

天然感を増強させる微量重要香気成分の解明と
その有用性に関する研究

中西 啓

目次

第一章 緒言

| | |
|--|----|
| 1.1 香料 | 1 |
| 1.1.1 香料とは | 1 |
| 1.1.2 天然香料 | 2 |
| 1.1.3 合成香料 | 4 |
| 1.1.4 香料産業 | 6 |
| 1.1.5 食品におけるフレーバーの役割 | 8 |
| 1.2 食品の香気分析 | 10 |
| 1.2.1 香気分析 | 10 |
| 1.2.2 前処理 | 11 |
| 1.2.3 ガスクロマトグラフィー (gas chromatography) による分析 | 12 |
| 1.2.4 GC-匂い嗅ぎ (gas chromatography-olfactometry ; GC-O) による分析 | 13 |
| 1.2.5 立体異性体の分析 | 14 |
| 1.3 重要香気成分 | 17 |
| 1.3.1 重要香気成分の探索 | 17 |
| 1.3.2 重要香気成分の定量 | 18 |
| 1.3.3 微量重要香気成分の解明 | 18 |
| 1.4 本研究の目的と意義 | 23 |

第二章

ワサビの新規微量重要香気成分の解明とワサビ香気への有用性評価

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.1 | 序 | 27 |
| 2.2 | 試料および実験方法 | 29 |
| 2.2.1 | 試料および試薬・化合物 | 29 |
| 2.2.1.1 | ワサビ | 29 |
| 2.2.1.2 | 試薬・化合物 | 29 |
| 2.2.1.3 | ラセミ体の 3-methyl-4-decanolide の合成 | 29 |
| 2.2.1.4 | 光学活性 3-methyl-4-decanolide の合成 | 30 |
| 2.2.1.4.1 | (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-3-Methyl-4-decanolide の合成 | 30 |
| 2.2.1.4.2 | (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-3-Methyl-4-decanolide の合成 | 32 |
| 2.2.1.4.3 | (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-Methyl-4-decanolide の合成 | 34 |
| 2.2.1.4.4 | (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-3-Methyl-4-decanolide の合成 | 36 |
| 2.2.2 | ワサビ香気濃縮物の調製 | 38 |
| 2.2.3 | AEDA | 38 |
| 2.2.4 | ワサビ香気濃縮物の分画 | 38 |
| 2.2.5 | 機器分析 | 39 |
| 2.2.5.1 | GC-MS | 39 |
| 2.2.5.2 | GC-MS/O | 40 |
| 2.2.5.3 | MD-GC-MS | 40 |
| 2.2.5.4 | NMR | 41 |
| 2.2.5.5 | 比旋光度 | 41 |
| 2.2.6 | 官能評価 | 41 |
| 2.3 | 結果および考察 | 43 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.3.1 | ワサビの重要香気成分の決定 | 43 |
| 2.3.2 | ワサビ中の 3-methyl-4-decanolide の絶対立体配置の決定 | 44 |
| 2.3.3 | 官能評価 | 50 |
| 2.4 | 結論 | 52 |

第三章

果物の新規微量重要香気成分の解明と果物香味への有用性評価

| | | |
|---------|-------------------------------------|----|
| 3.1 | 序 | 54 |
| 3.2 | 試料および実験方法 | 56 |
| 3.2.1 | 試料および試薬・化合物 | 56 |
| 3.2.1.1 | 試料 | 56 |
| 3.2.1.2 | 試薬・化合物 | 56 |
| 3.2.1.3 | Rotundone の標品合成 | 56 |
| 3.2.2 | 構造不明成分の解明 | 58 |
| 3.2.2.1 | 減圧蒸留 | 58 |
| 3.2.2.2 | シリカゲルカラムクロマトグラフィー | 58 |
| 3.2.2.3 | 分取 HPLC | 59 |
| 3.2.3 | グレープフルーツ、リンゴ、マンゴーにおける rotundone の同定 | 61 |
| 3.2.3.1 | グレープフルーツにおける rotundone の同定 | 61 |
| 3.2.3.2 | リンゴにおける rotundone の同定 | 61 |
| 3.2.3.3 | マンゴーにおける rotundone の同定 | 62 |
| 3.2.4 | 機器分析 | 62 |
| 3.2.4.1 | 分取 HPLC 分画 | 62 |

| | | |
|---------|------------------------------------|----|
| 3.2.4.2 | GC-MS | 65 |
| 3.2.4.3 | GC-MS/O | 65 |
| 3.2.4.4 | MD-GC-MS | 66 |
| 3.2.4.5 | NMR | 66 |
| 3.2.4.6 | HRMS | 67 |
| 3.2.5 | 官能評価 | 67 |
| 3.3 | 結果および考察 | 70 |
| 3.3.1 | 構造不明成分の単離および解明 | 70 |
| 3.3.2 | グレープフルーツ、リンゴ、マンゴーからの rotundone の同定 | 72 |
| 3.3.3 | Rotundone の香気特性 | 74 |
| 3.3.4 | 果物モデル飲料への rotundone の添加効果 | 75 |
| 3.4 | 結論 | 77 |

第四章

グレープフルーツ中の rotundone の定量とグレープフルーツ香気への有用性評価

| | | |
|---------|--------------------------|----|
| 4.1 | 序 | 79 |
| 4.2 | 試料および実験方法 | 81 |
| 4.2.1 | 試料および試薬・化合物 | 81 |
| 4.2.1.1 | グレープフルーツ | 81 |
| 4.2.1.2 | 試薬・化合物 | 81 |
| 4.2.1.3 | Rotundone- $d_{2,3}$ の合成 | 81 |
| 4.2.2 | グレープフルーツ果皮の極性画分の調製 | 86 |
| 4.2.3 | グレープフルーツ果汁の香気濃縮物の調製 | 86 |
| 4.2.4 | AEDA | 87 |

| | | |
|---------|----------------------------------|-----|
| 4.2.5 | SIDA による rotundone の定量 | 87 |
| 4.2.5.1 | 検量線の作成 | 87 |
| 4.2.5.2 | グレープフルーツ果皮における rotundone の定量 | 87 |
| 4.2.5.3 | グレープフルーツ果汁における rotundone の定量 | 88 |
| 4.2.5.4 | GC-MS 測定 | 88 |
| 4.2.5.5 | 分取 HPLC 分画 | 89 |
| 4.2.6 | 機器分析 | 90 |
| 4.2.6.1 | GC-MS | 90 |
| 4.2.6.2 | GC-MS/O | 90 |
| 4.2.6.3 | HRMS | 91 |
| 4.2.6.4 | NMR | 91 |
| 4.2.7 | 官能評価 | 91 |
| 4.3 | 結果および考察 | 93 |
| 4.3.1 | グレープフルーツの果皮と果汁の重要香気成分の決定 | 90 |
| 4.3.2 | グレープフルーツの果皮と果汁における rotundone の定量 | 95 |
| 4.3.3 | グレープフルーツ香気における rotundone の効果の検証 | 99 |
| 4.4 | 結論 | 101 |

第五章

果物の新規香気成分としての rotundone 立体異性体の解明とその有用性評価

| | | |
|---------|-------------|-----|
| 5.1 | 序 | 103 |
| 5.2 | 試料および実験方法 | 104 |
| 5.2.1 | 試料および試薬・化合物 | 104 |
| 5.2.1.1 | 試料 | 104 |

| | | |
|---------|--------------------------------|-----|
| 5.2.1.2 | 試薬・化合物 | 104 |
| 5.2.1.3 | 3- <i>epi</i> -Rotundone の調製 | 104 |
| 5.2.2 | 果物中での構造不明成分の検出 | 106 |
| 5.2.3 | 機器分析 | 106 |
| 5.2.3.1 | GC-MS | 106 |
| 5.2.3.2 | HRMS | 107 |
| 5.2.3.3 | NMR | 107 |
| 5.2.3.4 | 比旋光度 | 107 |
| 5.2.4 | 閾値測定 | 107 |
| 5.3 | 結果および考察 | 109 |
| 5.3.1 | 様々な果物中での構造不明成分の検出 | 109 |
| 5.3.2 | 構造不明成分の解明 | 111 |
| 5.3.3 | 3- <i>epi</i> -Rotundone の香気特性 | 114 |
| 5.4 | 結論 | 117 |
| 第六章 総括 | | 118 |
| Summary | | 123 |
| 参考文献 | | 128 |

本研究において使用される略号

| | |
|------------|--|
| Ac | acetyl |
| AcTBDMSBCD | heptakis-(2,3-di- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin |
| AEDA | aroma extract dilution analysis |
| CIS | cooled injection system |
| COSY | correlation spectroscopy |
| DMAP | <i>N,N</i> -dimethylaminopyridine |
| EI | electron impact |
| Et | ethyl |
| FD | flavor dilution |
| FID | flame ionization detector |
| GC | gas chromatography |
| GC-MS | gas chromatography-mass spectrometry |
| GC-O | gas chromatography-olfactometry |
| HMBC | heteronuclear multiple bond correlation |
| HMPA | hexamethylphosphoric triamide |
| HMQC | heteronuclear multiple quantum correlation |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| HRMS | high resolution mass spectrometry |
| IR | infrared spectroscopy |
| JETRO | Japan external trade organization (日本貿易振興機構) |
| LDA | lithium diisopropylamide |
| LTM | low thermal mass |
| MCPBA | <i>m</i> -chloroperbenzoic acid |
| Me | methyl |
| MD-GC-MS | multidimensional gas chromatography-mass spectrometry |
| MIBK | methyl isobutyl ketone = 4-methyl-2-pentanone |
| MS | mass spectrometer |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| NOE | nuclear Overhauser effect |
| NOESY | nuclear Overhauser effect spectroscopy |
| OAV | odor activity value |
| ODP | olfactory detection port |
| ppb | parts per billion |
| ppm | parts per million |

| | |
|------|--------------------------------------|
| RI | retention index |
| SAFE | solvent assisted flavor evaporation |
| SDE | simultaneous distillation extraction |
| SIDA | stable isotope dilution assay |
| SIM | selected ion monitoring |
| THF | tetrahydrofuran |
| TIC | total ion chromatogram |
| Ts | <i>p</i> -toluenesulfony |

第一章 緒言

1.1 香料^{1,2)}

1.1.1 香料とは

我々は日々匂いと共に生活している。果物や花などの自然界から薫る香りや、シャンプーや洗剤、ジュースやお菓子などの人工物（商品）から薫る香り、様々な香りが生活に彩りを与えてくれている。人類は古来より天然に存在する芳香性の動植物を生活に使用してきた。科学技術の進歩により、その中の香気部分のみを抽出することが可能となり、さらに現在では、香気を化学的に解析し、合成・調合し、産業的に利用することができるようになった。我々の生活必需品の多くが香りを有しており、スーパーやコンビニエンスストアで売られている商品の原材料の欄を見ると、ほとんどのものに「香料」と記載されている。我々の生活において香料は必要不可欠な存在といっても過言ではない。

日本における香料の分類を図 1-1 に示す。日本において香料は、天然物に由来する天然香料と有機合成化学によって作られた合成香料に分類され、ほとんどが天然香料や合成香料を混合した調合香料である。調合香料は、清涼飲料水や菓子などの食品に使用されるものを「フレーバー（食品香料）」、化粧品やハウスホールド製品などに使用されるものを「フレグランス（化粧品香料）」として分類される。フレーバーは、食品衛生法では「食品の製造または加工の工程で、香気を付与または増強するために添加される添加物及びその製剤」と定義されているが、香気の付与や補強の他に、好ましくない香り（オフフレーバー）の抑制といった目的もあり、食品が本来持っている香りを付与・再現することを主目的として使用される。一方でフレグランスは、製品をイメージする香りを付与することを主な目的として用いられるが、製品基材由来のオフオーダーの除去や抑制が目的となる場合もある。

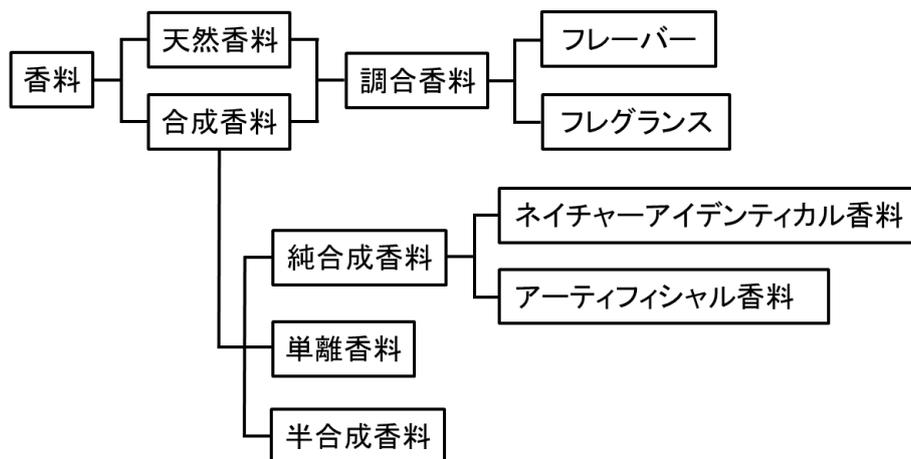


図 1-1 香料の分類

1.1.2 天然香料¹⁾

天然香料は天然に存在する様々な植物や動物を原料として、それらの匂いを蒸留や抽出などの物理的手段によって取り出したものである（図 1-2）。その種類は 1500 種以上にも及ぶと言われているが、多く使用されているものは約 200 種ほどである。

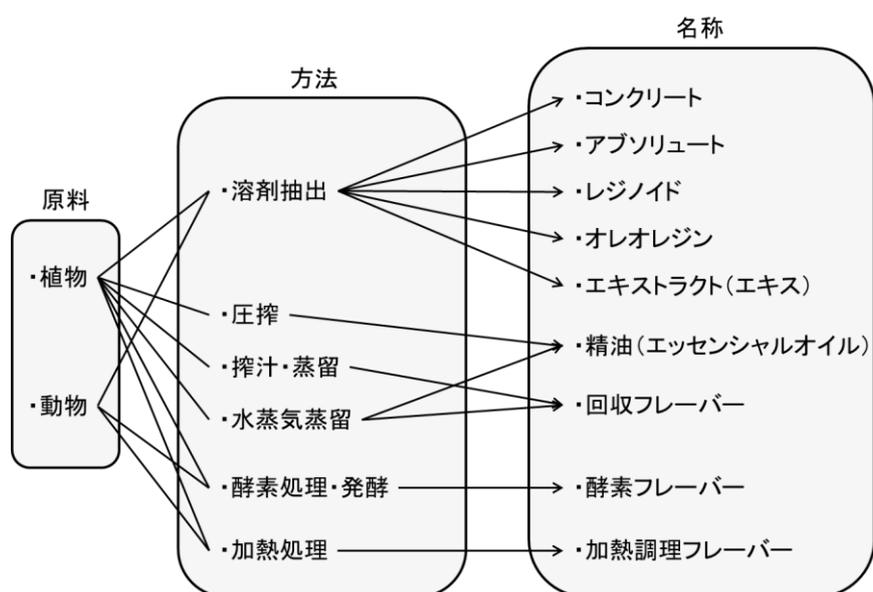


図 1-2 天然香料の分類

植物由来の天然香料は植物性香料と呼ばれる。植物の、花、蕾、葉、樹皮、根茎、苔、果実、種子、果皮など様々な部位から蒸留や抽出によって調製されるため、同一の植物からでも様々な匂いや形状の異なるものが得られる。一方で、動物由来の天然香料は動物性香料と呼ばれる。フレグランス用の動物性香料は、特定の動物の分泌物や内臓に生じる結石から抽出することで得られ、代表的なものは以下の4つである。

- ・ムスク（麝香：ジャコウジカの雄の生殖腺囊の分泌物）
- ・シベット（霊猫香：ジャコウネコの雌雄の生殖腺囊の分泌物）
- ・カストリウム（海狸香：ビーバーの雌雄の生殖腺囊の分泌物）
- ・アンバーgris（竜涎香：マッコウクジラの腸内結石）

しかし、これらの動物が希少動物となってしまう、ワシントン条約により現在ではほとんど用いられていない。

溶剤抽出法で得られる天然香料は、原料や製法の違いにより様々な名称のものが存在する。花を石油エーテルやヘキサンで抽出し、溶媒を減圧して除去したものをコンクリートと呼ぶ。コンクリートにはワックス分が含まれており、室温で固化しているものが多い。コンクリートをエタノールに加熱溶解した後、溶液を冷却してワックスなどを取り除き、エタノールを留去したものをアブソリュートという。樹脂やガムなどを石油エーテルやヘキサン、エタノールなどで抽出し、不溶物を除いて、溶剤を減圧して除去したものはレジノイド、食品原料から同様の方法で調製したものはオレオレジンと呼ばれる。オレオレジンには味成分も含まれているため、胡椒などの香辛料で用いられることが多い。エキストラクトは、原料を水あるいは含水エタノールで抽出し不溶物を濾過で取り除いたもので、バニラやコーヒーなどで用いられる。

その他、植物の花や葉、果実を水蒸気蒸留、あるいは果皮を圧搾して得られる油層部を精油、植物の花や葉、果実を水蒸気蒸留して得られる水層部や果汁を濃縮した際に得られる水層部を回収フレーバーという。また、天然原料を酵素処理・発酵させて香味を

強化させたものは酵素フレーバー、メイラード反応を応用した加熱反応により香味を発現・強化させたものは加熱調理フレーバーと呼ばれる。

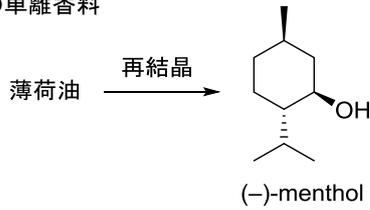
天然香料の収量は非常に少なく、例えばジャスミンの場合、花からコンクリートは約0.3%、アブソリュートは約0.15%しか得られない。収量が少ないために高価であり、さらに原料が天然物であるため、価格や供給量、品質が変動するリスクも高い。これらの理由により、実際の調合香料への使用量はあまり多くない。

1.1.3 合成香料¹⁾

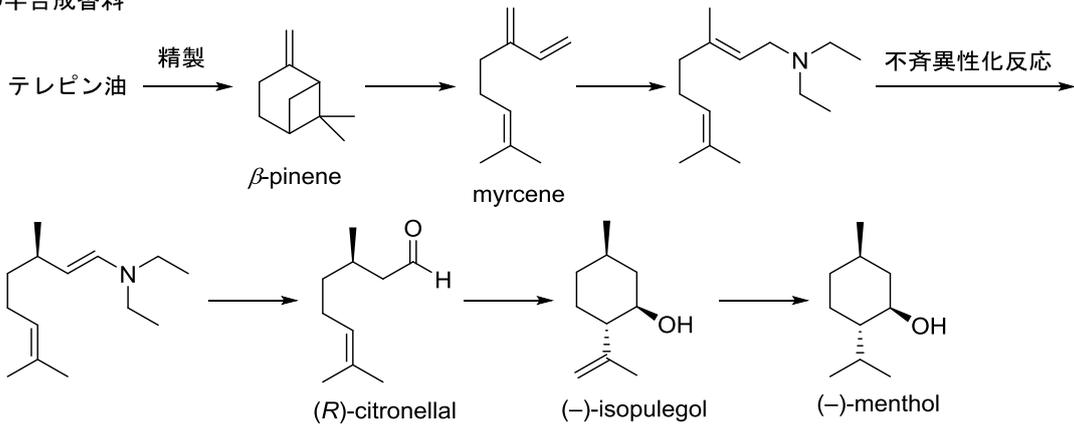
合成香料とは単一の純度の高い有機化合物で、単品香料とも呼ばれる。安定して大量に得られる天然原料や石油製品から有機合成化学を駆使して調製されるため、天然香料と異なり供給量、品質、価格を安定させることが可能である。合成香料の中には、石油由来の原料を使用して有機合成化学を駆使して調製される「(純)合成香料」の他に、天然原料の中から蒸留や抽出により単離される「単離香料」、単離香料を原料に有機合成化学の手法により化学変換して調製される「半合成香料」なども含まれる(図1-1)。

メントールを例に挙げると、薄荷の水蒸気蒸留で得られる薄荷油から再結晶により精製されたメントールは「単離香料」、マツ科の樹木の精油であるテレピン油(松精油)を精製して得られる単離香料の β -pineneから、図1-3に示した化学変換を行って合成されたメントールは「半合成香料」、図に示したように石油由来のisobuteneとformaldehydeを出発物質として合成されたメントールは「純合成香料」となる。

○単離香料



○半合成香料



○純合成香料

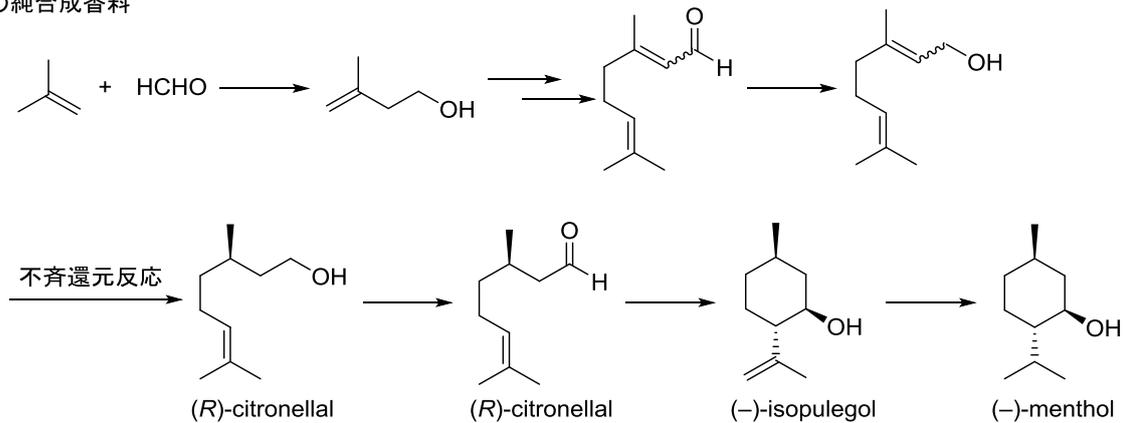


図 1-3 メントールの製法による合成香料の分類

また、天然から見出されているものは「ネイチャーアイデンティカル (nature identical) 香料」、天然から未だ見出されていないものは「アーティフィシャル (artificial) 香料」と分類される。キャラメル、メープルシュガー、など様々な食品中から見出されている maltol (3-hydroxy-2-methyl-4-pyranone) はネイチャーアイデンティカル香料であるが、maltol の methyl 基が ethyl 基に変換された ethyl maltol (2-ethyl-3-hydroxy-4-pyranone) は

アーティフィシャル香料である（図 1-4）。両者とも綿あめ様の甘い類似の香気を有しているが、香りの強度は ethyl maltol の方が 4~6 倍強い³⁾。

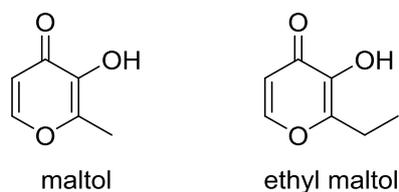


図 1-4 maltol と ethyl maltol

食品香料として使用できる合成香料は食品衛生法で規制されており、ネイチャーアイデンティカル香料が大半を占め、アーティフィシャル香料は少ない。安全性に関しては、ネイチャーアイデンティカル香料だから安全であり、アーティフィシャル香料だから安全でない、ということはないが、昨今の消費者および食品会社は天然志向が強く、ネイチャーアイデンティカル香料が好まれて使用される。

1.1.4 香料産業

「香りは文化のバロメーター」という言葉があるように、香料産業の発達度合がその国の文化レベルを指し示していると言われている。過去 5 年間の国内生産量および金額の香料統計を図 1-5 および 1-6 に示す。

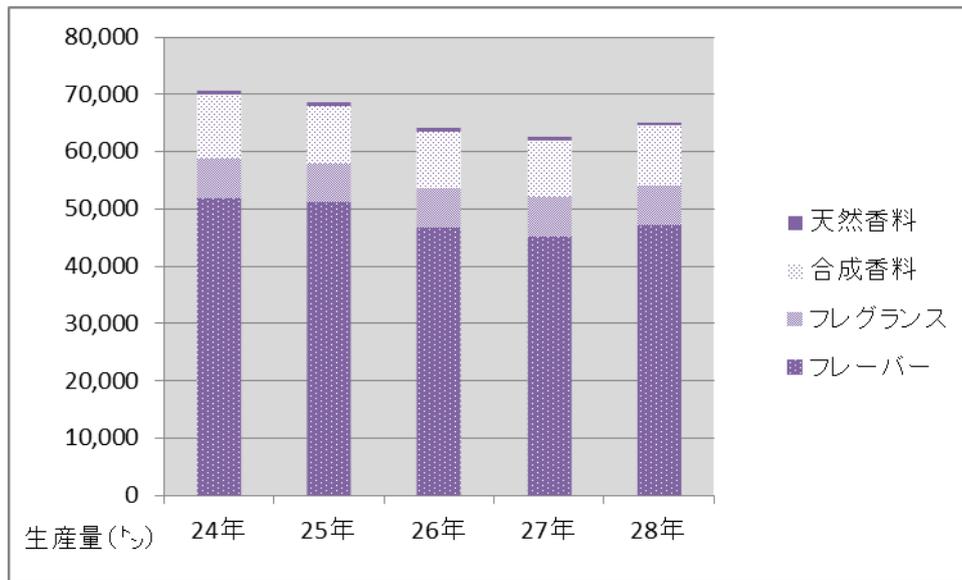


図 1-5 香料の国内生産量⁴⁾

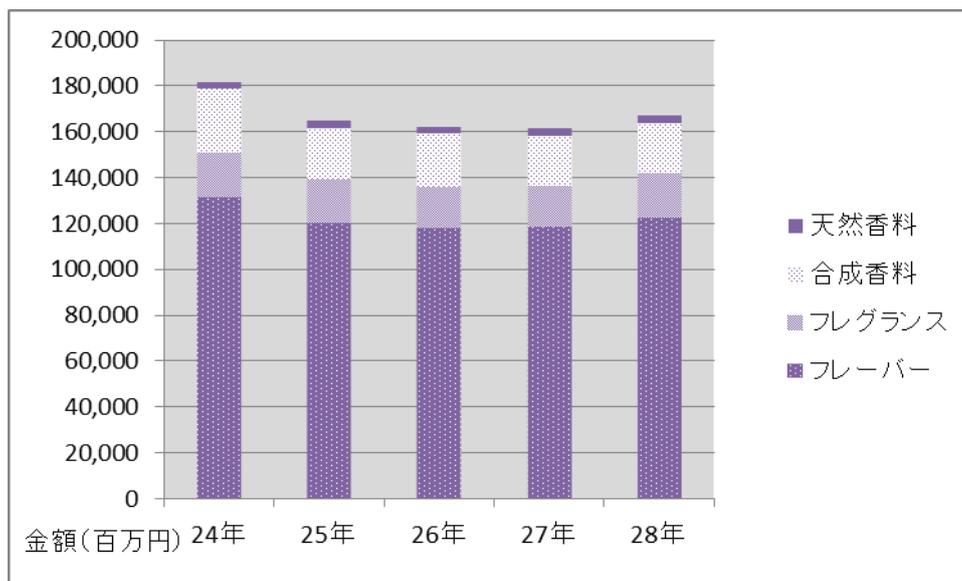


図 1-6 香料の国内生産金額⁴⁾

欧米ではフレーバーとフレグランスの比率はおよそ 50 : 50 であるが、これは欧米では香水文化が基本となっていることに起因する。日本国内ではフレーバーが全体の約 70% を占めており、食文化が大きく発展していることを示している。過去 5 年間でフレ

