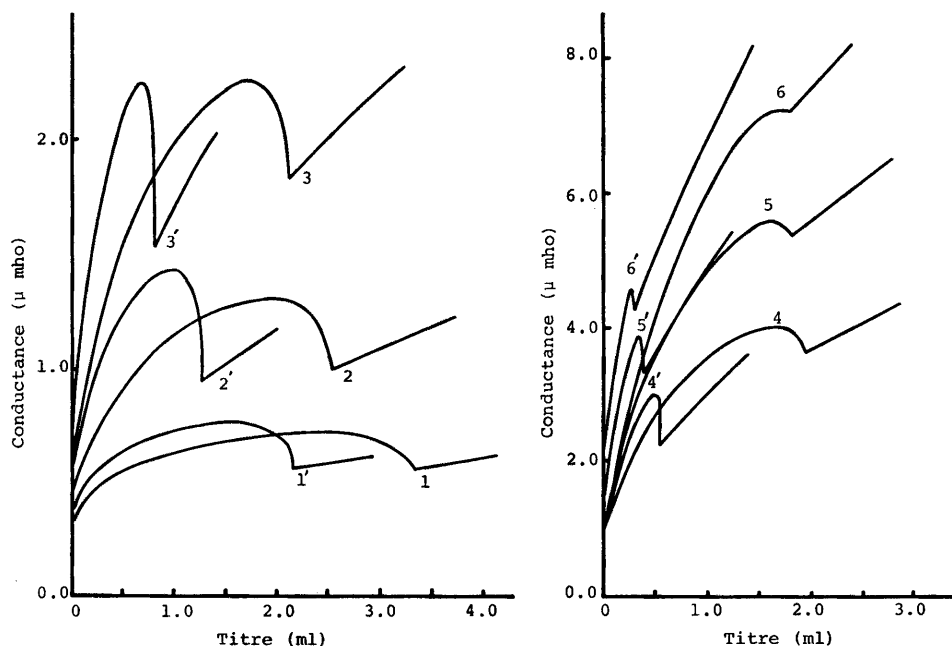


Fig. 5. Effect of acetic anhydride on the conductometric titration curve. Titrant: 0.01 N $\text{HClO}_4/\text{HOAc}$ ($f=0.918$). 1', CHCl_3 25 ml + AA 3 ml; 2', CHCl_3 23 ml + AA 5 ml; 3', CHCl_3 21 ml + AA 7 ml; 4', CHCl_3 19 ml + AA 9 ml; 5', CHCl_3 17 ml + AA 11 ml; 6', CHCl_3 15 ml + AA 13 ml; 1, 1' + Caffeine 2.913 mg; 2, 2' + Caffeine 2.913 mg; 3, 3' + Caffeine 2.913 mg; 4, 4' + Caffeine 2.913 mg; 5, 5' + Caffeine 2.913 mg; 6, 6' + Caffeine 2.913 mg.

Table 2. Recovery of caffeine by the present method.

No.	Caffeine added (Anhyd.) (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
1	0.915	0.913	99.8
2	1.830	1.806	98.7
3	2.745	2.719	99.1
4	3.660	3.593	98.2
5	Tea (lg) (unknown)	23.86	—

2 から明らかなようにカフェインはほぼ定量的に回収された。分析例としての煎茶中のカフェイン量は 2.39% であった。

2. 非水電導度滴定

2.1. 溶媒および組成の検討

電位差法において最も良好な溶媒系であったクロロホルム—無水酢酸—ベンゼン系について電導度法に適する組成を検討した結果、ベンゼンの含まれていない溶媒系すなわちクロロホルム—無水酢酸系が最も可能性に富むことが示されたのでクロロホルム—無水酢酸

系の混合比を検討した。Fig. 5 から明らかなように電導度曲線は無水酢酸濃度に依存し無水酢酸濃度が低い場合には当量点が不明確であるが、濃度の増大とともにシャープな当量点を示すようになった。しかしながら無水酢酸濃度が一定量以上高くなると逆に当量点が不明確になった。従つて最適混合比をクロロホルム：無水酢酸=23：5 または 21：7 (3：1) と決定した。この最適混合比の溶媒を用いたときのカフェイン濃度と滴定値との比例性を Fig. 6 に示した。図から明らかなように両溶媒系ともに良好な直線性を示した。

2.2. 抽出と回収率

電導度法は被測定溶液中のイオンの電導性を求めるため抽出操作において使用した酸・アルカリが抽出クロロホルム相に何らかのイオン状態の変化をひき起こし電導度に影響を与えることが懸念される。そこで Fig. 4 の方法を用いて抽出操作を行なった試料液について電導度滴定曲線を求めた。Fig. 7 に示した滴定曲線は純粋系の曲線と全く変わらず回収率が満足すべきものであった。

