ロイシン、及びバリン等でこのことは供試ソラマメ及びエンドウの両種子に共通した現象であった。

豆種子の成熟に伴ってそのアミノ酸含量比が増大する傾向を示すアミノ酸は、供試両豆種子に共通なものとして、 γ -アミノ酪酸、グリシン、及びヒスチジン等が認められた。

3. アミノ態Nの含有量の変化状況 アミノ態Nの含有量は豆種子形成の初期には著しく多いが、その後2週間の経過中に急激な減少を示し、その後も成熟期に近づくにつれて漸減する傾向を示すが、特にソラマメでは、その減少率が高く、成熟種子の含有量は、種子形成初期のものの約 0.88% 位の含量であった。

要 約

エンドウ及びソラマメ種子の成熟過程における遊離アミノ酸の分布状況を、イオン交換樹脂及び PC を用いて追跡し、又アミノ酸含有量の変化状況は J. Awapara⁽³⁾ の PC によるアミノ酸の呈色斑抽出比色法を用いて定量した。成熟過程における豆種子中の遊離アミノ酸は不変のものでなく、成熟に伴って、その種類及び含有量に変化がみられ、中には途中で非常に少くなるか、又は濾紙上では認められなくなるものもあり、又逆に新しく濾紙上に認められて、含有量が多くなってゆくものもあることが認められた。

本実験に当り有益な助言と便宜を与えられた本学、山田教授、及び photoelectric spectrophotometer の使用にあたり便宜を与えられた熊本通信病院臨床検査室主任竹屋博士の方々に厚く感謝の意を表します。

(1) 松下アヤコ：熊本女子大学学術紀要，10，
98 (1958).	(3) J. Awapara：J. Biol. Chem., 178, 113
(1949).
(2) 松下アヤコ：本誌，32，833 (1958).	(4) 松下アヤコ，山田晃：本誌，31，578 (1957).

新式醬油に関する研究 (第2報)*

フルフラール及びアセトアルデヒドの消長

上 野 喬 宏，延 原 昭 男 (野田醬油株式会社試験所)

昭和 34 年 10 月 10 日 受 理

前報に於て新式醬油製造行程中の一般成分の変化を見たが、その中でフルフラール等のアルデヒド類が興味ある消長を示した。之は新式醬油製造に於ける特徴の一つである。酸分解により pentose より furfural, methyl pentose より methyl-furfural, hexose より hydroxy methyl furfural, levulinic acid, formic acid 等を生成するが之等は褐色反応の母体となり^(1,2)又醗酵阻害性^(3,4)を有し新式醬油の製造に対して大きな関係を持っている。

本報に於てはアルデヒド中、多量に存在するフルフラール、アセトアルデヒド等を 2,4-dinitro phenyl hydrazone (以下 2,4-DNPH と略記する)に導き、column chromatography により分離、確認しその消長を試験した。

カルボニル化合物の 2,4-DNPH の column chromatography による分離に就て White 等⁽⁵⁾、能勢等⁽⁶⁾はベントナイト、硅藻土を、Gordon 等⁽⁷⁾、Pippen 等⁽⁸⁾、大西等⁽⁹⁾は硅胶、セライトを、Stadtman⁽¹⁰⁾は硫酸マグネシウムを、Lucas⁽¹¹⁾、大亦等⁽¹²⁾はアルミナ、フーラスアースを夫々吸着剤として用いているが、本報に於てはアルミナを用いた結果に就き報告する。

実 験

1. 実験方法

(1) カルボニル化合物 2,4-DNPH の liquid chromatography：充填剤として、メルク製クロマトグラフ用 Al_2O_3 を用い、石油エーテル (bp. $40^{\circ}\sim 60^{\circ}$)、ベンゼン 1:1 混液にてカラムにつめる (15 mm×180 mm)。2,4-DNPH のクロロフォルム溶液 6 ml 内外を上端にのせ展開する。展開剤として石油エーテル、ベンゼン混液、ベンゼン、及びベンゼン、酢酸エチル混液の順に用いた。展開を長く続けて後半カラム上のバンドの分離が不明瞭になる時はアルミナと共に突き出し、クロロフォルム、アルコール等で溶出し改めて再度展開を行う。各溶出し

* Studies on Shinshiki Shoyu (Semi-chemical Soy Sauce). Part II. On the Content of Furfural and Acetaldehyde.