ーバー、フレグランス共に生産量・金額に大きな変動はなく、日本の香料市場が成熟してきたことが伺える。一方で、加工食品の多様化やライフスタイルの変化、高齢化、健康志向、省資源化などにより、市場の多様化や消費者の嗜好の多様化・細分化が進んでいる。そのため、今後も香料会社としては、市場の多様性や消費者の嗜好性に合わせた、より高品質で付加価値のあるフレーバー、フレグランスの開発を行っていく必要がある。

1.1.5 食品におけるフレーバーの役割¹⁾

香りは「おいしさ」を構成する重要な要因の一つである。このことは鼻をつまんで、飲食品を食してみると良く分かる。例えば、鼻をつまんだ状態でグレープ味の炭酸飲料を飲むと、甘味と炭酸の刺激が感じられ甘い炭酸飲料であることは分かるが、それが何味であるかは分からなくなる。すなわち、香りはその食品が何であるかを識別するのに重要な要素であると言える。もちろん、高品質の香りは高品質のおいしい食品の創造・開発に繋がることは言うまでもなく、フレーバーの役割は食品の嗜好性と価値を高めることにもある。

嗜好性が高く価値のある食品を作るために、フレーバーは以下のような用途で使用されている。

- ・香りのない、あるいは香りの少ない素材に香りを付与する。

例) 無果汁飲料、キャンディー、チューインガム等に果物などの風味を与える。

- ・加工や殺菌の過程で損失・減少した素材本来の香りを補強する。

例) 果汁飲料に、加熱殺菌で減少するフレッシュな香りを補強する。

- ・食品素材が本来持つ風味や加工時に生じる風味を更に強化する。

例) ミルク香料でラクトアイスに濃厚な乳脂肪感を更に強化する。

・素材の好ましくない匂いや、加工工程で発生する加熱臭や発酵臭などのオフフレーバーをマスキングする（抑制する）。

例) コラーゲンを配合した飲料のコラーゲン由来の生臭みを、比較的相性の良いピーチやマスカットのフレーバーでマスキングする。

近年の様々な加工食品の開発ならび消費者の嗜好の多様化に伴い、多くの場面でフレーバーが利用される機会が増加してきている。また、高品質・高嗜好性の商品開発においては、上記の役割をいくつか兼ね備えたフレーバーが求められることが多く、フレーバー開発においては調合技術の向上だけでなく、香料素材開発や香気分析技術の高度化なども重要となってきている。

1.2 食品の香気分析^{1,5)}

1.2.1 香気分析

消費者の嗜好性や安心・安全・健康への関心の高まりから、近年特に飲食品業界からは実際の食品の香気を再現したような天然感のあるフレーバーが強く要求されるようになった。食品の香気の完全な再現は、香料産業において究極の目標の一つである。食品の香気を再現したような天然感のあるフレーバーの開発を行うに当たっては、一般的には食品の香気を分析し、対象の食品の香気成分組成を正確に把握し、そのデータをもとに模倣・再現することが近道である。しかしながら、食品の全ての香気成分を分析することは、以下の要因により容易ではない。まず第一に、食品中の香気成分は ppm～ppb といった極めて微量でしか存在しない。タンパク質や脂質等は数%のレベルで存在しており、分析を行うためには、大量の不揮発性成分の中から極微量の香気を分離しなくてはならない。第二に、香気は多種多様な揮発性成分の集合体であり、非常に多くの成分から成り立っている。例えば、リンゴには約 400 種、蜂蜜には約 650 種、牛肉には約 800 種の揮発性成分が存在することが知られている⁶⁾。これら全ての成分を解明することは非常に困難な作業である。第三に、香気を構成する数百の揮発性成分すべてに芳香があるわけではない。さらに、各香気成分はそれぞれ固有の匂いの質や閾値を有しているため、量的に主要な揮発性成分が官能的にはあまり重要ではなく、逆に微量揮発性成分が重要である場合が多々ある。第四に、香気成分間の相互作用により、ある香気成分が他の成分の香気を増強、あるいは抑制する場合がある。様々な香気成分の複合体である香気は、非常に複雑な相互作用が起こっていると考えられるため、嗅覚官能的に香気成分を評価する手法が必要になる。近年、分析技術および分析機器が急速に進歩し、前述したような複雑な香気成分を解明するための様々な香気分析手法が開発されている。

1.2.2 前処理

香気は揮発性成分の集合体であり、食品中には微量しか存在せず、効率良く揮発性成分を分析するには、大量の不揮発性成分の中から、極微量の揮発性成分を取り出し、濃縮しなくてはならない。分離・濃縮された揮発性成分のことを本論文では香気濃縮物と呼ぶが、通常これは、揮発性の差異を利用した蒸留法や溶解度の差異を利用した抽出法を組み合わせで調製される。蒸留法には、凍結乾燥法 (lyophilization, 図 1-7) や水蒸気蒸留法、simultaneous distillation extraction (SDE)^{7,8)}、solvent assisted flavor evaporation (SAFE) といった様々な方法があり、分析試料の特性や目的のにおい特性 (高揮発性、中揮発性、低揮発性) を考慮して選択する必要がある。SAFE は、Wolfgang Engel、Wolfgang Bar、Peter Schieberle により報告された蒸留手法で、つなぎ目を極力少なくした専用の器具 (図 1-7) と高真空排気装置を用いて、高真空下で液状の試料を蒸留することを特徴としている⁹⁾。熱劣化が少ない状態で低揮発性から中・高揮発性成分をバランス良く捕集することができるため、香気濃縮物の調製法としてよく使用される手法である。蒸留法で得られる留分はしばしば水溶液として得られるため、diethyl ether (Et₂O)、dichloromethane (CH₂Cl₂) や pentane などの低沸点溶媒で抽出し、最終的にそれらの溶媒を蒸留除去することで濃縮する。

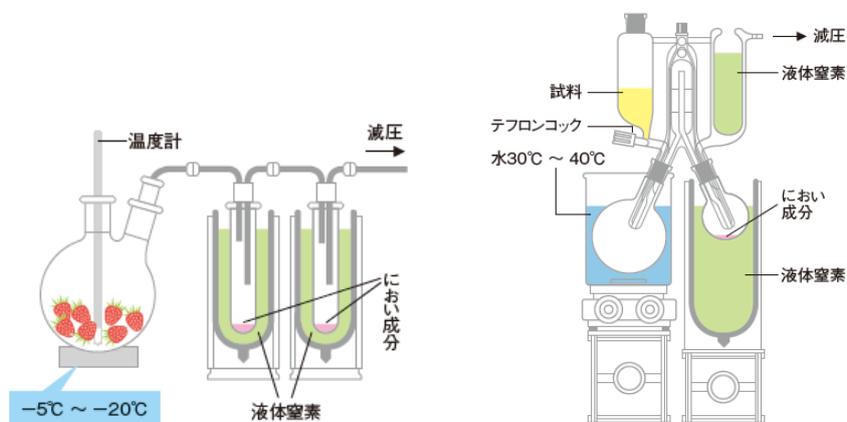


図 1-7 凍結乾燥法 (左) と SAFE 装置 (右)¹⁾

一方でこれらの方法では、抽出溶媒の同等かより低い沸点の成分の捕集はできない。そのような低沸点成分の分析・捕集には、吸着剤に揮発性成分を吸着させる方法（固相抽出）がしばしば用いられる。分析試料を閉じ込めると、閉じられた空間（ヘッドスペース）には低沸点成分（高揮発性成分）が優先して充満する。このヘッドスペース部の低沸点成分を吸着剤に吸着させて濃縮する。吸着剤としては、ポリジメチルシロキサン（polydimethylsiloxane）、ポリエチレングリコール（polyethylene glycol）、poly(2,6-diphenylphenylene oxide)などのポリマーやシリカゲル、活性炭などが用いられる。SPME キット（Aldrich）や Twister[®]（GERSTEL）、MonoTrap[®]（ジーエルサイエンス）など、その後の分析に適した形で市販されているものもある。

1.2.3 ガスクロマトグラフィー（gas chromatography）による分析

前処理によって得られた香気濃縮物は、ガスクロマトグラフ（gas chromatograph）に導入され分析・解析が行われる。前述のとおり、食品の揮発性成分は非常に多くの成分から成り立っているが、適切な条件で GC 分析を行うことによって、これらの解析が可能となる。GC 分析では、高温加熱された注入口に試料を注入することによって試料を気化し、キャリアガス（ヘリウム、窒素、水素など）によって加熱されたカラム中を気化した試料が移動し、カラム内部にコーティングされた液相と吸収・放出等の相互作用を繰り返し起こすことによって分離され、最終的に水素炎イオン化検出器（flame ionization detector ; FID）や質量分析計（mass spectrometer ; MS）等の検出器に到達し検出される。時間を横軸に、検出器から得られた電気信号を縦軸にとることで、クロマトグラムが得られる。成分割合の算出には FID が、成分同定には MS が用いられるが、香気分析においては主にこれら 2 つの検出器を用いて行われる。なお、特に GC と MS を組み合わせた分析は gas chromatography-mass spectrometry（GC-MS）と呼ばれる。

- ・水素炎イオン化検出器 (FID)

FID は成分を水素炎で燃焼させて生じるイオン電流を検出する検出器で、有機化合物全般の検出が可能な検出器である。得られるクロマトグラムのピーク面積値は、試料中の各成分の量と比較的良好な相関を示すため、成分割合を算出することができる。しかしながら、ピーク面積以外の情報は得られないため、ピーク検出された成分が何であるかを決定することはできない。

- ・質量分析計 (MS)

MS は、真空下で高電圧をかけることで分子をイオン化し、生成するイオンやそれが分解してできたイオンなどを質量電荷比 (m/z) に応じて分離し検出することで、 m/z を横軸、イオン強度を縦軸にしたスペクトルを得ることができる。マススペクトル情報から分子構造や分子量の推定などを行うことができ、GC 保持指標 (retention index ; RI) およびマススペクトルのデータベースを活用したライブラリーサーチにより定性分析が行われる。

1.2.4 GC-匂い嗅ぎ (gas chromatography-olfactometry ; GC-O) による分析

前処理および GC 分析により、食品の揮発性成分が「どんな成分がどんな割合で構成されているか」を知ることができるが、食品の香気の解明にはこれだけでは不十分である。前述のとおり、実際に食品の香気に寄与している香り成分 (重要香り成分) は揮発性成分の中のほんの一部であり、嗅覚官能的に香り成分を探索する必要がある。嗅覚官能的に香り成分を探索する最も有効な手段としては、GC の検出器として人間の鼻を使用する GC-匂い嗅ぎ (gas chromatography-olfactometry ; GC-O) がある。MS と分岐して使用することによって、MS で検出された成分がどのような匂いがするのかを実際に評価することができる。すなわち、GC-O を用いることによって、食品の揮発性成分中の香り成分を調べることが可能になる。MS では検出できないような微量な成分が GC-O

では検知できる、ということが食品の香気分析ではしばしばあり、現在の香気分析において GC-O はなくてはならないものであると言っても過言ではない。

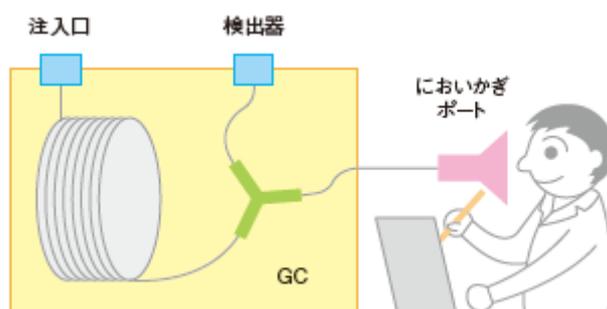


図 1-8 GC-O の概略¹⁾

1.2.5 立体異性体の分析

天然の香気成分には立体異性体を持つものが多く、さらに、1つの立体異性体が優先して存在していることが多い。立体異性体間で匂いの質や閾値は異なることが多いため、立体異性体の比率がその食品の香気特性に大きく影響する場合がある。従って、食品中の香気成分の立体異性体を分析することは食品の香気の再現において重要なことである。例えば、ジャスミンの香気成分として見出された methyl jasmonate¹⁰⁾は2つの不斉炭素を有しているため4つの立体異性体が存在するが、(1*R*,2*S*)-体のみが強いジャスミン様の香気(閾値 3 ng/mL)を有しているのに対し、(1*S*,2*S*)-体および(1*S*,2*R*)-体は無臭、(1*R*,2*R*)-体は弱い香気(閾値>70 ng/mL)であり、立体異性体間で香気や閾値が大きく異なることが知られている¹¹⁾。また、包種茶や烏龍茶などの半発酵茶が有する floral な香気には methyl jasmonate が寄与していることが報告されているが¹²⁻¹⁴⁾、半発酵茶である黄金桂(Huang Jin Gui)や鉄観音(Tie Guan Yin)中の methyl jasmonate の立体異性体の存在量を調べたところ、(1*R*,2*S*)-体が閾値よりも多く存在していることが判明し、floral の香気には(1*R*,2*S*)-体が大きく寄与していることが示された(図 1-9)¹⁵⁾。

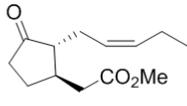
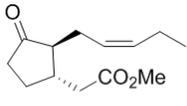
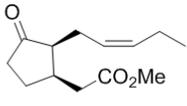
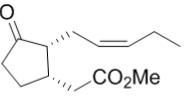
| | | | | |
|-------------------|---|---|--|---|
| |  |  |  |  |
| | (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>) | (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>) | (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>) | (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>) |
| odor (threshold) | weak (>70 ng/mL) | odorless | strong, jasmin-like (3 ng/mL) | odorless |
| oolong tea | | | | |
| Huang Jin Gui | 0.89 μg/g | | 0.15 μg/g | |
| Tie Guan Yin | 0.38 μg/g | | 0.04 μg/g | |

図 1-9 光学活性 methyl jasmonate の香気とウーロン茶中での存在量¹²⁾

GC での立体異性体の分離には、cyclodextrin 誘導体を固定相としたキラルカラムが主に用いられる。Cyclodextrin は D-glucose が α -1,4 結合によって結合した環状オリゴ糖であり、6 分子が結合したものを α -cyclodextrin、7 分子が結合したものを β -cyclodextrin、8 分子が結合したものを γ -cyclodextrin と呼ぶ (図 1-10)。Cyclodextrin の内部は空孔となっており、その空孔に分子を包接することができる。Cyclodextrin 自体が D-glucose のみから成る光学活性体であるため立体異性体によって包接しやすさが異なること、 α -cyclodextrin、 β -cyclodextrin、 γ -cyclodextrin で空孔の大きさが異なること、被包接化合物の極性や cyclodextrin との相互作用など、様々な要因が複合して立体異性体の分離に関わっていると考えられている。

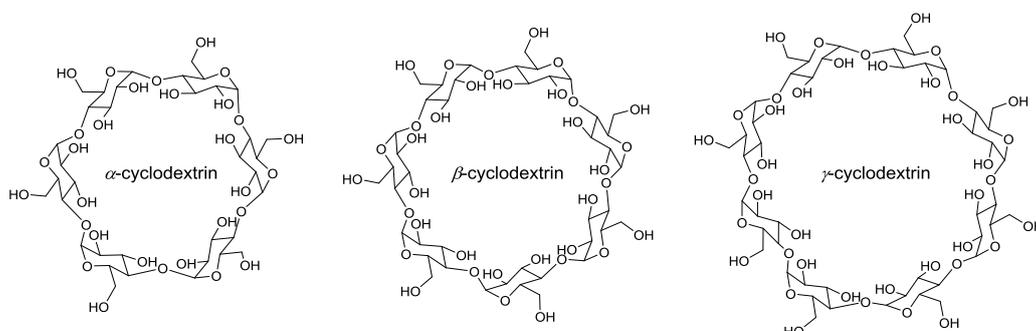


図 1-10 cyclodextrin の構造

さらに、glucose の水酸基を誘導体化することによって、cyclodextrin の構造や物理化学的性質が変わり、多様な立体異性体の分離が可能となる。2-位、3-位および6位の水酸基が alkyl 基 (methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl など) や acyl 基 (acetyl, propionyl, butyryl, trifluoroacetyl) 、*tert*-butyldimethylsilyl 基などで誘導体化された様々な cyclodextrin カラムが開発されており、市販されているものもある。また、CHIRAMIX[®] (ジーエルサイエンス, 長谷川香料) という複数の cyclodextrin 誘導体を混合したカラムも開発されており、従来の cyclodextrin 誘導体を1種類のみ使用しているカラムと比較して、より広範囲の成分の分離を行うことができる¹⁶⁾。

1.3 重要香気成分

1.3.1 重要香気成分の探索^{17,18)}

先に述べたように、食品の香気を構成する数百の揮発性成分をすべて同定することは不可能に近いうえに、すべての揮発性成分が香気を有しているわけではない。そこで、実際に寄与している重要な香気成分（重要香気成分）を見出す方法が開発され、さらに見出された重要香気成分だけでも元の食品の香気に非常に類似した香気を構築できることが分かってきた。Stuart Patton および Donald V. Josephson は、1957 年に香気成分の食品中の濃度とその香気成分の閾値の比を算出することで、香気成分の食品の香気における重要性を見積もることができると提唱した¹⁹⁾。この値は odor activity value (OAV) と呼ばれ、食品中での濃度がその香気成分の閾値以上である香気成分、すなわち OAV が 1 以上を示す香気成分は、その食品の香気に寄与している重要香気成分と言えることになる。この OAV の概念を発展させ、1984 年 Terry Acree らにより CharmAnalysisTM²⁰⁾ が、また 1987 年 Werner Grosch らにより aroma extract dilution analysis (AEDA)²¹⁻²³⁾ といった重要香気成分のスクリーニング手法が開発された。両者ともに、食品の香気濃縮物を段階的に希釈していき、それぞれの希釈液に対し GC-O を行い、GC-O で検知される成分がなくなるまで希釈を繰り返し、GC-O を行う。AEDA では、各成分の匂いが検知できる最大の希釈倍率を flavor dilution factor (FD factor) と定義し、高 FD factor を示す成分は香気濃縮物の香気において貢献度の高い成分として選定することができる。一方 CharmAnalysisTM では、希釈段階に加え GC-O で匂いが検知される時間も考慮に入れて Charm value が算出され、高い Charm value を示す成分は貢献度の高い成分として選定される。最近では、操作の簡便さから AEDA が主流となっている。選定された成分に関しては、食品中の存在量を測定し OAV を算出することによって、実際の食品の香気への貢献度を示すことができる。しかしながら、実際には食品中の揮発成分や不揮発性成分との複雑な相互作用により、OAV が 1 以上を示しても食品の香気に寄与していない

場合や、逆に OAV が 1 より小さくても食品香気に寄与している場合もある。最終的には、香気再構築実験やモデル香料への添加実験、オMISSIONテストなどの官能評価を行って、その成分の効果を検証する必要がある。

1.3.2 重要香気成分の定量

重要香気成分の実際の食品中での存在量は、前述の OAV の算出のみならず、香気を再現する上でも非常に重要な情報となる。食品中の香気成分の定量は、内部標準法で行われることが多いが、前処理での成分の消失やばらつきの影響が大きく、通常の内部標準添加法ではあまり正確な定量はできない。Werner Grosch と Peter Schieberle らは、1987 年に香気成分のより正確な定量法として stable isotope dilution assay (SIDA) を開発した²⁴⁾。SIDA は、対象となる成分の安定同位体 (²H や ¹³C) 標識化合物を試料に添加し、GC-MS にて対象成分とその同位体の存在比を検定することで、もとの試料中での存在量を算出する手法である。対象の成分と物理的・化学的性質がほぼ変わらない安定同位体標識化合物を内部標準物質として用いることで、前処理工程での成分の消失やばらつきがなくなり、精度の高い定量を行うことができる。ただし、必要とされる安定同位体標識化合物は通常市販されていないため、市販原料から有機合成化学により合成する必要がある。

1.3.3 微量重要香気成分の解明

重要香気成分の中には、天然での存在量が極微量で、かつ、閾値が非常に低い成分がしばしば存在する。そのような微量重要香気成分は、現代の高感度の GC-MS であっても容易にマススペクトルを得ることができず、構造を解明することが困難であることが多い。一方で、閾値が非常に低いため、低濃度でその食品の香気に大きく影響することがあるため、微量重要香気成分の解明は食品の香気分析においても重要な課題の一つで

ある。このような構造不明な微量香気成分を解明するためには、まずは GC-MS において検出・分析可能なレベルにまで濃縮・精製を行い、該不明成分の単独のマスペクトルを得る必要がある。濃縮・精製は、GC を 2 台連結した multidimensional GC-MS (MD-GC-MS) などの機器を用いた方法や、蒸留やシリカゲルカラムクロマトグラフィー、high performance liquid chromatography (HPLC) など物性の違いを利用した分画手法を用いた方法により行われる。マスペクトルだけでは構造を推定できない場合は、高分解能質量分析 (high resolution mass spectrometry ; HRMS) から分子式を推定し、核磁気共鳴分光法 (nuclear magnetic resonance ; NMR) や赤外分光法 (infrared spectroscopy ; IR) などの分光法から構造情報を得て、それら情報から構造を推定することになるが、これらの分光法では一定量以上の高純度の試料が必要となるため、より厳密な濃縮・精製が必要となる。構造を推定した後は、推定構造を化学的に合成し、各種分析データ・物性を比較し、不備なく一致すれば同定となる。アメリカ化学会 (American Chemical Society) が出版している雑誌である Journal of agricultural and food chemistry では、不明成分の同定には「3 つ以上の分析データや物性の一致」が必要条件とされている²⁵⁾。

筆者らは柚子精油の香気分析を行い、特徴的な peely、balsamic な香気を有する微量重要香気成分として (6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-3-one (YUZUNONE[®]) および (6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-4-ol (YUZUOL[®]) を見出している²⁶⁾。柚子 (*Citrus junos*) は中国原産のミカン属の常緑小高木であり、現在では日本および韓国で広く栽培されている。果実は酸味が強く直接食用とされることは無いが、柚子果汁と醤油からの柚子ポン酢、柚子果皮と塩、唐辛子からの柚子胡椒といった調味料として主に食用に用いられる。柚子は他の柑橘とは異なる独特な香りを有することからその香りについて多くの研究が報告されてきたものの、報告された香気成分だけでは柚子の独特な香りは再現できず、未だ香気的全容は明らかになっていない²⁷⁻³²⁾。そこで、筆者らは柚子の独特な香りに寄与する成分の解明を目的に柚子香気の分析を行った。初めに、柚子と他の柑橘との香り

の違いを明らかにすべく、柚子、オレンジ、グレープフルーツ、ライムの香りの官能評価を行ったところ、balsamic が他の柑橘と異なった柚子香気に特徴的な要素であることが分かった（図 1-11）。続いて、柚子精油の極性部の AEDA を行ったところ、最も高い FD 128 を示した 12 成分のうち、balsamic の香調を示す成分として unknown A および unknown B が検出されたが、微量のため GC-MS では単一のマススペクトルが得られず、構造不明であった（表 1-1）。それぞれの成分に対し、MD-GC-MS を行ったところ、それぞれのマススペクトルを得ることに成功した。マススペクトルから構造を推定し、推定構造を合成して、GC-MS での RI、マススペクトルおよび香気が一致したことより、unknown A を(6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-3-one、unknown B を(6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-4-ol であると同定した（図 1-12）。合成した(6E/Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-3-one および(6E/Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-4-ol の水中での閾値は、それぞれ 10 ng/kg および 42 ng/kg という非常に低い閾値であった。さらに、柚子香気再構築液へそれぞれを添加し官能評価を行ったところ、(6E/Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-3-one に関しては sweet、floral、balsamic の項目が有意に増強し、(6E/Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-4-ol に関しては sweet、metallic、sour、balsamic の項目が増強した。両者は柚子の特徴的な要素である balsamic を増強するだけでなく、その他の複数の要素を増強させることから、天然の柚子らしさを表現するのに重要な微量香気成分であることが明らかとなった（図 1-13）。

このように、微量重要香気成分の解明は困難である一方で、食品の香気における効果は、単純に微量重要香気成分が有している香気を与えるのではなく、食品の複数の香気特徴に影響を及ぼし、天然の食品の香気に近づかせるといった、通常的重要香気成分とは異なる特別な効果を示すことがある。このような微量重要香気成分を解明することで、食品の香気の完全な再現という目標に近づき、天然感のある高品質のフレーバーの創成に繋がることが期待される。

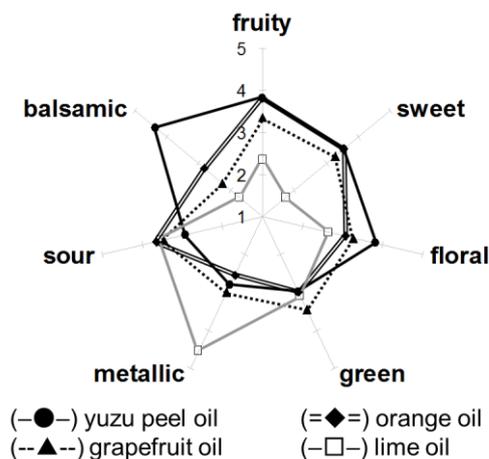


図 1-11 柑橘精油の香気特性

表 1-1 柚子精油の極性部の AEDA の結果

| odorant | odor quality ^a | FD factor | GC peak area, % ^b | identification mode |
|---|------------------------------|-----------|------------------------------|---------------------|
| (<i>Z</i>)-hex-3-enal | green, citrus, apple-like | 32 | 0.090 | MS, RI, GC-O |
| octanal | citrus | 8 | 0.326 | MS, RI, GC-O |
| oct-1-en-3-one | mushroom-like, spicy, earthy | 32 | 0.001 | MS, RI, GC-O |
| 6-methyloctanal | citrus, herbal | 8 | 0.012 | MS, RI, GC-O |
| 4-methyl-4-mercaptopentan-2-one | sulfury, tropical fruit-like | 128 | trace | MS, RI, GC-O |
| (3 <i>E</i> ,5 <i>Z</i>)-undeca-1,3,5-triene | peely, citrus, fruity | 32 | 0.001 | MS, RI, GC-O |
| nonanal | citrus, peely | 32 | 0.275 | MS, RI, GC-O |
| (<i>Z</i>)-non-4-enal | floral, citrus, peely | 32 | 0.002 | MS, RI, GC-O |
| (<i>E</i>)-non-6-enal | peely, citrus, albedo-like | 128 | trace | MS, RI, GC-O |
| (3 <i>E</i> ,5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i>)-undeca-1,3,5,8-tetraene | peely, citrus | 32 | trace | MS, RI, GC-O |
| 8-methylnonanal | peely, citrus | 32 | 0.053 | MS, RI, GC-O |
| decanal | citrus | 8 | 1.117 | MS, RI, GC-O |
| unknown | peely, sweet, floral | 32 | nd | GC-O |
| (<i>E</i>)-non-2-enal | floral, green, albedo-like | 128 | 0.009 | MS, RI, GC-O |
| (<i>E</i>)-dec-4-enal | peely, citrus, oily | 128 | 0.063 | MS, RI, GC-O |
| linalool | citrus, peely, green | 128 | 74.939 | MS, RI, GC-O |
| (<i>Z</i>)-oct-5-en-1-ol ^c | fatty, citrus | 128 | nd | RI, GC-O |
| (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-nona-2,4-dienal ^c | fatty, citrus | 8 | nd | RI, GC-O |
| (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-deca-2,4-dienal | fatty, oily | 128 | 0.110 | MS, RI, GC-O |
| unknown A | peely, balsamic, floral | 128 | 0.010 | GC-O |
| (<i>Z</i>)-dodec-9-eno-12-lactone | fatty, spicy, albedo-like | 32 | 0.014 | MS, RI, GC-O |
| (2 <i>E</i>)- <i>cis</i> -4,5-epoxydec-2-enal | peely, citrus, albedo-like | 128 | trace | MS, RI, GC-O |
| unknown B | peely, balsamic, albedo-like | 128 | 0.003 | GC-O |
| (2 <i>E</i>)- <i>trans</i> -4,5-epoxydec-2-enal | citrus, peely | 128 | trace | MS, RI, GC-O |
| unknown | peely, citrus | 8 | trace | GC-O |
| thymol | medicinal, spicy | 128 | 1.434 | MS, RI, GC-O |

^a Odor quality perceived at the sniffing port. ^b nd, not detected; trace, trace amount (<0.001%).