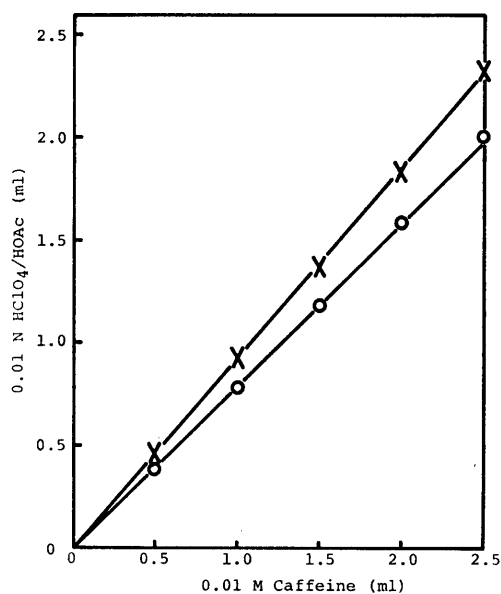


Fig. 6. Calibration curves of conductometric titration method. —○— CHCl_3 : AA=23:5, —×— CHCl_3 : AA=21:7(3:1). 0.01 N $\text{HClO}_4/\text{HOAc}$ ($f=0.918$).

考 察

解離定数が 10^{-6} 以下の弱酸、弱塩基は水溶液中では滴定終点付近の pH の飛躍が小さいため明確な滴定終点を認め難く定量困難であるが、非水溶液滴定の導入により対象とする弱酸、弱塩基の滴定可能な強度限界を著しく延長し得る。 K_b が 10^{-12} 以下のきわめて弱い塩基ではその塩基性が弱まるに従い電位の飛躍が極端に小さくなるので、酢酸をベースとした溶媒に非プロトン溶媒を加えた混合非プロトン溶媒系が有効とみなされる。カフェインが $K_b \approx 1 \times 10^{-14}$ と極めて弱い塩基であること、抽出剤としてクロロホルムが用いられることからクロロホルム—無水酢酸混合溶媒をベースとして第3の溶媒の検索を行なった。第3の溶媒としては誘電率のきわめて低い溶媒でかつ各溶媒が混り合うことを前提として検討した結果トルエン、シクロヘキサン、ベンゼンを適当と判定した。

一方、溶媒に含まれる水分は第2の塩基として作用し当量点後の滴定曲線の変化に影響を与え、特に滴定曲線の電位飛躍幅に多大の影響を与えたとされている(田中・中川, 1966)。本実験系においてはクロロホルムに飽和する水分は約 0.07% と極めて少いことならびに溶媒系に無水酢酸を使用していることからほとんど水分の影響は無視したものである。

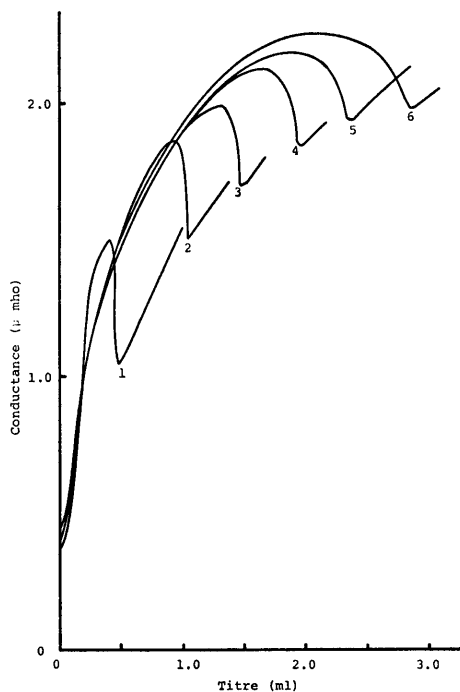
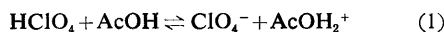


Fig. 7. Conductometric titration curve of caffeine extract. Composition: CHCl_3 21 ml+AA 7 ml, Caffeine content: 1, Blank; 2, 0.915 mg; 3, 1.830 mg; 4, 2.745 mg; 5, 3.660 mg; 6, 4.575 mg. Titrant: 0.01 N $\text{HClO}_4/\text{HOAc}$ ($f=0.918$). Cell constant: 1.996 cm^{-1} .

