

## ノート

# バニラフレーバーに関する一考察

辻井 淳\*, 新井 健司\*, 榎本 康敬\*, 印出 進\*

## Study of Vanilla Flavors

Jun TSUJII\*, Kenji ARAI\*, Yasuyuki ENOMOTO\* and Susumu INDE\*

\*Tokyo Customs Laboratory

5-5-30 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8469, Japan

Sensory evaluations were carried out to know the minimum at concentration which we can detect by nose the odor of vanillin mixed with milk powder. It was found that all the persons could detect the odor of vanillin mixed at the concentration of 0.1%.

The extraction method of vanillin from vanilla power flavors was also examined. It was found that the extraction method using much amount of water brought the good recovery rate of vanillin, because the carrier materials in vanilla flavors could be dissolved in water. Therefore the water-system HPLC method was superior to GC method for determining the content of vanillin in vanilla flavors.

It was also found that all of the vanilla flavors on the market contained more than one kind of carrier materials such as lactose, fructose, arabinose and dextrin.

## 1. 緒 言

一般に脱脂粉乳及びしょ糖の混合物にバニラフレーバーを加えた調製品は関税率表上第 19.01 項に分類されるが、輸入時にバニラ臭が官能できない場合、その含有割合が 0.1%未満のものは、ミルク及びクリーム（砂糖その他の甘味料を加えたもの）として第 04.02 項に分類するとされている。

分析依頼のあった脱脂粉乳、しょ糖及びバニリンの量が 1%程度のバニラフレーバーを含むミルク調製品を分析したところ、バニラ臭の官能が困難なものがあったことから、バニラフレーバー中にバニリンがどの程度含まれていればおいを感じるのかをフレーバーリスト（香料業界の専門家）と分析職員をパネルとして官能試験を行った。また、この依頼されたミルク調製品中のバニラフレーバーのバニリンを従来のバニリンの抽出法であるエタノール：エーテル系による溶媒抽出法を用いてガスクロマトグラフィーで定量したがバニリンは完全抽出されず、賦形剤による妨害が想定された。

そこで、バニラパウダー（市販のバニラフレーバーと同じ製造法によるバニリン濃度標準品）中のバニリンの定量における抽出法の検討を行い、市販のバニラフレーバーについて賦形剤の構成成分及びバニリン含有量について検討したので報告する。

## 2. 実 験

### 2. 1 試薬及び試料

バニリン（和光純薬工業製・試薬特級）  
 クマリン（和光純薬工業製・試薬特級）  
 エタノール（純正化学製、純正一級）  
 ジエチルエーテル（純正化学製、純正一級）  
 バニラフレーバー（8 社、14 種類）  
 ミルク調製品（脱脂粉乳 30%、しょ糖 70%）  
 バニリン濃度標準品（1%、10%、20%の 3 種類。アラビアガムとデキストリンと水を加え 80℃、30 分処理後 60℃に冷却して攪拌を行い液状化した後、スプレードライ工程をしたもので香料会社で製造されたもの。なお、バニリンの濃度は処方上の濃度であり、スプレードライ工程後の濃度ではない。）

### 2. 2 測定条件及び分析装置

#### 2. 2. 1 官能試験

被 験 者 当関分析職員（10 名）、フレーバーリスト（香料会社、3 名）

\*東京税関業務部 〒108-8469 東京都港区港南 5-5-30

官能対象物 0.1, 0.02, 0.01, 0.005%のバニリンを含むミルク調製品 4 種。

条 件 被験者にそれぞれ 4 種類の官能対象物について、バニリンのにおいが強い、する、どちらともいえない、しないの 4 種類で判定を行った。

## 2.2.2 ガスクロマトグラフィー（以下GC法）

|          |                                     |
|----------|-------------------------------------|
| 装 置      | HP5890                              |
| カ ラ ム    | HP-WAX (30m×0.25 mm I.D.膜厚 0.25 μm) |
| キャリアーガス  | He                                  |
| キャリアー線速度 | 30cm/sec                            |
| カラム温度    | 210°C                               |
| 注入量      | 1 μl                                |
| スプリット比   | 100 : 1                             |
| 注入口温度    | 240°C                               |
| 検出器温度    | 250°C                               |

