晶 (融点 123°) が析出する。これを濾去し、濾液を氷冷放置すれば、融点 113° の結晶が得られる。この結晶を少量の無水エタノールより再結すれば、融点 $114\sim 115^{\circ}$, $[\alpha]_D^{18} +165^{\circ}$ ($c=1.2$, クロロホルム) の結晶 0.5 g が得られる。この結晶と塩化亜鉛を触媒として β -pentaacetyl-D-glucose tetraacetate とフェノールより得られた α -phenyl-D-glucoside tetraacetate と混融試験の結果、融点の降下を認めない。

御指導をたまわった京都大学名誉教授井上吉之博士、京都大学小野寺幸之進教授に感謝致します。

- (1) E. Fischer, E. F. Armstrong : *Ber.*, 35, 3154(1902) ; C. Mannich : *Ann.*, 394, 225 (1912); B. Helferich, R. Gieber : *Ann.*, 544, 201 (1940); H. Fischer, W. L. Hawkins, H. Hibbert : *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 1413 (1940).
- (2) B. Helferich, H. Bredereck : *Ann.*, 465, 166 (1928); E. Fischer, L. v. Mechel : *Ber.*, 49, 2814 (1916).
- (3) B. Helferich, Kare-Heinz Jung : *Ber.*, 87, 589 (1954).
- (4) G. Zemplén, Z. S. Nagy : *ibid.*, 63, 368 (1930).
- (5) a) B. Helferich, E. Schmitz-Hillebrecht : *ibid.*, 66, 380 (1933); 実戸圭一 : 工化, 39, 459 (1936).
b) B. Helferich, E. Günther, S. Winkler : *Ann.*, 508, 197 (1934).
- (6) a) E. M. Montgomery, N. K. Richtmyer, C. S. Hudson : *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 690 (1942).
b) 高橋三雄 : 薬学, 74, 706 (1954).
c) M. A. Yermyn : *C. A.*, 50, 1891(1956); 51, 6839 (1957).
- (7) C. D. Hurd, W. A. Bonner : *J. Org. Chem.*, 11, 50 (1946).
- (8) H. Bretschneider, K. Beran : *Monatsch.*, 80, 282 (1949).
- (9) L. Asp, B. Lindberg : *Acta Chem. Scand.*, 6, 941 (1952); *C. A.*, 47, 9278 (1953).
- (10) E. M. Montgomery, N. K. Richtmyer, C. S. Hudson : *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 1848 (1943).

[農化 第 35 卷, 第 8 号, p.711~715, 1961]

清酒香気成分に関する研究 (第 3 報)*

α -ケトカルボン酸類の分離, 同定

山 本 淳 (協和醸酵工業株式会社熊本工場研究室)

昭和 35 年 11 月 24 日 受 理

緒

論

Hq-F 樹脂脱着揮発性区分を減圧分溜して得た割分 1 は顕著の芳香を有するが、その一部を採って加水分解に附すると芳香成分は酸区分に移り、著しく芳香を減ずることより、その主成分がエステルであることが推定できる。さらに同区分の一部に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬 (2,4-DNPH 試薬) を加えると、著量のヒドラゾン結晶が析出し、これを濾別した濾液は前の芳香が完全に消失することより、同区分の芳香の主成分がケト酸エステルであることが推定できた。

これらの結果に基づいて行った同区分のガスクロマトグラフィー (GC), 分別ヒドラゾン結晶のペーパークロマトグラフィー (PC) および加水分解生成酸の PC により、芳香の主成分が α -ケトイソカプロン酸, α -ケトイソ吉草酸, α -ケト n -酪酸, 焦性葡萄糖の各ケト酸エチルエステルであることが同定できた。

これら各ケト酸エチルエステルはいずれも極めて芳香に富む香気成分であるが、特に α -ケトイソカプロン酸エチルは合成酒に $0.1\text{ mg}\sim 1\text{ mg/l}$ 添加すると、その添加量により清酒芳香ないし広く吟醸香といわれる香気を附与し、前に報告したロイシン酸エチルと同様、他種香気と併用して自然感附与に著しい効果を呈する、またこれらの結果従来吟醸香といわれた香りは、特別な香気成分によるものでなく、普遍的な香気成分の量的な因子にすぎないことを知った。

* The Flavors of Saké. Part III. Separation and Identification of Ketocarboxylic Acids.

