

ノート

チョコレートフレーバーの分析

大城博伸*, 加藤時信**

Analysis of Chocolate Flavor

Hironobu OHSHIRO* and Tokinobu KATO**

*Okinawa Regional Customs Laboratory

134, Tsudo-cho, Naha-shi, Okinawa-Ken, 900 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-Ken, 271 Japan

For the analysis of chocolate flavor, analysis of composition in cocoa powder and its extracts were examined. The extract from cocoa powder was obtained by extraction with aqueous solution containing 60% ethyl alcohol for different extraction procedure. The content of alcoholic extract in cocoa powder was 17 - 30%, and theobromin content of the alcoholic extract was 8 - 12%.

The major aroma components in volatiles of cocoa extract were methyl pyrazine, ethyl pyrazine, dimethyl pyrazine, propyl benzene, benzaldehyde, phenethyl alcohol. The major amino acid components were alanine, valine, leucine, phenylalanine.

IR spectra of acetone soluble matters in cocoa extract showed similar spectral for theobromin and insoluble matter showed characteristic spectral pattern for carboxylic salts.

- Received October 28, 1986 -

1 緒言

食品香料原料として輸入されているチョコレートフレーバーには多種多様なものがある。これらの関税率表上の分類は、香気性物質をベースとした混合物の場合には一般に税番第 33.04 号であるが、ココアを含むものは税番第 18.06 号に分類されることとなる。した

がって、チョコレートフレーバーにココアが含まれているか否かの鑑別は税関分析において重要である。

チョコレートフレーバーに使用されているココア成分は、通常、ココア粉から水 - エチルアルコール等の極性溶媒で抽出されたココアレジノイドである。これまでに輸入された商品にはココアレジノイド、あるいはココアレジノイドにバニリン、芳香族アルデヒド等

*沖縄県地区税関業務総合分析室 〒900 沖縄県那覇市通堂町 134

**大蔵省関税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬 531

の香気性物質を添加したものなどがあり、これらの性状は、抽出溶媒を多量に含む液状のものからペースト状のものまで組成、性状ともに多種多様である。

ココア粉を含む調製品のココア分の定量は、ココアの特徴的成分であるテオプロミンの含有量から算出してあり、定性的には、ココアの風味は別として、薄層クロマトグラフィーによるテオプロミンの確認、ガスクロマトグラフィーによる香気性物質の確認等によっている。しかし、ココアレジノイドは、抽出条件等の違いによりテオプロミンの量及びその他の組成がココア粉のものと異なることが考えられる。これまでココアレジノイドの化学組成に関するデータはほとんど報告されておらず、ショコレートフレーバーにココア成分が含まれているかどうか判別に苦慮する場合がある。

本報では、ココア粉及びその抽出物について、不揮発性成分、香気性物質、テオプロミン含有量等について検討を行い、二、三の知見を得たので報告する。

2 実験

2.1 試料

ココア粉は大東カカオ(株)より入手したもので、下記組成のものを用いた。

(1) 低脂肪ココア粉：水分 = 1.5%，粗脂肪 = 11.8%，
テオプロミン = 2.90%

(2) 高脂肪ココア粉：水分 = 2.1%，粗脂肪 = 24.2%，
テオプロミン = 2.29%

実際の試料として数種類の輸入品(水 - エチルアルコール及び水 - プロピレングリコールで抽出したココアレジノイド)を用いた。

2.2 装置及び実験方法

2.2.1 抽出方法

ココア粉の一定量を三角フラスコに採取し、次に試料の 10~50 倍量の水 : エチルアルコール(40 : 60v/v)混液を加え、スターラーで攪拌しながら一定時間抽出した。抽出液は遠心分離後、上澄液はろ過し、ろ液は減圧乾燥した。