^c Tentatively identified odorant

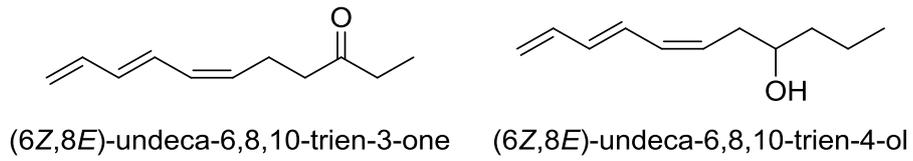


図 1-12 (6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-3-one および(6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-4-ol

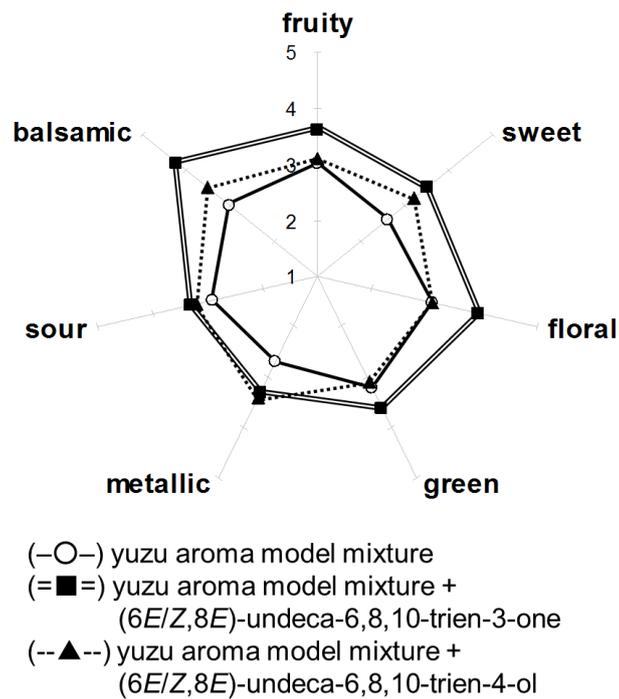


図 1-13 柚子香気再構築液に対する(6E/Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-3-one および
(6E/Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-4-ol の添加効果

1.4 本研究の目的と意義

日本政策金融公庫農林水産事業が平成28年1月に実施した消費者動向調査によると、消費者の食の志向は「健康志向」が最も高く、さらに今後の食の志向は「健康志向」および「安全志向」が高まる可能性があることが報告されている³³⁾。世界的に見ても「健康」と「安全」は加工食品市場のトレンドであり、飲食品メーカーではこれらを意識した商品開発が盛んに行われている。消費者の健康志向の高まりにより、昨今では日本食が世界的ブームとなっている。日本食は古くから健康食（ヘルシーフード）として世界で広く認知されており、2013年に「和食」がユネスコの世界無形文化遺産に登録されたことにより、更に認知度が高まった。日本貿易振興機構（JETRO）による日本食品に対する海外消費者意識アンケート調査によると、中国、香港、台湾、韓国、アメリカ、フランス、イタリアにおいて好きな外国料理のトップに「和食（日本料理）」が選ばれている³⁴⁾。このような日本食の世界的認知度の高まりに伴って、味噌や醤油、抹茶、柚子、ワサビといった日本の食材も世界的に認知されてきている。それに付随して、和の食材のフレーバーを有する加工食品も増加している。市場調査会社 Mintel の Mintel GNPD（世界新商品情報データベース）を用いて、2008年～2016年における日本を除く世界（中東、アフリカ、北米、中南米、欧州）で「miso」「matcha」「yuzu」「wasabi」のフレーバーを有する飲食品の新商品の数を検索した結果を図1-14に示した。「miso」や「yuzu」は数量が少ないものの、いずれのフレーバーもここ数年で新製品が増加していることが分かる。

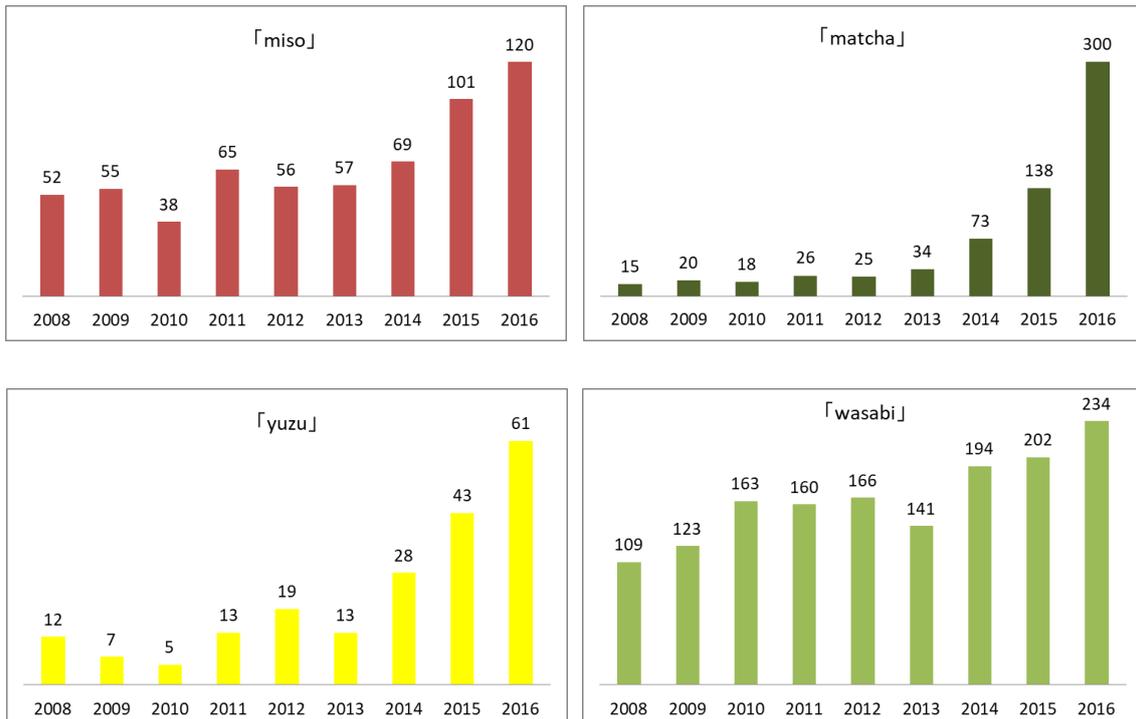


図 1-14 日本を除く世界で「miso」「matcha」「yuzu」「wasabi」のフレーバーを有する新商品の数の推移（Mintel GNPD 調べ）

一方で、消費者の「健康志向」と「安全志向」が合わさって、食品に「天然」（GMOフリーやオーガニックなど）を求める消費者が多くなった。そのため、加工食品も「天然」を訴求した製品が近年増加している。Mintel GNPD を用いて、2007 年～2016 年における世界で「ナチュラル」（GMOフリー、オーガニック、オールナチュラル、全粒、無添加物・保存料）を訴求した飲食品の新商品の数を検索した結果を図 1-15 に示した。世界中で「ナチュラル」を訴求した新商品の数が年々増加しているのが分かる。

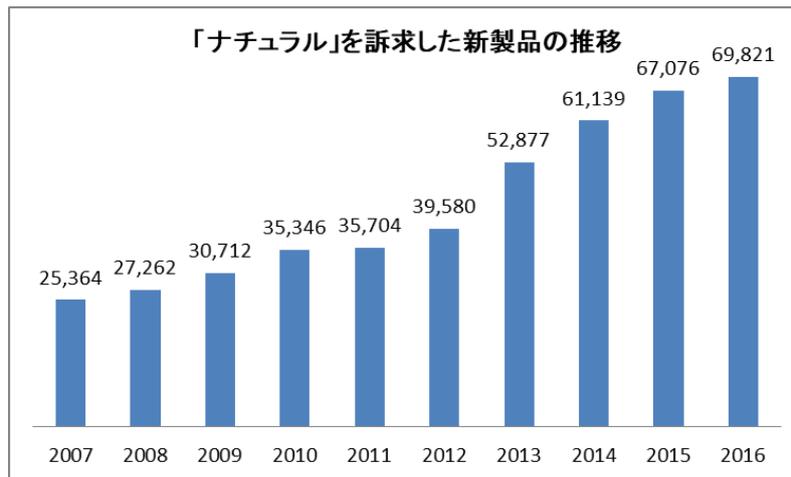


図 1-15 世界で「ナチュラル」を訴求した飲食品の新商品の数の推移
(Mintel GNPD 調べ)

「天然」を訴求した加工食品には、「天然感」のあるフレーバーが合うのは言うまでもなく、近年は特に実際の食品の香気を再現したような「天然感」のある高品質なフレーバーが求められるようになった。世界の定番である果物やミルク、コーヒーのフレーバーはもとより、昨今の日本食ブームに由来する日本特有の食材のフレーバーに関しても、「天然感」を表現したフレーバーの需要は多くなってきている。天然香料を使用することで天然感のあるフレーバーを創成することは可能であるが、前述したように天然香料には価格・供給・品質変動リスクが危惧されるため、産業的には可能な限り合成香料のみを使用してフレーバーを調製することが望まれる。合成香料のみでフレーバーを調製するにあたっては、実際の食品の香気分析を行い、その食品の香気に寄与する重要香気成分を解明することが必須である。特に微量重要香気成分の解明は香料業界において大きな課題の一つである。微量重要香気成分は極微量であるがために構造解明に必要な分析データを得ることが難しく、同定するのが非常に困難である一方で、微量重要香気成分の解明は食品の香気の完全な再現への道を開き、天然感のある高品質のフレーバーの創成には欠かせないものとなっている。

以上の背景から、本論文では日本食材として特に人気のある柚子とワサビ、また、定番の果物であるグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの香気分析を行った際に見出した微量重要香気成分の解明とその有用性に関してまとめた。

本論文は六章より成り立っている。第一章では、緒言として本研究の背景および柚子中の微量重要香気成分の解明と柚子香気への有用性評価に関して述べた。第二章では、ワサビの新規微量重要香気成分の解明とワサビ香気への有用性評価に関して述べる。第三章では、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの新規微量重要香気成分の解明と果物香味への有用性評価に関して述べる。第四章では、ホワイトグレープフルーツおよびピンクグレープフルーツの果皮および果汁中の *rotundone* の定量とグレープフルーツ香気への有用性評価に関して述べる。第五章では、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴー中に存在する新規香気成分としての *rotundone* の立体異性体の解明とその有用性評価に関して述べる。第六章では、第二章から第五章までの結果を総括する。

第二章

ワサビの新規微量重要香気成分の解明とワサビ香気への有用性評価^{35,36)}

2.1 序

ワサビ（山葵）は日本原産のアブラナ科ワサビ属の香辛料で、学名としては *Wasabia japonica* が良く知られているが、系統学的に *Wasabia* 属は *Eutrema* 属から独立した属としてみなされていないため、正式には *Eutrema japonicum* (Miq.) Kiudz.が学名となる³⁷⁾。主に根茎部をすりおろし、刺身や寿司、蕎麦の薬味として使用される。およそ 1100 年前の日本においてワサビは薬草として用いられていたが、刺身や寿司、蕎麦などが国内で広まるにつれて、薬味として使用されるようになった。更に、今日ではこれらの日本食が海外に普及するに伴い、ワサビも世界的に知られるようになった。また、イギリスやアメリカ、カナダ、中国などでもワサビが栽培されるようになり、第一章に述べたように新商品の数も増え続け、世界の食品や菓子などのフレーバーに「wasabi」が多く見受けられるようになった。さらに、フランス料理のソースやマッシュポテトの味付けなどといった各国の伝統料理にも使用されるようになっており、ワサビは世界的な香辛料といっても過言ではない。

スーパーなどで販売されているチューブ入りワサビや、スーパーの寿司や刺身に付いてくるような小袋のワサビなどの業務用のワサビは、主原料としては安価な西洋ワサビ（horseradish, *Armoracia rusticana*）が使用されている。西洋ワサビに、ワサビフレーバーや緑色系の着色料を添加することによって、ワサビの風味や外観を再現している。商品によっては、本物のワサビを添加しているものもあり、日本加工わさび協会では原料ワサビのうち本物のワサビの量が 50%以上のものには「本わさび使用」、50%未満のものには「本わさび入り」と表示できると定めている³⁸⁾。西洋ワサビはワサビに類似した

辛味は有しているものの、ワサビとは風味が大きく異なる。この風味の差を補正するためには、高品質なワサビフレーバーの開発が必須となる。

すりおろしたワサビは特有の鼻にツンとくる辛味を有しているが、これは種々の isothiocyanate 類 (R-NCS) によるものである。ワサビをすりおろすと、外層に存在する glucosinolate と維管束形成層に存在する myrosinase が反応して、isothiocyanate 類が生成する。ワサビの香気成分は、90%以上が isothiocyanate 類で占められており、特に allyl isothiocyanate の存在量が多い³⁹⁻⁴³⁾。しかしながら、すりたてのワサビは「earthy」「metallic」「green」「creamy」といった香気が混ざり合った複雑な香気を有しており、isothiocyanate 類だけでは表現できない。そのため、様々なグループにより isothiocyanate 以外の重要香気成分の探索が行われている。大川らは GC-O による香気分析を行い、3-methyl-2,4-nonanedione および vanillin を新規重要香気成分として見出している⁴⁴⁾。また、今関らは AEDA により、furfuryl mercaptan、1-octen-3-one、*trans*-4,5-epoxy-2(*E*)-decenal、methional、furanol、2-methoxy-3-isopropylpyrazine、2-methoxy-3-isobutylpyrazine を重要香気成分として同定している。さらに今関らは、FD factor が高くないものの重要な香気成分として(3*S*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide を見出している⁴⁵⁾。

このように isothiocyanate 以外の重要香気成分に関する研究も行われているが、これまで見出された成分だけではおろしたてのワサビの香りを完全に再現できていないのが現状である。そこで、我々はワサビの最高品種の一つである「真妻」を分析試料として、すりおろしたてのワサビの香気に寄与する微量重要香気成分の探索を目的に香気分析を行った。

2.2 試料および実験方法

2.2.1 試料および試薬・化合物

2.2.1.1 ワサビ

ワサビは静岡県農林技術研究所 伊豆農業研究センターより提供された「真妻」を用いた。

2.2.1.2 試薬・化合物

ラセミ体の 3-methyl-4-decanolide は 1-heptanol と methyl crotonate から文献記載の方法で調製した⁴⁶⁾。光学活性な 3-methyl-4-decanolide は、光学活性な γ -decalactone より調製した。(R)- γ -Decalactone (>99.0% e.e.) は、ひまし油から酵母とリパーゼを用いて調製した⁴⁷⁻⁴⁹⁾。(S)- γ -Decalactone (91.8% e.e.) は、(R)- γ -decalactone (>99.0% e.e.) から導いた (R)-N-benzyl-4-hydroxydecanamide に対する光延反応を経由して調製した^{50,51)}。1-Heptanol、methyl crotonate、*p*-toluenesulfonic acid monohydrate、lithium diisopropylamide、hexamethylphosphoric triamide、*m*-chloroperoxybenzoic acid、methyl lithium、sodium borohydride (NaBH₄) は東京化成工業株式会社 (東京, 日本) より、NaIO₄、H₂O₂ は純正化学株式会社 (東京, 日本) より、1,1-bis(*t*-butylperoxy)cyclohexane、phenylselenyl bromide は Aldrich (東京, 日本) より、silica gel 60N (spherical neutral, particle size 63–210 μ m) は関東化学株式会社 (東京, 日本) より、CuI、NiCl₂·6H₂O、Wakogel C-100 は和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) より購入した。その他の試薬および溶媒は分析グレードのものを使用した。

2.2.1.3 ラセミ体の 3-methyl-4-decanolide (±)-**1** の合成 (図 2.1)⁴⁶⁾

1-Heptanol (303.2 g, 2.61 mol) を 145~150 °Cまで昇温し、副生する高揮発成分を留去しながら 1-heptanol (33.7 g, 0.290 mol)、methyl crotonate (29.0 g, 0.290 mol) および

1,1-bis(*t*-butylperoxy)cyclohexane (純度 50%, 7.5 g, 14.5 mmol) の混合溶液を 5 時間で滴下した。更に 150 °C で 3 時間反応させた後、余剰の 1-heptanol を減圧下留去した (~80 °C, 1.6 kPa)。反応溶液を 0 °C まで冷却した後、5% NaOH 水溶液 (270 g, 0.320 mol) を加え、加熱環流下 2 時間反応した。反応溶液を室温まで冷却後、toluene で洗浄し、30% 硫酸水溶液 (65 g) で酸性にした。AcOEt で抽出後、AcOEt 溶液を減圧下濃縮し、濃縮物 (41.4 g) に toluene (200 mL) と *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (1.0 g) を加え、副生する水を留去しながら加熱環流下 4 時間反応した。反応溶液を室温まで冷却後、飽和 Na₂CO₃ 水溶液、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (33.1 g) を減圧下蒸留し (~110 °C, 0.1 kPa)、ラセミ体の 3-methyl-4-decanolide (14.2 g, *trans* : *cis* = 61 : 39, 収率 27%) を得た。得られたラセミ体の 3-methyl-4-decanolide (1.0 g) に対し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 100 g, *n*-hexane/Et₂O=1/2, v/v) を行い、*trans*-3-methyl-4-decanolide (283 mg, *trans* : *cis* = 99 : 1) および *cis*-3-methyl-4-decanolide (34 mg, *trans* : *cis* = 2 : 98) を得た。

2.2.1.4 光学活性 3-methyl-4-decanolide の合成 (図 2-4 参照)

2.2.1.4.1 (3*S*,4*R*)-3-Methyl-4-decanolide の合成

(4*R*)-2-Phenylselenyl-4-decanolide (4*R*)-5

窒素雰囲気下 lithium diisopropylamide (0.5 M THF 溶液, 200 mL, 100 mmol) に (*R*)- γ -decalactone (8.5 g, 50 mmol) の THF 溶液 (20 mL) を -70 °C で 1 時間かけて滴下した。-70 °C で 30 分間攪拌した後、hexamethylphosphoric triamide (20 mL) を加え、次いで phenylselenyl bromide (28.3 g, 120 mmol) の THF 溶液 (20 mL) を -70 °C で 45 分かけて滴下した。反応溶液を室温で終夜攪拌した後、飽和 NH₄Cl 水溶液に注いだ。水層を Et₂O で抽出し、有機層を飽和 Na₂CO₃ 水溶液および飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (22.6 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフ

イー (silica gel 60N: 600 g, *n*-hexane/AcOEt=20/1 ~ 5/1, v/v) で精製し、(4*R*)-2-phenylselenyl-4-decanolide ((4*R*)-5, 8.6 g, 収率 53%) を得た。

¹H NMR: δ 7.68 (2H, d, *J* = 7.6), 7.31–7.38 (3H, m), 4.31 (1H, q, *J* = 6.8), 3.94 (1H, dd, *J* = 3.2 and 7.6), 2.25–2.36 (2H, m), 1.64–1.72 (1H, m), 1.49–1.56 (1H, m), 1.26–1.43 (8H, m), 0.88 (3H, t, *J* = 6.4). ¹³C NMR: δ 175.8, 135.8, 129.4, 129.1, 126.9, 79.5, 37.2, 36.7, 35.2, 31.6, 28.9, 25.1, 22.5, 14.0. GC-MS: 326 (*M*⁺, 41), 158 (49), 157 (47), 116 (46), 83 (42), 77 (37), 69 (76), 55 (100), 43 (47), 41 (47).

(*R*)-2-Decen-4-olide (*R*)-6⁵²⁻⁵⁴

氷水冷下、(4*R*)-5 (4.0 g, 12.3 mmol) の MeOH 溶液 (30 mL) に NaIO₄ (3.9 g, 18 mmol) 水溶液 (10 mL) を 10 °C 以下で 30 分かけて滴下した。滴下後、室温で 3 時間攪拌し、反応溶液を水に注いだ。Et₂O で抽出し、有機層を飽和 Na₂S₂O₃ 水溶液、飽和 Na₂CO₃ 水溶液、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (1.6 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 150 g, *n*-hexane/AcOEt=4/1, v/v) で精製し、(*R*)-2-decen-4-olide ((*R*)-6, 1.6 g, 収率 75%) を得た。

¹H NMR: δ 0.87 (3H, t, *J* = 6.8), 1.28–1.47 (8H, m), 1.61–1.79 (2H, m), 5.03 (1H, dddd, *J* = 1.6, 2.0, 5.6 and 7.2), 6.09 (1H, dd, *J* = 2.0 and 5.6), 7.45 (1H, dd, *J* = 1.6 and 5.6). ¹³C NMR: δ 173.1, 156.3, 121.5, 83.4, 33.1, 31.5, 28.9, 24.9, 22.4, 14.0. GC-MS: 168 (*M*⁺, 2), 139 (30), 126 (12), 113 (16), 108 (19), 97 (29), 84 (89), 69 (19), 55 (77), 43 (100), 41 (46), 39 (19). [α]_D²⁰ –89.3 (*c* 1.03, CHCl₃).

(3*S*,4*R*)-3-Methyl-4-decanolide (3*S*,4*R*)-1

窒素雰囲気下、CuI (5.1 g, 26.7 mmol) の Et₂O 懸濁液 (50 mL) に、methyl lithium (1.1 M Et₂O 溶液, 48.6 mL, 53.5 mmol) を –30 ~ –20 °C で 30 min かけて滴下した。0 °C で 2

時間攪拌し、銅アート錯体を調製した。次いで、(R)-6 (3.0 g, 17.8 mmol) の Et₂O 溶液 (10 mL) を -10 °C で 30 分かけて滴下し、0 °C で 2 時間攪拌した。反応溶液を飽和 NH₄Cl 水溶液に注ぎ、Et₂O 層を飽和 Na₂CO₃ 水溶液および飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (3.7 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 250 g, *n*-hexane/AcOEt=9/1, v/v) し、(3*S*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide ((3*S*,4*R*)-1, 1.4 g, 収率 44%) を得た。純度 (FID) : 99.5%。2.2.5.1 に記載の方法にて、鏡像体過剰率を測定した結果、99.2% e.e. (GC 保持時間:161.64 min) であった。[α]_D²⁰ +71.0 (*c* 1.00, CHCl₃)。¹H NMR、¹³C NMR およびマススペクトルはラセミ体の *trans*-3-methyl-4-decanolide と一致した。

2.2.1.4.2 (3*R*,4*S*)-3-Methyl-4-decanolide の合成

(4*S*)-2-Phenylselenyl-4-decanolide (4*S*)-5, (S)-2,2-bis(phenylselenyl)-4-decanolide (S)-7

窒素雰囲気下 lithium diisopropylamide (0.47 M THF 溶液, 100 mL, 47.0 mmol) に (S)-γ-decalactone (4.0 g, 23.5 mmol) の THF 溶液 (80 mL) を -70 °C で 40 分かけて滴下した。-70 °C で 20 分間攪拌した後、hexamethylphosphoric triamide (10 mL) を加え、次いで phenylselenyl bromide (11.2 g, 47.0 mmol) の THF 溶液 (50 mL) を -70 °C で一気に加えた。反応溶液を室温で 1 時間攪拌した後、1 N HCl 水溶液に注いだ。水層を AcOEt で抽出し、有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (11.5 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 100 g, *n*-hexane/AcOEt=50/1, v/v) で精製し、(4*S*)-2-phenylselenyl-4-decanolide ((4*S*)-5, 2.7 g, 収率 35%) および (S)-2,2-bis(phenylselenyl)-4-decanolide ((S)-7, 4.6 g, 収率 40%)、(S)-2-phenylselenyl-2-decen-4-olide ((S)-8, 29 mg, 収率 0.4%) を得た。

(4*S*)-5: ¹H NMR、¹³C NMR およびマススペクトルは(4*R*)-5 と一致した。

(*S*)-7: $^1\text{H NMR}$: δ 0.85 (3H, t, $J = 6.8$), 1.16–1.40 (10H, m), 2.21 (1H, dd, $J = 9.6$ and 14.4), 2.34 (1H, dd, $J = 6.0$ and 14.4), 4.24 (1H, m), 7.31–7.48 (6H, m), 7.68 (2H, d, $J = 7.2$), 7.74 (2H, d, $J = 7.2$). $^{13}\text{C NMR}$: δ 174.3, 137.5, 136.9, 130.2, 129.6, 129.3, 128.3, 127.1, 77.7, 46.1, 42.7, 34.6, 31.5, 28.8, 24.6, 22.5, 14.0. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +28.1$ (c 1.01, CHCl_3). 本化合物は不揮発性であったため、GC-MS でマススペクトルは得られなかった。

(*S*)-2-Decen-4-olide (*S*)-6^{54,55}

氷水冷下、(*4S*)-5 (2.6 g, 8.0 mmol) の THF 溶液 (30 mL) に AcOH (1 滴) を加え、0 °C で H_2O_2 (純度 35%, 3.5 g, 36.0 mmol) をゆっくりと加えた。0 °C で 1 時間攪拌した後、反応液に 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液と塩を加え (温度が 30 °C まで上昇)、氷水冷下で攪拌した。室温まで昇温した後、AcOEt で抽出し、有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、 MgSO_4 にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (2.7 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 50 g, n -hexane/AcOEt=9/1, v/v) で精製し、(*S*)-2-decen-4-olide ((*S*)-6, 1.3 g, 収率 97%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$ およびマススペクトルは(*R*)-6 と一致した。

(3*R*,4*S*)-3-Methyl-4-decanolide (3*R*,4*S*)-1

窒素雰囲気下、CuI (1.4 g, 7.4 mmol) の Et_2O 懸濁液 (10 mL) に、methyl lithium (1.10 M Et_2O 溶液, 13.0 mL, 14.3 mmol) を $-20 \sim -10$ °C で 10 分かけて滴下し、 -20 °C で 10 分間、 -5 °C で 1 時間攪拌し、銅アート錯体を調製した。次いで、(*S*)-6 (800 mg, 4.8 mmol) を $-30 \sim -20$ °C で 10 分かけて滴下し、 $-20 \sim -10$ °C で 3 時間攪拌した。反応液を飽和 NH_4Cl 水溶液に注ぎ、AcOEt で抽出した。有機層を飽和 NH_4Cl 水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、 MgSO_4 にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (852 mg) をシリカゲル

ルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 10 g, *n*-hexane/AcOEt=30/1, v/v) で2回精製し、(3*R*,4*S*)-3-methyl-4-decanolide ((3*R*,4*S*)-**1**, 379 mg, 収率 43%) を得た。

¹H NMR、¹³C NMR およびマススペクトルはラセミ体の *trans*-3-methyl-4-decanolide と一致した。純度 (FID) : 96.6%。2.2.5.1 に記載の方法にて、鏡像体過剰率を測定した結果、93.1% e.e. (GC 保持時間:163.20 min) であった。[α]_D²⁰ -69.1 (c 0.84, CHCl₃)。

2.2.1.4.3 (3*R*,4*R*)-3-Methyl-4-decanolide の合成

(3*R*,4*R*)-3-Methyl-2-phenylselenyl-4-decanolide (3*R*,4*R*)-**9**

窒素雰囲気下、lithium diisopropylamide (0.55 M THF 溶液, 20 mL, 11.0 mmol) に(3*S*,4*R*)-**1** (1.0 g, 5.4 mmol) の THF 溶液 (10 mL) を -70 °C で 45 分かけて滴下した。-70 °C で 45 分間攪拌した後、hexamethylphosphoric triamide (3 mL) を加え、次いで phenylselenyl bromide (1.8 g, 7.6 mmol) の THF 溶液 (10 mL) を -70 °C で 45 分かけて滴下した。室温で 2 時間攪拌した後、飽和 NH₄Cl 水溶液に注いだ。水層を Et₂O で抽出し、有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液および飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (2.4 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 150 g, *n*-hexane/AcOEt=9/1, v/v) で精製し、(3*R*,4*R*)-3-methyl-2-phenylselenyl-4-decanolide ((3*R*,4*R*)-**9**, 863 mg, 収率 47%) を得た。不安定であることが懸念されたため、得られた(3*R*,4*R*)-**9** は直ちに次の反応に使用した。

(*R*)-3-Methyl-2-decen-4-olide (*R*)-**10**⁵⁶⁾

氷水冷下、(3*R*,4*R*)-**9** (863 mg, 2.5 mmol) および NaHCO₃ (214 mg, 2.5 mmol) の CH₂Cl₂ 懸濁液 (10 mL) に、*m*-chloroperoxybenzoic acid (純度 70%, 940 mg, 3.8 mmol) を少しずつ加えた。0 °C で 1 時間攪拌した後、反応液に飽和 Na₂S₂O₃ 水溶液 (10 mL) を加え、1 時間攪拌し、Et₂O で抽出した。有機層を水、飽和 NaHCO₃ 水溶液、飽和食塩水で洗浄

し、MgSO₄にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物（800 mg）をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（silica gel 60N: 150 g, *n*-hexane/AcOEt=4/1, v/v）で精製し、(*R*)-3-methyl-2-decen-4-olide ((*R*)-**10**, 365 mg, 収率 79%) を得た。

¹H NMR: δ 0.87 (3H, t, *J* = 6.8), 1.28–1.52 (9H, m), 1.88 (1H, m), 2.04 (3H, s), 4.82 (1H, dd, *J* = 2.8 and 7.6), 5.79 (1H, s). ¹³C NMR: δ 173.3, 168.6, 116.9, 84.6, 31.9, 31.5, 28.9, 24.3, 22.5, 14.0, 13.9. GC-MS: 182 (M⁺, 4), 153 (27), 113 (42), 111 (39), 98 (100), 97 (81), 69 (83), 55 (19), 43 (64), 41 (72). [α]_D²⁰ -5.9 (*c* 1.02, CHCl₃).