By Takahiro UENO and Akio NOBUHARA (Noda Soy Sauce Co., Ltd.)

第1表 カルボニル化合物の分離法

バンド No. 1 : エタノール, 酢酸エチル 2:1 混液より再結し黄色針状結晶を得, m. p. 202°. 市販フルフラールを蒸溜したものより 2,4-DNPH を作り, 同様に展開すると黄色のシス型 (m. p. 204°~205°) と赤色のトランス型 (m. p. 228°) の 2 つの Isomer⁽¹⁴⁾ が得られる. シス型と混融すると 202°~203° で m. p. の降下なし, PPC は R_F 0.36 でシス型に一致, 紫外外部吸収スペクトルは第1図, 赤外部吸収スペクトルは第2図の如く夫々シス型に一致, 元素分析の結果は

	C%	H%	N%
C ₁₁ H ₈ N ₄ O ₅ 理論値:	47.83,	2.89,	20.29
分析値:	47.63,	2.63,	20.18

以上によりバンド No. 1 はフルフラール-2,4-DNPH のシス型である.

バンド No. 2 : エタノール, 酢酸エチル 1:2 混液より再結し赤色結晶を得. m. p. 227~228° フルフラール-2,4-DNPH のトランス型と混融すると 228° で m. p. の降下なし, PPC (R_F 0.25),

第2表 分解液 2,4-DNPH の液体クロマト

バンド No.	カラム上の色	展開溶剤組成			紫外外部吸収		2,4-DNPH 収量	
		石油エーテル	ベンゼン	酢酸エチル	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\min}$	分解液 11 当	比率 (%)
1	Y. O.	50	50		380, 295, 265	320	437.8 mg	24.5
2	R. O.	40	60		390, 300, 260	320	1228.5	68.7
3	O. Y.		100		385	305	微量	—
4	O. Y.		90	10	385, 300, 265	320	22.1	1.2
5	O.		80	20	395, 300, 260	330	100.8	5.6
残	Br.						微量	—

註. Y. 黄色, O. 橙色, R. 赤色, Br. 褐色

たバンドは 8 mm × 15 mm の細いカラムを用い再度展開, 精製して同定に用いた.

(2) 2,4-DNPH の paper chromatography (以下 PPC と略す): 服部^(6,13)のテトラリン吹付逆相法を用いた. 展開剤は 90% メタノール, 氷酢酸, テトラリン 10:1.5:1.0 (vol) の混液を用い, 東洋濾紙 No. 51 2.5 cm × 40 cm の原点に試料をスポットした後, テトラリンを吹付け 30° で上昇法を行った. テトラリンの吹付法により R_F は必ずしも一定しないが同時展開のものについては物質の同定に有効に利用し得る.

(3) 紫外部, 可視部吸収スペクトル: 日立分光光度計 EPB-U 型, 液層の厚さ 10 mm, 測定範囲 220~500 m μ , 酒精溶液として測定.

(4) 赤外部吸収スペクトル, 元素分析: 東大農学部農芸化学教室に依頼.

2. 実験結果

(1) 塩酸分解液に就て: 第1報第1図記載の塩酸分解 46 時間のものを第1表の如く処理してクロマト用カルボニル化合物 2,4-DNPH のクロロフォルム溶液を得た. 之をアルミナカラムにかけ, 最初に溶出したバンドを No. 1 とし以下順に番号を附し表記すると第2表の如くである.

各バンドの同定は次の如く行った.