2.2.2 香気性物質

香気性物質は、試料の適量を水蒸気蒸留し、溜出液から塩析してエチルエーテルで抽出して得た。この

香気性物質はガスクロマトグラフィーにより分離し、ガスクロマトグラムにおける主要ピーク成分は GC-MS で同定した。

ガスクロマトグラフィーの条件は次のとおりである。

装置：島津 GC-9A 型ガスクロマトグラフ

分離カラム：Silicone OV-101, 0.2mm × 25m

カラム温度：70~220, 4 / min 昇温

なお、GC-MS 用の装置は、日立 M-80B 型に M-0101 データ処理装置を接続したものを用いた。

2.2.3 テオプロミンの定量

テオプロミンの定量は D. J. Timbie らの方法¹⁾に準拠して行った。即ち、試料を 1~0.2g 程度精秤し、水約 70 ml を加え、攪拌しながら 30 分間ゆるく煮沸した後、冷却し、100ml に定容する。その 1ml を 10ml に定容し、濾過したものを高速液体クロマトグラフに一定量注入し、テオプロミンのピーク高を測定し、あらかじめ作成した検量線は、からテオプロミン量を求めた。検量線は、標準テオプロミンを 0.4mg/ml 程度になるように標準原液を調製し、その 1ml~5ml を各々 10ml に定容して 0.4mg, 0.8mg, 1.2mg, 1.6mg 及び 2.0mg / 10ml の各種準液を調製し、その一定量を注入してピーク高と濃度との関係から作成した。

液体クロマトグラフィーの条件は次のとおりである。

装置：ウォーターズ社製高速液体クロマトグラフ

分離カラム：μ-Bondapak C18

溶離液：水 - アセトニトリル - リン酸ニアンモニウム(85 : 15 : 1)

検出：紫外線検出器(254nm)

2.2.4 不揮発性成分及びアセトン分別

不揮発性成分中の配糖体、アミノ酸組成について、薄層クロマトグラフィー及びアミノ酸分析計で検討した。

アセトン分別は試料に 10 倍量のアセトンを加え、分別ろ過し、ろ過物を可溶分、残渣を不溶分とし、それについて赤外吸収スペクトルを測定し、検討した。

3 結果及び考察

ショコレートフレーバーに使用されているココア成分の大部分は、水 - アルコール系極性溶媒抽出のココアレジノイドと考えられることから、ここでは、標準

ノート チョコレートフレーバーの分析

ココア粉を主として水・エチルアルコール混合溶媒で抽出し、得られたレジノイドについて、配糖体、アミノ酸、香気性物質、テオブロミン等の組成分析を試みた。

3.1 抽出条件による抽出量の変動

ココア粉末から 60%エチルアルコール液を用いて抽出したときの抽出量と抽出溶剤使用量、抽出時間及び抽出温度の関係について検討した。

Table 1 に示したように、抽出量は使用溶剤量、抽出時間の増加及び抽出温度の上昇とともに増加する傾向にある。抽出量は、低脂肪ココア粉では 25%程度（原料ココア粉を無水・無脂肪に換算したときの値）、高脂肪ココア粉では 20%程度であった。この原料間の差は、原料ココア豆の前処理工程の差に由来するものと考えられる。

3.2 アミノ酸組成及び配糖体

ココア等の抽出物中のアミノ酸類の薄層クロマトグラムを Fig.1 に示した。ココア抽出物のクロマトパターは、コーヒー、チェリー及びキャロブのものと異なっている。アミノ酸分析計によりココア抽出物及びココアレジノイド（輸入品）のアミノ酸組成を測定した結果は Table 2 に示した。ココア抽出物は、アラニン、バリン、ロイシン及びフェニルアラニンが主体となっており、相対的に輸入品のココアレジノイドとの間に著しい差はみられない。