(*3R,4R*)-3-Methyl-4-decanolide (*3R,4R*)-**1** ⁵⁷⁻⁵⁹⁾

NiCl₂·6H₂O (119 mg, 0.50 mmol) の MeOH 懸濁液 (10 mL) に、0~10 °C で NaBH₄ (57 mg, 1.5 mmol) を少しずつ加えた。0~10 °C で 30 分攪拌した後、(*R*)-**10** (182 mg, 1.0 mmol) の MeOH 溶液 (1 mL) を 0~10 °C で一気に加えた。更に 0~10 °C で NaBH₄ (132 mg, 3.5 mmol) を少しずつ加え、0~10 °C で 5 分攪拌した。反応溶液を濾過し、濾液に水を加え、Et₂O で抽出した。有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液および飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (212 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 50 g, *n*-hexane/AcOEt=15/1, v/v) にて精製し、(*3R,4R*)-3-methyl-4-decanolide ((*3R,4R*)-**1**, 61 mg, 収率 33%)、(*3S,4R*)-**1** (16 mg, 収率 8.5%) および(*3R,4R*)/(*3S,4R*)=94/6 の 3-methyl-4-decanolide (89 mg, 収率 49%) を得た。

(*3R,4R*)-**1**: ¹H NMR、¹³C NMR およびマススペクトルはラセミ体の *cis*-3-methyl-4-decanolide と一致した。純度 (FID) : 99.4%。2.2.5.1 に記載の方法にて、鏡像体過剰率を測定した結果、99.4% e.e. (GC 保持時間:171.38 min) であった。[α]_D²⁰ +64.2 (*c* 1.03, CHCl₃).

2.2.1.4.4 (3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-decanolide の合成

(*S*)-2-Phenylselenyl-2-decen-4-olide (*S*)-8

氷水冷下、(*S*)-7 (4.0 g, 8.3 mmol) の CH₂Cl₂ 溶液 (40 mL) に、*m*-chloroperoxybenzoic acid (純度 65%, 3.5 g, 13.2 mmol) の CH₂Cl₂ 溶液 (20 mL) を 20 分かけて滴下した。0 °C で 1.5 時間攪拌した後、反応液を飽和 Na₂S₂O₃ 水溶液と飽和 NaHCO₃ 水溶液の混合溶液に注ぎ、氷水冷下で攪拌した。CH₂Cl₂ で抽出し、有機層を飽和 Na₂S₂O₃ 水溶液、飽和 NaHCO₃ 水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (3.6 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 100 g, *n*-hexane/AcOEt=30/1, v/v) で精製し、(*S*)-2-phenylselenyl-2-decen-4-olide ((*S*)-8, 1.9 g, 収率 72%) を得た。

¹H NMR: δ 0.87 (3H, t, *J* = 6.8), 1.21–1.41 (8H, m), 1.59–1.69 (2H, m), 4.92 (1H, ddd, *J* = 2.0, 5.2 and 7.2), 6.72 (1H, d, *J* = 2.0), 7.35–7.41 (3H, m), 7.64 (2H, dd, *J* = 1.6 and 8.4). ¹³C NMR: δ 171.1, 149.1, 135.5, 129.8, 129.2, 127.6, 125.7, 84.0, 33.5, 31.5, 28.9, 24.8, 22.5, 14.0. GC-MS: 324 (M⁺, 12), 212 (10), 183 (25), 157 (11), 113 (100), 102 (14), 91 (13), 85 (22), 77 (16), 57 (11), 51 (11), 43 (36). [α]_D²⁰ -64.4 (c 1.02, CHCl₃).

(4*S*)-3-Methyl-2-phenylselenyl-4-decanolide (4*S*)-9

窒素雰囲気下、CuI (1.40 g, 7.38 mmol) の Et₂O 懸濁液 (10 mL) に、methyl lithium (1.10 M Et₂O 溶液, 13.4 mL, 14.8 mmol) を -30 ~ -10 °C で 10 分かけて滴下し、-20 ~ -10 °C で 50 分間、-5 °C で 1 時間攪拌し、銅アート錯体を調製した。次いで、(*S*)-8 (1.60 g, 4.92 mmol) を -10 ~ -5 °C で 10 分かけて滴下し、-5 °C で 2 時間攪拌した。反応液を飽和 NH₄Cl 水溶液に注ぎ、AcOEt で抽出した。有機層を飽和 NH₄Cl 水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (1.70 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 15 g, *n*-hexane/AcOEt=50/1 ~ 20/1, v/v) で精製し、

(4*S*)-3-methyl-2-phenylselenyl-4-decanolide ((4*S*)-**9**, 1.63 g, 収率 98%) を得た。不安定であることが懸念されたため、得られた(4*S*)-**9** は即座に次の反応に使用した。

(*S*)-3-Methyl-2-decen-4-olide (*S*)-**10**⁵⁶⁾

氷水冷下、(4*S*)-**9** (1.0 g, 3.0 mmol) の CH₂Cl₂ 溶液 (30 mL) に、*m*-chloroperoxybenzoic acid (純度 70%, 1.1 g, 4.5 mmol) の CH₂Cl₂ 溶液 (10 mL) を 5 分かけて滴下した。0 °C で 50 分攪拌した後、反応液に飽和 Na₂S₂O₃ 水溶液 (10 mL) を加え、1 時間攪拌し、CH₂Cl₂ で抽出した。有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (0.82 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 25 g, *n*-hexane/AcOEt=10/1, v/v) で精製し、(*S*)-3-methyl-2-decen-4-olide ((*S*)-**10**, 504 mg, 収率 94%) を得た。

¹H NMR、¹³C NMR およびマススペクトルは(*R*)-**10** と一致した。[α]_D²⁰ +4.6 (*c* 1.02, CHCl₃).

(3*S*,4*S*)-3-Methyl-4-decanolide (3*S*,4*S*)-**1**⁵⁸⁾

NiCl₂·6H₂O (196 mg, 0.83 mmol) の MeOH 懸濁液 (10 mL) に、0 °C で NaBH₄ (94 mg, 2.5 mmol) を加えた。0~10 °C で 30 分攪拌した後、(*S*)-**10** (300 mg, 1.7 mmol) の MeOH 溶液 (5 mL) を 0 °C で一気に加えた。−5 °C に冷却後、NaBH₄ (219 mg, 5.8 mmol) を一気に加え、0 °C で 10 分攪拌した。反応溶液を濾過し、濾液に水を加え、AcOEt で抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (324 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 60 g, *n*-hexane/AcOEt=15/1, v/v) にて精製し、(3*S*,4*S*)-3-methyl-4-decanolide ((3*S*,4*S*)-**1**, 240 mg, 収率 79%)、(3*R*,4*S*)-**1** (30 mg, 収率 10%) および (3*S*,4*S*)/(3*R*,4*S*)=51/49 の 3-methyl-4-decanolide (29 mg, 収率 9%) を得た。

(3*S*,4*S*)-1: ^1H NMR、 ^{13}C NMR およびマススペクトルはラセミ体の *cis*-3-methyl-4-decanolide と一致した。純度 (FID) : 94.7%。2.2.5.1 に記載の方法にて、鏡像体過剰率を測定した結果、91.6% e.e. (GC 保持時間:169.47 min) であった。 $[\alpha]_D^{20}$ -61.3 (*c* 1.02, CHCl_3).

2.2.2 ワサビ香気濃縮物の調製

ワサビの根茎を先から 1 cm ほど切り落とし、ナイフで皮を薄く剥いた後、鮫皮おろしですりおろした。直ちにおろしワサビ (15 g) に CH_2Cl_2 (75 mL) を加え抽出し、抽出液を濾紙濾過し、濾液を SAFE⁹⁾にて蒸留した(水浴温度:40 °C、減圧度: $<2.2\times 10^{-3}$ Pa)。蒸留液を、Widmer 分留管を用い常圧下で 100 μL まで濃縮し、ワサビ香気濃縮物を得た。

2.2.3 AEDA¹⁸⁾

ワサビ香気濃縮物に対し AEDA を行い、各香気成分の寄与度を調べた。ワサビ香気濃縮物を CH_2Cl_2 にて 1:4、1:16、1:64、1:256、1:1024 の割合になるように順次希釈し、各希釈液に対し 2 名で GC-MS/O にて分析を行い、FD factor を決定した。

2.2.4 ワサビ香気濃縮物の分画

ワサビ香気濃縮物 125 mg (CH_2Cl_2 溶液) に対し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-100: 10 g) にて分画を行った。展開液として *n*-pentane (Fr.1)、*n*-pentane/ Et_2O =20/1 (Fr.2)、*n*-pentane/ Et_2O =5/1 (Fr.3)、*n*-pentane/ Et_2O =1/1~0/1 (Fr.4) を順に流し、4 画分に分けた。各画分を、Widmer 分留管を用い常圧下で濃縮し、各濃縮物 (Fr.1: 14.8 mg, Fr.2: 5.4 mg, Fr.3: 0.1 mg, Fr.4: 0.1 mg) に対し GC-MS-O で分析を行った。

2.2.5 機器分析

2.2.5.1 GC-MS

GC-MS 測定は、Agilent 5973 質量検出器 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) と FID が接続された Agilent 6890 ガスクロマトグラフ (Agilent Technologies) にて行った。カラムは、濃縮物の分析には TC-WAX (0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness; ジーエルサイエンス, 東京, 日本) を、光学異性体測定には heptakis-(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-β-cyclodextrin カラム (AcTBDMSBCD, 0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness; 長谷川香料(株)にて調製) を使用した。カラム末端は 2 つに分岐し、不活性キャピラリーカラムにて質量検出器および FID に分配した。注入口温度は 250 °C に設定し、各試料はスプリット比 50:1 にて 1 μL 注入した。TC-WAX カラム使用時は、オーブンは最初の 3 分間 40 °C で保持した後、3 °C/min にて 230 °C まで昇温し、キャリアガスにはヘリウムを使用し、1.8 mL/min の一定流量とした。AcTBDMSBCD カラム使用時は、オーブンは 40 °C から 0.7 °C/min にて 180 °C まで昇温し、キャリアガスにはヘリウムを使用し、0.7 mL/min の一定流量とした。マススペクトルは electron impact (EI) モードで 70 eV のイオン化電圧にて測定を行った。各化合物の RI は C5 から C30 の直鎖アルカンの保持時間を基準に算出した。各合成品の純度は FID によって得られるクロマトグラムのピーク面積値より算出した。合成品の 3-methyl-4-decanolide の鏡像体過剰率は、質量検出器によって得られるトータルイオンクロマトグラム (total ion chromatogram ; TIC) のピーク面積値より算出した。ワサビ濃縮物中の 3-methyl-4-decanolide の鏡像体過剰率は、質量検出器によって得られるイオンクロマトグラム (m/z 99 で抽出) の面積値より算出した。

2.2.5.2 GC-MS/O

GC-MS/O 測定は、Agilent 5973 質量検出器と匂い嗅ぎ口 (Olfactory detection port 3, ODP 3; GERSTEL GmbH & Co. KG, Mülheim an der Ruhr, Germany) が接続された Agilent 6890 ガスクロマトグラフにて行った。カラムは TC-WAX (0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness) を使用した。カラム末端は 2 つに分岐し、不活性キャピラリーカラムにて質量検出器および匂い嗅ぎ口に分配した。注入口温度、試料注入量、スプリット比、オープン昇温条件、キャリアガス、流量は 2.2.5.1 記載の GC-MS 測定 (TC-WAX 使用時) と同一の条件で行った。

2.2.5.3 MD-GC-MS

MD-GC-MS 測定は、¹D/²D GC-MS システムを備えた Agilent 7890A ガスクロマトグラフにて行った。本 Agilent 7890A ガスクロマトグラフには、multicolumn switching system (GERSTEL) が搭載されており、1st カラムには DB-WAX (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm film thickness, LTM 用, Agilent) を使用し、カラム末端は 3 つに分岐し、不活性キャピラリーカラムにて 5975 質量検出器、FID および ODP に分配した。目的成分は、multicolumn switching system にて 1st カラムから検出器に分配せずに直接 2nd カラムへ導入した。2nd カラムには DB-1 (0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 μm film thickness, LTM 用, Agilent) を使用し、カラム末端は 3 つに分岐し、不活性キャピラリーカラムにて質量検出器、FID および ODP に分配した。注入口は cooled injection system (CIS, GERSTEL) を使用した。各試料はスプリットレスにて 1 μL 注入し、試料注入後 0.5 分間 10 °C で保持し、その後 12 °C/sec にて 250 °C まで昇温した。キャリアガスにはヘリウムを使用し、362 kPa の一定圧力で流した。1st GC のオープン是最初の 70 °C から 5 °C/min にて 230 °C まで昇温した。目的の保持時間の間、留分を -50 °C のコールドトラップに導入し、0.5 分後にトラップを 250 °C まで昇温して 2nd GC に導入した。2nd GC のオープン は 40 °C から 5 °C/min

にて 230 °Cまで昇温した。イオン化条件は 2.2.2.1 記載の GC-MS 測定と同一の条件で行った。

2.2.5.4 NMR

^1H NMR (400 MHz)、 ^{13}C NMR (100 MHz) および nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) は、JEOL JNM-ECX400 (日本電子, 東京, 日本) にて測定した。測定は CDCl_3 中、 CDCl_3 のケミカルシフト (^1H NMR: $\delta = 7.26$ ppm、 ^{13}C NMR: $\delta = 77.0$ ppm) を基準として用いた。ケミカルシフトは ppm、カップリングコンスタント (J 値) は Hz で記載した。

2.2.5.5 比旋光度

比旋光度は、P-2300 polarimeter (日本分光, 東京, 日本) にて測定した。

2.2.6 官能評価⁶⁰⁻⁶⁵⁾

長谷川香料株式会社 総合研究所の所員 10 名をパネリストとして評価を行った。評価試料としては、ワサビ香気濃縮物とワサビ香気再構築液の(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide 無添加品 (香気再構築液 A) と添加品 (香気再構築液 B) を用意した。香気再構築液 A は、allyl isothiocyanate (256 mg/g)、(Z)-1,5-octadien-3-one (0.828 $\mu\text{g/g}$)、4-pentenyl isothiocyanate (18.2 mg/g)、5-hexenyl isothiocyanate (8.54 mg/g)、2-isopropyl-3-methoxypyrazine (0.173 $\mu\text{g/g}$)、3-methyl-2,4-nonanedione (67.8 ng/g)、6-(methylthio)hexyl isothiocyanate (5.56 mg/g)、vanillin (13.9 $\mu\text{g/g}$) により調製した。香気再構築液 B は、香気再構築液 A に(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide (1.52 $\mu\text{g/g}$) を添加して調製した。

評価用語は、事前のセッションにおいてパネリストでディスカッションを行いながら6つの評価用語（pungent, sulfurous, metallic, earthy, green, creamy）を選定した。乱数表により3桁の試料番号をつけた試料3種を1セットとしてパネリストに提示した。パネリストは各試料の香気に関して、各評価用語につき、1（感じない）、2（弱い）、3（やや弱い）、4（普通）、5（やや強い）、6（強い）、7（非常に強い）の7段階で評価を行った。官能評価実験は23℃に設定された静かな部屋で行った。各評価用語についてスコア平均値を算出し、スパイダーチャートにプロットした。

官能評価結果の有意差を検定するため、分散分析およびTukeyの多重比較検定を行った。分散分析では修正ファクター、平方和、自由度、平均平方、分散比（*F*値）を算出し、確立水準0.05および0.01で有意差を検定した。Tukeyの多重比較検定ではそれぞれの評価用語について標準誤差および最小有意差を算出し、確立水準0.05で有意差を検定した。

2.3 結果および考察

2.3.1 ワサビの重要香気成分の決定

ワサビ香気濃縮物の GC-MS 分析の結果、96.86% (GC-FID area%) が isothiocyanate 類であった。AEDA の結果、256 および 1024 と高い FD factor を持つ重要香気成分は、10 成分であった (表 2-1)。これら 10 成分の内、5 成分 (No.2 : allyl isothiocyanate、No.4 : 4-pentenyl isothiocyanate、No.5 : 5-hexenyl isothiocyanate、No.9 : 6-(methylthio)hexyl isothiocyanate、No.10 : vanillin) は、マススペクトル、RI および匂いの質が標品と一致したことから容易に同定することができた。残りの 5 成分の内、4 成分 (No.1, No.3, No.4, No.7) はワサビ香気濃縮物中の存在量が極微量であったため、マススペクトルが得られず同定することができなかった。No.8 の成分に関しては、存在量が極微量である上に他の成分と重なってしまい、マススペクトルが得られず同定することができなかった。未同定の 5 成分 (No.1, No.3, No.4, No.7, No.8) を同定するために、ワサビ香気濃縮物のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画を行い、各成分の精製・濃縮を試みた。分画によって No.3 (Fr.2 に存在)、No.4 (Fr.2 に存在)、No.7 (Fr.4 に存在) の 3 成分に関しては、GC-MS 分析によりマススペクトルを得ることができ、マススペクトル、RI および匂いの質が標品と一致したことから、それぞれ No.3 : (Z)-1,5-octadien-3-one、No.4 : 2-isopropyl-3-methoxypyrazine、No.7 : 3-methyl-2,4-nonanedione と同定した。No.1 (Fr.1 に存在) に関しては分画による濃縮を行っても、マススペクトルは得られなかったが、RI および匂いの質より、3-methyl-2-butene-1-thiol と推定した。No.8 の成分に関しては、分画を行ってもマススペクトルを得ることができなかったが、Fr.3 の MD-GC-MS 分析を行うことによって、単独のマススペクトルを得ることができた。マススペクトル、RI および匂いの質が標品と一致したことから、No.8 は *cis*-3-methyl-4-decanolide と同定した。本研究により同定した 9 種の重要香気成分の内、(Z)-1,5-octadien-3-one および *cis*-3-methyl-4-decanolide はワサビの香気成分として初めて

見出された成分であった。ワサビの中でも最高級品と言われる「真妻」を分析試料としたことにより、これらの新規重要香気成分を見出すことができたと考えている。

表 2-1 ワサビ香気的重要香気成分 (AEDA により抽出)

| No. | odorant | odor quality ^a | RI ^b | FD factor ^c | GC area % ^d | identification mode | Fr. |
|-----|------------------------------------|---------------------------|-----------------|------------------------|------------------------|---------------------|-----|
| 1 | 3-methyl-2-buten-1-thiol | hop-like, sulfurous | 1127 | 256 | trace | RI, GC-O | 1 |
| 2 | allyl isothiocyanate | garlic-like, pungent | 1383 | 1024 | 73.819 | MS, RI, GC-O | - |
| 3 | (Z)-1,5-octadine-3-one | metallic | 1392 | 1024 | trace | MS, RI, GC-O | 2 |
| 4 | 2-isopropyl-3-methoxypyrazine | earthy, nutty | 1448 | 256 | trace | MS, RI, GC-O | 2 |
| 5 | 4-pentenyl isothiocyanate | pungent | 1564 | 1024 | 7.695 | MS, RI, GC-O | - |
| 6 | 5-hexenyl isothiocyanate | green, pungent | 1685 | 1024 | 6.516 | MS, RI, GC-O | - |
| 7 | 3-methyl-2,4-nonanedione | earthy | 1741 | 256 | trace | MS, RI, GC-O | 4 |
| 8 | <i>cis</i> -3-methyl-4-decanolide | celery-like | 2221 | 256 | trace | MS, RI, GC-O | 3 |
| 9 | 6-(methylthio)hexyl isothiocyanate | green, oily | 2406 | 256 | 1.108 | MS, RI, GC-O | - |
| 10 | vanillin | vanilla-like | 2605 | 256 | 0.006 | MS, RI, GC-O | - |

^a odor quality perceived at the sniffing port

^b RI on TC-WAX

^c FD factor: flavor dilution factor

^d trace: trace amount (< 0.001%)

2.3.2 ワサビ中の 3-methyl-4-decanolide の絶対立体配置の決定

本研究でワサビの香気成分として初めて同定された *cis*-3-methyl-4-decanolide は、これまで天然からは蘭^{66,67}から同定されているのみで、食品から同定された報告はなく、さらに天然物中での絶対立体配置に関する報告もない。一方、立体異性体である *trans*-3-methyl-4-decanolide は、クラリセージ⁶⁸、オレンジ果汁⁶⁹、マンダリン果皮⁶⁹ およびワサビ⁴⁵から見いだされており、ワサビ中での絶対立体配置は (3*S*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide であると報告されている。

今回のワサビの香気分析において、*cis*-3-methyl-4-decanolide は痕跡量であったものの FD factor は 256 と高い値を示し、前述したようにワサビの香気成分として今回初めて見出されたものであったことから、ワサビ中での絶対立体配置を調べることにした。なお、今回の分析においても、FD factor は低かったが、今関らがワサビの重要香気成分として

報告した *trans*-3-methyl-4-decanolide も検出されたため (GC-FID area% : 0.008%、FD factor : 1) 、合わせて絶対立体配置を確認した。

まず、標品としてラセミ体の *cis*-3-methyl-4-decanolide および *trans*-3-methyl-4-decanolide を合成し (図 2-1) 、3-methyl-4-decanolide の4種の立体異性体がGCで分離する条件を探索した。1-Heptanol と methyl crotonate からラセミ体の3-methyl-4-decanolide の *cis/trans* 混合物を合成し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて *cis*-体と *trans*-体を分離した。なお、分離した *cis*-体と *trans*-体の立体化学は、nuclear Overhauser effect (NOE) によって決定した (図 2-2) 。

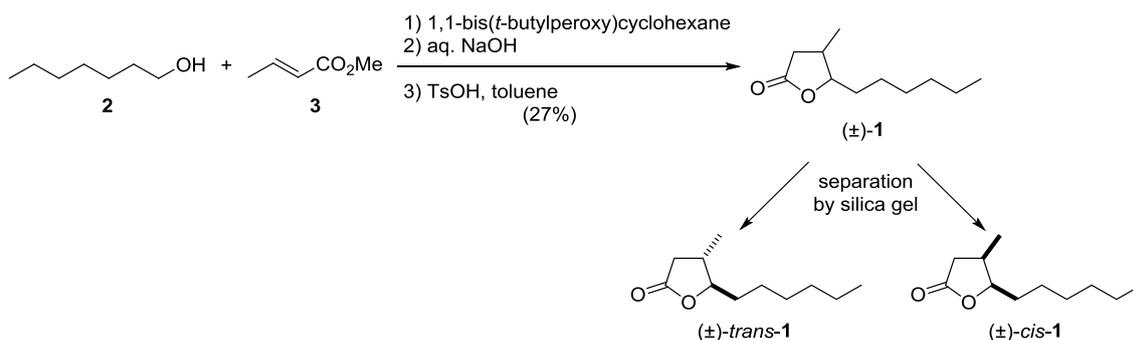


図 2-1 ラセミ体の 3-methyl-4-decanolide の合成

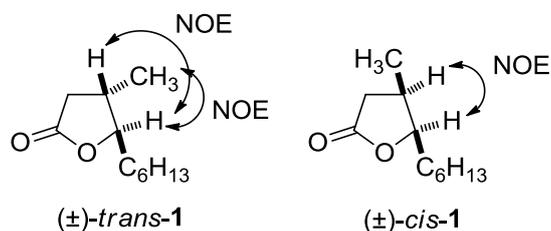


図 2-2 *trans*-3-methyl-4-decanolide と *cis*-3-methyl-4-decanolide の NOE

3-methyl-4-decanolide の4種の立体異性体を分離すべく、octakis-(2,3-di-*O*-methoxymethyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)- γ -cyclodextrin⁷⁰⁾、octakis-(2,6-di-*O*-methyl-3-*O*-trifluoroacetyl)