第1図 Band No. 1 の紫外外部吸収スペクトル
— band No. 1
---- furfural-2,4-DNPH cis form

第2図 Band No. 1 の赤外部吸収スペクトル

— band No. 1 ---- furfural-2,4-DNPH cis form

第3図 Band No. 2 の紫外外部吸収スペクトル

— band No. 2 ---- furfural-2,4-DNPH trans form

第4図 Band No. 4 の紫外外部吸収スペクトル

— band No. 4 ---- 5-me-furfural-2,4-DNPH

第5図 Band No. 5 の紫外外部吸収スペクトル

— band No. 5 ---- H.M.F-2,4-DNPH

紫外外部吸収 (第3図) は何れもトランス型に一致, 以上によりバンド No. 2 はフルフラール-2, 4-DNPH のトランス型である。

バンド No. 4 : エタノールより再結し赤色物質微量を得. m. p. 194°~197°, PPC (R_F 0.40), 紫外外部吸収 (第4図) は夫々

5-methyl-furfural-2, 4-DNPH (Runde⁽¹⁵⁾) の方法で調製に一致, 依てバンド No. 4 は 5-methyl-furfural である。

バンド No. 5 : エタノールより再結し赤色板状結晶を得. m. p. 197°, Howrth-Jones⁽¹⁶⁾ の方法で作った hydroxy-methyl-furfural-2, 4-DNPH (m. p. 198°) と混融すると 197° で m. p. の降下なし. PPC (R_F 0.69), 紫外外部吸収 (第5図), 赤外部吸収 (第6図) は, 何れも H.M.F.-2, 4-DNPH に一致, 依てバンド No. 5 は hydroxy-methyl-furfural である。

第3表 回収エーテル中の 2,4-DNPH の液体クロマト

バンド No.	カラム上の色	展開溶剤組成		紫外外部吸収		2,4-DNPH 収量	
		石油エーテル	ベンゼン	λ_{max}	λ_{min}	分解液 11 当	比率 (%)
1	Y.O.	50	50	380, 295, 260	320	47.5 mg	50.8
2	R.O.	40	60	390, 300, 260	320	27.5	29.4
3	O.Y.	20	80	375	310	0.7	0.8
残	Br.					17.8	19.1

第 6 図 Band No. 5 の赤外線吸収スペクトル
— band No. 5 ---- HMF-2,4-DNPH

次に第 1 表のエーテル抽出液よりの回収エーテル中の 2,4-DNPH を同様に展開した結果は第 3 表の如く。m.p. PPC, 紫外外部吸収等よりバンド No. 1 はフルフラール-2,4-DNPH のシス型, バンド No. 2 はトランス型なる事を確認した。バンド No. 3 は第 2 表のバンド No. 3 と同一物質と思われるが微量のため精査しなかった。

第 7 図 Band No. 1 の紫外外部吸収スペクトル
— band No. 1 ---- acetaldehyde-2,4-DNPH

第 2, 3 表の結果を合計すると分解液 1 l 当りフルフラール類 2,4-DNPH の収量は第 4 表の如くである。

(2) 中和液に就て: 第 1 報第 1 図記載の中和後 72 時間経過のものを (1) の場合と同様に処理し, 同様に展開した結果は第 5 表の如くがある。

バンド No. 1: エタノールより再結し黄色針状結晶を得。m.p. 152°~154°, アセトアルデヒド-2,4-DNPH form 1 (m.p. 163°) と混融すると 155°~157° で m.p. の降下なし, PPC (R_F 0.54), 紫外外部吸収 (第 7 図), 赤外部吸収 (第 8 図) は何れもアセトアルデヒド-2,4-DNPH form 1 に一致する。依て No. 1 はアセトアルデヒドである。

バンド No. 2: バンド No. 1 を精製する時生じた微量の黄色バンドで PPC (R_F 0.67), 紫外外部吸収は何れもフルフラール-2,4-DNPH シス型に一致する。

第 5 表 中和液 2,4-DNPH の液体クロマト

バンド No.	カラム上の色	展開溶剤組成				紫外外部吸収		2,4-DNPH 収量	
		石油エーテル	ベンゼン	酢酸エチル		λ_{max}	λ_{min}	中和液 1 l 当り	比率 (%)
1	Y	60	40			360	295		
2	O.Y.	60	40			380, 295, 260	320	95.4 mg	32.5
3	R.O.	40	60			390, 300, 260	320	4.8	1.6
4	O.Y.	40	60			364, 260, 230	295	9.8	3.3
5	Br	30	70			395, 260	295	3.8	1.3
6	O	20	80			385	305	5.2	1.8
7	Bl, Br	20	80			345, 260	295	6.0	2.0
8	O		90	10		375, 260	310	5.0	1.7
9	Bl, Br		80	20		365	295	13.8	4.7
10	Gr, Br		80	20		370	300		
11	Gr, Br		80	20		370	300	149.6	51.0
残	Br								