### 2.2.2.1 GCによるエタノール、エーテル抽出法

試料 0.5g をエタノール 50ml, ジエチルエーテル 50ml の順に溶かしたものを、超音波振とうで 15 分間攪拌した後、エバポレーターで減圧濃縮した（水温 40°C）。濃縮は 2ml 程度まで行いその濃縮液について GC でバニリンを内部標準法により定量した（内部標準物質；クマリン）。

### 2.2.2.2 GCによるエタノール、水及びエーテル抽出法

試料 0.5g をエタノール 30ml, 温水（50°C程度）5ml, エタノール 35ml, ジエチルエーテル 30ml の順に溶かし、超音波振とうで 15 分間攪拌した後、エバポレーターで減圧濃縮した（水温 40°C）。濃縮は 2ml 程度まで行いその濃縮液について GC でバニリンを内部標準法により定量した（内部標準物質；クマリン）。

### 2.2.2.3 GCによる水蒸気蒸留抽出法

試料 8.0g を常圧で飽和水蒸気を送り、留出液が 800ml になるまで蒸留したものを 80ml ジエチルエーテルで 3 回抽出する。抽出液は完全に留去した後、エタノールを 2ml 加えたものを GC でバニリンを内部標準法により定量した（内部標準物質；クマリン）。

## 2.2.3 高速液体クロマトグラフィー（以下HPLC法）

|        |                              |
|--------|------------------------------|
| 装 置    | HP1100                       |
| カ ラ ム  | Shodex 5C8 4E (250mm ×4.6mm) |
| 移 動 相  | 水：メタノール：酢酸（720：80：10）        |
| 流 速    | 0.5ml/min                    |
| オープン温度 | 50°C                         |
| 検 出 器  | Shodex RI71                  |

### 2.2.3.1 HPLCによる超音波振とう器抽出法

試料 0.5g を移動相と同一組成の溶液 100ml に溶かし、その溶液を超音波振とう器で 15 分間攪拌させ、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過して、HPLC でバニリンを絶対検量線法に

より定量した。

### 2.2.3.2 HPLCによるミキサー抽出法

試料 0.5g を移動相と同一組成の溶液 100ml に溶かし、その溶液をミキサーで 15 分間攪拌させ、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過して、HPLC でバニリンを絶対検量線法により定量した。

### 2.2.4 標準品の回収率測定

バニリン濃度標準品を GC 法(2.2.2)と HPLC 法(2.2.3)によりバニリンの定量を行い、それらより回収率を算出した(3回測定)。

### 2.2.5 市販のバニラフレーバー中のバニリンの定量

バニラフレーバーを HPLC を用いたミキサー抽出法(2.2.3.2)でバニリンの定量を行った。

### 2.2.6 バニラフレーバー中の賦形剤の定性

試料を硫酸酸性条件で 90°C湯浴中に、3 時間放置させ、冷却したのちに水酸化ナトリウムで中和させた後、薄層クロマトグラフィーで定性を行った。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 官能試験

官能試験の結果を Table 1.2 に示す。一般人である分析職員 10 名の多くが官能ができる限界は 0.01%あり、全職員が官能できたのは 0.1%の濃度のバニリンであった。このように、それぞれバニリンの官能できる限界にばらつきがみられた。これらのことから、サンプル全体でバニリンが 0.1%含まれているようなバニラフレーバーを含むミルク調製品であれば、官能が可能であるということがいえる。そして、ミルクのにおいとバニリンのにおいは類似しているために、正確にバニリンのにおいを判定することは、官能の限界濃度では困難ではないかと考えられる。また、香料に関する専門家であるフレーバリストは少なくとも 0.005%のバニリンは官能できるということが示された。

Table 1 Sensory evaluation by ten non-Flavorists panel.

| vanillin concentration (%) | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.1                        | ◎ | ◎ | ○ | ○ | ◎ | ◎ | ◎ | ◎ | ○ | ○ |
| 0.02                       | △ | × | △ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | △ | ○ |
| 0.01                       | ○ | × | △ | ○ | ○ | ○ | △ | ○ | △ | ○ |
| 0.005                      | × | × | × | × | × | ○ | × | ○ | △ | × |