- γ -cyclodextrin⁷¹⁾、heptakis-(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin (AcTBDMSBCD)⁷²⁾を液相としてコーティングした各カラムおよび CHIRAMIX^{®73)}を用いて GC 測定を行ったところ、AcTBDMSBCD カラムを用いた時のみ全ての立体異性体が良好に分離することが分かった。図 2-3 にラセミ体の 3-methyl-4-decanolide の *cis/trans* 混合物とワサビ香気濃縮物の AcTBDMSBCD カラムを用いた GC-MS 分析におけるイオンクロマトグラムを示した (3-methyl-4-decanolide の特徴イオン *m/z* 99 で抽出)。図 2-3 より、ワサビ香気濃縮物中の *cis*-3-methyl-4-decanolide および *trans*-3-methyl-4-decanolide は、それぞれ一方の立体異性体が優先的に存在していることが分かった。

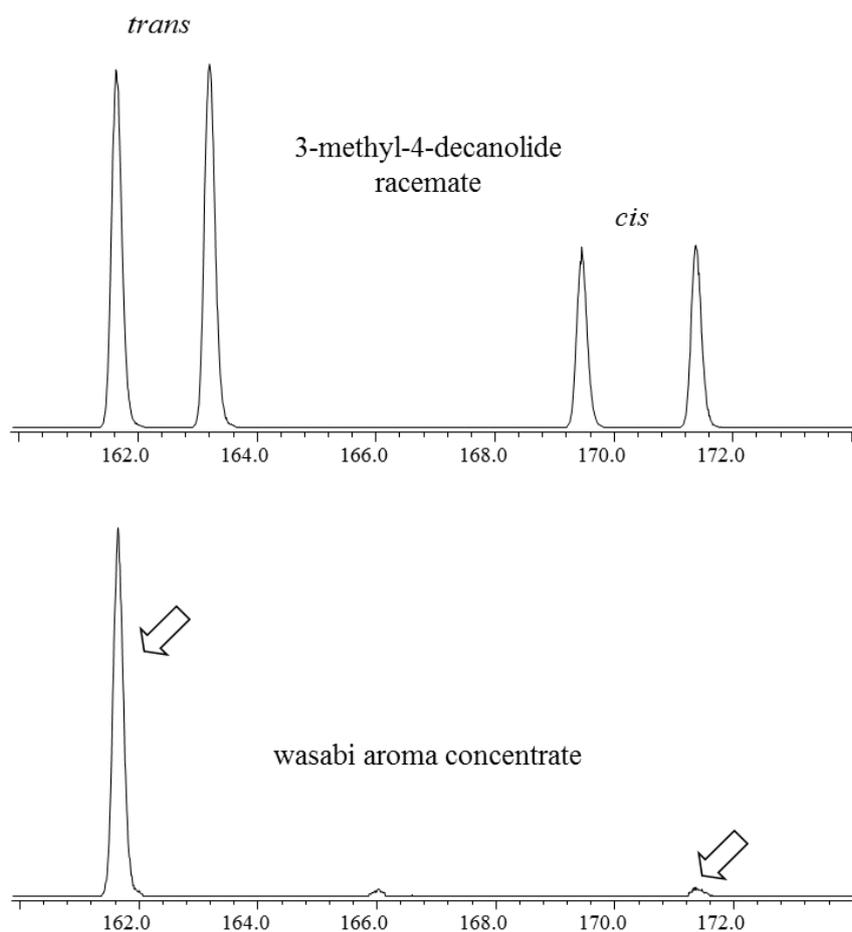


図 2-3 ラセミ体の 3-methyl-4-decanolide の *cis/trans* 混合物とワサビ香気濃縮物のイオンクロマトグラム (*m/z* 99 で抽出)

次に、3-methyl-4-decanolide の 4 種の立体異性体の合成を行った (図 2-4)。香料原料として使用される光学活性 γ -decalactone を出発物質として、phenylselenenyl 基の導入および酸化・脱離を行い α,β -不飽和ラクトンとした後、Gilman 試薬により methyl 基を導入し、(3*S*,4*R*)-**1** および(3*R*,4*S*)-**1** を合成した。(3*R*,4*R*)-**1** に関しては、(3*S*,4*R*)-**1** に対し phenylselenenyl 基の導入および酸化・脱離を行い α,β -不飽和ラクトンとした後、nickel boride による水素添加により合成した。なお、本水素添加反応は、Raney nickel や Pd-C を触媒として用いた場合はラセミ化が進行したが、nickel boride を触媒として用いた場合はラセミ化が抑制された。(3*S*,4*S*)-**1** は、(3*R*,4*R*)-**1** の合成法と同様の方法で(3*R*,4*S*)-**1** から合成することもできたが、合成できた(3*R*,4*S*)-**1** が少なかつたため、副生成物として比較的大量に得られた(*S*)-**7** を利用して合成した。(S)-**7** の phenylselenenyl 基の酸化・脱離を行い、Gilman 試薬により methyl 基を導入し、再度 phenylselenenyl 基の酸化・脱離を行い、nickel boride で水素添加を行い、(3*S*,4*S*)-**1** を合成した。

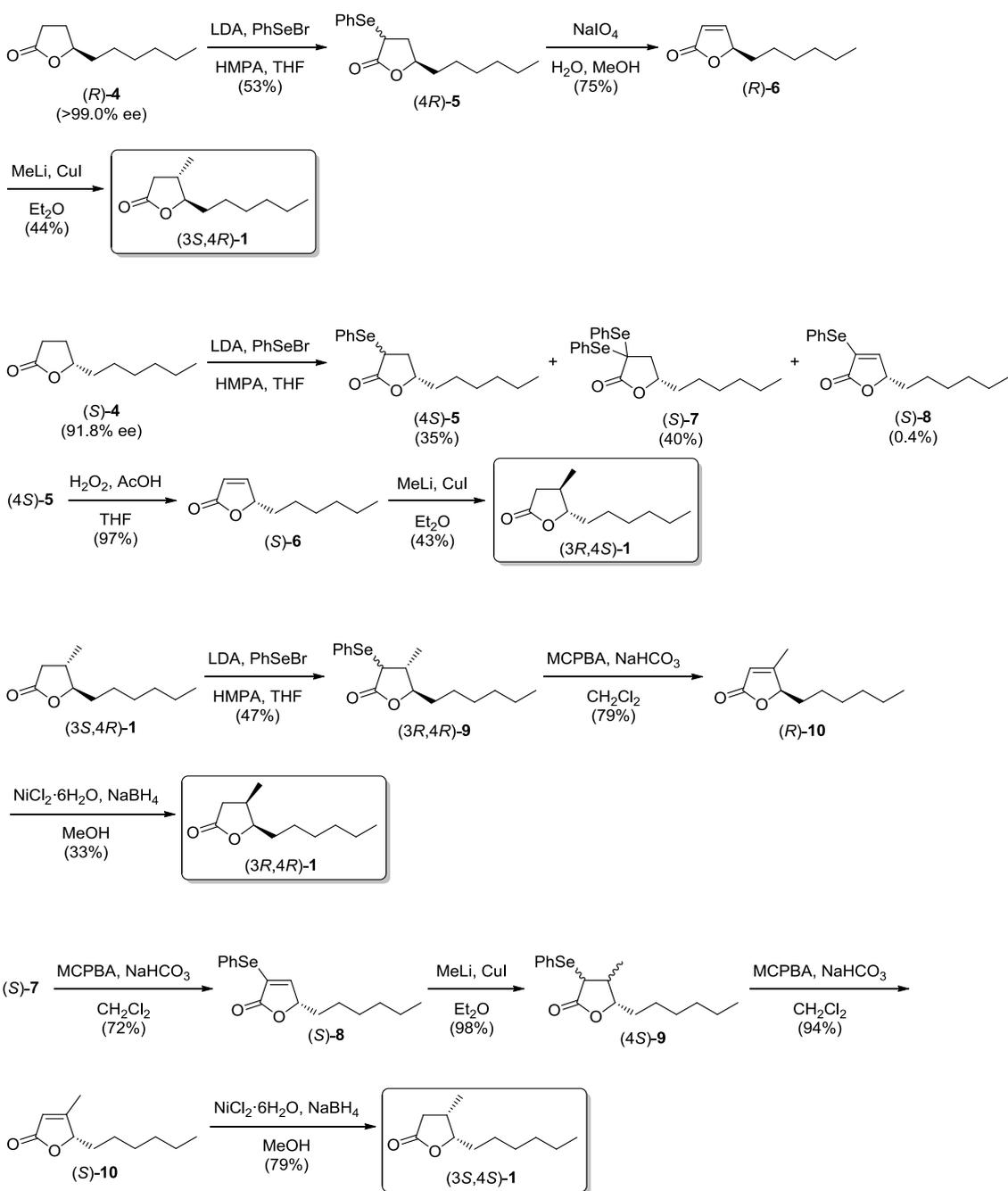


図 2-4 光学活性 3-methyl-4-decanolide の合成

合成した 3-methyl-4-decanolide の 4 つの立体異性体の純度、比旋光度および匂いの質を表 2-2 に示した。4 つの立体異性体はそれぞれ異なる香気を有していたが、特に

(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide は他の立体異性体と比較して「creamy, celery-like」などの特有な香気特徴を有していた。

表 2-2 合成した光学活性 3-methyl-4-decanolide の純度、比旋光度および匂いの質

| compound | purity (enantiomeric excess) | $[\alpha]_D^{20}$ | odor quality (1% EtOH solution) |
|---|---------------------------------|---|--|
| (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-3-methyl-4-decanolide | 99.5% (99.2% ee) | +71.0 (<i>c</i> 1.00, CHCl ₃) | oily, waxy |
| (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-3-methyl-4-decanolide | 96.6% (93.1% ee) | -69.1 (<i>c</i> 0.84, CHCl ₃) | peach-like, fruity |
| (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-methyl-4-decanolide | 99.4% (99.4% ee) | +64.2 (<i>c</i> 1.03, CHCl ₃) | peach-like, fruity, creamy, celery-like |
| (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-3-methyl-4-decanolide | 94.7% (91.6% ee) | -61.3 (<i>c</i> 1.02, CHCl ₃) | peach-like, weak |

図 2-5 に合成した 3-methyl-4-decanolide の 4 種の立体異性体とワサビ香気濃縮物の AcTBDMSBCD カラムを用いた GC-MS 分析におけるイオンクロマトグラム (m/z 99 で抽出)を示した。標品との RI と匂いの質の一致から、ワサビ中の *cis*-3-methyl-4-decanolide および *trans*-3-methyl-4-decanolide の絶対立体配置を、それぞれ (3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide と (3*S*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide と決定した。

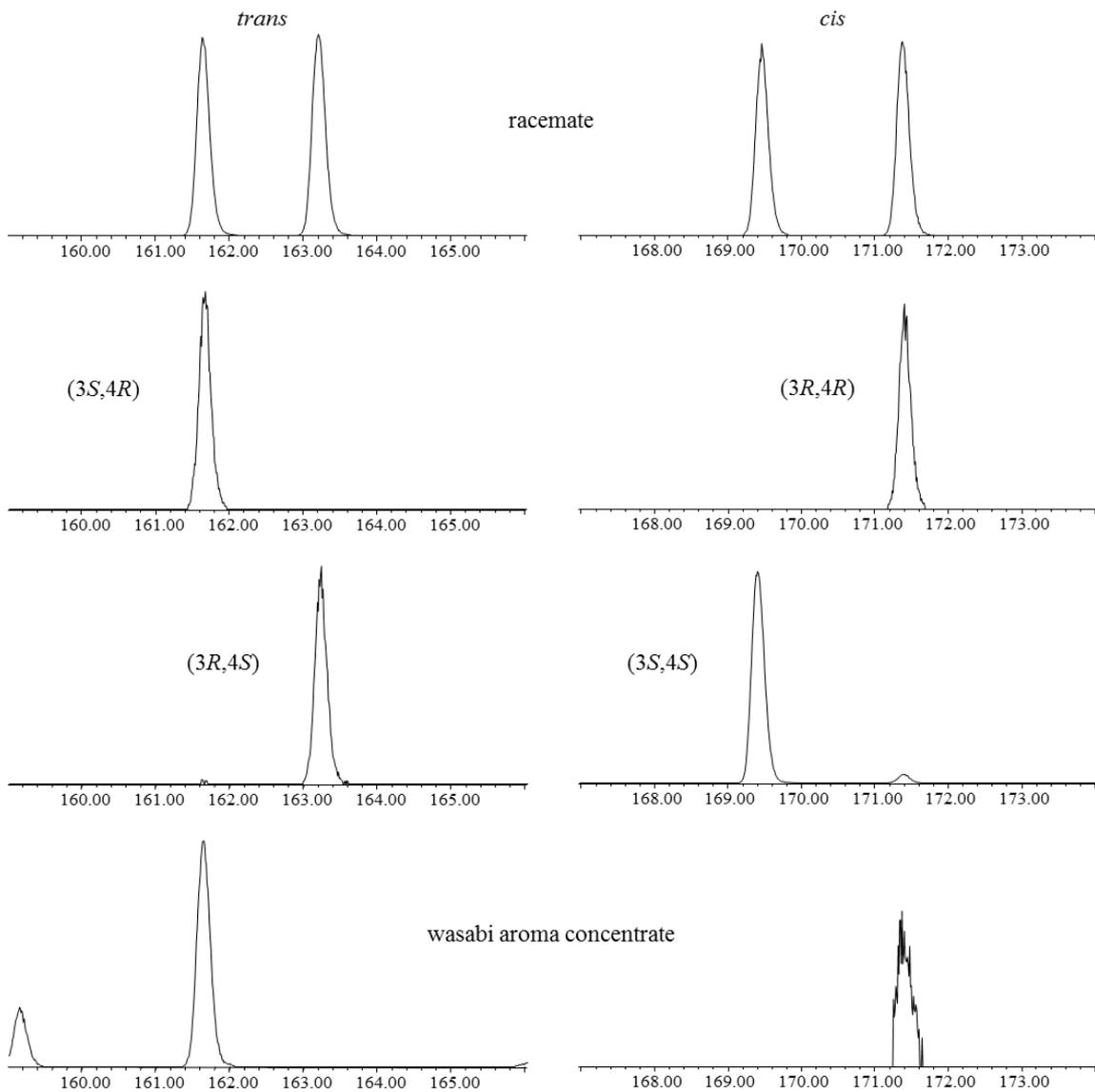


図 2-5 光学活性 3-methyl-4-decanolide とワサビ香気濃縮物のイオンクロマトグラム
(m/z 99 で抽出)

2.3.3 官能評価

今回新規に見出した(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide のワサビ香気中における効果を検証すべく、官能評価を行った。AEDA にて重要香気成分として同定された 8 成分 (allyl isothiocyanate, (*Z*)-1,5-octadien-3-one, 4-pentenyl isothiocyanate, 5-hexenyl isothiocyanate,

2-isopropyl-3-methoxypyrazine, 3-methyl-2,4-nonanedione, 6-(methylthio)hexyl isothiocyanate, vanillin) を用いてワサビ香気再構築液 A を調製し、ワサビ香気再構築液 A に (3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide を添加しワサビ香気再構築液 B を調製した。また、ワサビはすりおろしてから時間が経つと香気が大きく変化することから、対象試料としてはワサビ香気濃縮物を使用することとした。

官能評価の結果、(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide を添加することによって、「creamy」のスコアの向上および「pungent」のスコアの減少が見られ、いずれの評価用語においてもワサビ香気再構築液 B とワサビ香気濃縮物の各評価用語のスコアには有意な差が無くなった。すなわち、(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide は、再構築液の香気特性を天然のワサビ香気濃縮物の香気特性に近づける効果があることが示された (図 2-6)。

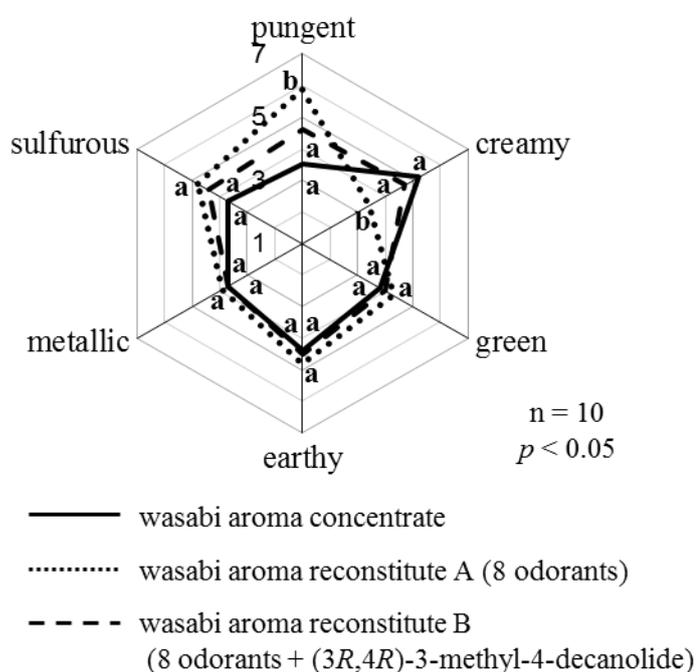


図 2-6 ワサビ香気再構築液における(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide の添加効果
(異なる文字の付いている項目では有意に異なる)

2.4 結論

本章では、ワサビの最高品種の一つである「真妻」を分析試料として、すりおろしたワサビの香気に寄与する微量重要香氣成分の探索を行った。ワサビ香氣濃縮物の GC-O および AEDA を行い、FD factor 256 および 1024 を示す 9 種の重要香氣成分を同定した。9 成分の内、allyl isothiocyanate、4-pentenyl isothiocyanate、5-hexenyl isothiocyanate、6-(methylthio)hexyl isothiocyanate、vanillin は容易に同定することができたが、2-isopropyl-3-methoxypyrazine、3-methyl-2,4-nonanedione、(Z)-1,5-octadien-3-one、cis-3-methyl-4-decanolide はワサビ香氣濃縮物中での存在量が微量であったため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる濃縮・精製を駆使し単独のマスマスペクトルを得て同定した。なお、後者の 2 成分はワサビ中から初めて見出した成分である。

cis-3-Methyl-4-decanolide にはこれまで天然物中での絶対立体配置に関する報告がなかったことから、trans-体を含め 4 種の立体異性体を合成し、ワサビ中の絶対立体配置を調べた。全立体異性体とワサビ香氣濃縮物の AcTBDMSBCD カラムを用いたキラル GC-MS 分析を行い、ワサビ中には (3R,4R)-3-methyl-4-decanolide および (3S,4R)-3-methyl-4-decanolide が優先的に存在していることを明らかにした。(3R,4R)-3-Methyl-4-decanolide が天然物から同定されたのは、本研究が初めてである。さらに、合成した立体異性体の香氣を比較したところ、それぞれ異なる香氣を有していたが、特に(3R,4R)-3-methyl-4-decanolide は他の立体異性体と比較して特有な香氣特徴 (creamy, celery-like) を有していた。

同定した上述の 8 種の重要香氣成分から調製したワサビ香氣再構築液 A、ワサビ香氣再構築液 A に(3R,4R)-3-methyl-4-decanolide を添加したワサビ香氣再構築液 B、およびワサビ香氣濃縮物を用いて官能評価を行った。その結果、ワサビ香氣再構築液 B はワサビ香氣再構築液 A と比較し、「creamy」のスコアの向上および「pungent」のスコアの減少が見られ、いずれの評価用語においても、ワサビ香氣濃縮物の各評価用語のスコア

には有意な差が無くなった。すなわち、(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide は、再構築液の香気特性を天然のワサビの香気濃縮物の香気特性に近づける効果があることが示された。

以上のことから、(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide はワサビをすりおろした時に立ち上がるワサビ特有の香りの再現に非常に有用な成分であると結論された。

第三章

果物の新規微量重要香気成分の解明と果物香味への有用性評価⁷⁴⁾

3.1 序

果物は特徴的な嗜好性の高い香気を有しており、果物の香りはフレーバー、フレグランス両者において人気が高く、香料として世界的に古くから需要の多い重要な香調である。特に飲料や菓子においてフルーツフレーバーを使用した商品は多く、天然感のあるフルーツフレーバーの開発が重要となってきた。天然感のあるフルーツフレーバーの開発にむけて、これまで長谷川香料では様々な果物の香気分析を行ってきた。果物の香気分析では、GC-Oにおいて匂いを検知した箇所のRIとその匂いの質を記録するが、これまで行ってきた果物の香気分析を振り返ってみたところ、興味深いことに、RI:2300 (InertCap WAX)を示し、匂いの質がwoodyである一つの香気成分が様々な果物の香気分析で共通して検知されていることが分かった。その香気成分はいずれの果物の香気分析においてもマススペクトルが得られないほど微量であり、構造不明の成分であった。本成分は、これまでwoody香気を有すると知られている香気成分とは異なるタイプのwoody香気を有しており、まさにヒノキを想起させる心地よいwoody香気であった。本成分は特にグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーのGC-O分析において強く検知されていたが、これらの果物の香りから直接「ヒノキを想起させるwoody香気」を感じることはなく、果物の香気において新しい役割を持っているのではないかと非常に興味を持たれた。

極性の異なる2種類のカラムにおけるRI (2300 : InertCap WAX, 1680 : InertCap IMS) およびwoodyという匂いの質から、本成分はrotundone [(3S,5R,8S)-5-isopropenyl-3,8-dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1(2H)-azulenone]ではないかと推測された(図3-1)。Rotundoneはパチョリ精油⁷⁵⁾やシラズワイン⁷⁶⁾、シラズブドウ(シラ

ーズワインの原料のブドウ)⁷⁶⁾、各種スパイス(白胡椒、黒胡椒、マジョラム、オレガノ等)⁷⁶⁾、樽熟成されたスピリッツ⁷⁷⁾、乳香⁷⁸⁾、シプリオール精油⁷⁹⁾などの重要香気成分として知られているが、シラズブドウ以外の果物の香気成分としての報告はない。また、これらの報告において rotundone の香気は woody よりも peppery/spicy と主に表現されているが、我々の果物の香気分析において peppery/spicy と表現されることは全くなかった。以上のことから、本成分が rotundone であるという確証はなく、構造解明を行うためには更なる分析データを得る必要があると考えられた。

果物の香りにとって異質である woody 香気は果物の香りにどのような影響を及ぼすかは大変興味深く、本成分の解明が天然感のある果物フレーバーの開発に繋がるのではないかと考えた。そこで本研究では、まず市販のオレンジ精油の高沸点留分から本成分を単離し、構造解明を行い、更に、グレープフルーツ、リンゴ、マンゴー中での同定を行った。最後に、本成分のグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの香気中での香气的役割を明らかにすることを目的に官能評価を行った。

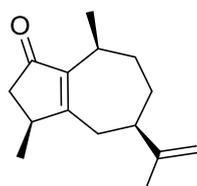


図 3-1 rotundone

3.2 試料および実験方法

3.2.1 試料および試薬・化合物

3.2.1.1 試料

オレンジ精油の高沸点留分（商品名：sinensal）は R. C. Treatt & Co. Ltd（Suffolk、UK）から購入した。グレープフルーツ（マーシュ シードレス）、リンゴ（サンふじ）は神奈川県川崎市のスーパーマーケットで、マンゴーピューレ（アルフォンソ）はオーウイール株式会社（東京、日本）より購入した。

3.2.1.2 試薬・化合物

(-)-Guaiol、cobalt(II) 2-ethylhexanoate、cobalt(II) acetylacetonate、cobalt(II) naphthenate は Sigma-Aldrich（St. Louis、USA）より、toluene、pyridine、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine、4-methyl-2-pentanone は純正化学株式会社（東京、日本）より、acetic anhydride は株式会社ダイセル（東京、日本）より、silica gel 60N（球状 中性、粒子径 63–210 μm）は関東化学株式会社（東京、日本）、Wakogel[®] C-100 は和光純薬工業株式会社（東京、日本）より購入した。酸素はマールス株式会社の酸素濃縮器 LFY-I-5F から発生させたものを使用した。その他の試薬および溶媒は分析グレードのものを使用した。官能評価で使用した香料は、長谷川香料株式会社保有のものを使用した。

3.2.1.3 Rotundone の標品合成

Rotundone は、文献記載の方法⁷⁶⁾を参考に(-)-guaiol から図 3-5 の方法で合成した。

2-[(3*S*,5*R*,8*S*)-3,8-Dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroazulen-5-yl]propan-2-yl acetate (**3**, guaiyl acetate)

氷冷下 (4 °C)、pyridine (3.08 g, 39.0 mmol) および toluene (5 mL) の混合物中に、(-)-guaiol (445 mg, 2.00 mmol)、acetic anhydride (225 mg, 2.20 mmol) および *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (12.2 mg, 0.100 mmol) の混合物を滴下した。室温で1時間半攪拌した後、acetic anhydride (5.17 g, 50.6 mmol)、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (598 mg, 4.90 mmol) および pyridine (3.08 g, 39.0 mmol) を再び加え、50 °Cで6時間攪拌した。反応溶液を2N 塩酸に注ぎ、AcOEt で抽出した。有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液および飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥後、減圧下濃縮した。濃縮物 (731 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 10 g, *n*-hexane/AcOEt=100/1, v/v) で精製し、2-[(3*S*,5*R*,8*S*)-3,8-dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroazulen-5-yl]propan-2-yl acetate (**3**, 453 mg, 収率 86%) を得た。

2-[(3*S*,5*R*,8*S*)-3,8-Dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1(2*H*)-azulenon-5-yl]propan-2-yl acetate (**4**)

3 (353 mg, 1.33 mmol)、cobalt(II) 2-ethylhexanoate (22.9 mg)、cobalt(II) acetylacetonate (20.0 mg)、cobalt(II) naphthenate (48.5 mg) および 4-methyl-2-pentanone (10 mL) の混合物中に酸素を吹き込みながら、70 °Cで2時間半攪拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、飽和 Na₂S₂O₃ 水溶液中に注ぎ、AcOEt で抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (571 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 20 g, *n*-hexane/AcOEt=25/1, v/v) で精製し、2-[(3*S*,5*R*,8*S*)-3,8-dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1(2*H*)-azulenon-5-yl]propan-2-yl acetate (**4**, 45.2 mg, 収率 12%) を得た。

Rotundone (1)

4 (47.7 mg, 0.171 mmol) を 280–300 °C で 1 時間攪拌し、室温まで冷却後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 1.0 g, *n*-hexane/AcOEt=50/1, v/v) で精製し、rotundone (1, 15.0 mg, 収率 40%) を得た。

合成した rotundone の NMR (¹H, ¹³C) およびマススペクトルは文献記載の値⁷⁶⁾と一致した。

3.2.2 構造不明成分の解明

オレンジ精油の高沸点留分に対し、減圧蒸留、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取 HPLC の順で分画を行った (図 3-2)。