配糖体の薄層クロマトグラムを Fig. 2 に示した。ココア抽出物の配糖体はコーヒーのものに比較的類似しているが、チェリー及びキャロブのものとは異なっている。

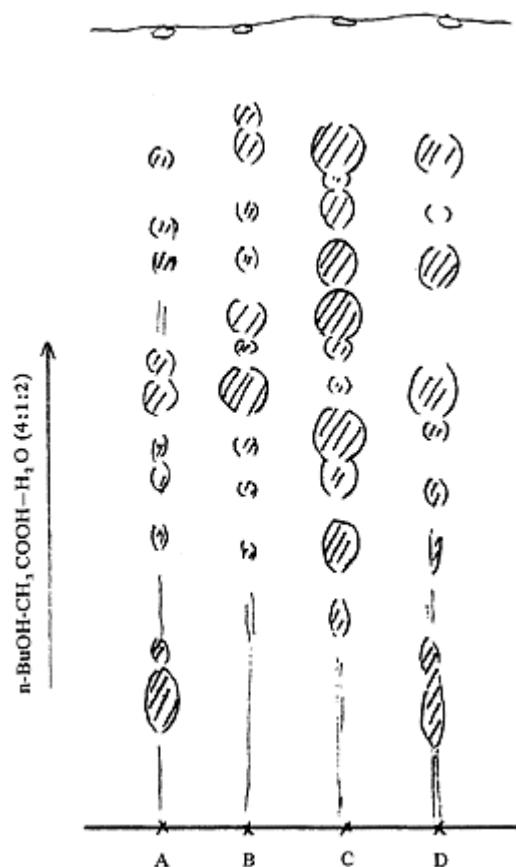


Fig. 1 Thin-layer chromatograms of amino acids in cocoa extract

A : chicory extract

B : coffee "

C : cocoa "

D : carob "

Table 1 Extraction yield from cocoa powders with 60% ethanol solution

	Amount of solvent Times/Sample	Extraction Time (hr)	Extraction Temp (°C)	Yield * (%)
Low fat cocoa powder	10	0.5	25	24
	20	1	25	26
	50	3	25	29
	10	0.5	50	25
	20	1	50	29
High fat cocoa powder	10	0.5	25	16
	20	1	25	19
	50	3	25	22

* For dry nonfat base of samples

Table 2 Analytical data of amino acid in cocoa extracts

	Low fat cocoa powder extract	Imported goods A	Imported goods B	Imported goods C
ASP	5.9	1.5	—	1.7
THR	3.2	2.7	1.7	2.4
SER	3.0	3.0	1.4	3.2
GIU	1.5	0.4	—	—
GLY	0.7	0.4	—	—
ALA	11.2	17.9	20.3	16.5
CYS	1.3	0.8	—	—
VAL	8.3	13.1	18.5	14.1
MET	—	—	—	—
ILEU	5.7	8.2	11.9	8.3
LEU	13.5	15.1	17.8	17.3
TYR	10.4	9.0	6.7	6.9
PHE	18.4	15.6	11.9	15.8
HIS	4.3	1.8	2.1	1.9
LYS	1.7	0.4	—	—
ARG	3.8	0.7	—	—
PRO	6.9	8.8	7.3	11.3

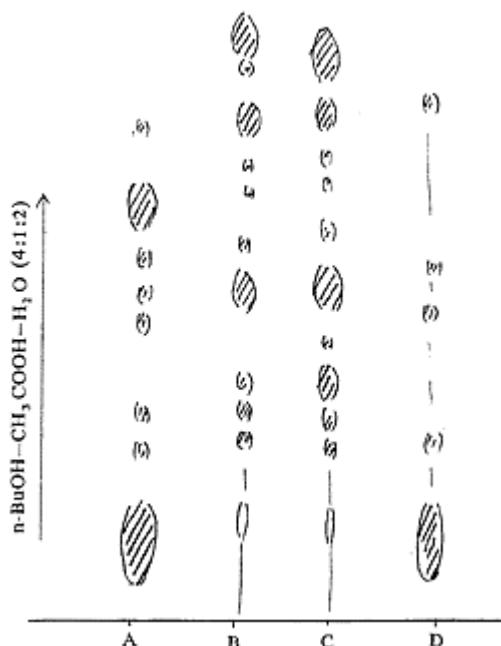


Fig. 2 Thin-layer chromatograms of glycosides in cocoa extract

A : chicory extract

B : coffee " "

