[農化 第 47 卷, 第 7 号, p. 463~465, 1973]

醤油よりカテコールの分離, 同定

湯浅克己, 石塚啓子, 鎗木 進, 逆井利夫

(キッコーマン醤油株式会社中央研究所)

昭和 48 年 2 月 8 日 受 理

Isolation and Identification of Catechol from Shoyu [Note]

By Katsumi YUASA, Keiko ISHIZUKA, Susumu KABURAKI and Toshio SAKASAI

Central Research Laboratories, Kikkoman Shoyu Co., Ltd.

The relation between the oxidation of phenolic compounds in shoyu and the browning of shoyu has been studied.

In this paper, ether soluble phenolic compounds in shoyu were studied. One of the phenolic compounds on TLC plate became brown without any spraying of chemical reagents (solvent system; benzene : methanol : AcOH=45 : 7 : 1 v/v). This compound was fractionated by silicic acid column chromatography (solvent; *n*-hexane : ether=9 : 1 v/v and *n*-hexane : ether=1 : 1 v/v) and separated by TLC. Resolved substance was eluted with *n*-hexane : ether=9 : 1 (v/v) from adsorbent and crystallized from hot *n*-hexane. *R_f* value, mp, UV spectra and IR spectra isolated needles were the same as those of catechol.

Isolation of catechol from shoyu was first carried out in the present work.

(Received February 8, 1973)

食品, 特に果実, 野菜類ではタンニン酸, 低分子のフェノール類が鉄イオンと反応して着色したり, 酸化を受けて黒化したりすることは良くみられる現象であり, それらに関する研究⁽¹⁻⁹⁾もなされている。最近, 大場ら^(4,5)によって黒粕の原因物質がドーパ, プロトカテキェ酸であると結論された。著者らもフェノール類の酸化と醤油の褐変に注目し, 醤油麹菌 *Aspergillus sojae* KS のフェノール類酸化酵素の性質を検討し, 本酵素はピロガロール, DL-ドーパ, *p*-ベンズキノンに対する活性を強く有するがチロシン, カテコールには弱い活性しか示さなかった⁽⁶⁾。そこで, 醤油中に基質となるようなフェノール類が含まれているか検索した。まず最初にかテコールを分離, 同定したので報告する。

純天然醸造醤油諸味液汁 (生醤油) 2 l にエチルエーテル 1.5 l を添加し, 120rpm の往復振盪機で 1 時間抽出した。150ml 程度に減圧濃縮後, 飽和重曹溶液とふり, 強酸性部を除去した。エーテル相を無水芒硝で脱水し,

減圧下, 30°C で 4~5ml に濃縮した。

フェノール類はシリカゲルクロマトグラフィーにより分別した。すなわち, シリカゲル (マリンクロット社) 40g を *n*-ヘキサンでカラム (3×30cm) に充填し, さきの濃縮液を全量負荷した。最初 *n*-ヘキサン : エーテル (9 : 1, v/v) 200ml で溶出し, F-1 とした。ついで *n*-ヘキサン : エーテル (1 : 1, v/v) にて溶出し, 50ml ずつ分取した。その各々を F-2~F-6 とした。

次にさきの濃縮液および各フラクション (F-1~F-6) に含まれる成分を G. Pastusuka ら⁽⁷⁾ の方法を多少改変し, ベンゼン : メタノール : 酢酸 (45 : 7 : 1, v/v) の溶媒系を用い, 薄層クロマトグラフィーで分離した。なお担体はシリカゲル G (メルク社) を用い, 0.5mm の厚さに調整した薄層を使用した。検出には, アンモニヤ性硝酸銀⁽⁸⁾を用いた。この結果を Fig. 1 に示した。*R_f* 値の大きい順に spot 1~spot 7 まで番号をつけた。spot 1 は F-1 に, spot 2 は F-4, F-5 に, spot 4 は F-3, F-4

Fig. 1. Thin-layer Chromatogram of the Elute with *n*-Hexane : Ether.

F-0; ethyl ether soluble fraction of shoyu without carboxylic acid, F-1; the elute with *n*-hexane : ether (9 : 1 v/v, vol.; 200 ml), F-2~F-6; the elute with *n*-hexane : ether (1 : 1 v/v) (fraction volume : 50 ml), F-2 was not detected with ammoniac silver nitrate.

Detection method: ammoniac silver nitrate.

に各々溶出された。ここで各フラクションに検出された成分が、どのようなフェノール類であるか推定するため、さきの展開溶媒とベンゼン：ジオキサン：酢酸 (90 : 25 : 4, v/v) の計 2 種類の溶媒系で、エーテル抽出物 (濃縮液) および各種標準物質を同時に展開した。Rf 値を Table I に示した。また、ベンゼン：メタノール：酢酸 (45 : 7 : 1, v/v) で展開した標準物質、および各フラクションのスポットをアンモニア性硝酸銀⁽⁸⁾、フォリン試薬⁽⁹⁾、塩化第二鉄溶液⁽¹⁰⁾ で検出し、色調を検討した。この結果を Table II に示した。spot 1, spot 4, spot 5 物質は Rf 値、第二鉄反応等において、それぞれグアヤコール、カテコール、ゲニステインに一致した。