注 Bl: black, Gr: green, band No. 2 の収量は微量。

第 4 表 分解液よりのフルフラール類

2,4-DNPH 収量		
物質	収量	含有比率
furfural (cis)	485.3 mg/l	25.8
furfural (trans)	1256.0	66.7
5-me-furfural	22.1	1.2
H.M.F	100.8	5.4
その他	18.5	1.0
計	1882.7	100.1

第 6 表 中和液よりの 2,4-DNPH 収量

物質	収量	含有比率
acetaldehyde*	116.1 mg/l	36.1%
furfural (trans)	4.8	1.5
H.M.F?	5.0	1.6
その他	195.5	60.8
計	321.4	100.0

* 少量の furfural を含む。

第 8 図 Band No. 1 の赤外部吸収スペクトル
 — band No. 1 ---- acetaldehyde-2,4-DNPH

バンド No. 3 : 微量の赤色物質, PPC (R_F 0.27), 紫外外部吸収は何れもフルフラール-2,4-DNPH トランス型に一致する。

バンド No. 4 以下は何れも微量のため物質の確認に到っていない。No. 5, 6 は分解液には存在しなかったものであり, No. 8 は尚不純であるが PPC 上 HMF に一致する (R_F 0.68)。

次に回収エーテル中の 2,4-DNPH を同様に展開し第 5 表の結果と合計すると中和液 11 当り 2,4-DNPH の収量は第 6 表の如くである。

(3) 熟成液に就て : 第 1 報第 1 図記載の麴添加後 30 日目の液汁を (1) の場合と同様に処理し, 同様に展開した結果は第 7 表の如くである。

バンド No. 1 : エタノールより再結し黄色針状結晶を得, m. p. $162^\circ \sim 163^\circ$, アセトアルデヒド-2,4-DNPH form I (m. p. $163^\circ \sim 165^\circ$) と混融すると $163^\circ \sim 164^\circ$ で m. p. の降下なし。PPC (R_F 0.56), 紫外外部吸収はアセトアルデヒドに一致する。

バンド No. 2 : 微量の赤色物質で PPC (R_F 0.44) はフルフラール-2,4-DNPH トランス型に一致する。

バンド No. 3 以下は何れも微量のため物質の確認に到っていない。No. 4, 6 は麴添加以後に生成されたもので, No. 5 は中和液で生成し麴添加後増加している。No. 9 は PPC では H. M. F に一致する。回収エーテル中のものと合計し熟成液 11 当りの 2,4-DNPH

収量は第 8 表の如くである。

第 7 表 熟成液 2,4-DNPH の液体クロマト

考 察	バンド No.	カラム上の色	展開溶剤組成			紫外外部吸収		2,4-DNPH 収量	
			石油エーテル	ベンゼン	酢エチ	λ_{max}	λ_{min}	熟成液 11 当	比率 (%)
第 4, 第 6, 第 8 よりフルフラール, アセトアルデヒドの消長をまとめると第 9 表の如くなる。カルボニル化合物は量的に分解液が最も多く, 且つその約 92% がフルフラールである。之が中和後 80° 前後に加熱された中和液では全量は約 1/6 に減少し, フルフラールは微量となり同時に分解液では見られなかったアセトアルデヒドが全体の 36% 生成している。赤堀 ⁽¹⁷⁾ はアラニンとグルコースを 120° に加熱してアセトアルデヒドを得ており, 山田 ⁽¹⁸⁾ は乳酸の加熱蒸溜, アラニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, シスチン等とグルコースを加熱して何れもアセトアルデヒドが生成する事を述べている事からして中和後生成したアセトアルデヒドは, 非酵素的褐変反応による産物であ	1	Y	50	50		360	295	600.7mg	89.4
	2	O. Y.	40	60		380	320	7.3	1.1
	3	Y	10	90		360	295	1.6	0.2
	4	Gr	10	90		415	305	8.8	1.3
	5	Br		98	2	395, 345, 260	290	10.1	1.5
	6	Gr		95	5	400	295	11.9	1.8
	7	O		95	5	385, 260	300	8.6	1.3
	8	Bl, Br		90	10	360, 255	290	12.5	1.9
	9	O		90	10	370	305	10.1	1.5
	残	Br						微量	