3.2.2.1 減圧蒸留

オレンジ精油の高沸点留分 (801.3 g) を減圧蒸留にて分画した (Fr.i-1: 136 °C / 1.0 kPa, 282.4 g; Fr.i-2: 136 °C / 1.0 kPa, 96.8 g; Fr.i-3: 136–157 °C / 0.9 kPa, 165.4 g; Fr.i-4: 157–169 °C / 0.9 kPa, 85.6 g; Fr.i-5: 169–172 °C / 0.9 kPa, 18.4 g; 残渣: 140.8 g)。各画分の GC-MS/O 分析の結果、Fr.i-3~Fr.i-5 および残渣に目的の woody 香気が検知されたため、Fr.i-3~Fr.i-5 および残渣を混合し、次のシリカゲルカラムクロマトグラフィーに用いた。

3.2.2.2 シリカゲルカラムクロマトグラフィー

Fr.i-3~Fr.i-5 および残渣の混合物 (350.0 g) を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 1800 g, *n*-hexane/AcOEt = 3/1, v/v) に供し、5 画分に分画した (Fr.ii-1~Fr.ii-5)。各画分をエバポレーターにて濃縮し、GC-MS/O にて目的成分が存在するか確認したところ、Fr.ii-3 に目的の woody 香気が検知された。Fr.ii-3 の濃縮物 (112.8 g)

について、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 2000 g, *n*-hexane/AcOEt = 5/1, v/v) にて分画を行い、7 画分を得た (Fr.iii-1~Fr.iii-7, 各 1.5 L)。各画分をエバポレーターにて濃縮し、GC-MS/O にて目的成分の存在を確認したところ、Fr.iii-3~Fr.iii-5 に目的の woody 香気が検知された。Fr.iii-3~Fr.iii-5 の濃縮物 (38.5 g) に対し、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 1750 g, toluene/AcOEt = 100/1~75/1, v/v) にて分画を行い、薄層クロマトグラフィー (TLC, 展開液 toluene/AcOEt = 4/1, v/v) にて R_f 値が 0.58 の画分のみを集めた。本画分をエバポレーターにて濃縮し、濃縮物 (10.0 g) を得た。GC-MS/O にて確認したところ、目的成分の woody 香気は確認できたが、本成分は本画分でもマススペクトルが得られないほど微量であった。これ以上シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製・濃縮することは困難であると考え、分取 HPLC による分画を行った。

3.2.2.3 分取 HPLC

シリカゲルカラムクロマトグラフィーの最後の分画によって得られた濃縮物 (10.0 g) に対し、3.2.4.1 に記載の条件で 2 回の分取 HPLC による分画を行った。匂い紙にて HPLC 溶出画分の香気を調べ、目的の woody 香を有する画分を集め、HPLC 分画物 (1.3 mg) を得た。本 HPLC 分画物に対し GC-MS 分析を行ったところ、目的成分が主成分で他の成分はいずれも 10% 未満であることが分かった (目的成分の純度 36.7%)。本成分の HRMS (EI) は *m/z* 218.16680 が検出され、組成式が C₁₅H₂₂O であることが示された。HPLC 分画物の NMR 分析 (¹H, ¹³C, H-H COSY, HMQC, HMBC) の結果、本成分は rotundone であると推定された。標品と各種分析データを比較し、本成分の構造を rotundone と決定した。

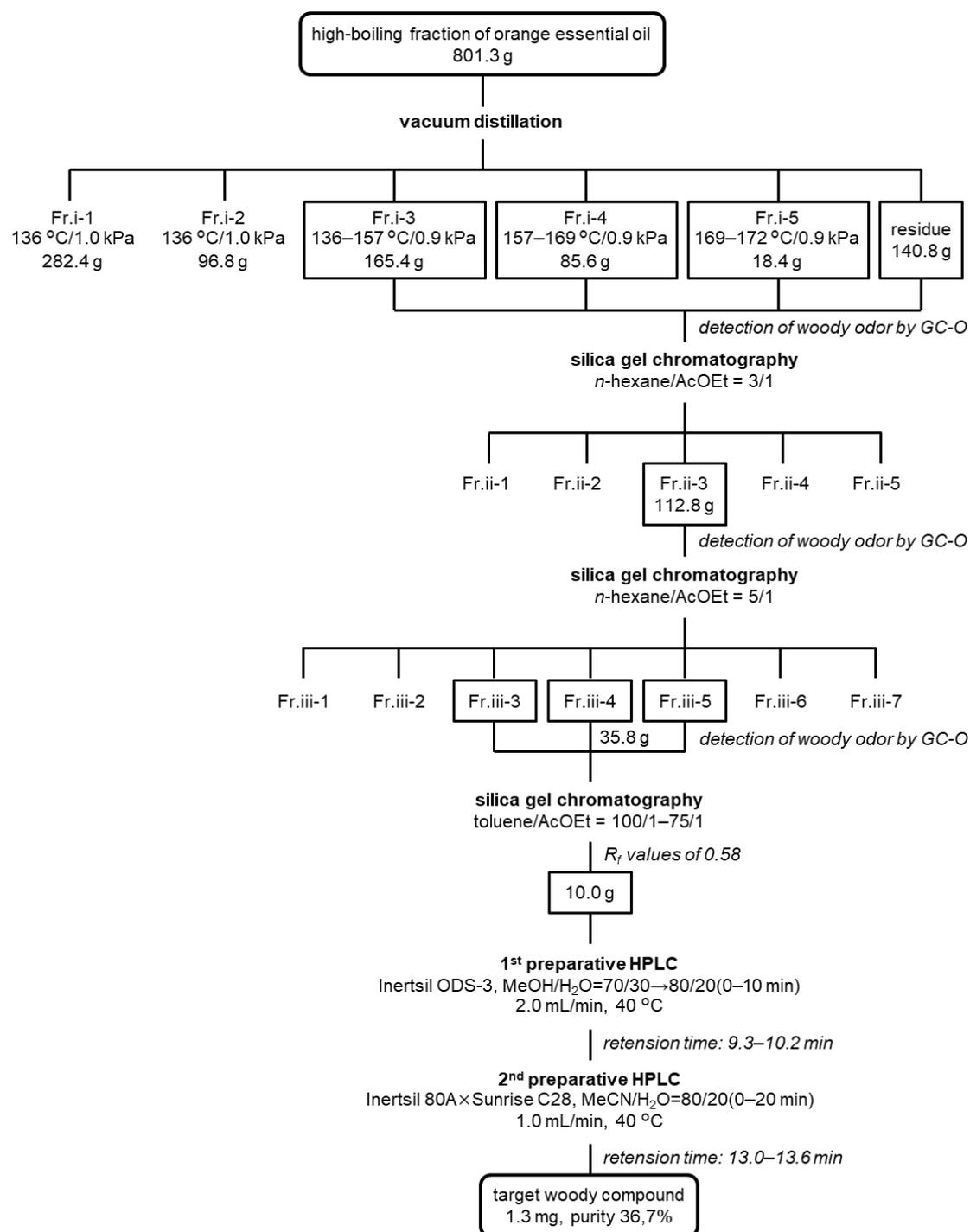


図 3-2 オレンジ精油高沸点留分の分画フローチャート

3.2.3 グレープフルーツ、リンゴ、マンゴーにおける rotundone の同定

3.2.3.1 グレープフルーツにおける rotundone の同定

ホワイトグレープフルーツ 25 個の果皮のフラベドのみをナイフでむき、得られたフラベド (1.20 kg) に *n*-pentane (2.4 L) を加え、粉碎しながら 30 分激しく攪拌した。デカンテーションにより *n*-pentane 溶液を分離し、残渣部に新しい *n*-pentane (1.2 L) を加え、30 分激しく攪拌した。デカンテーションにより *n*-pentane 溶液を分離後、先の *n*-pentane 溶液と合わせて、Na₂SO₄ で脱水した。常圧下 43 °C で約 200 mL まで濃縮し、35 °C で SAFE⁹⁾ を行った。得られた留分を常圧下 43 °C で濃縮し、ホワイトグレープフルーツ果皮油 (50.9 g) を得た。得られた果皮油の内 12.0 g をエバポレーターにて減圧濃縮し、得られた濃縮物 (4.4 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wakogel[®] C-100: 40 g) に供した。*n*-Hexane (900 mL) および AcOEt (900 mL) で展開し、AcOEt 画分を集め、エバポレーターにて減圧濃縮し、果皮油の極性部 (44.3 mg) を得た。3.2.4.1 に記載の条件で 2 回の分取 HPLC による分画を行い、woody 香気を含む画分 (Et₂O 溶液, 10.7 mg) を得た。本画分の GC-MS/O 測定において、rotundone のマススペクトル、RI (InertCap WAX : 2300, InertCap 1MS : 1680) および匂いの質 (woody) が得られ、これらが rotundone の標品と一致することを確認した。

3.2.3.2 リンゴにおける rotundone の同定

リンゴ 10 個をそれぞれ 4 等分し、へたと芯を除いた後、皮ごとすりおろした。すりおろしたリンゴ (2400 g) に Et₂O (1.6 L) と NaCl (240 g) を加え攪拌した。0 °C で一晩静置し、デカンテーションにて Et₂O 溶液を分離した。常圧下 43 °C で約 100 mL まで濃縮し、60 °C で SAFE を行った。得られた留分をエバポレーターにて減圧濃縮し、得られたリンゴ香気濃縮物 (25.5 mg) について 3.2.4.1 に記載の条件で 2 回の分取 HPLC による分画を行い、woody 香気を含む画分 (Et₂O 溶液, 7.8 mg) を得た。本画分の

MD-GC-MS 測定において、rotundone のマススペクトル、RI (InertCap WAX : 2300, InertCap 1MS : 1680) および匂いの質 (woody) が得られ、これらが rotundone の標品と一致することを確認した。

3.2.3.3 マンゴーにおける rotundone の同定

マンゴーピューレ (1000 g) に室温で Na_2SO_4 (1000 g) を加え、よく混合した。Et₂O (1.5 L) を加え、0 °C で 1 時間攪拌し、濾紙濾過した。濾液を常圧下 43 °C で約 200 mL まで濃縮し、半量を 60 °C で SAFE を行った。得られた留分をエバポレーターにて減圧濃縮し、得られたマンゴー香気濃縮物 (20.4 mg) について 3.2.4.1 に記載の条件で 2 回の分取 HPLC による分画を行い、woody 香気を含む画分 (Et₂O 溶液, 11.8 mg) を得た。本画分の GC-MS/O 測定において、rotundone のマススペクトル、RI (InertCap WAX : 2300, InertCap 1MS : 1680) および匂いの質 (woody) が得られ、これらが rotundone の標品と一致することを確認した。

3.2.4 機器分析

3.2.4.1 分取 HPLC 分画

「3.2.2.3 分取 HPLC」および「3.2.3 グレープフルーツ、リンゴ、マンゴーにおける rotundone の同定」において、2 つの HPLC 機器システム (システム A および B) を使用した。システム A は Waters 600 controller、Waters 600 pump、Waters 2707 autosampler、Waters 2487 dual λ absorbance detector (Waters Corporation、Milford、USA) から構成された。システム B は Shimadzu LC-20AT、Shimadzu SIL-20AC、Shimadzu CTO-20A、Shimadzu SPD-M20A、Shimadzu CBM-20A (島津製作所、京都、日本) から構成された。

3.2.2.3 における 1 回目の HPLC 分画は、以下に示した条件で行った。

表 3-1 3.2.2.3 の 1 回目の HPLC 分画条件

| | |
|--------|--|
| 原料： | 約 20% MeOH 溶液 |
| 装置： | システム A |
| カラム： | Inertsil ODS-3 (5 µm particle size, 250 mm × 4.6 mm i.d.; ジーエルサイエンス) |
| 移動相： | MeOH/H ₂ O=70/30→80/20 (0～10 min), 90/10 (10～15 min) |
| 流速： | 2.0 mL/min |
| カラム温度： | 45 °C |
| 分取時間： | 9.3～10.2 min |

得られた留分に対し、減圧下溶媒を除去し、食塩 (15%, w/w) を加え、Et₂O で抽出した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧濃縮した。得られた濃縮物に対して、2 回目の HPLC 分画を以下に示した条件で行った。

表 3-2 3.2.2.3 の 2 回目の HPLC 分画条件

| | |
|--------|--|
| 原料： | 約 10% MeCN 溶液 |
| 装置： | システム B |
| カラム： | Inertsil 80A (5 µm particle size, 250 mm × 4.6 mm i.d.; ジーエルサイエンス) × Sunrise C28 (5 µm particle size, 250 mm × 4.6 mm i.d.; クロマニックテクノロジーズ, 大阪, 日本) |
| 移動相： | MeCN/H ₂ O=80/20 (0～20 min) |
| 流速： | 1.0 mL/min |
| カラム温度： | 40 °C |
| 分取時間： | 13.0～13.6 min |

得られた留分は、1 回目の HPLC 分画と同様の方法にて処理し、濃縮物を得た。得られた濃縮物 (1.3 mg) に対し、3.2.2.3 に示したように各種分析を行った。

3.2.3 における 1 回目の HPLC 分画は、以下に示した条件で行った。

表 3-3 3.2.3 の 1 回目の HPLC 分画条件

| | |
|--------|--|
| 原料： | 約 20% MeOH 溶液 |
| 装置： | システム B |
| カラム： | Inertsil ODS-3 (5 µm particle size, 250 mm × 4.6 mm i.d.; ジーエルサイエンス) |
| 移動相： | MeOH/H ₂ O=70/30→80/20 (0~10 min), 90/10 (15~20 min) |
| 流速： | 2.0 mL/min |
| カラム温度： | 45 °C |
| 分取時間： | 9.3~10.2 min |

得られた留分は、3.2.2.3 の 1 回目の HPLC 分画と同様の方法にて処理した。得られた濃縮物に対して、2 回目の HPLC 分画を以下に示した条件で行った。

表 3-4 3.2.3 の 2 回目の HPLC 分画条件

| | |
|--------|--|
| 原料： | 約 10% MeCN 溶液 |
| 装置： | システム B |
| カラム： | Sunrise C28 (5 µm particle size, 250 mm × 4.6 mm i.d.; クロマトテクノロジー) |
| 移動相： | MeCN/H ₂ O=80/20 (0~20 min) |
| 流速： | 1.0 mL/min |
| カラム温度： | 40 °C |
| 分取時間： | 6.2~7.2 min |

得られた留分は、1 回目の HPLC 分画と同様の方法にて処理し、濃縮物を得た。得られた濃縮物に対し、3.2.3 に示したように各種分析を行った。

3.2.4.2 GC-MS

GC-MS 測定は、Agilent 5975 質量検出器と FID が接続された Agilent 7890 ガスクロマトグラフにて行った。カラムは InertCap WAX (0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness; ジェールサイエンス) を使用した。カラム末端は 2 つに分岐し、不活性キャピラリーカラムにて質量検出器および FID に分配した。注入口温度は 250 °C に設定し、各試料はスプリット比 50:1 にて 1 μL 注入した。オーブンは最初の 3 分間 40 °C で保持し、その後 3 °C/min にて 230 °C まで昇温した。キャリアガスにはヘリウムを使用し、1.0 mL/min の一定流量とした。マススペクトルは EI モードで 70 eV のイオン化電圧にて測定を行った。各化合物の RI は C5 から C30 の直鎖アルカンの保持時間を基準に算出した。合成品の純度は FID によって得られるクロマトグラムのピーク面積値より算出した。

3.2.4.3 GC-MS/O

GC-MS/O 測定は、Agilent 5975 質量検出器と GERSTEL ODP 3 匂い嗅ぎ口 (GERSTEL GmbH & Co. KG) が接続された Agilent 7890 ガスクロマトグラフにて行った。カラムは InertCap WAX (0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness) を使用した。カラム末端は 2 つに分岐し、不活性キャピラリーカラムにて質量検出器および匂い嗅ぎ口に分配した。注入口温度、試料注入量、スプリット比、オーブン昇温条件、キャリアガス、流量は 3.2.4.2 記載の GC-MS 測定と同一の条件で行った。同定のための rotundone 標品との比較においては、InertCap 1MS (0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness) も使用した。その際のオーブンは、最初の 3 分間 40 °C で保持し、その後 5 °C/min にて 250 °C まで昇温した。

3.2.4.4 MD-GC-MS

MD-GC-MS 測定は、GELSTEL CIS-4 注入口と FID が接続された Agilent 7890 ガスクロマトグラフ (1st GC) と、Agilent 5975 質量検出器と GERSTEL ODP 3 匂い嗅ぎ口が接続された Agilent 7890 ガスクロマトグラフ (2nd GC) とが連結された装置にて行った。1stGC は、カラムに InertCap WAX (0.32 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness) を使用し、カラム末端は 2 つに分岐し、不活性キャピラリーカラムにて FID および 2nd GC に分配した。2ndGC は、カラムに InertCap IMS (0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness) を使用し、カラム末端は 2 つに分岐し、不活性キャピラリーカラムにて質量検出器および匂い嗅ぎ口に分配した。注入口の温度は 0.5 分間 10 °C で保持し、その後 12 °C/sec にて 250 °C まで昇温した。各試料はスプリットレス モードにて 1 μL 注入した。1st GC のオーブンは最初の 5 分間 40 °C で保持し、その後 10 °C/min にて 190 °C まで昇温し、そのまま 20 分間保持した。1st GC のキャリアガスにはヘリウムを使用し、7.5 mL/min の一定流量とした。目的の保持時間 (24.1 分から 24.5 分まで) の間、留分を -50 °C のコールドトラップに導入し、0.5 分後にトラップを 250 °C まで昇温して 2nd GC に導入した。2nd GC のオーブンは最初の 3 分間 40 °C で保持し、その後 10 °C/min にて 280 °C まで昇温した。イオン化条件は 3.2.4.2 記載の GC-MS 測定と同一の条件で行った。

3.2.4.5 NMR

¹H NMR (400 MHz) 、¹³C NMR (100 MHz) 、H-H correlation spectrometry (COSY) 、heteronuclear multiple quantum correlation (HMQC) 、heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) は、JEOL JNM-ECX400 (日本電子) にて測定した。測定は CDCl₃ 中、tetramethylsilane を内部標準化合物として用いた ($\delta = 0.00$ ppm)。ケミカルシフトは ppm、カップリングコンスタント (J 値) は Hz で記載した。

3.2.4.6 HRMS

HRMS は、AccuTOF GCv 4G（日本電子）にて測定した。カラム、注入口温度、試料注入量、スプリット比、オープン昇温条件、キャリアガス、流量は 3.2.4.2 記載の GC-MS 測定と同一の条件で行った。

3.2.5 官能評価⁶⁰⁻⁶⁵⁾

長谷川香料株式会社 総合研究所の所員をパネリストとして評価を行った（グレープフルーツ：11 名、オレンジ：10 名、マンゴー：13 名、リンゴ：13 名）。評価用語は、事前のセッションにおいてパネリスト全員で実際の果物を評価しながら、ディスカッションを行い選定した（表 3-5）。なお、全ての果物に共通した用語である「complex」は「complex flavor of natural fruits」、「discordant」は「unpleasant taste or artificial flavor (unnatural)」として定義した。

表 3-5 評価用語

| | |
|----------|--|
| グレープフルーツ | sweet, sour, bitter, fresh, juicy, peely, complex, discordant |
| オレンジ | sweet, sour, floral, fresh, juicy, peely, complex, discordant |
| リンゴ | sweet, sour, green, fruity, pulpy, complex, discordant |
| マンゴー | sweet, sulfurous, green, fruity, metallic, ripe, complex, discordant |

評価試料としては、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーのモデル飲料の rotundone 無添加品と添加品をそれぞれ用意した。Rotundone 無添加モデル飲料は、糖酸液（果糖ブドウ糖液糖 6.5%、クエン酸 0.1%）に各果物の香気再構築液を添加し調製した。Rotundone 添加モデル飲料は、同様の糖酸液に同様の各果物の香気再構築液と rotundone (5 ng/kg) を添加し調製した。各果物の香気再構築液は、文献記載の定量値を基に調製した（表 3-6）⁸⁰⁻⁸³⁾。

乱数表により3桁の試料番号をつけた試料2種を1セットとしてパネリストに提示した。パネリストは各試料を飲んで、各評価用語につき、1（感じない）、2（弱い）、3（普通）、4（強い）、5（非常に強い）の5段階で評価を行った。官能評価実験は23℃に設定された静かな部屋で行った。各評価用語についてスコア平均値を算出し、スパイダーチャートにプロットした。

官能評価結果の有意差を検定するため、それぞれの評価用語について有意水準0.05および0.01で t -検定を行った。

表 3-6 官能評価に用いた果物香気再構築の構成成分組成

| No | compound | concentration (µg/kg) | | | |
|----|---|-----------------------|--------|-------|-------|
| | | grapefruit | orange | apple | mango |
| 1 | acetaldehyde | 6150 | 8305 | | 940 |
| 2 | limonene | 2308 | 85598 | | |
| 3 | ethyl 3-hydroxyhexanoate | 117 | 1136 | | |
| 4 | (<i>Z</i>)-hex-3-enal | 108 | 187 | | 11 |
| 5 | myrcene | 94 | 594 | | |
| 6 | decanal | 89 | 45 | | |
| 7 | linalool | 76 | 81 | | 160 |
| 8 | ethyl butanoate | 70 | 1192 | 3.4 | 11 |
| 9 | vanillin | 69 | 67 | | |
| 10 | α -pinene | 42 | 308 | | 1500 |
| 11 | hexanal | 33 | 197 | 4305 | |
| 12 | octanal | 32 | 25 | | |
| 13 | nonanal | 9.3 | 13 | | |
| 14 | ethyl 2-methylpropanoate | 5.8 | 8.8 | | |
| 15 | ethyl hexanoate | 4.3 | 63 | | 280 |
| 16 | ethyl 2-methylbutanoate | 3.9 | 48 | 33 | |
| 17 | <i>trans</i> -4,5-epoxy-(<i>E</i>)-dec-2-enal | 3.1 | 4.3 | | |
| 18 | 3,6-dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(3 <i>H</i>)-one | 1.1 | 0.8 | | |
| 19 | (<i>E,E</i>)-deca-2,4-dienal | 1.0 | 1.2 | | |
| 20 | oct-1-en-3-one | 0.8 | 4.1 | 0.27 | |
| 21 | 4-sulfanyl-4-methylpentan-2-one | 0.8 | | | |
| 22 | (<i>E</i>)-non-2-enal | 0.5 | 0.6 | | |
| 23 | 3-methylsulfanylpropanal | 0.2 | 0.4 | | |
| 24 | 1- <i>p</i> -menthene-8-thiol | 0.01 | | | |
| 25 | 3-methylbutanol | | 639 | | |
| 26 | 2-methylbutanol | | 270 | | |
| 27 | butanoic acid | | 74 | | 12330 |
| 28 | hexan-1-ol | | | 1450 | |
| 29 | butan-1-ol | | | 900 | |
| 30 | (<i>E</i>)-hex-2-enal | | | 306 | |
| 31 | β -damascenone | | | 4.6 | 7.9 |
| 32 | dimethyl sulfide | | | 1.3 | |
| 33 | terpinolene | | | | 23560 |
| 34 | linalool oxide | | | | 1710 |
| 35 | 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2 <i>H</i>)-furanone | | | | 1660 |
| 36 | δ -3-carene | | | | 1260 |
| 37 | ethyl octanoate | | | | 610 |
| 38 | γ -terpinene | | | | 530 |
| 39 | ethyl decanoate | | | | 140 |
| 40 | <i>p</i> -methylacetophenone | | | | 140 |
| 41 | β -ionone | | | | 27 |
| 42 | (<i>E,Z</i>)-nona-2,6-dienal | | | | 19 |

3.3 結果および考察

3.3.1 構造不明成分の単離および解明

グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの香気濃縮物で検知された woody 香気を有する構造不明の成分を解明するにあたり、本成分のマススペクトルを得られるまで濃縮・精製し、さらに可能であれば NMR 測定を行うのに十分な量を単離することを目的とした。しかしながら、本成分は各果物の香気濃縮物中でもマススペクトルを検出できないような極微量成分であったため、これらの果物から本成分を単離するには大量の果物が必要となることが予想された。目的の成分は RI (InertCap WAX: 2300, InertCap 1MS: 1680) が比較的高いことから含酸素セスキテルペンであると推測されたため、含酸素セスキテルペンを多く含むオレンジ由来の香料素材である「オレンジ精油の高沸点留分」に着目した。この「オレンジ精油の高沸点留分」は「sinensal」という製品名で香料素材として購入可能であり、さらに GC-O 分析において強い woody 香を感知することができ、目的成分が存在していることが確認された。果物の香気濃縮物よりも目的成分が多く存在していることが期待されたが、残念ながらマススペクトルは得られず、精製・濃縮が必要であることが分かった。「オレンジ精油の高沸点留分」に対し減圧蒸留および展開溶媒を変えながら 3 回のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画を行ったが、目的成分のマススペクトルは得られなかった。次に 2 回の分取 HPLC による分画を行ったところ、目的成分のマススペクトルを得ることができ、さらに純度を 36.7% (GC-FID, 図 3-3) まで向上させることができた。純度は比較的低いものであったが、不純物として含まれていたものは全て 10%未満であり、目的成分が主成分であったことから、構造解析を行うのに十分な分析データが得られた。HRMS (EI) および NMR データ (^1H NMR, ^{13}C NMR, H-H COSY, HMQC, HMBC) から、本成分の構造を rotundone であると推定した (図 3-4)。Rotundone の標品を市販の(-)-guaiol より文献⁷⁰⁾記載の方法を参考に合成した (図 3-5)。合成した rotundone と単離した目的成分