次に F-3, F-4 に含まれるカテコールと推定された spot 4 物質の UV スペクトルを測定した。すなわち、さきのシリカゲルクロマトグラフィーで分別された F-3 および F-4 を濃縮し、G. Pastusuka⁽⁷⁾ らの方法を改変した薄層クロマトグラフィーで spot 4 物質を分取した。このものからエタノールで溶出し、再度分離、精製した。薄層板を 1 夜室温で風乾後、spot 4 物質をかきとりエタノールで溶出した。この溶出液を日立 EPS-2 U 型自記分光光度計を用いて、UV 吸収を測定した。標準

Table I. Comparison of Rf of the Spots with Those of Some Phenolic Compounds

	Solvent system	
	benzene : methanol : AcOH (45 : 7 : 1)	benzene : dioxane : AcOH (90 : 25 : 4)
Spot 1	0.69	0.84
Guaiacol	0.69	0.84
Spot 4	0.31	0.58
Catechol	0.31	0.58
Spot 5	0.24	0.56
Genistein	0.24	0.56
Hydroquinone	0.15	0.54
Pyrogallol	0.13	0.45
Vanillin	0.38	0.72
Syringa aldehyde	0.37	0.66
Homocatechol	0.33	0.68

Table II. Comparison of Color Reaction of the Spots with Those of Some Phenolic Compounds

	Folin	Ferric chloride	Ammoniac silver nitrate
Spot 1	blue	orange	brown
Guaiacol	blue	orange	brown
Spot 4	blue	blue grey	black
Catechol	blue	blue grey	black
Spot 5	—	red violet	grey
Genistein	—	red violet	grey
Hydroquinone	blue	—	brown
Vanillin	blue	red violet	black
Syringa aldehyde	blue	grey	black
Homocatechol	blue	yellow	black

物質のカテコールも、展開溶媒に含まれる酢酸の影響を考慮して全く同様に行なった。その結果、spot 4 物質およびカテコールの UV スペクトルの λ_{max} は両者とも 280 m μ を示し、全スペクトルも全く一致した。

以上の結果から、spot 4 物質がカテコールと推定されたので、その単離を試みた。シリカゲルクロマトグラフィーで分別された F-3 および F-4 を厚さ 0.5 mm の薄層に带状にスポットし、ベンゼン：メタノール：酢酸 (45 : 7 : 1, v/v) の溶媒系で分離した。spot 4 に相当する区分 (この区分は薄層板を室温で風乾する間に淡黄色に変化し、他と区別できた) をかきとり、カラムに充填後、*n*-ヘキサン：エーテル (9 : 1, v/v) で徐々に溶出させた。溶出液を減圧下、40°C で乾固した。残渣を熱 *n*-ヘキサンに溶解後、冷蔵庫に 1 夜放置することによって、無色針状晶が得られた。この針状晶を母液と分け、*n*-ヘキサンで洗浄後、デシケーター内で減圧乾燥した。

ここに得られた針状晶を日立 EPI-G 3 型赤外分光光度計を用い, KBr 錠剤法により IR 吸収を測定した. 標準物質のカテコールも α -ヘキサンより再結した後, 全く同様にして測定した. この結果, spot 4 物質は 1925 cm^{-1} , 1885 cm^{-1} , 1845 cm^{-1} , 1805 cm^{-1} , 1760 cm^{-1} のそれぞれに吸収があり, これはベンゼン核オルト置換体であることを意味する. また 3436 cm^{-1} , 3305 cm^{-1} の吸収から OH 基を有することは明らかである. また 1600 cm^{-1} および 1466 cm^{-1} の吸収は C-O の伸縮振動, 768 cm^{-1} , 753 cm^{-1} ならびに 739 cm^{-1} の吸収は, 隣接する水素の面外変角振動によるものとそれぞれ考えられた. 標準物質のカテコールも全く同様の吸収を示したことから, spot 4 物質をカテコールと同定した.

さらに spot 4 物質の融点を柳本ミクロ融点測定装置を用いて測定し, mp $104\sim 105^{\circ}\text{C}$ の値を得た. この値はカテコールの融点と一致した. また混融試験でも, 融点の降下は認められなかった. 醤油からカテコールを分離, 同定したのは著者らが最初である.

本稿を終るにあたり, 終始ご鞭撻を賜りました東京農業大学教授小原哲二郎博士, 東京教育大学農学部小笠原八十吉博士, ご指導を賜りました当研究所横塚保所長ならびに発表を許可されたキッコーマン醤油株式会社役員各位に厚くお礼申し上げます. また, 実験に協力された嶋田長二郎氏に感謝いたします.

- (1) 長沢俊三: 農化, **34**, 233 (1960).
- (2) 中林敏郎: 食工試, **17**, 231 (1970).
- (3) 東野哲三: 同上, **17**, 447 (1970).
- (4) 大場俊輝, 村上英也, 原 昌道, 加藤明彦: 醸協誌, **66**, 71 (1971).
- (5) T. Ohba, H. Murakami and S. Hara: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 674 (1971).
- (6) 湯浅克己, 鍋木 進, 逆井利夫: 未発表.
- (7) G. Pastusuka: *Z. Anal. Chem.*, **179**, 355 (1961).
- (8) 長沢俊三: 農化, **34**, 237 (1960).
- (9) O. Folin and V. Ciocalteu: *J. Biol. Chem.*, **73**, 629 (1927).
- (10) 船久保英一: 有機化合物確認法, 上巻, 養賢堂, 1954, p. 759.