◎: Smell strongly, ○: Smell, △: Uncertain, ×: No smell

Table 2 Sensory evaluation by three Flavorists panel.

| vanillin concentration (%) | X | Y | Z |
|----------------------------|---|---|---|
| 0.1                        | ◎ | ◎ | ◎ |
| 0.02                       | ◎ | ◎ | ◎ |
| 0.01                       | ◎ | ◎ | ◎ |
| 0.005                      | ○ | ○ | ○ |

◎: Smell strongly, ○: Smell, △: Uncertain, ×: No smell

### 3. 2 標準品による回収率の測定

回収率結果を Table 3 に示す。そして GC 及び HPLC のピークパターンを Fig.1~4 に示す。ここで用いられた標準品は、市販されているバニラフレーバーと同様の方法で製造されているものであるため、この結果はそのままバニラフレーバーにも適用できると考えられる。水蒸気蒸留法は参考のため行った。GC 法(2. 2. 2)の中では、GC によるエタノール、水及びエーテル抽出法(2. 2. 2. 2)が高い抽出率を示した (Fig.1,2)。

全ての分析法において HPLC 法 (2. 2. 3) が他の分析法より回収率が高かった。しかしながら、回収率は 74~89%であり、更なる抽出法の検討が必要である。またいずれの方法を用いても回収率が 100%にならない原因として、賦形剤へのバニリンの吸着による妨害のほか、時間の経過によるバニリンの損失による回収率の低下も考えられる。Fig.5 より、どのような条件で放置しておいても時間の経過に伴い、バニリンの回収率は低下していく。今回用いたバニラ標準品の定量分析値については標準品の製造時のスプレードライ工程における分解や抽出操作によるバニリンの損失が考えられ、100%回収することができなかった。

HPLC 法(2. 2. 3)において、超音波振とう器抽出(2. 2. 3. 1)とミキサー抽出(2. 2. 3. 1)ではバニリンの抽出につい

ての優劣はつけられないが、いずれも、GC 法 (2. 2. 2) と比較して高い抽出率を示した。これはバニラフレーバー中の賦形剤を移動相中の水が溶かし、バニリンの吸着による抽出妨害を防ぐことにより、バニリンを多く溶解させることができたためと考えられる。

また、HPLC 法において、バニリンの含有量が 1%程度の低濃度では回収率が低かった。

Table 3 Recovery of vanillin about five methods.

| Method | Recovery: (Coefficient of variation (n=3)) |             |             |             |             |
|--------|--------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|        | GC(2.2.2)                                  |             |             | HPLC(2.2.3) |             |
|        | 2.2.2.1                                    | 2.2.2.2     | 2.2.2.3     | 2.2.3.1     | 2.2.3.2     |
| St.1%  | —(※)                                       | 33.9%(2.9%) | 18.5%(1.6%) | 74.8%(4.6%) | 73.6%(4.1%) |
| St.10% | 6.5%(0.6%)                                 | 27.8%(1.9%) | 10.9%(0.7%) | 85.7%(9.9%) | 89.0%(4.3%) |
| St.20% | 7.4%(0.5%)                                 | 23.2%(1.4%) | 11.0%(0.4%) | 88.4%(4.5%) | 88.5%(3.5%) |

※Determination can't be done of St.1%.

2.2.2.1 : Solvent (Ethanol : Diethylether=50:50)

2.2.2.2 : Solvent (Ethanol : Diethylether : Water=65:30:5)

2.2.2.3 : Steam distillation.

2.2.3.1 : Stirred by ultrasonic shaker.

2.2.3.2 : Stirred by mixer.