By Atsushi YAMAMOTO (Kumamoto Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)

第 1 図 Hq-F 減圧劃温蒸溜 No. 1 の GC
試料：約 0.02ml カラム：Silicon DC 550, 3m
キャリアガス：H₂ 100ml/min カラム温度：139.4°

第 2 図 Hq-F 減圧劃温蒸溜 No. 1 の加水分解
中性区分の GC
試料：約 0.02ml 設定条件：第 1 図に同じ。

硝で脱水後エーテルを溜去して得た酸区分は、低くなったが元の芳香を有するが、さらに SOCl₂, 無水エタノールで処理して得た同区分エチルエステルは完全に元の芳香を復活する。これより加水分解により消失した芳香成分がエステル類であることは明らかである。また水解生成酸エチルエステルが、その香気を検する目的で別に Bergström ら⁽¹⁾の方法に従いロイシン酸エチルの酸化により合成した α -ケトイソカプロン酸エチルと酷似するので、これを検する目的で同時に焦性葡萄糖エチル、 α -ケトイソバレリアン酸エチル、 α -ケト *n*-酪酸エチルと混じた混合試料を前と同様条件で GC を行った結果は第 3 図に示すごとくで、その retention volume が、P₃ は焦性葡萄糖エチル、P₅ は α -ケト *n*-酪酸エチル、P₆ は α -ケトイソバレリアン酸エチル、P₈ は α -ケトイソカプロン酸エチルと完全に一致する。この結果対応する各ピークがそれぞれ各ケト酸エステルであることが推定

第 3 図 各種ケト酸エステル混合試料の GC
試料：約 0.01 ml 設定条件：第 1 図に同じ。
P₃'—CH₃COCOOC₂H₅
P₅'—CH₃CH₂COCOOC₂H₅
P₆'—CH₃CH(CH₃)CHCOOC₂H₅
P₈'—CH₃CH₂CH₂CHCOOC₂H₅

なお焦性葡萄糖エチルを除き、 α -ケトイソカプロン酸、 α -ケトイソ吉草酸、 α -ケト *n*-酪酸の各エチルエステルを清酒香気成分として分離、同定したのは全く新しい事実である。

実験の部

1. Hq-F 脱着減圧分溜劃分 1 の GC Hq-F 樹脂脱着揮発性区分を減圧分溜して得た最も沸点の低い劃分 1 [~100°/20 mm (Bath)] 約 0.5 g は著しい芳香を有する。同区分の芳香成分を明らかにするため、まず島津製 GC 1A 型で分析を行った結果は第 1 図に示すごとくで、同区分が予期以上に多くの成分よりなることがわかったが、その主要ピークに P₁~P₁₀ の記号を附して後の便ならしめた。ついで同区分約 0.03 g に 3% KOH-メタノール 1 ml を加えて 48 時間室温に放置、加水分解を行ったのちメタノールを減圧溜去、残渣をエーテルで抽出して得た水解中性区分を同様条件で行った GC の結果は第 2 図に示すごとくで、P₁, P₂, P₁₀ のみは全然変化なく、P₄, P₇ は著しくその量を減じ、P₃, P₅, P₆, P₈, P₉ は完全に消失したことがわかる。また加水分解によって得た中性区分は元の芳香を完全に消失し、同区分の芳香成分がエステル類もしくはアルカリにより容易に変化し得る物質であることを知った。つぎに前の加水分解減圧濃縮残渣に 30% H₂SO₄ を滴加して微酸性となし、エーテルで抽出、芒

第 4 図 Hq-F No. 1 + α -ケトイソカプロン酸
エチルの GC
試料：約 0.02 ml 設定条件：第 1 図に同じ。

第 5 図 Hq-F No. 1-2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン結晶加水分解酸性ヒドラゾン結晶の PC

東洋濾紙 No. 50, 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノール, 1 夜上昇展開

3. Hq-F No. 1-2, 4-DNPH 加水分解酸性ヒドラゾン

滴加すると著量のヒドラゾン結晶が析出する。これを濾別, D. Cavallini ら⁽³⁾の方法に従い分別ヒドラゾン結晶を東洋濾紙 No. 50 にスポット, 別に合成した各種ケト酸エステルの既知試料ヒドラゾンと共に密封容器中で下降展開を行ったが, R_F が接近して分離が思わしくないで, 先に得た濾別ヒドラゾン結晶に 3% KOH-メタノールを加え, 48 時間室温に放置し, エステル部分を加水分解したのち, 30% H₂SO₄ で微酸性とし, 生成ケト酸ヒドラゾンをエーテルで抽出, 抽出ヒドラゾンを再び東洋濾紙 No. 50 上にスポット, 各種ケト酸ヒドラゾンと共に 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノールで 1 夜上昇展開した結果は第 5 図, 第 1 表に示すごとくで, R_F 0.79 の α -ケトイソカプロン酸と, R_F 0.28 の焦性葡萄糖のみは完全に同定できたが, 他のケト酸ヒドラゾンは R_F が接近し分離が困難であった。