Bailey-Andrew 法 (Horwitz, 1975) を改変した著者らのカフェイン抽出法は抽出操作中に用いた酸、アルカリの影響を抽出後に残すことなくカフェインをほぼ定量的に抽出し得るので電気化学的諸量を指標とする非水溶媒系での実験操作に極めて有効と考えられる。

非水滴定の終点決定法として電導度法を用いる例は極めて少く、特殊な例に限られている。これは溶液の抵抗が一般にはなほ高く測定に特別の工夫を要するのが普通で、その努力の割に報われるところが少いからとされている(梶井, 1957)。しかしながら、最近の測定技術の進歩から極めて低い電導度値の変化をも正確に測定し得るようになったため、電導度滴定も終点決定法として有力な手段とみなされる。すなわち、Kolthoff 一派 (Kolthoff and Chantooni, 1963, 1965) はアセトニトリル中の酸—塩基の電導度滴定曲線の理論的推定を行なっているし、一方 Bruss and Harlow (1958) は弱酸の電導度滴定曲線の研究から立体化学的考察を加えている。本研究における電導度

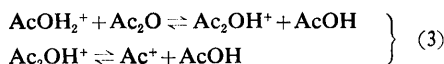
滴定曲線を考察するに溶媒系の誘電率は約7~8でイオン対を形成しやすい状態にあると思われる。酢酸中の過塩素酸は完全に解離した状態と考えてさしつかえないから (Kolthoff and Bruchenstein, 1956), その平衡は式 (1) で表わされる。



一方、無水酢酸は式 (2) のように一部解離する。



さらに、式 (1) の AcOH_2^+ は無水酢酸中で次のように酸として最も強い状態になると考えられる (Pietrzyk, 1967)。



従つて中和反応式は



となつて考えられる。すなわち、電導度曲線は酸の滴下に伴いある一定濃度の塩が生じるまで電導度の上昇を与え、当量点近傍で塩濃度の増加によりある極大となり低誘電率とあひまつて $\text{B} \cdot \text{Ac}^+ \text{ClO}_4^-$ 型のイオン対を形成して電導度の急降下をひき起こすものと推定される。当量点以後は過剰の酸による ClO_4^- , AcOH_2^+ , Ac_2OH^+ , Ac^+ の電導度増をひき起こすと考えられる。

Fig. 7 から明らかなように当量点後の滴定曲線が一定傾きで上昇することはある濃度範囲のカフェインに一定過剰の過塩素酸 / 酢酸溶液を加えたものの電導度を測定することにより直接定量できる可能性を示すものである。一例として 1 mg/ml (カフェイン / 水飽和クロロホルム) を 0.5~2.5 ml 加え、水飽和クロロホルム : 無水酢酸 = 0.01 N 過塩素酸 / 酢酸 = 12 ml : 3 ml : 3 ml にして電導度を測定した結果を Fig. 8 に示す。Fig. 8 から明らかなように良好な直線性を示し十分定量可能であることを示唆している。しかしながら、本法の場合には妨害物質が他の方法以上に顕著に影響すると思われるので詳細は現在検討中である。

現在、カフェインの定量には Bailey-Andrew 法に基礎をおく方法でクロロホルムにて抽出後その室素をケルダール法にて測定しカフェインに換算する方法、あるいはセライトをつめた塩基性、酸性両カラムを用いエーテルで塩基性カラム中のカフェインを溶出し酸性カラムに吸着後酸性カラムからクロロホルムで溶出し吸光度あるいはガスクロマトグラフィーで定量する

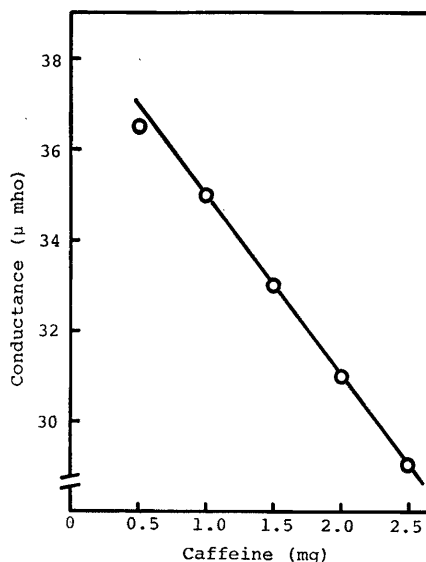


Fig. 8. Relationship between conductance and caffeine content. Component: H_2O satd, CHCl_3 12 ml + AA 3 ml + 0.01 N HClO_4 / HOAc ($f = 0.918$) 3 ml. Cell constant: 0.096 cm^{-1} .