の全ての分析データ (HRMS, 各種 NMR データ, RI) および匂いの質が一致したことから、本成分を rotundone と決定した。

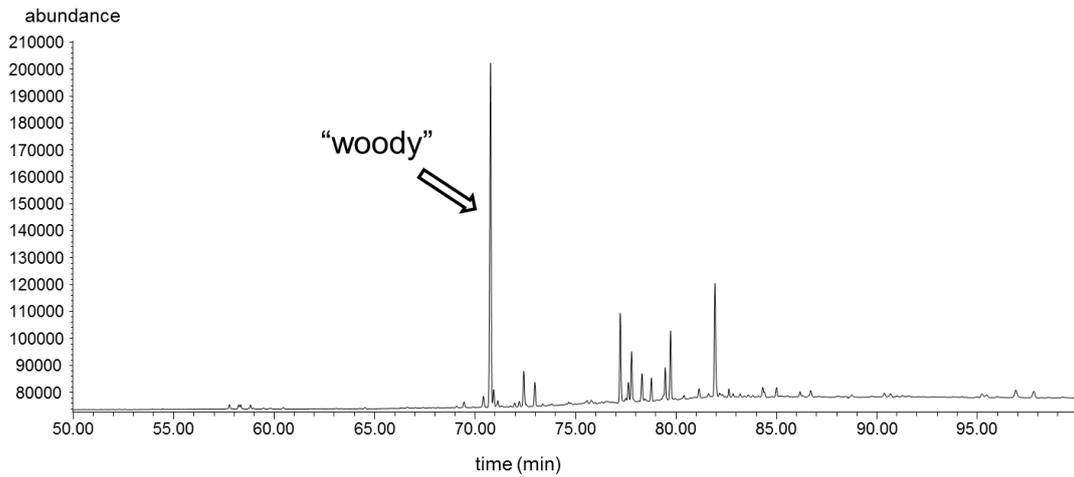


図 3-3 単離した目的成分の GC-FID クロマトグラム

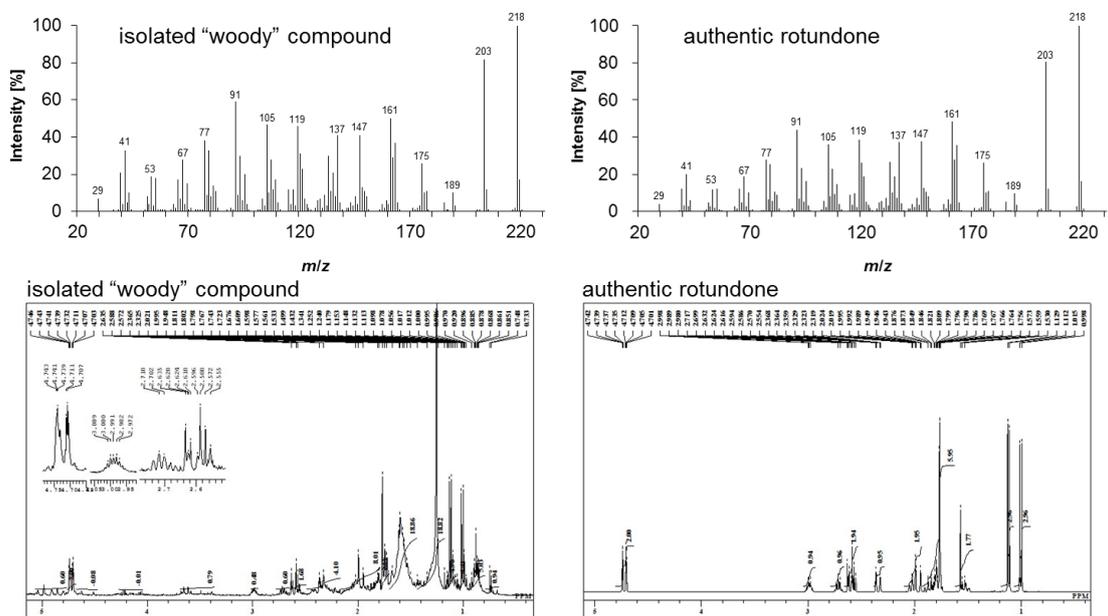


図 3-4 単離した目的成分と rotundone 標品のマススペクトルと ¹H NMR

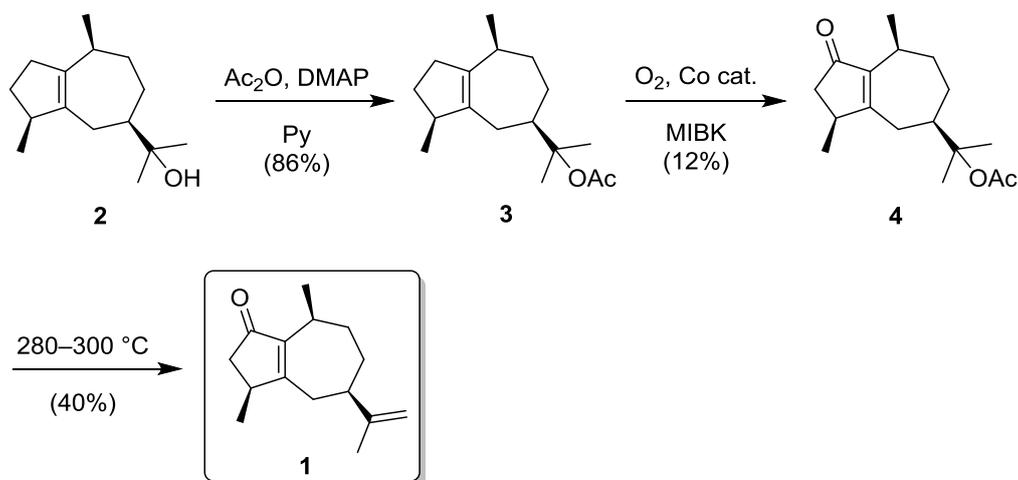


図 3-5 Rotundone の合成

Rotundone は先に述べた重要香気成分としての同定の他に、ハマスゲ (*Cyperus rotundus*)⁸⁴⁾や沈香⁸⁵⁻⁸⁷⁾、沈香木 (*Aquilaris tree*)⁸⁸⁾、cypriol (*Cyperus scariosus*)⁸⁹⁾中の成分としても同定されている。これらの内、rotundone の存在量が比較的多いハマスゲや沈香中では単離され NMR データも得られているが、重要香気成分として同定されているシラズワインや黒胡椒、樽熟成されたスピリッツ、乳香などでは rotundone のマススペクトルを得ることですら困難であったと報告されている。今回の研究では、rotundone のマススペクトルおよび RI、匂いの質に加え、通常マススペクトルよりも測定するのが困難な NMR データも得ることができ、果物中においては本研究で初めて科学的データに基づいた十分な同定を行うことができたことになる。

3.3.2 グレープフルーツ、リンゴ、マンゴーからの rotundone の同定

3.3.1 でオレンジ精油の高沸点留分から rotundone を単離し、構造を解明したことから、オレンジ中の woody 香を有する構造不明成分は rotundone であると同定することができた。そこで、次にその他の果物 (グレープフルーツ、リンゴ、マンゴー) について、woody 香を有する構造不明成分が rotundone であるかどうか確認することとした。初め

に、各香気濃縮物からの rotundone のマススペクトルの検出を検討した。3.3.1 において、分取 HPLC が rotundone の精製に有用であることが分かったので、類似の分取 HPLC 条件を各果物の香気濃縮物に対し適用した。グレープフルーツおよびマンゴーに関しては、HPLC 分画物を極性の InertCap WAX カラムを用いた GC-MS 測定することによって、rotundone のマススペクトルを得ることができた。一方で、リンゴにおいては、HPLC 分画物を GC-MS 測定すると、InertCap WAX カラムでも InertCap 1MS カラムでも不純物と重なってしまい、rotundone のマススペクトルが得られなかった。そこで、MD-GC-MS 測定を行ったところ、rotundone のマススペクトルを得ることができた。以上のことから、各果物中の構造不明成分と rotundone 標品のマススペクトルおよび 2 種のカラムでの RI、匂いの質の全てが一致することが確認でき、グレープフルーツ、リンゴ、マンゴー中の構造不明成分も rotundone であると同定した（図 3-6）。

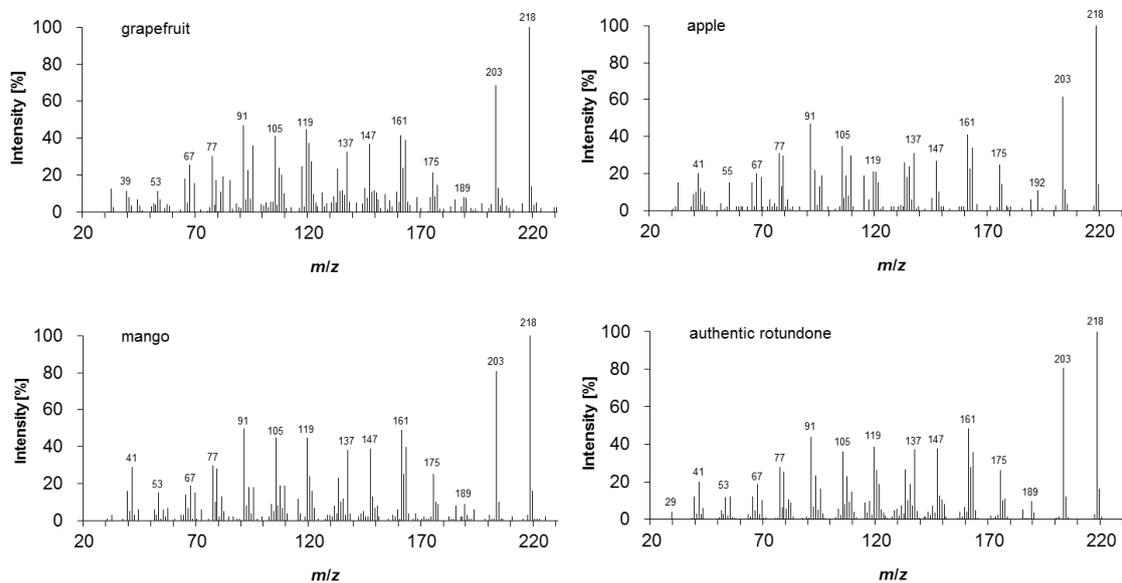


図 3-6 各果物の香気濃縮物から得られた rotundone のマススペクトル

3.3.3 Rotundone の香気特性

3.1 で述べたように、rotundone の GC-O での匂いの質に関しては、これまでの文献における主な香気表現 (peppery/spicy) と実際に果物の GC-O 分析で検知された香気 (woody) に相違があった。Wood らのシラーズワインの香気分析の報告において、rotundone は希釈されていない状態では harsh、burnt 香気であり、希釈状態でのみ peppery 香気を有すると述べられている⁷⁶⁾。また、近年報告された Niebler らの乳香の香気研究においては、rotundone は閾値付近の濃度では peppery 香気は弱く、woody、coniferous、incense-like の香気が強く感じられる一方で、濃度が高くなると peppery 香気が強くなると言及されている⁷⁸⁾。すなわち、本研究における rotundone の香気の文献との相違は、GC-O における濃度の違いによるものと考えられた。そこで、合成した rotundone 標品を用いて、GC-O における濃度による香気の違いを検証したところ、マススペクトルが検出されない濃度では強く woody 香気のみが感じられたが、マススペクトルが検出されるような濃度では woody 香気の外にやや peppery/spicy 香気を感じられることが分かった。果物香気中の rotundone はマススペクトルを検出できないほどの極微量であるため、本研究においては woody 香気のみが検知されたと考えられる。また、rotundone は特に高濃度において匂いの順応 (一度嗅ぐと匂いを検知し辛く、あるいは、検知できなくなる現象) が非常に強いことも分かった。強い匂いの順応、低い閾値および GC-O における濃度依存の香気変化といった独特な香気特性を有している香気成分としては、前述の乳香の香気分析で見出された mustakone (図 3-7) が報告されているが⁷⁸⁾、食品の香気成分としては筆者の知る限り rotundone のみである。

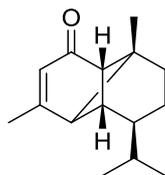


図 3-7 mustakone

3.3.4 果物モデル飲料への rotundone の添加効果

今回初めて果物中の香り成分として rotundone を同定し、興味深い香り特性を有していることが分かったことから、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの香り中の rotundone の香气的役割を明らかにすることを目的に官能評価を行った。Rotundone の香り閾値は水中で 8 ng/kg と非常に低いが、ヒノキ様の woody 香気が各果物（グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴー）の香りから直接感じられることはないため、果物中の rotundone の濃度は閾値付近であると予想された。そこで、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーのモデル飲料における閾値付近（5 ng/kg）での rotundone の効果を検証することとした。評価試料としては、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーのモデル飲料の rotundone 無添加品と添加品をそれぞれ用意した。Rotundone 無添加モデル飲料は、糖酸液（果糖ブドウ糖液糖 6.5%、クエン酸 0.1%）に各果物の香り再構築液を添加し調製し、rotundone 添加モデル飲料は、同様の糖酸液に同様の各果物の香り再構築液と rotundone（5 ng/kg）を添加し調製した。評価方法は一対比較法で行った。

官能評価の結果、rotundone は閾値付近の微量な添加であっても、果物飲料の風味に大きく影響を及ぼすことが分かった（図 3-8）。特に、いずれの果物飲料においても rotundone の添加により「complex flavor of natural fruits」と定義した「complex」のスコアが向上し、「unpleasant taste or artificial flavor (unnatural)」と定義した「discordant」のスコアが減少しており、このことから rotundone には果物飲料の風味を天然の果物の風味に近づける効果があることが示された。また、4種の果物の中でグレープフルーツとオレンジにおいては、rotundone の添加により「complex」「discordant」以外の複数の項目のスコアが向上しており、rotundone は柑橘類に特に有用な成分であるということが示唆された。

以上のことから、rotundone には果物飲料の複数の風味特徴に影響を及ぼし、天然感を増強させる効果があり、rotundone が天然の果物の風味の再現に非常に有用な成分であると結論された。

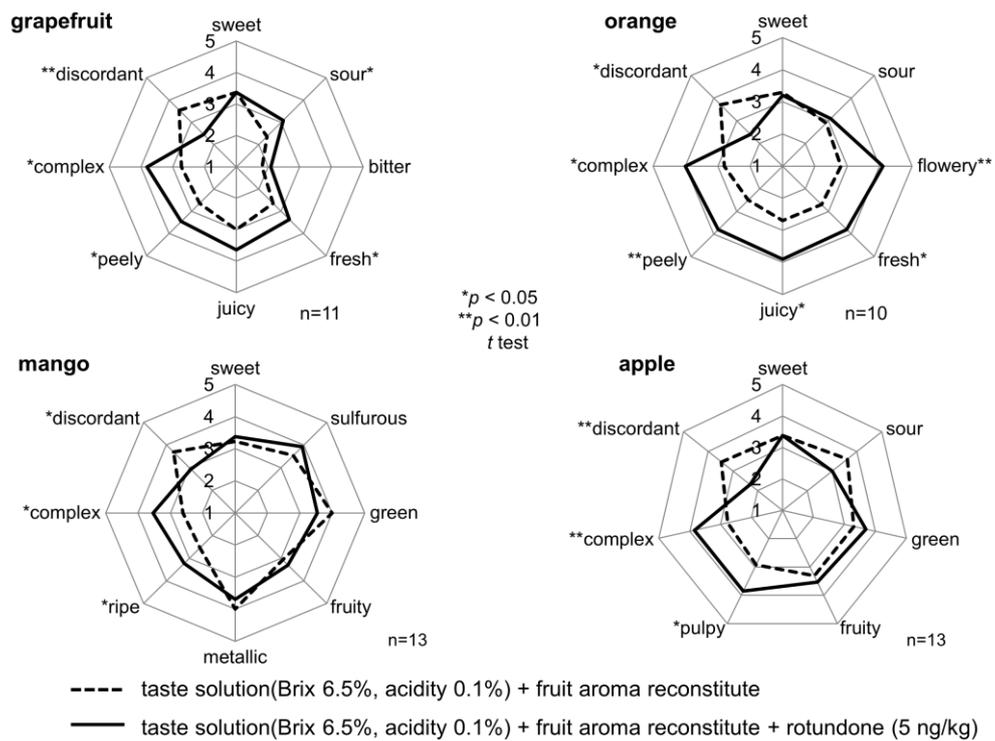


図 3-8 果物モデル飲料中での rotundone の添加効果

3.4 結論

本章では、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの香気濃縮物の GC-O において共通して強く検知される woody 香を有する構造不明の成分の解明を行った。本成分は各果物中で極微量であったため市販のオレンジ精油の高沸点留分 約 800 g を使用し、減圧蒸留、3 回のシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび 2 回の分取 HPLC を行い、純度 36.7% で目的の成分 1.7 mg を単離した。HRMS および 1D, 2D NMR から構造解析を行い、本成分を rotundone と推定した。市販の(-)-guaiol より文献を参考に rotundone を合成し、合成標品と単離した成分の各種分析データが一致したことから、オレンジ中の構造不明成分を rotundone と決定した。グレープフルーツ、リンゴ、マンゴー中の woody 香を有する構造不明成分に関しては、各香気濃縮物に対し分取 HPLC による分画を行うことにより、マススペクトルを得ることに成功し、マススペクトル、2 種のカラムでの RI および匂いの質の全てが rotundone と同一であったことから rotundone であると同定した。Rotundone はパチョリ精油やシラズワイン、シラズブドウ、各種スパイス、樽熟成されたスピリッツ、乳香、シプリオール精油などの重要香気成分として知られているが、一般的な果物の重要香気成分として rotundone を同定したのは今回の研究が初めてである。

文献記載の定量値から調製したグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーのモデル飲料へ rotundone を添加し官能評価を行ったところ、rotundone は閾値付近の微量な添加であっても果物飲料の風味に大きく影響を及ぼし、いずれの果物飲料においても「complex flavor of natural fruits」と定義した「complex」のスコアが向上し、「unpleasant taste or artificial flavor (unnatural)」と定義した「discordant」のスコアが減少したことから、果物飲料の風味を天然の果物の風味に近づける効果があることが示された。

3.1 でも述べたように、これまでの我々の研究において、rotundone はグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴー以外にも、様々な果物（レモン、ライム、ブラッドオ

レンジ、ミカン、バナナ、イチゴ、マスカット、メロン、スイカ、ナシなど) の GC-O 分析で、RI と匂いの質からその存在が示唆されている。Rotundone は極微量な添加であっても風味に影響を及ぼす効果を有しているため、これらの果物の風味においても rotundone は重要な役割を持っていると考えられる。すなわち、rotundone をフルーツフレーバーへ使用することにより、より天然感のあるフルーツフレーバーおよび果物飲料の開発が可能となったと考える。

第四章

グレープフルーツ中の rotundone の定量とグレープフルーツ香気への有用性評価⁹⁰⁾

4.1 序

グレープフルーツ (grapefruit、*Citrus paradisi*) は、文旦 (pomelo、*Citrus maxima*) とオレンジ (*Citrus sinensis*) の交配によって、18 世紀に誕生したとされている。果皮は黄色～オレンジ色を呈しており、果肉の色によって、ホワイトグレープフルーツ、ピンクグレープフルーツ、レッドグレープフルーツなどの品種に分けられる。グレープフルーツの名は、ブドウの房のように実をつけることに由来して名付けられたが、学名の「*paradisi*」は「楽園 (paradise)」を意味するラテン語で、その名にふさわしく特徴的で嗜好性の高い香気を有している。そのため、グレープフルーツの香調は世界的に人気が高く、フレーバーの需要も多い。グレープフルーツの天然香料の産地としてはアメリカ フロリダ州が有名であるが、ハリケーンや病害の被害を受けやすく、生産量および価格が不安定である。そのため、可能な限り合成香料のみで構成されたグレープフルーツフレーバーを製造することが産業的に望まれている。

グレープフルーツの果皮および果汁の香気分析は古くから行われており、様々な香気成分が既に報告されている^{80,91-95)}。Nootkatone^{91,96)}や 1-*p*-menthene-8-thiol^{93,97)}は、グレープフルーツ様の香気を有する最も著名なグレープフルーツの重要香気成分である。特に、1-*p*-menthene-8-thiol は、thioterpineol や grapefruit mercaptan と呼ばれ、最も閾値の低い香気成分としても知られている。Lin らは、コールドプレスで調製されたグレープフルーツ果皮油の GC-O 分析により、1,8-cineole、octanal、dodecanal、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal、 β -sinensal、nootkatone を重要香気成分として見出している⁹⁴⁾。一方で、Buettner らはグレープフルーツ果汁の AEDA および SIDA を行い、ethyl 2-methylpropanoate、ethyl butanoate、(*S*)-ethyl 2-methylbutanoate、wine lactone、(*Z*)-3-hexenal、

trans-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal、4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one、1-*p*-menthene-8-thiol を重要香気成分であると報告している^{80,95)}。

第三章において、著者らはグレープフルーツの新規重要香気成分として **rotundone** を同定し、**rotundone** が閾値付近の微量な添加でグレープフルーツ飲料の風味を天然の果物の風味に近づける効果があることを見出した⁷⁴⁾。そこで、本研究ではグレープフルーツに着目し、**rotundone** の効果について詳細に把握することにした。天然感のあるグレープフルーツフレーバーの開発にあたっては、グレープフルーツの香気における **rotundone** の寄与度やグレープフルーツ中での **rotundone** の濃度を把握し、グレープフルーツの香気における **rotundone** の効果を検証することが重要である。本研究ではホワイトグレープフルーツおよびピンクグレープフルーツの果皮、果汁の香気における **rotundone** の貢献度を、AEDA により評価し、さらに SIDA での定量および OAV の算出により検証した。また、ホワイトグレープフルーツ香気における **rotundone** の役割を明らかにすることを目的に、定量値を用いた官能評価を行った。

4.2 試料および実験方法

4.2.1 試料および試薬・化合物

4.2.1.1 グレープフルーツ

スーパーマーケットで購入したフロリダ産のホワイトグレープフルーツおよびピンクグレープフルーツを試料として用いた。

4.2.1.2 試薬・化合物

Rotundone は 3.2.1.3 で合成した際と同様の方法で調製したが、最後の精製は行わず、純度 61.8% のものを用いた。*m*-Chloroperoxybenzoic acid、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine および acetic acid は東京化成工業株式会社（東京、日本）より、iodomethane-*d*₃ は太陽日酸株式会社（東京、日本）より、ヨウ素は純正化学株式会社（東京、日本）より、acetic anhydride は株式会社ダイセル（東京、日本）より、silica gel 60N (spherical neutral, particle size 63–210 μm) は関東化学株式会社（東京、日本）より、periodic acid、マグネシウム、Wakogel C-100 は和光純薬工業株式会社（大阪、日本）より購入した。その他の試薬および溶媒は分析グレードのものを使用した。官能評価で使用した香料は、長谷川香料株式会社保有のものを使用した。

4.2.1.3 Rotundone-*d*_{2,3} の合成

Rotundone-*d*_{2,3} は図 4-3 のスキームに従い、合成した。

(3*S*,5*R*,8*S*)-5-Acetyl-3,8-dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydroazulen-1(2*H*)-one (2)

氷冷下 (4 °C)、rotundone (**1**, 純度 61.8%, 2.0 g, 5.7 mmol) および NaHCO₃ (840 mg) の CH₂Cl₂ (30 mL) 懸濁溶液に、*m*-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA, 純度 65%, 3.7 g, 13.9 mmol) を加えた。室温で 1 時間攪拌後、氷冷下 (4 °C) で冷却し、10% Na₂S₂O₃ 水溶液

を加えた。AcOEt で抽出し、有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄にて乾燥して、減圧下濃縮した。得られた濃縮物 (2.7 g) を THF (30 mL) に溶解させ、氷冷下 (4 °C) で冷却した。Periodic acid (2.1 g, 9.2 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。再度、氷冷下 (4 °C) で冷却し、10% Na₂S₂O₃ 水溶液を加えた。AcOEt で抽出し、有機層を飽和 NaHCO₃ 水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (2.6 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 100 g, *n*-hexane/Et₂O=5/1~4/1, v/v) で精製し、5-acetyl-3,8-dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydroazulen-1(2*H*)-one (**2**, 751 mg, 収率 60%) を得た。

¹H NMR: δ 3.01 (1H, ddq, *J* = 11.2, 3.4 and 7.2), 2.64–2.72 (2H, m), 2.60 (1H, dd, *J* = 18.8 and 6.8), 2.41–2.50 (2H, m), 2.22 (3H, s), 2.03 (1H, m), 1.99 (1H, br d, *J* = 18.8), 1.76–1.88 (2H, m), 1.55 (1H, m), 1.14 (3H, d, *J* = 6.8), 0.99 (3H, d, *J* = 7.2). ¹³C NMR: δ 210.7, 207.8, 175.1, 145.5, 51.4, 42.9, 37.9, 32.0, 31.9, 28.3, 27.3, 26.9, 19.1, 17.5. GC-MS (EI): 221 (10), 220 (M⁺, 66), 205 (6), 191 (10), 178 (19), 177 (100), 175 (13), 163 (19), 162 (9), 161 (6), 159 (16), 150 (9), 149 (18), 147 (21), 145 (10), 136 (8), 135 (50), 134 (6), 133 (16), 131 (7), 121 (14), 119 (15), 117 (7), 108 (6), 107 (30), 105 (23), 93 (28), 92 (6), 91 (37), 81 (9), 79 (21), 78 (6), 77 (22) 71 (6), 69 (10), 67 (7), 65 (10), 55 (12), 53 (8), 43(50), 41 (14), 39 (9). HRMS (EI) calculated for C₁₄H₂₀O₂: 220.14633, found 220.14694.

(3*S*,5*R*,8*S*)-5-(2-Hydroxy-1,1,1-*d*₃-propan-2-yl)-3,8-dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydroazulen-1(2*H*)-one (**3**)

窒素雰囲気下、マグネシウム (turnings, 267 mg, 11 mmol) と THF (9 mL) の懸濁液に、室温でヨウ素 (触媒量) を加え、溶液の茶色が消えるまで攪拌した。Iodomethane-*d*₃ (1.5 g, 10 mmol) の THF 溶液 (10 mL) を、還流が維持されるように滴下し、滴下後室温で 40 分攪拌して、CD₃MgI 溶液を調製した。**2** (580 mg, 2.6 mmol) の Et₂O 溶液 (10 mL)

に、調製した CD_3MgI 溶液を室温で 10 分かけて滴下した。そのまま 10 分攪拌した後、氷冷下 ($4\text{ }^\circ\text{C}$) で冷却し、飽和 NH_4Cl 水溶液を加えた。AcOEt で抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、 MgSO_4 にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (682 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 15 g, *n*-hexane/AcOEt=3/1, v/v) で精製し、5-(2-hydroxy-1,1,1- d_3 -propan-2-yl)-3,8-dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydroazulen-1(2H)-one (**3**, 224 mg, 収率 36%) を得た。

^1H NMR: δ 2.95 (1H, ddq, $J = 11.2, 3.4, \text{ and } 7.2$), 2.68–2.74 (2H, m), 2.59 (1H, dd, $J = 18.8$ and 6.4), 2.28 (1H, dd, $J = 15.6$ and 12.4), 1.97 (1H, br d, $J = 18.8$), 1.91–1.96 (1H, m), 1.77–1.83 (1H, m), 1.45–1.63 (2H, m), 1.60 (1H, br s), 1.35 (1H, ddq, $J = 12.0, 10.0, \text{ and } 2.0$), 1.26 and 1.21 (diastereomer, total 3H, each s,), 1.14 (3H, d, $J = 7.6$), 1.00 (3H, d, $J = 7.2$). ^{13}C NMR: δ 208.2, 177.4, 145.2, 73.1, 49.7, 43.0, 37.9, 32.8, 32.0, 28.0, 27.1, 26.6, 25.7, 19.3, 17.8. GC-MS (EI): 239 (M^+ , 0.5), 222 (8), 221 (53), 192 (21), 179 (18), 178 (73), 177 (20), 175 (10), 164 (14), 163 (68), 150 (19), 149 (11), 148 (8), 147 (20), 145 (6), 136 (12), 135 (13), 133 (9), 121 (11), 119 (12), 107 (14), 105 (14), 93 (13), 91 (22), 79 (13), 77 (12), 69 (6), 62 (100), 55 (7), 46 (7), 43 (11), 41 (9). HRMS (EI) calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{D}_3\text{O}_2$: 239.19646, found 239.19847.