第 1 表 Hq-F No. 1-2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン結晶加水分解酸性ヒドラゾン結晶の PC

	CH_3CCOOH $\text{N}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$	$\text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{CCOOH}$ $\text{CH}_3 \quad \text{OH}$ $\text{N}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$	$\text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{CCOOC}_2\text{H}_5$ $\text{CH}_3 \quad \text{O}$ $\text{N}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$	Hq-F No. 1 酸性ヒドラゾン	考 察
R_F	0.28	0.79	0.93	0.28	CH ₃ COCOOH
				0.79	$\text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{COCOOH}$ CH_3
				0.93	$\text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{COCOOC}_2\text{H}_5$ CH_3

東洋濾紙 No. 50, 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノール, 1 夜上昇展開

できたが, これを確かめるためこの中でも隣接ピークが離れている α -ケトイソカプロン酸エチルを原料料に加えて行った GC の結果は第 4 図に示すごとくで, 対応する P₈ の増大を認めるのみで, 他に別のピークの出現を認めず, P₈ と α -ケトイソカプロン酸エチルは完全に一致した。

α -ケトイソカプロン酸エチルの合成⁽¹⁾

前報⁽²⁾でロイシンより合成したロイシン酸エチル 2.4 g を水酢酸 500 ml に溶解, Cr₂O₃ 1.69 g を 95% 酢酸 500 ml に溶解した溶液を徐々に加える。混液は攪拌しながら 36° で 1 時間保ったのちメタノール 10 ml を注意深く加え, 過剰の Cr₂O₃ を分解, 減圧濃縮, シラップ状の残渣は炭酸ソーダで中和後エーテルで生成エステルを抽出する。生成エステルは小フラスコ中で減圧蒸溜, b. p. 41~41.5°/5 mm の溜分を集める。収量 1.5 g。

生成エステルより常法に従い 2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン結晶を作り, 熱水より 3 回再結晶したのち元素分析を行った結果はつぎのごとくである。

理論値: C 49.71, H 5.37, N 16.55%

実測値: C 49.83, H 5.42, N 16.86%

2. Hq-F No. 1-2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾンの PC

上述の GC の結果各ケト酸エステルの存在が推定されたが, これを確かめるため Hq-F No. 1 の少量を採り, 2, 4-DNPH 試薬を滴加すると著量のヒドラゾン結晶が析出する。これを濾別, D. Cavallini ら⁽³⁾の方法に従い分別ヒドラゾン結晶を東洋濾紙 No. 50 にスポット, 別に合成した各種ケト酸エステルの既知試料ヒドラゾンと共に密封容器中で下降展開を行ったが, R_F が接近して分離が思わしくないで, 先に得た濾別ヒドラゾン結晶に 3% KOH-メタノールを加え, 48 時間室温に放置し, エステル部分を加水分解したのち, 30% H₂SO₄ で微酸性とし, 生成ケト酸ヒドラゾンをエーテルで抽出, 抽出ヒドラゾンを再び東洋濾紙 No. 50 上にスポット, 各種ケト酸ヒドラゾンと共に 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノールで 1 夜上昇展開した結果は第 5 図, 第 1 表に示すごとくで, R_F 0.79 の α -ケトイソカプロン酸と, R_F 0.28 の焦性葡萄糖のみは完全に同定できたが, 他のケト酸ヒドラゾンは R_F が接近し分離が困難であった。

3. Hq-F No. 1 加水分解生成酸の PC 分別ヒドラゾン結晶の PC が R_F の接近により確認し難いので, Hq-F No. 1 の残り全量に 3% KOH-メタノール 5 ml を加え, 48 時間室温に放置したのち, 2 時間湯煎上で還流して混在エステル類を完全に加水分解, 減圧濃縮残渣を少量の水に溶解, エーテルで抽出, 中性区分を除いた水層に 30% H₂SO₄ を注意深く滴加して微酸性となし, エーテルで抽出, 抽出エーテル液は芒硝で脱水後, 注意

第 6 図 Hq-F No. 1 加水分解生成酸の PC

東洋濾紙 No. 50, 1.5N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノール,
1 夜上昇展開