方法が行なわれている (Horwitz, 1975). 吸光度法およびガスクロマトグラフィーは定量感度は高い (μg オーダー) が、カラムクロマトグラフィー操作にかなりの時間を要す欠点がある。これらの方法の分析研究室間のバラツキは約 $\pm 0.1 \sim 0.25\%$ (カフェイン濃度 % の標準偏差値) (Newton, 1969) で一般の茶、コーヒーが約 1~4% のカフェインを含むことから考えると、操作時間が長い割にはかならずしも良い精度とは言い難い。本研究による定量法は定量下限こそ幾分劣るがその簡便性は比較にならないほどである。すなわち、パーセントオーダーのカフェイン定量には簡便性および特殊な装置を必要としない点から本法が推奨される。

要 約

非水溶媒中の酸-塩基滴定研究の一環として食品中のカフェインの定量法を検討した。カフェインをクロロホルムに抽出後、クロロホルム : 無水酢酸 : ベンゼン = 1 : 2 : 4 の液組成とし、過塩素酸 / 酢酸滴定液で電位差滴定を行なつた場合、最も良好な滴定曲線が得られた。電導度滴定の場合にはクロロホルム : 無水酢酸 = 23 : 5 または 21 : 7 (3 : 1) の液組成で当量点の明確な滴定曲線が得られた。定量下限は 0.2 mg であつた。電導度滴定曲線の考察から、一定過剰の滴定液

の存在下での直接電導度測定によりカフェイン濃度を算出し得る可能性を示唆した。

文 献

- Bruss, D. B. and C. A. Harlow 1958 Titration of weak acids in non-aqueous solvents. *Anal. Chem.*, 30 : 1836-1839
- 古谷貞治 1967 高周波ポーラログラフ法による亜鉛とコバルトまたはニッケルの同時定量. *分析化学*, 16 : 103-110
- Horwitz, W. 1975 *Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, pp. 246-250
- John, A. R. and E. T. Emory Jr. 1955 *Technique of Organic Chemistry. Vol. VII Organic Solvents*. 2nd ed., ed. by A. Weissberger, Interscience Pub. Inc., New York, pp. 193
- Kolthoff, I. M. and S. Bruchenstein 1956 Acid-base equilibria in glacial acetic acid. I. Spectrophotometric determination of acid and base strengths and of some dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, 78 : 1-9
- Kolthoff, I. M. and M. K. Chantooni Jr. 1963 Calculated and experimental conductometric titration curve of intermediately strong acids and bases in acetonitrile. *J. Amer. Chem. Soc.*, 85 : 426-430
- Kolthoff, I. M. and M. K. Chantooni Jr. 1965 Effect of molecular acid-base dissociation of salts on conductometric titration curves in acetonitrile. *J. Amer. Chem. Soc.*, 87 : 1004-1012
- 榎井雅一郎 1957 非水溶液滴定法. *分析化学*, 6 : 511-523
- Newton, J. M. 1969 Chromatographic determination of caffeine in instant tea. *JAOAC*, 52 : 653-656
- 箴島 豊・松本 清・岡山謙一・沢村正義・中島正利・橋永文男・白石真一・芥田三郎 1976 食品の酸味とその電気化学的測定に関する研究. (第1報) 電導度測定法に基礎を置く食品中の有機酸含量測定法. *食工誌*, 23 : 262-267
- 箴島 豊・松本 清・岡山謙一・沢村正義・芥田三郎 1977 a 食品の酸味とその電気化学的測定に関する研究. (第2報) 実用測定装置とその校正. *食工誌*, 24 : 136-141
- 箴島 豊・岡山謙一・松本 清・坂根康伸・芥田三郎 1977 b 食品の酸味とその電気化学的測定に関する研究. (第3報) 有機酸含量測定用セルの試作. *食工誌*, 24 : 221-225
- Pietrzyk, D. J. 1967 Acidic behavior of sulfonic and perchloric acid in acetic anhydride solvent mixtures and their use as titrants. *Anal. Chem.*, 39 : 1367-1373
- 田中元治・中川元吉 1966 酸塩基平衡と中和滴定. 日本化学会編: 実験化学講座 続7 分析化学の反応と新技術. 丸善, 東京, 1-54 頁
- West, T. S. 1960 Titrations in non-aqueous solvents. In "Comprehensive Analytical Chemistry", Vol. 1B, ed. by C. L. Wilson and D. W. Wilson, Elsevier Pub. Co., Amsterdam London New York Princeton, pp. 767-827

Summary

A practical method has been studied for the determination of caffeine in foods. A non-aqueous electrochemical technique was introduced for this purpose.

Use of chloroform, acetic anhydride and benzene in 1 : 2 : 4 vol. proportions gave the most precise potentiometric curve with perchloric acid/glacial acetic acid titrant.

Use of chloroform, acetic anhydride in 23 : 5 or 3 : 1 vol. proportions gave well defined conductometric curve.

The lower limit of caffeine determination was about 0.2 mg.

Conductometric titration curves suggested that the conductance of the solution in the presence of a certain excess of titrant would have high correlation with caffeine content.