

1. はじめに

Nunomura ら¹⁾は、醤油の特徴香成分を醤油から抽出・分離し、各種の機器分析による測定結果から 4-Hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone (以下、HEMF) と同定した。

その後、木原ら²⁾は、醤油から分離した HEMF 画分をキャピラリーカラム付ガスクロマトグラフ質量分析計 (以下、GCMS) および高速液体クロマトグラフを駆使し、HEMF の 2 異性体を分離し詳細な研究を行った。その結果、HEMF として 4-Hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2H)-furanone (以下、HEMF2・5) および新たに 3,4-Dihydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-furane (以下、DHEMF) の異性体を同定し、今日に至っている。

著者は、HEMF を多く生産する醤油酵母の育種について検討しているが、上記の状況は HEMF の定量分析に大きな障壁となっている。

このため、GCMS を用いて、醤油から抽出・分離した HEMF 画分と最近入手可能になった HEMF2・5 標品を比較検討した結果、HEMF 異性体について若干の知見を得たので報告する。

2. 試験方法

2.1 試薬

HEMF2・5 標品：東京化成工業 (株) 製

その他の試薬：いずれも市販の試薬特級品を用いた。

2.2 GCMS 装置

GCMS ; (株) 島津製作所製 GCMS-9100MK, ガスク

ロマトグラフは GC-14A 型

データ処理装置 ; Digital Equipment 社製の Micro VAX

データ処理ソフトウェア : (株) 島津製作所製 PAC-1500

2.3 GCMS 条件

1) GC 条件

GC カラム : 信和化工 (株) 製, キャピラリーカラム

HR-20M, 0.25mm × 25m, 膜厚 0.25 μm

カラム温度 : 40 (1.5min) → 230 (10min),
4 / min 昇温

気化温度 : 200 キャリヤーガス : He

注入量 : 1 μl (スプリットレス)

サンプリング時間 : 1.5 min

カラムヘッド圧力 : 0.75Kg/cm²

2) MS 条件

イオン源温度 : 250 イオン化法 : EI

イオン化電圧 : 70eV

2.4 分析試料の調製

1) HEMF2・5 標品溶液

HEMF2・5 を 20mg 精秤しアセトン 100ml 溶液とする。

2) 醤油の HEMF 画分試料液

分液ロートに醤油 (本醸造, 特級) 200ml およびジクロロメタン 100ml を加え振とう抽出する。同様の操作を繰り返し 醤油 1000ml から 500ml ジクロロメタン層を得る。この層を ロータリーエバポレータで約 80ml に濃

縮し分液ロートへ移し入れ, 15% 炭酸カリウム水溶液 40ml を加え振とう抽出する。水層を分取し, 氷冷下にて濃塩酸を滴下し微酸性とし, 次に炭酸水素ナトリウムを加え微アルカリ性とする。これをジクロロメタン 50ml で振とう抽出する。ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水し, ロータリーエバポレータで溶媒を溜去する。

残留物を水に溶かし, 全量 1.2ml とする。

上液の 0.6ml を前処理済みセップパック (ウォーターズ社製, ODS, ペット容量 1ml) へ添加し, 次に水 0.4 ml で洗う。15% メタノール水溶液 2.5ml を流し, 最初の 0.5ml を捨て, 後の 2ml を分取する。新たに, 同様の操作を繰り返し, 4ml を得る。

この分取液を水で 12ml に希釈し, 塩化ナトリウム飽和溶液とする。次に, 分液ロートへ移し入れジクロロメタン 20ml で 2 回振とう抽出する。ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水し, ロータリーエバポレータで溶媒を溜去し, 残留物をアセトンに溶かし 50ml とする。この溶液を醤油の HEMF 画分試料液とする。

3) HEMF2・5 標品のメチル化溶液および醤油の HEMF 画分のメチル化試料液の調製

常法に従って, 水酸化カリウムを溶かしたカルピトール溶液に N-Methyl-N-nitroso-p-toluenesulfonamide を加え, 発生するジアゾメタンを HEMF2・5 標品溶液および醤油の HEMF 画分試料液 2.5 ml へ導入し, 各々のメチル化試料液を調製した。