C : cocoa " "

D : carob " "

3.3 テオブロミンの定量

ココア中のテオブロミンの定量は、これまで Schütz²⁾、石黒ら³⁾のカラムクロマト法により行っているが、この方法は操作が比較的煩雑であり、また、分析に長時間を要する難点がある。ここでは、高速液体クロマト法によるテオブロミンの定量法について検討した。

Fig. 3 に標準テオブロミン、標準カフェイン及びココア抽出物のクロマトグラムを示した。テオブロミン (Rt : 7.8 分) とカフェイン (Rt : 13.2 分) は完

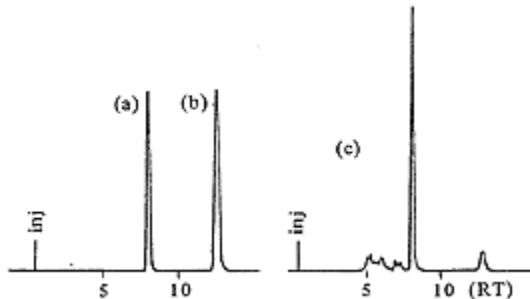


Fig. 3 High performance liquid chromatography

Traces of : (a) theobromine standard : (b)

coffee standard : (c) cocoa extract

Stationary phase : M-Bana Pak C₁₈

Mobile phase : water - acetonitrile -

(NH₄)₂HPO₄

(85 : 15 : 1)

ノート チョコレートフレーバーの分析

全に分離され、ピーク高から求め検量線の変動係数は1.000であり良好であった。なお、輸入チョコレートフレーバーにバニリンを含むものがあるが、バニリンはテオプロミンとカフェインの間に溶出し、テオプロミンの定量に影響を与えたかった。

Table 3に3.1により得られたココア抽出物のテオプロミン量を示した。Table 3に示したように、抽出方法によって、ココア抽出物中のテオプロミン含有量は、低脂肪ココア粉で8~10%，高脂肪ココア粉で9~12%とかなり変動することがわかった。原料ココア粉のテオプロミン量が各々2.90%，2.29%であるのに対し、アルコール抽出物ではかなりテオプロ

ミンが濃縮されてくることがわかった。

一方、輸入された各種チョコレートフレーバー（レジノイドで添加物のないもの）について、乾燥物中のテオプロミンを定量した結果、それぞれ、2.4%（試料中0.2%），4.5%（同3.1%），4.8%（同0.3%），5.8%（同2.3%）及び9.2%（同0.6%）であった。ココア粉からアルコール抽出して得た抽出物（レジノイド）が8~12%の値を示すのに比べ、商品による差が大きい。このことから、チョコレートフレーバー中のココア成分の割合をテオプロミン量から推定することに問題がある。

Table 3 Theobromine content of cocoa extracts

	Amount of solvent times/sample	Extraction Time (hr)	Extraction Temp (°C)	Theobromine dry base (%)
Low fat cocoa powder	10	0.5	25	8.15
	20	1	25	9.41
	50	3	25	9.66
	10	0.5	50	8.87
	20	1	50	8.50
High fat cocoa powder	10	0.5	25	9.33
	20	1	25	11.30
	50	3	25	12.10