第 8 表 熟成液 11 当り 2,4-DNPH 収量

物 質	収 量	含有比率
acetaldehyde	616.5mg/l	88.2%
furfural	7.3	1.0
そ の 他	75.3	10.8
計	699.1	100.0

第 9 表 フルフラール, アセトアルデヒドの消長

試料	2,4-DNPH として				furfural (mg/l)	acetald. (mg/l)
	Total (mg/l)	furf./ Total(%)	acetald./ Total(%)			
分解液	1882.7	92.5	0		604.2	0
中和液	321.4	1.5	16.1		1.7	22.7
熟成液	699.1	1.0	88.2		2.5	120.8

ル等の赤系統の色は殆ど無くなり黒, 褐色系統のものが多く, 熟成液では更に緑色のものも現われ複雑になってくる。天然醸造醤油の場合はアセトアルデヒドが約 40% 占め, 新式熟成液汁に似たクロマトグラムを示すがバンドの数は 20 ケ内外認められ更に複雑な組成である。バンドの数が多くなるとアルミナの分離能力は劣り再結操作もやりにくく, 大量に存在するフルフラール類, アセトアルデヒドの確認しか出来なかった。この点次報に述べる硅酸セライトの方が有効のように思われる。

要 約

新式分解液, 中和液, 熟成液を中性でエーテル抽出し, 得られたカルボニル化合物の 2,4-DNPH をアルミナを用いた液体クロマトグラフィーにより分離し, フルフラール, メチルフルフラール, ハイドロオキシメチルフルフラール, アセトアルデヒドの存在を確認, 定量した。フルフラールは塩酸分解により大量生成するが中和後急減して微量となり, 逆にアセトアルデヒドが生成し之は熟成中更に増加する。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導, 御鞭撻を賜った本社の仲谷一二取締役, 技術部長茂木正利博士, 試験所長横塚保博士に厚く御礼申上げ, 併せて 2,4-DNPH の PPC につき御教示頂いた服部氏, 赤外部吸収スペクトル, 元素分析をお願いした東大農芸化学教室の方々に感謝の意を表する次第である。又本研究の発表を許可された野田醤油株式会社に対し深謝する次第である。

(本報告の要約は昭和 34 年 6 月 27 日, 日本農芸化学会関東支部例会に於て発表した。)

(1) E. R. Stadtman: <i>Advance in Food Research</i> , 1, 325 (1948).	(11) H. J. Lucas, A. N. Prater, R. E. Morris: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 57, 723 (1935).
(2) M. L. Wolfrom, R. D. Schuetz, L. F. Cavalieri: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 71, 3518 (1949).	(12) 大亦正次郎, 上野照雄, 中川泰: 本誌, 29, 165 (1955).
(3) 平 友垣: 醸協, 21, 48 (1926).	(13) Y. Hattori: <i>J. Scientific Research Institute</i> , 50, 51 (1956).
(4) 馬場真一郎: 本誌, 17, 47 (1941).	(14) L. I. Braddock et al.: <i>Anal. Chem.</i> , 25, 301 (1953).
(5) J. W. White: <i>Anal. Chem.</i> , 20, 726 (1948).	(15) M. M. Runde, E. W. Scott, J. R. Johnson: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 52, 1284 (1930).
(6) 能勢繁三郎, ト部紫朗, 山下庄介: 醸協, 14, 410 (1956).	(16) W. N. Howrth, W. G. M. Jones: <i>J. Chem. Soc.</i> , 1944, 667.
(7) B. E. Gordon et al.: <i>Anal. Chem.</i> , 23, 1754 (1951).	(17) 赤堀四郎: 日化, 52, 606 (1931).
(8) E. L. Pippen et al.: <i>Food Research</i> , 23, 103 (1958).	(18) 山田正一: 本誌, 4, 666 (1928).
(9) I. Onishi, K. Yamasaki: <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 19, 143 (1955).	(19) 山田正一: 本誌, 3, 791, 929 (1927).
(10) F. H. Stadtman: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 70, 3583 (1948).	