発色: 5% Fe₂(SO₄)₃-0.1% 赤血塩 フェノール
発色試薬

1. 焦性葡萄糖 2. α -ケト *n*-酪酸

3. α -ケトイソバレリアン酸

4. α -ケトイソカプロン酸 5. 水解生成酸

色が完全に一致し, α -ケトイソカプロン酸, α -ケトイソ吉草酸, α -ケト *n*-酪酸, 焦性葡萄糖の存在が同定できた。

第 2 表 Hq-F No. 1 加水分解生成酸の PC

CH ₃ COCOOH	CH ₃ CH ₂ COCOOH	CH ₃ >CHCOCOOH	CH ₃ >CHCH ₂ COCOOH	Hq-F No. 1 加水分解 生成酸	考 察
原点				原点	CH ₃ COCOOH
	0.12			0.12	CH ₃ CH ₂ COCOOH
		0.29		0.30	CH ₃ >CHCOCOOH
			0.38	0.38	CH ₃ >CHCH ₂ COCOOH
				0.58	?

東洋濾紙 No. 50, 1.5N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノール, 1 夜上昇展開 5%Fe₂(SO₄)₃-0.1% 赤血塩 フェノール発色試薬

結 果 お よ び 考 察

上述のごとく極めて顕著な芳香を有する Hq-F 脱着揮発性区分減圧割温蒸溜 No. 1 の GC および生成ヒドラゾンの PC, 加水分解生成酸の PC により焦性葡萄糖, α -ケト *n*-酪酸, α -ケトイソ吉草酸, α -ケトイソカプロン酸の各エチルエステルが存在が同定できたが, これはいずれも極めて芳香に富み, 合成酒に 0.1~1 mg/l 添加すると著しく清酒感を付与し, また他種香氣に対して顕著な自然感付与作用を呈する. 特に α -ケトイソカプロン酸エチルはロイシン酸エチル, イソアミルアルコールと併用するとき, その添加量の多少に従い清酒感の付与からさらにいわゆる吟醸香を呈するにいたる. すなわちイソアミルアルコール 100 mg/l, ロイシン酸エチル 0.5 mg/l, α -ケトイソカプロン酸エチル 1 mg/l を添加したものは清酒様感を付与し, なんら自然感を害うことなく香味共に著しい品質の向上が認められる. さらにその量を増し 1.5~5 mg/l を加えると, いわゆる吟醸香を呈するに至るが, この場合でもなんら不自然感を感じられない. すなわち従来, 特殊な香氣成分に由来すると考えられていた吟醸香は, 普遍的な香氣成分の量的な因子に過ぎないことが明らかになった。

このように顕著な香り効果を有する各種ケト酸エステル類は糖質もしくはアミノ酸の生体内代謝の過程でエステル化により反応系外に脱離生成したと考えられるが, 第 1 図に示した No. 1 の GC で各 α -ケト酸エステルのピーク面積が原試料中の各ケト酸エステルの存在量に比例することを考慮すると, P₈>P₆>P₅ を示し, アミノ酸代謝によってできるフーゼル油区分中の対応する各アルコールの存在量の順位が一致することは非常に興味深い事実である。

深くエーテルを溜去して, 残留水解生成酸約 5 mg を得た。

一方, 予め行った各種ケト酸類の PC で一般に用いられている発色剤として, 2,4-DNPH 試薬を散布しても, 脂肪族ケト酸では生成ヒドラゾンが鮮黄色で試薬の色との差が小さいため, かなり試料が多くないと発色の識別が困難であり, 上述のごとく極く微量の混合試料を同発色試薬にて検するのは不適當である. このためこれに代るものとして α -ケト酸は隣接 COOH 基の影響で, そのエノル型-OH はフェノール性 OH-基に相当する活性を有することに着目し, 既知 α -ケト酸類をペーパー上にスポットし, まず 5% Fe₂(SO₄)₃ をスプレーすると明瞭な淡紫色の発色が見られ, さらに 0.1% 赤血塩のスプレーによりフェノール発色同様濃青色の発色が鋭敏に現われることを知った。

このような結果に従い, 前に得た Hq-F No. 1 加水分解生成酸を東洋濾紙 No. 50 上にスポット, 同時に附した各種ケト酸とともに 1.5N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノールで 1 夜展開したのち硫酸第二鉄-赤血塩のフェノール発色試薬をスプレーした結果は第 6 図, 第 2 表に示すごとくで, それぞれ対応する各種ケト酸と R_F, 発

本報告は昭和 35 年 11 月, 本会西日本支部例会で発表した. 元素分析を依頼した熊本薬学部分析化学教室の田中先生に感謝致します. なお $C_4 \sim C_8$ の異性体を含むケト酸類およびそのエステル類を酒類の品質向上を目的として添加することについては目下特許出願中のものです.