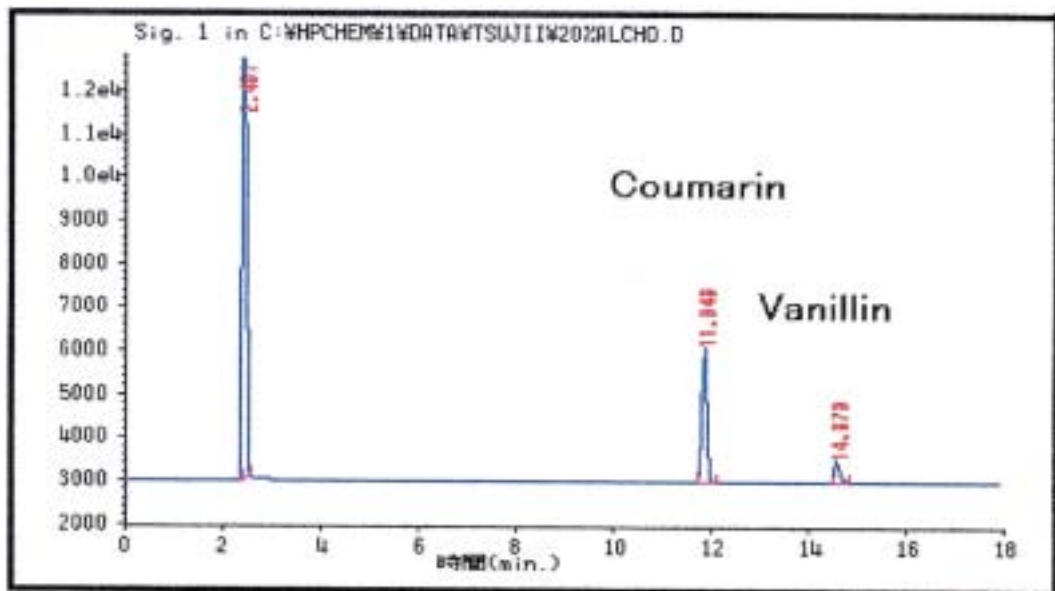


Fig.1 Determination of vanillin by GC method (ethanol : diethylether=50 : 50).

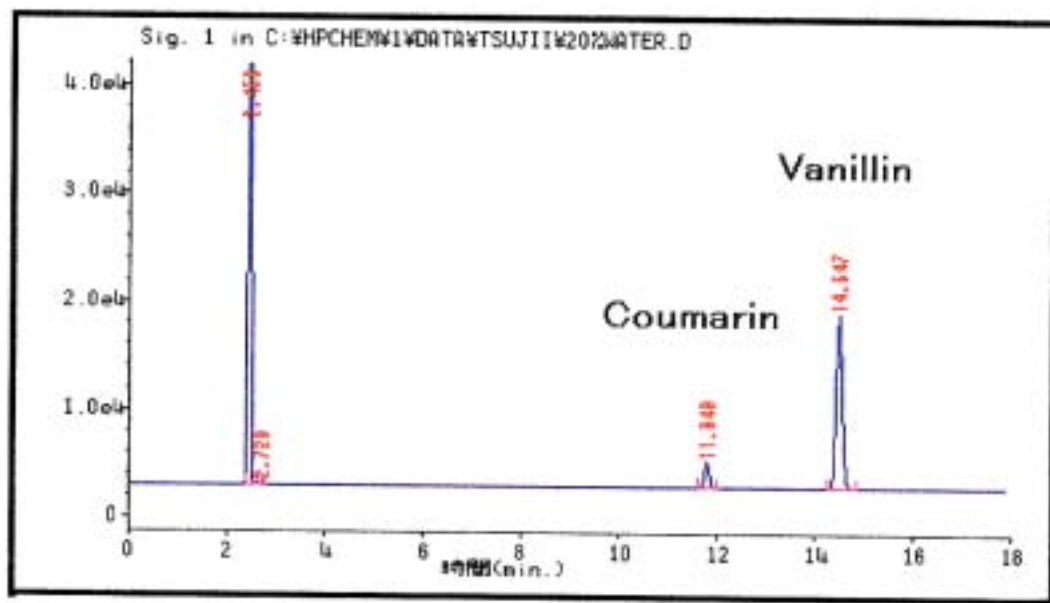


Fig.2 Determination of vanillin by GC method (ethanol : diethylether : water=65 : 30 : 5).