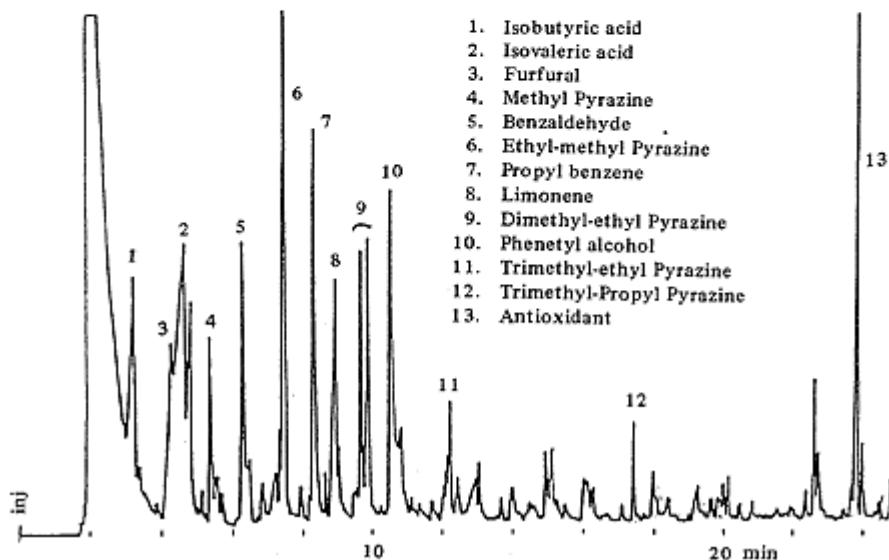


Fig. 4 Gas chromatogram of steam volatile aroma constituents in cocoa powder

Capillary column : OV-101 0.2 mm × 25m, temp 70-220 (4 °C/min)

3.4 香気性物質

ココア粉及びその抽出物について香気性物質を測定した。ココア粉の香気性物質は、Praag⁴⁾らの研究により、268種類⁵⁾の化合物が同定されており、その香気成分は培焼によるアミノ-カルボニル反応で生成したピラジン類、アルデヒド類、ピロール類、フラン類によるものである。低脂肪ココア粉を蒸気蒸留して得た香気性物質は、Fig. 4に示したように、メチルピラジン、エチルメチルピラジン、ジメチルエチルピラジン等のピラジン類を主体としており、このほか、イソバレリノ酸、ベンジルアルデヒド、プロピルベンゼン等が確認された。

ココア粉からのアルコール抽出物（ココアレジノイド）及びココア豆のハスクの香気性物質のガスクロマトグラムをFig. 5に示した。ココア粉から得た香気性物質とココア粉のアルコール抽出物から得た香気性物質のガスクロマトグラムは、ピーク強度に差がみられるものもあるが、類似したパターンを示している。

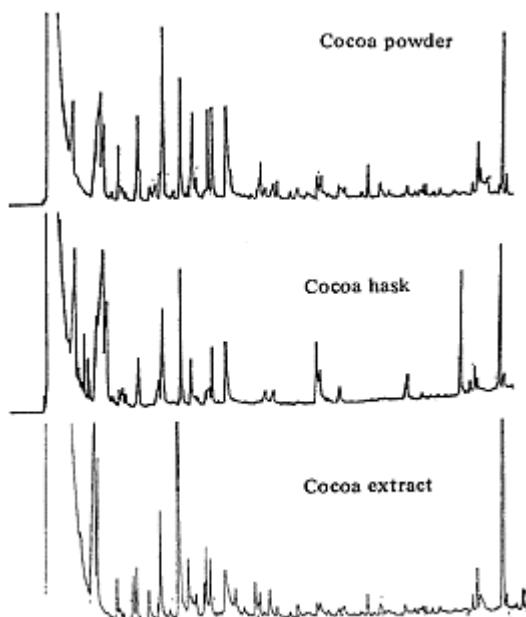


Fig. 5 Gas chromatograms of steam volatile aroma constituents

3.5 アセトン分別

ココア粉及びそのアルコール抽出物の赤外吸収スペクトルをFig. 6に示した。Fig. 6に示したように、

ココア粉においては、糖質（多糖類等）の吸収を主体とし、油脂、たんぱく質、カルボン酸塩による吸収がみられる。一方、アルコール抽出物においては多糖類、油脂の吸収が減少し、カルボン酸塩を主体とした吸収を示している。また、1700cm⁻¹、800~400cm⁻¹にテオブロミンによる吸収がみられる。アルコール抽出物にその10倍量のアセトンを加え、可溶物と不溶物に分別したものの赤外吸収スペクトルをFig. 7に示した。アセトン不溶物はカルボン酸塩による強い吸収と糖質による弱い吸収がみられる。一方、アセトン可溶物では、テオブロミンを主体とした吸収を示している。