- (1) S. Bergström, G. Aulin-Erdtman, B. Rolander, E. Stenhagen, S. Östling: *Acta Chem. Scand.*, 6, 1157 (1952); *C. A.* 47, 8645 (1953).
(2) 山本 淳: 本誌, 35, 619 (1961).
(3) D. Cavallini, N. Frontali, G. Toshi: *Nature*, 163, 856 (1949), 164, 792 (1949).

[農化 第 35 巻, 第 8 号, p.715~719, 1961]

清酒香気成分に関する研究 (第 4 報)*

フェルラ酸, バニリン酸, バニリンの分離, 同定

山本 淳, 佐々木喜代, 猿野琳次郎 (協和醸酵工業株式会社熊本工場研究室)

昭和 35 年 11 月 24 日 受理

緒 論

活性炭脱着酸性区分をエステル化, 生成エステルを $CaCl_2$ で処理して得た揮発性オキシ酸区分よりフェルラ酸, バニリン酸を, またエステル化未反応酸区分よりバニリンを分離, 同定できた.

このように清酒中より新たに見出した 3 成分の合成酒添加試験を行った結果, フェルラ酸およびそのエチルエステルは 2~3 mg/l を添加すると明らかに辛味が附与せられ, 同酸が清酒辛味成分の一つであることを知った. またバニリンの芳香についてはよく知られているが, これを合成酒に 1 mg/l 添加すると顕著な菓子様芳香が附与せられ不可である. これに前に報告⁽¹⁾した β -フェニルエチルアルコール酢酸エステルを 0.5 mg/l 添加すると, 今までの菓子様芳香が即座に醸造物様香気に変じることを知り, 香気成分間の感覚的相互作用の顕著な一例として興味深い結果を得た.

また分離フェルラ酸の収量が同時に得たバニリン酸, バニリンに比し遙かに多いことより, 後者の生因がフェルラ酸の二次代謝に基くことが考えられ, これを確かめるため麴エタノール抽出液を処理して得たフェノール酸区分のペーパークロマトグラフィー (PC) によりフェルラ酸のみを検出, 確認できたがバニリン酸を見出すことはできなかった. また同時にシリンガ酸, 没食子酸等リグニン骨核物質も確認できなかったことより, 麴中のフェルラ酸の生因を確かめる目的で, 原料米を粉碎, 緩徐な条件で酸糖化した糖化液中より, 前と同様フェノール酸区分を分別, その PC の結果フェルラ酸を検出, 確認できた. このことより米中のフェルラ酸がリグニン構成物質として考えるより, 配糖体等のごとく酸分解により容易に分解し得る前駆物質を考える方が妥当である等の興味深い結果が得られた.

実 験 の 部

1. 活性炭脱着酸区分の分別 活性炭脱着アルコール溜去残渣エーテル抽出液を 10% Na_2CO_3 で処理して酸性区分約 30 g の多量を得たが, これを PC にて検した結果, 大部分がサリチル酸であることを知った. この故に同区分に無水エタノール 100 ml 濃硫酸 2 ml を加え, 8 時間加熱, 還流したのち, 重曹粉末を加え生成エステルの分解を防ぎながら減圧濃縮, 残渣をエーテルに溶解, 10% Na_2CO_3 と振って生成エステルと未反応酸を分った. すなわちこのような緩徐な条件では他のカルボン酸に比しサリチル酸はエステル化され難いので, その大部分を未反応酸として分離できる. 次にエーテルを溜去して得た生成エステル約 3 g をリグロイン 50 ml に溶解, 無水 $CaCl_2$ 粉末 15 g を加え, 1 夜放置したのち濾別, 濾別結晶は石油エーテルで充分洗滌したのち氷水 200 g 中に投入, 生成附加化合物を分解, 遊離したオキシ酸エステルをエーテルで抽出, 無水芒硝で脱水後エー

* The Flavors of Saké. Part IV. Separation and Identification of Ferulic Acid, Vanillic Acid and Vanilline.

By Atsushi YAMAMOTO, Kiyo SASAKI and Rinjiro SARUNO (Kumamoto Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)