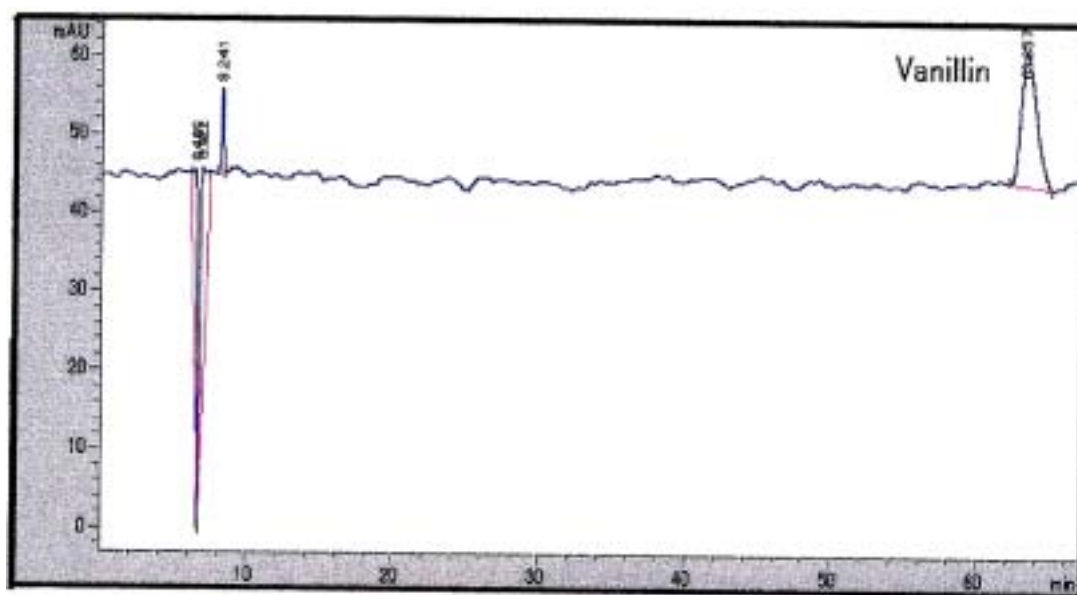


Fig.3 Determination of the vanillin which used HPLC.

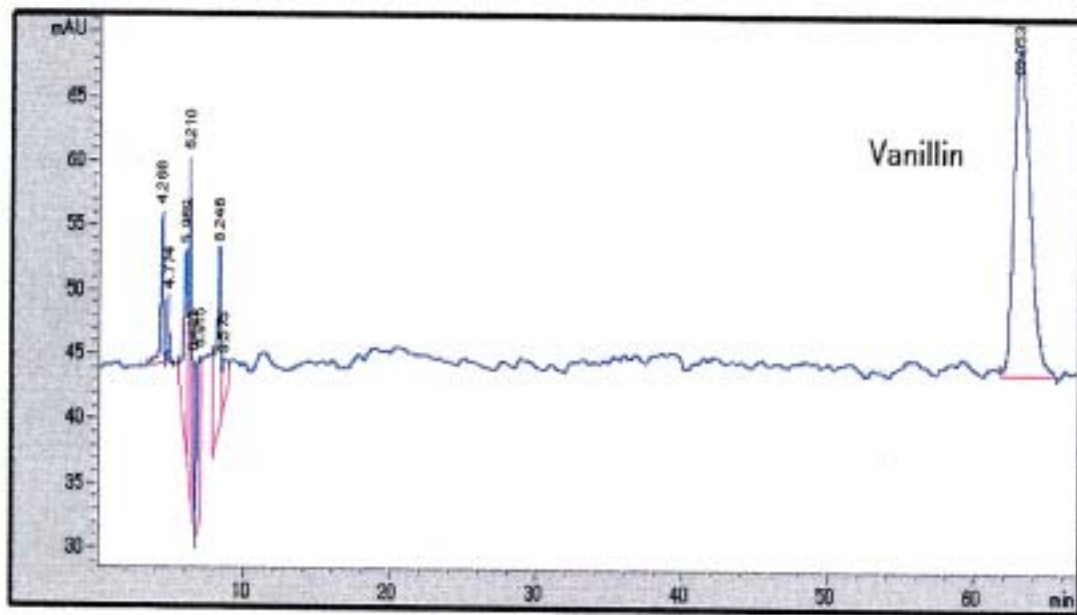


Fig.4 Determination of the vanilla flavor which used HPLC.