3. 結果および考察

HEMF2・5 標品溶液のトータルイオンクロマトグラム (以下, TIC) を図 1 に示した。TIC には十分に分離していると言い難い A1 と B1 の 2 ピークを認めた。図 5 および図 6 に示したマススペクトルの解析から, B1 が主成分である HEMF2・5, A1 はもう一方の異性体である 4-Hydroxy-5-ethyl-2-methyl-3(2H)-furanone (以下, HEMF5・2) と同定した。

図 2 に示した醤油の HEMF 画分試料液の TIC には A2 および B2 のピークがあり, その各々は図 1 の A1, B1 のピーク形状, Rt 値およびマススペクトルにおいて良く一致している。

HEMF2・5 標品のメチル化試料液の TIC を図 3 に, C1 および D1 ピークのマススペクトルを図 9, 10 に示した。メチル化により A1, B1 ピークは消失し, 新たに検出された C1, D1 ピークは, マススペクトル解析から各々メチル化 HEMF5・2, メチル化 HEMF2・5 と同定される。

図 4 に示した醤油の HEMF 画分のメチル化試料液の TIC 上に新たに検出された C2, D2 は, 各々 C1, D1 の Rt 値およびマススペクトルにおいて良く一致している。

以上の結果から, 醤油の HEMF 画分に見られる A2, B2 ピークは各々 HEMF5・2, HEMF2・5 と同定され, DHEMF の存在を示唆するようなピークは全く見出せなかった。

醤油から HEMF 画分を調製する方法として, 有機溶媒抽出法と固相抽出法を組み合わせることにより, TIC 上に共存ピークの少ない HEMF 画分を得ることができた。