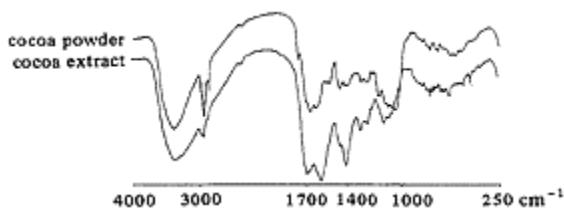


Fig. 6 IR Spectra of cocoa powder and its extract

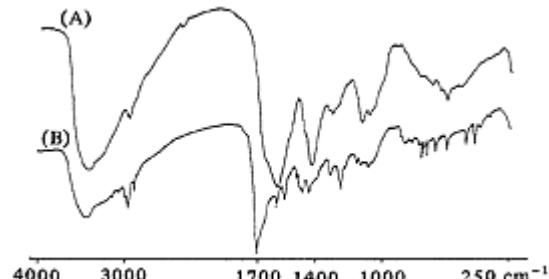


Fig. 7 IR Spectra of acetone soluble matter and insoluble matter in cocoa extract

(A) : Acetone soluble matter

(B) : Acetone insoluble matter

ココア粉のエチルアルコール又はプロピレングリコール抽出物及び輸入品のココアレジノイドを80減圧下で乾燥して残った不揮発分と、これらのアセトン不溶分の割合をTable 4に示した。いずれの試料についてもアセトン不溶分は不揮発分の約8割を占めており、エチルアルコール、プロピレングリコールの抽出溶媒及び輸入ココアレジノイドの間に大きな差はみられなかった。

ノート チョコレートフレーバーの分析

Table 4 Relationship between non volatile components and acetone insoluble matter

	Acetone insoluble matter A (%)	non volatile components B (%)	A/B (%)
cocoa extract of 60 % ethylalcohol	80.8	100	80.8
cocoa extract of 60 % propyreneglycol	6.0	7.8	77.0
imported good A	3.3	4.2	78.6
Imported good B	32.4	39.1	82.9

4 要 約

チョコレートフレーバーに含まれているココア抽出物の諸成分を明らかにすることを目的として、原料となるココア粉及びその抽出物の抽出収量、テオプロミン量、香気性物質等について分析を行った。

ココア粉を 60%エチルアルコールで抽出すると、17~30%の抽出物が得られ、抽出収量の変動は抽出条件よりも原料ココア粉によるものが大きいと考えられた。

抽出物の香気性物質はメチルピラジン、エチルピラジン、ジメチルピラジン等のピラジン類を主体としており、他にプロピルベンゼン、ベンジルアルデヒド、フェネチルアルコール等がみられ、原料ココア粉と同様の香気性物質が確認された。

抽出物のアミノ酸組織は、アラニン、バリン、ロイシン及びフェニアラニンを多く含んでいるのが特徴的であった。

アルコール抽出物には、テオプロミンが 8~12%含まれており、ココア粉の 3~4 倍になっているが、輸入品のココアレジノイドでは 2~9% であった。

抽出物のアセトン可溶物の赤外吸収スペクトルは、テオプロミンの吸収を示し、アセトン不溶物はカルボン酸塩の強い吸収を示した。

文 献

- 1) D.J. Timbie, L. Sechrist and P. G. Keeney : J. Food Science, **43**, 560 (1978)
- 2) G.P. Schütz, A.Z. Prinsen and A. Pafer : Rev. Int. Choc., **25** (1970)
- 3) 石黒昌孝 : 本誌, No.13, 39 (1973)
- 4) M.V. Praag, H.S. Stein and M.S. Tibbetts : J. Agr. Food Chem., **16**, 1005 (1968)
- 5) 渡辺進 : 香料, No.92, 53 (1969)