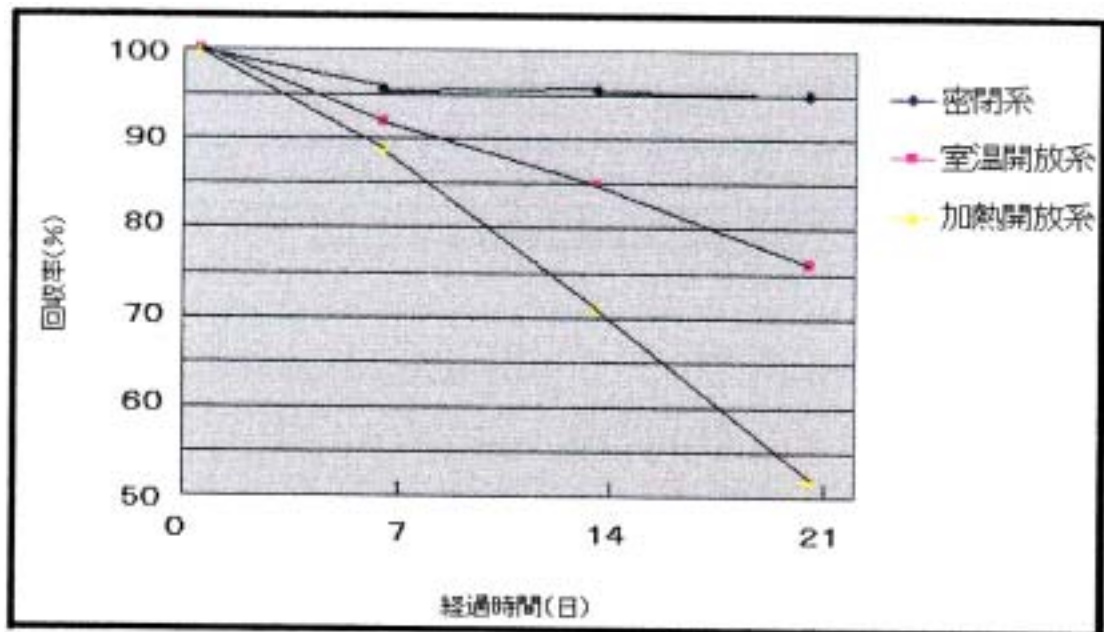


Fig.5 Variation of recovery of vanillin by time progress.

3.3 バニラフレーバーの定量

定量結果を Table 4 に示す。抽出条件は、3. 2 で高い回収率であった HPLC によるミキサー抽出法（2. 2. 3. 2）を用いて定量を行なった。バニラフレーバーは含有しているバニリンの割合がそれぞれ異なり、結果が示すように、30%近いバニリンを含有しているものがある一方、0.1%程度のバニリンが含まれているものもあり、そのため同じ抽出条件でもフレーバーの全てが同じ回収率にならなかった。

またバニラフレーバーの中には、バニリンの他にエチルバニリンが検出されたものもあった（Fig.6）。

Table 4 Determination of the vanilla flavors on the market.

| Method | HPLC(2.2.3.2) | Estimated vanillin concentration |
|--------|---------------|----------------------------------|
| I      | 25.6%         | 28.9%                            |
| II     | 0.4%          | 0.5%                             |
| III    | 3.6%          | 4.9%                             |
| IV     | 2.3%          | 3.1%                             |
| V      | 10.5%         | 11.8%                            |
| VI     | 11.7%         | 13.1%                            |
| VII    | 2.6%          | 3.5%                             |
| VIII   | 10.0%         | 11.2%                            |
| IX     | 1.2%          | 1.6%                             |
| X      | 0.9%          | 1.2%                             |
| X I    | 12.8%         | 14.4%                            |
| X II   | 0.1%          | 0.1%                             |
| X III  | 6.0%          | 6.7%                             |
| X IV   | 5.3%          | 6.0%                             |