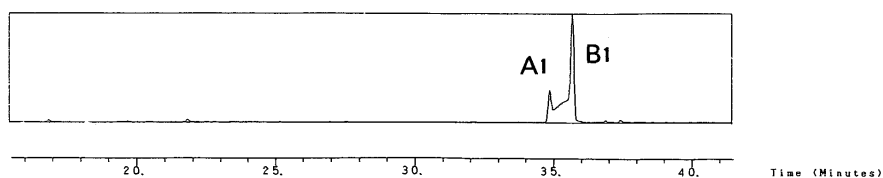


図 1. HEMF2 · 5 標品溶液の TIC

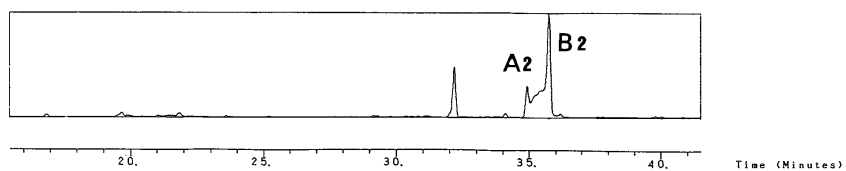


図 2. 醤油の HEMF 画分試料液の TIC

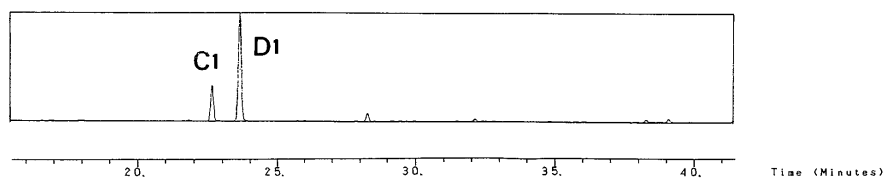


図 3. HEMF2 · 5 標品のメチル化溶液の TIC

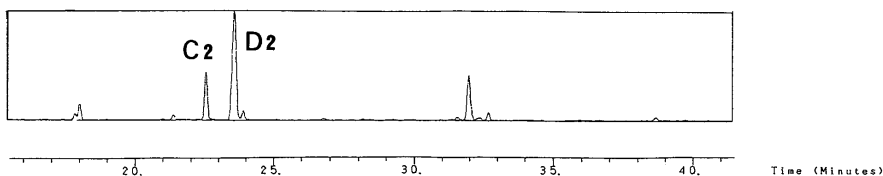


図 4. 醤油の HEMF 画分のメチル化試料液 TIC

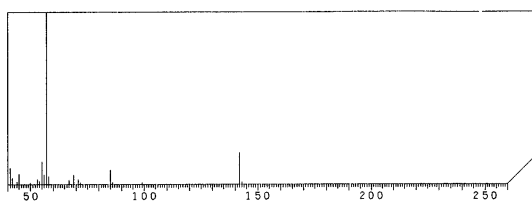


図 5. A1ピークのマススペクトル

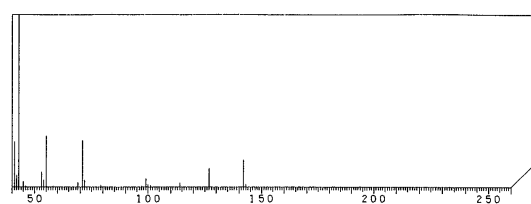


図 6. B1ピークのマススペクトル

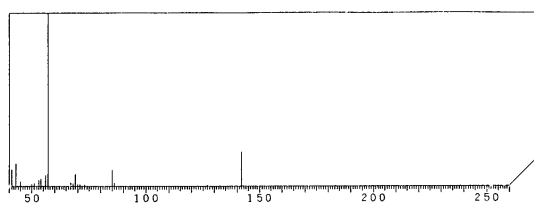


図 7. A2ピークのマススペクトル

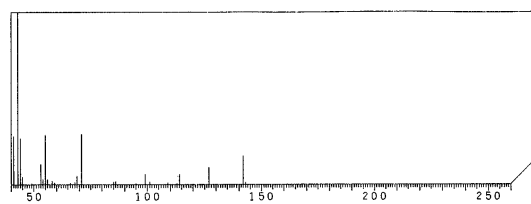


図 8. B2ピークのマススペクトル

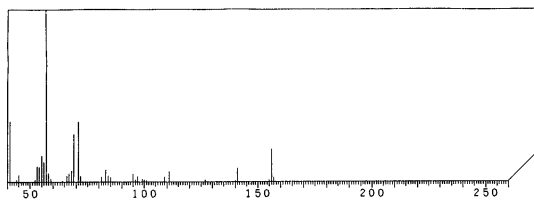


図 9. C1 ピークのマススペクトル

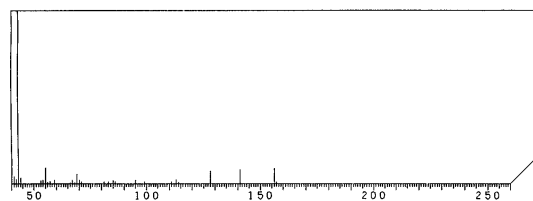


図 10. D1 ピークのマススペクトル

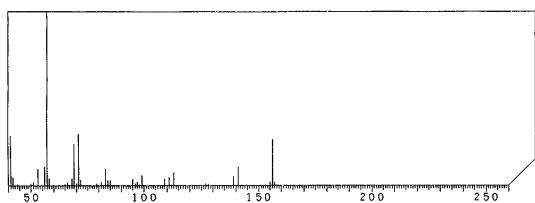


図 11. C2 ピークのマススペクトル

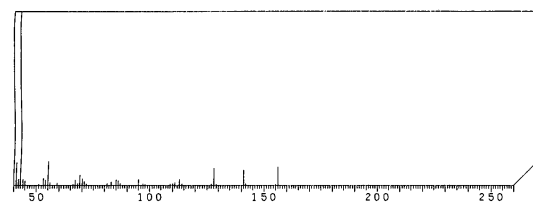


図 12. D2 ピークのマススペクトル

4. 要約

醤油の HEMF 画分液に存在する HEMF 異性体を検討するため、GCMS をもちいて、HEMF2・5 標品と醤油から得た HEMF 画分のデータ解析を行った。その結果、醤油の HEMF 画分には、HEMF2・5 および HEMF5・2 の 2 異性体のみ確認され、DHEMF は検出されなかった。

醤油から HEMF 濡分を調製する方法として有機溶媒抽出法と固相抽出法を組み合わせた手法を考案した。

参考文献

- 1) N.Nunomura, M.Sasaki, Y.Asao and T.Yokotuka ;
Agr.Biol.Chm., 40, 491(1976).
- 2) 木原 清, 大谷 肇, 益田 勝吉, 榊原 仁作 ;
醤研, 20, 7, (1994).