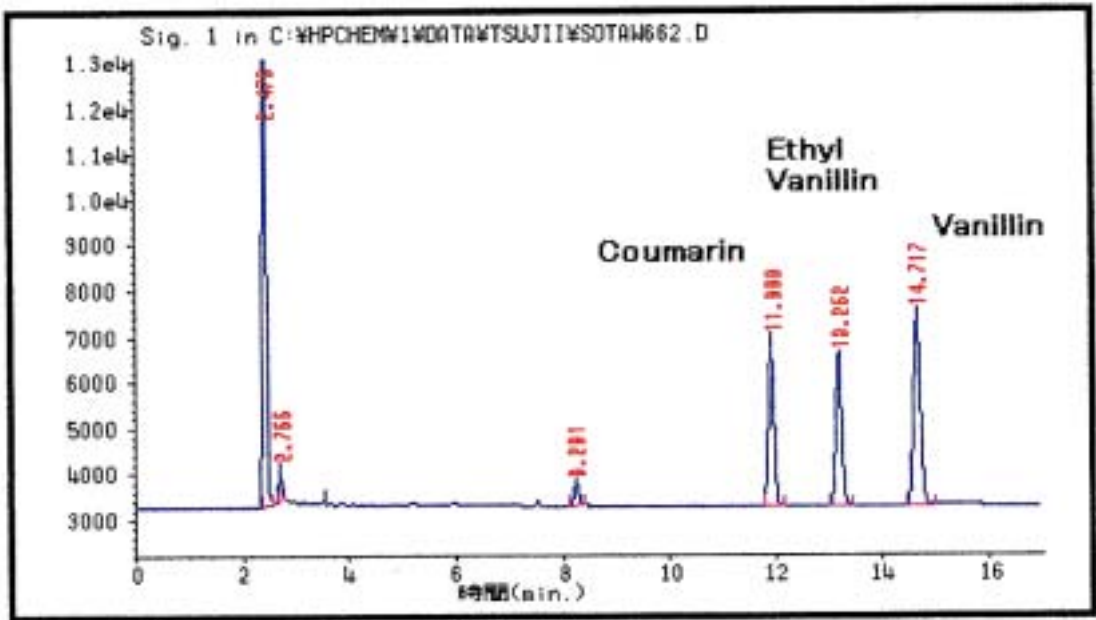


Fig.6 Detection of ethyl vanillin in vanilla flavor.

3.4 バニラフレーバー中の賦形剤の定性

結果を Table 5 に示す。3. 2 や 3. 3 のようにそれぞれ抽出法により抽出率、回収率の異なる結果になった原因の賦形剤がバニラフレーバー中に含まれているかどうかの確認を行なった。今回は標準品として一般的に賦形剤として知られている乳糖、果糖、アラビアガム、デキストリンを用いた。サンプルとして用いた全てのバニラフレーバーからは、これらのうちのいずれかが検出されており、バニラフレーバー中に賦形剤が含まれている事が確認された。

4. 要 約

バニラフレーバー中からバニリンをより高い抽出率で得ることが主な目的であり、分類基準でもあるバニラののにおいの基準

の妥当性についての考察も加えた。なおについてはバニリンが 0.1%含まれていれば、全ての人は官能が可能であることが示された。

定性により、バニラフレーバー中に賦形剤が含まれていることが示され、これらが抽出妨害の一因であるということが考えられる。

定量については、今回の抽出法の比較から移動相によりバニラフレーバー中のバニリンを抽出し、高速液体クロマトグラフィーにより定量する方法が高い抽出率を得られるが、抽出法に更なる検討が必要である。また、回収率に影響を与える要因としては、賦形剤による影響以外にも、時間経過によりバニリンの損失が起きることが考えられる。そのため、抽出や定量を行なう際には迅速な分析を行なう必要があると考えられる。

Table 5 Qualitative test of carrier materials.

|       | Lactose | Fructose | Arabinose | Dextrin |
|-------|---------|----------|-----------|---------|
| I     | ×       | ×        | ○         | ○       |
| II    | ○       | ○        | ○         | ○       |
| III   | ○       | ×        | ○         | ○       |
| IV    | ×       | ○        | ×         | ○       |
| V     | ×       | ×        | ○         | ×       |
| VI    | ○       | ×        | ×         | ○       |
| VII   | ○       | ×        | ×         | ○       |
| VIII  | ×       | ×        | ×         | ○       |
| IX    | ×       | ×        | ×         | ○       |
| X     | ○       | ×        | ×         | ○       |
| X I   | ×       | ×        | ○         | ×       |
| X II  | ○       | ×        | ○         | ×       |
| X III | ○       | ○        | ○         | ○       |
| X IV  | ○       | ×        | ×         | ○       |