(3*S*,5*R*,8*S*)-2-(3,8-Dimethyl-1-oxo-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroazulen-5-yl)-1,1,1- d_3 -propan-2-yl acetate (**4**)

3 (218 mg, 0.910 mmol) と acetic anhydride (1.0 g, 10 mmol) の混合溶液に、氷冷下 ($4\text{ }^\circ\text{C}$) *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP, 5.6 mg, 0.046 mmol) を加え、そのまま 30 分攪拌した。さらに *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (28 mg, 0.23 mmol) と acetic anhydride (1.0 g, 10 mmol) を加え、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ で終夜攪拌した。飽和 NH_4Cl 水溶液を加え、AcOEt で抽出した後、有機層を飽和 Na_2CO_3 水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、 MgSO_4 にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (472 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N:

10 g, *n*-hexane/AcOEt=10/1, v/v) で精製し、2-(3,8-dimethyl-1-oxo-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroazulen-5-yl)-1,1,1-*d*₃-propan-2-yl acetate (**4**, 219 mg, 収率 86%) を得た。本化合物は GC 分析中に熱分解してしまい、正確なマススペクトルを得ることができなかった。不安定であることが懸念されたため、そのまま次の反応に使用した。

*Rotundone-d*_{2,3} (a mixture of rotundone-*d*₂, **5** and rotundone-*d*₃, **6**)

4 (215 mg, 0.764 mmol) を、270~280 °C で 1 時間半攪拌した。残渣 (165 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 10 g, *n*-hexane/AcOEt=30/1, v/v) で精製し、rotundone-*d*_{2,3} (**5+6**, 87.2 mg) を得た。しかしながら、GC-MS 分析の結果、rotundone-*d*₄ が少量存在していることが分かったので、rotundone-*d*_{2,3} (69.5 mg) に acetic acid (20 mL) を加え、270~280 °C で acetic acid を留去しながら 1 時間攪拌した。残渣 (484 mg) を AcOEt で希釈し、飽和 Na₂CO₃ 水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (98.9 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N: 5 g, *n*-hexane/AcOEt=30/1, v/v) で精製し、rotundone-*d*_{2,3} (**5+6**, 64.5 mg) を得た。GC-MS 分析の結果、rotundone-*d*₄ は全く存在していなかった。

¹H NMR: δ 4.74 (0.7H, d, *J* = 1.6), 4.70 (0.7H, d, *J* = 1.6), 2.99 (1H, ddq, *J* = 11.2, 3.2, and 7.2), 2.72 (1H, app quint, *J* = 6.4), 2.60 (1H, dd, *J* = 6.4 and 18.8), 2.59 (1H, dd, *J* = 15.6 and 12.4), 2.34 (1H, br dt, *J* = 16.0 and 1.6), 2.05–2.02 (1H, m), 1.97 (1H, dt, *J* = 18.4 and 1.2), 1.91–1.79 (3H, overlapping m), 1.76 (0.9H, s), 1.57–1.48 (1H, m), 1.12 (3H, d, *J* = 7.2), 1.01 (3H, d, *J* = 7.2). ¹³C NMR: δ 208.1, 177.0, 151.0, 145.4, 109.0, 46.1, 43.0, 37.9, 36.8, 32.6, 30.7, 26.8, 20.2, 19.2, 17.5.

¹H NMR における rotundone-*d*_{2,3} の isopropenyl 基の CH₃ (δ 1.76) と CH₂ (δ 4.74, 4.70) に由来するシグナルの積分値は、rotundone の対応するシグナルの積分値と比較すると小さく、rotundone-*d*_{2,3} の isopropenyl 基の CH₂ (δ 4.74, 4.70) の積分値 (1.4) から、

rotundone- d_2 :rotundone- d_3 =3:7であることが分かった。また、rotundone- $d_{2,3}$ の CH_3 (δ 1.76)のカップリングは、rotundoneの対応するシグナルのカップリングが broad singlet なのに対し singlet であった。 ^{13}C NMRにおける rotundone- $d_{2,3}$ の isopropenyl 基の CH_3 に由来するシグナル (δ 20.2) および CH_2 に由来するシグナル (δ 151.0 および 109.0) の積分値は、rotundoneの対応するシグナルの積分値と比較すると小さかった。以上のことから、rotundoneの isopropenyl 基の CH_3 基あるいは CH_2 基が重水素化されていると考えられる。Rotundone- d_2 : GC-MS (EI): 221 (23), 220 (M^+ , 100), 205 (53), 203 (34), 178 (10), 177 (18), 175 (17), 165 (28), 164 (16), 163 (33), 162 (30), 161 (20), 150 (17), 149 (25), 148 (14), 147 (25), 137 (49), 136 (15), 135 (32), 134 (15), 133 (17), 122, (17), 121 (36), 120 (30), 119 (24), 117 (10), 109 (23), 108 (15), 107 (35), 106 (17), 105 (33), 95 (21), 94 (12), 93 (36), 92 (19), 91 (52), 81 (15), 80 (13), 79 (36), 78 (15), 77 (39), 69 (23), 67 (20), 65 (17), 55 (18), 53 (17), 43 (21), 42 (15), 41 (31), 40 (11), 39 (18). HRMS (EI) calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{D}_2\text{O}$: 220.17962, found 220.17883.

Rotundone- d_3 : GC-MS (EI): 222 (18), 221 (M^+ , 100), 206 (44), 203 (39), 178 (13), 177 (9), 175 (16), 166 (28), 165 (14), 164 (41), 163 (14), 162 (15), 161 (17), 151 (9), 150 (20), 149 (11), 148 (13), 147 (30), 138 (9), 137 (44), 136 (20), 135 (20), 134 (9), 133 (18), 124 (10), 123 (28), 122 (28), 121 (18), 120 (10), 119 (22), 117 (12), 115 (8), 110 (13), 109 (19), 108 (19), 107 (23), 106 (8), 105 (33), 98 (11), 96 (8), 95 (13), 94 (11), 93 (30), 92 (13), 91 (52), 85 (12), 81 (13), 80 (10), 79 (34), 78 (11), 77 (37), 70 (9), 69 (16), 67 (20), 66 (8), 65 (17), 55 (18), 53 (15), 44 (10), 43 (18), 42 (11), 41 (32), 40 (9), 39 (17). HRMS (EI) calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{D}_3\text{O}$: 221.18590, found 221.18516.

4.2.2 グレープフルーツ果皮の極性画分の調製

グレープフルーツ（ホワイト: 25 個, ピンク: 20 個）の果皮のフラベドのみをナイフでむき、得られたフラベド（ホワイト: 1.20 kg, ピンク: 1.06 kg）に *n*-pentane（ホワイト: 2.40 L, ピンク: 2.12 L）を加え、粉碎しながら 30 分激しく攪拌した。デカンテーションにより *n*-pentane 溶液を分離し、残渣部に新しい *n*-pentane（ホワイト: 1.20 L, ピンク: 1.06 L）を加え、30 分激しく攪拌した。デカンテーションにより *n*-pentane 溶液を分離後、先の *n*-pentane 溶液と合わせて、Na₂SO₄ で乾燥した。常圧下 43 °C で約 200 mL まで濃縮し、35 °C で SAFE⁹ を行った。得られた留分を常圧下 43 °C で濃縮し、グレープフルーツ果皮油（ホワイト: 50.9 g, ピンク: 44.0 g）を得た。得られたグレープフルーツ果皮油（ホワイト: 15.0 g, ピンク: 15.0 g）に対しシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Wakogel[®] C-100: 50 g）を行った。展開液として *n*-pentane（500 mL, Fr.1）、*n*-pentane/Et₂O=200/1（300 mL, Fr.2）、*n*-pentane/Et₂O=1/1（300 mL, Fr.3）、Et₂O（500 mL, Fr.4）を順に流し、4 画分に分けた。Fr. 3 および Fr. 4 を合わせ、常圧下 43 °C で 100 μL まで濃縮し、グレープフルーツ果皮の極性画分を得た。

4.2.3 グレープフルーツ果汁の香気濃縮物の調製

グレープフルーツ（ホワイト: 25 個, ピンク: 20 個）の果皮をナイフでむき、得られた果肉（ホワイト: 8.70 kg, ピンク: 7.84 kg）を搾り、搾り汁をさらしで濾過し、グレープフルーツ果汁（ホワイト: 5.56 kg, ピンク: 5.00 kg）を得た。果汁に対し 35 °C で SAFE を行い、得られた留分（ホワイト: 4.53 kg, ピンク: 3.97 kg）に食塩（15%, w/w）を加え、Et₂O（ホワイト: 1.8 L, ピンク: 1.6 L）で抽出した。Et₂O 溶液を Na₂SO₄ で乾燥し、常圧下 43 °C で 100 μL まで濃縮し、グレープフルーツ果汁の香気濃縮物を得た。なお、香気成分の同定のための GC-MS 分析には、香気濃縮物をさらに濃縮したものを用いた（ホワイト: 50 μL, ピンク: 30 μL）。

4.2.4 AEDA¹⁸⁾

グレープフルーツ果皮の極性画分およびグレープフルーツ果汁の香気濃縮物に対し AEDA を行い、各香気成分の寄与度を調べた。グレープフルーツ果皮の極性画分およびグレープフルーツ果汁の香気濃縮物を CH_2Cl_2 にて 1:4、1:16、1:64、1:256、1:1024 の割合になるように順次希釈し、各希釈液に対し 2 名で GC-O にて分析を行い、FD factor を決定した。

4.2.5 SIDA による rotundone の定量

4.2.5.1 検量線の作成

Rotundone と rotundone- $d_{2,3}$ の混合割合 (1:10~6:1) と、それぞれの混合割合における 4.2.5.4 に記載の GC-MS 測定にて得られた rotundone と rotundone- $d_{2,3}$ のピーク面積値の比をプロットし検量線を作成した (図 4-5)。Rotundone のピーク面積値は m/z 218.2 の selected ion monitoring (SIM) モードで測定した際に得られたピーク面積値を、rotundone- $d_{2,3}$ のピーク面積値は m/z 220.2 および 221.2 の SIM モードで測定した際に得られたピーク面積値の和を用いた。作成した検量線は良い直線性を示した ($R^2=0.9998$)。

4.2.5.2 グレープフルーツ果皮における rotundone の定量

グレープフルーツ果皮のフラベド (ホワイト: 202 g, ピンク: 198 g) を粉砕し、そこに rotundone- $d_{2,3}$ (純度 93.5%, GC-FID) の EtOH 溶液 (1.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0.5 mL を添加した。 CH_2Cl_2 (各 400 mL) を加え、30 分激しく攪拌し、濾紙濾過して CH_2Cl_2 溶液を得た。果皮残渣に対し CH_2Cl_2 (各 200 mL \times 2 回) で同様の方法で抽出し、得られた CH_2Cl_2 溶液を合わせて、減圧下で約 50 mL まで濃縮し、50 $^\circ\text{C}$ で SAFE を行った。得られた留分を減圧濃縮し、得られた濃縮物 (ホワイト: 5.4 g, ピンク: 5.9 g) に対しシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wakogel[®] C-100: 50 g) を行った。展開液として *n*-hexane (各 500

mL)、AcOEt (各 500 mL) を順に流し、AcOEt 画分を減圧濃縮し、濃縮物 (ホワイト: 62.7 mg, ピンク: 112.4 mg) を得た。得られた濃縮物に対し、4.2.5.5 に記載の条件で 2 回の分取 HPLC による分画を行い、HPLC 分画物 (ホワイト: 18.7 mg, ピンク: 15.2 mg, 各エーテル溶液) を得た。得られた HPLC 分画物に対し、4.2.5.4 に記載の GC-MS 測定を行い、 m/z 218.2 で得られた rotundone のピーク面積値と m/z 220.2 と 221.2 で得られた rotundone- $d_{2,3}$ のピーク面積値の和を算出し、4.2.5.1 で作成した検量線より rotundone の濃度を算出した。この一連の操作を 3 回行い、3 回の平均を定量値とした。

4.2.5.3 グレープフルーツ果汁における rotundone の定量

グレープフルーツ果汁 (ホワイト: 801 g, ピンク: 1015 g) に、rotundone- $d_{2,3}$ (純度 93.5%, GC-FID) の EtOH 溶液 (10.1 ng/mL) を 1 mL 添加し、食塩 (各 120 g) を加えた後、Et₂O (各 800 mL) で抽出した。Et₂O 溶液を Na₂SO₄ で脱水し、減圧下で約 100 mL まで濃縮し、50 °C で SAFE を行った。得られた留分を Na₂SO₄ で脱水し、減圧濃縮して得られた濃縮物 (ホワイト: 16.7 mg, ピンク: 12.8 mg) に対し、4.2.5.5 に記載の条件で分取 HPLC による分画を行い、HPLC 分画物 (ホワイト: 21.2 mg, ピンク: 20.4 mg, 各エーテル溶液) を得た。得られた HPLC 分画物に対し、4.2.5.4 に記載の GC-MS 測定を行い、 m/z 218.2 で得られた rotundone のピーク面積値と m/z 220.2 と 221.2 で得られた rotundone- $d_{2,3}$ のピーク面積値の和を算出し、4.2.5.1 で作成した検量線より rotundone の濃度を算出した。この一連の操作を 3 回行い、3 回の平均を定量値とした。

4.2.5.4 GC-MS 測定

本項の GC-MS 測定は、Agilent 5975 質量検出器 (Agilent Technologies) が接続された Agilent 7890 ガスクロマトグラフにて行った。カラムは InertCap WAX (0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness; ジーエルサイエンス) を使用した。注入口温度は 250 °C に設

定し、各試料はスプリットレス モードで1 μL 注入した。オーブンは、最初の5分間40 $^{\circ}\text{C}$ で保持した後、10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ にて190 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温し、190 $^{\circ}\text{C}$ で20分保持した。キャリアガスにはヘリウムを使用し、1.0 mL/min の一定流量とした。

4.2.5.5 分取 HPLC 分画

分取HPLCによる分画は、Shimadzu LC-20AT、Shimadzu SIL-20AC、Shimadzu CTO-20A、Shimadzu SPD-M20A、Shimadzu CBM-20A（島津製作所）から構成されたシステムを用いた。「4.2.5.2 グレープフルーツ果皮における rotundone の定量」では2回のHPLC分画を、「4.2.5.3 グレープフルーツ果汁における rotundone の定量」では1回のHPLC分画を行った。1回目のHPLC分画は、以下に示した条件で行った。

表 4-1 1回目のHPLC分画条件

| | |
|--------|---|
| 原料： | 約20% MeOH 溶液 |
| カラム： | Inertsil ODS-3 (5 μm particle size, 250 mm \times 4.6 mm i.d.; ジーエルサイエンス) |
| 移動相： | MeOH/H ₂ O=70/30 \rightarrow 80/20 (0 \sim 10 min), 90/10 (10 \sim 15 min) |
| 流速： | 2.0 mL/min |
| カラム温度： | 40 $^{\circ}\text{C}$ |
| 分取時間： | 8.6 \sim 10.0 min |

得られた留分に対し、減圧下溶媒を除去し、食塩（15%, w/w）を加え、Et₂O で抽出した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、減圧濃縮し、HPLC 分画物を得た。4.2.5.2 においては、得られた HPLC 分画物に対して、2回目の HPLC 分画を以下に示した条件で行った。

表 4-2 2 回目の HPLC 分画条件

| | |
|--------|--|
| 原料： | 約 10% MeCN 溶液 |
| カラム： | Sunrise C28 (5 μ m particle size, 250 mm \times 4.6 mm i.d.; クロマトテクノロジー) |
| 移動相： | MeCN/H ₂ O=80/20 (0~20 min) |
| 流速： | 1.0 mL/min |
| カラム温度： | 40 $^{\circ}$ C |
| 分取時間： | 6.0~7.5 min |

得られた留分は、1 回目の HPLC 分画と同様の方法にて処理し、HPLC 分画物を得た。

4.2.6 機器分析

4.2.6.1 GC-MS

「4.2.1.3 Rotundone-*d*_{2,3} の合成」における GC-MS 測定は、Agilent 5975 質量検出器と FID が接続された Agilent 7890 ガスクロマトグラフにて行った。カラムは InertCap WAX (0.25 mm i.d. \times 60 m, 0.25 μ m film thickness; ジーエルサイエンス) を使用した。カラム末端は 2 つに分岐し、不活性キャピラリーカラムにて質量検出器および FID に分配した。注入口温度は 250 $^{\circ}$ C に設定し、各試料はスプリット比 50:1 にて 1 μ L 注入した。オーブンは、最初の 3 分間 40 $^{\circ}$ C で保持した後、3 $^{\circ}$ C/min にて 230 $^{\circ}$ C まで昇温し、キャリアガスにはヘリウムを使用し、1.8 mL/min の一定流量とした。マススペクトルは EI モードで 70 eV のイオン化電圧にて測定を行った。合成品の純度は FID によって得られるクロマトグラムのピーク面積値より算出した。

4.2.6.2 GC-MS/O

GC-MS/O 測定は、Agilent 5975 質量検出器と GERSTEL ODP 3 匂い嗅ぎ口が接続された Agilent 7890 ガスクロマトグラフにて行った。カラムは InertCap WAX (0.25 mm i.d. \times 60 m, 0.25 μ m film thickness) を使用した。カラム末端は 2 つに分岐し、不活性キャピ

ラリーカラムにて質量検出器および匂い嗅ぎ口に分配した。注入口温度、試料注入量、スプリット比、MS イオン化条件は 4.2.6.1 記載の GC-MS 測定と同一の条件で行った。オーブンは最初の 3 分間 40 °C で保持し、その後 3 °C/min にて 230 °C まで昇温し、キャリアガスにはヘリウムを使用し、1.8 mL/min の一定流量とした。各化合物の RI は C5 から C30 の直鎖アルカンの保持時間を基準に算出した。

4.2.6.3 HRMS

HRMS は、AccuTOF GCv 4G (日本電子) にて測定した。カラム、注入口温度、試料注入量、スプリット比、オーブン昇温条件、キャリアガス、流量は 4.2.6.2 記載の GC-O 測定と同一の条件で行った。

4.2.6.4 NMR

¹H NMR (400 MHz)、¹³C NMR (100 MHz) は、JEOL JNM-ECX400 (日本電子) にて測定した。測定は CDCl₃ 中、tetramethylsilane を内部標準化合物として用いた ($\delta = 0.00$ ppm)。ケミカルシフトは ppm、カップリングコンスタント (*J* 値) は Hz で記載した。

4.2.7 官能評価⁶⁰⁻⁶⁵⁾

長谷川香料株式会社 総合研究所の所員 12 名をパネリストとして評価を行った。評価試料としては、搾りたてのホワイトグレープフルーツ果汁とホワイトグレープフルーツ香気再構築液の rotundone 無添加品 (香気再構築液 A) と添加品 (香気再構築液 B) を用意した。香気再構築液 A は、3.2.5 で調製したホワイトグレープフルーツ香気再構築液を用いた。香気再構築液 B は、香気再構築液 A に rotundone (29.6 ng/kg) を添加して調製した。

評価用語は、事前のセッションにおいてパネリストに搾りたてのホワイトグレープフ

ルーツ果汁の匂いを評価しディスカッションを行いながら7つの評価用語 (sweet, sour, bitter, fresh, juicy, peely, harmonious) を選定した。乱数表により3桁の試料番号をつけた試料3種を1セットとしてパネリストに提示した。パネリストは各試料の香気に関して、各評価用語につき、1 (感じない)、2 (弱い)、3 (普通)、4 (強い)、5 (非常に強い) の5段階で評価を行った。官能評価実験は23℃に設定された静かな部屋で行った。各評価用語についてスコア平均値を算出し、スパイダーチャートにプロットした。

官能評価結果の有意差を検定するため、分散分析およびTukeyの多重比較検定を行った。分散分析では修正ファクター、平方和、自由度、平均平方、分散比 (F 値) を算出し、確立水準 0.05 および 0.01 で有意差を検定した。Tukeyの多重比較検定ではそれぞれの評価用語について標準誤差および最小有意差を算出し、確立水準 0.05 で有意差を検定した。

4.3 結果および考察

4.3.1 グレープフルーツの果皮と果汁の重要香気成分の決定

ホワイトグレープフルーツおよびピンクグレープフルーツの果皮および果汁の香気における rotundone の貢献度を調べるため、AEDA を行った。果皮に関しては、揮発性成分（香気濃縮物）の 9 割がテルペン系炭化水素で構成されており、グレープフルーツ香気に大きく寄与しているのは微量の含酸素部（極性画分）であることが過去の研究で分かっていたことより、香気濃縮物からシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて極性画分を調製し、得られた極性画分に対し AEDA を行った。AEDA の結果、rotundone はいずれにおいても高い FD factor を示した（表 4-3）。特に、果汁の香気濃縮物においては、すでに重要香気成分として知られている *trans*-4,5-epoxydec-2(*E*)-enal、ethyl butanoate、ethyl 2-methylbutanoate と共に最も高い FD factor（FD 1024）であった。4.1 で述べたようにグレープフルーツの香気に関してはこれまで様々な報告があるが、rotundone が高い FD factor を有していることを示したのは今回の分析が初めてである。

表 4-3 ホワイトおよびピンクグレープフルーツ果皮および果汁の重要香気成分

| No. | odorant | odor quality ^a | RI on InertCap WAX | FD factor ^b | identification mode ^c |
|------------------------|---|---------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| white grapefruit peel | | | | | |
| 1 | octanal | aldehydic | 1299 | 1024 | MS, RI, GC-O |
| 2 | decanal | aldehydic | 1514 | 1024 | MS, RI, GC-O |
| 3 | linalool | floral | 1552 | 1024 | MS, RI, GC-O |
| 4 | (<i>E</i>)-non-2-enal | fatty | 1557 | 1024 | RI, GC-O |
| 5 | <i>trans</i> -4,5-epoxydec-2(<i>E</i>)-enal | metallic | 2026 | 1024 | RI, GC-O |
| 6 | (<i>E,E</i>)-deca-2,4-dienal | fatty | 1834 | 1024 | MS, RI, GC-O |
| 7 | rotundone | woody | 2308 | 256 | RI, GC-O |
| 8 | nonanal | aldehydic | 1727 | 256 | MS, RI, GC-O |
| 9 | (<i>Z</i>)-hex-3-enal | green | 1156 | 256 | MS, RI, GC-O |
| pink grapefruit peel | | | | | |
| 1 | octanal | aldehydic | 1299 | 1024 | MS, RI, GC-O |
| 2 | decanal | aldehydic | 1514 | 1024 | MS, RI, GC-O |
| 3 | linalool | floral | 1552 | 1024 | MS, RI, GC-O |
| 4 | (<i>E</i>)-non-2-enal | fatty | 1557 | 1024 | RI, GC-O |
| 5 | <i>trans</i> -4,5-epoxydec-2(<i>E</i>)-enal | metallic | 2026 | 1024 | RI, GC-O |
| 6 | (<i>E,E</i>)-deca-2,4-dienal | fatty | 1834 | 256 | MS, RI, GC-O |
| 7 | rotundone | woody | 2308 | 256 | RI, GC-O |
| 8 | nonanal | aldehydic | 1727 | 256 | MS, RI, GC-O |
| white grapefruit juice | | | | | |
| 1 | ethyl butanoate | fruity | 1043 | 1024 | MS, RI, GC-O |
| 2 | <i>trans</i> -4,5-epoxydec-2(<i>E</i>)-enal | metallic | 2027 | 1024 | RI, GC-O |
| 3 | rotundone | woody | 2308 | 1024 | RI, GC-O |
| 4 | ethyl 2-methylbutanoate | fruity | 1059 | 256 | MS, RI, GC-O |
| 5 | ethyl methylpropionate | fruity | 972 | 256 | MS, RI, GC-O |
| 6 | vanillin | vanilla-like | 2606 | 256 | MS, RI, GC-O |
| pink grapefruit juice | | | | | |
| 1 | ethyl 2-methylbutanoate | fruity | 1059 | 1024 | MS, RI, GC-O |
| 2 | <i>trans</i> -4,5-epoxydec-2(<i>E</i>)-enal | metallic | 2027 | 1024 | RI, GC-O |
| 3 | rotundone | woody | 2308 | 1024 | RI, GC-O |
| 4 | wine lactone | sweet | 2285 | 256 | MS, RI, GC-O |
| 5 | hexanal | green | 1091 | 256 | MS, RI, GC-O |

^a Odor quality perceived at the sniffing port. ^b FD factor, flavor dilution factor

^c MS, reference mass spectrum; RI, retention indices; GC-O, gas chromatography-olfactometry.

4.3.2 グレープフルーツの果皮と果汁における rotundone の定量

Rotundone は黒胡椒や白胡椒では比較的高濃度で存在しているが、Shiraz ワインや他のスパイス類では低濃度であることが報告されている⁷⁶⁾。第三章において、グレープフルーツで rotundone を同定するにあたり、香気濃縮物に対し2回の HPLC 分画を行い、初めてマススペクトルを得ることができたことを踏まえると、グレープフルーツ中でも rotundone は低濃度であり、定量を行うにあたっては、同定の際と同様の香気濃縮物の分画が必要になると考えられた。そこで、今回定量方法として、分画工程が多くとも正確な定量が可能である SIDA²⁴⁾を選択した。

Rotundone の SIDA に関しては、安定同位体標識化合物として Genthner らが rotundone-*d*₄⁷⁷⁾を、Siebert らが rotundone-*d*₅⁹⁸⁾を報告している(図 4-1)。特に rotundone-*d*₅ に関しては、ワインや他の天然物の SIDA において内部標準物質として広く用いられている^{76,98-111)}。しかしながら、これら2つの安定同位体標識化合物はカルボニル基の α 位および γ 位が重水素化されているため、グレープフルーツ果汁のような比較的酸性の強い試料に用いた場合にカルボニル基の α 位および γ 位がプロトン化されてしまうことが危惧された。そのため、酸性条件下でもプロトン化が起こらないような安定同位体標識化合物として rotundone-*d*_{2,3} を新規に合成することとした(図 4-2)。

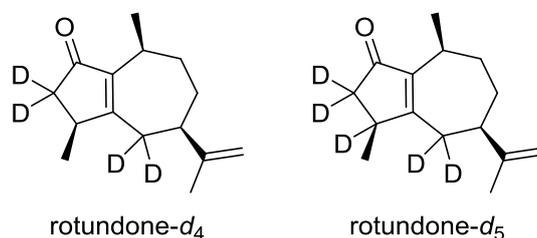


図 4-1 Rotundone-*d*₄ および rotundone-*d*₅

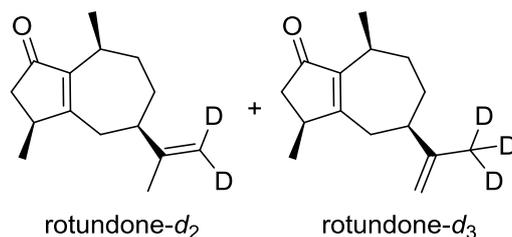


図 4-2 Rotundone- $d_{2,3}$

図 4-3 に示したように、rotundone を出発物質として、isopropenyl 基を epoxy 化および酸化開裂によって acetyl 基へと変換後、Grignierd 反応により重水素化された methyl 基を導入し、生じた水酸基を acetyl 化および熱分解による脱酢酸を行って、rotundone- $d_{2,3}$ を合成した。しかしながら、GC-MS 分析を行ったところ、 m/z 222 (rotundone- d_3 の「分子イオン+1」および rotundone- d_4 の「分子イオン」に由来) で抽出したイオンクロマトグラムにおいて、65.35~65.65 分のピークがブロードしており、65.35~65.45 分付近に rotundone- d_4 が存在していることが示唆された (図 4-4)。これは、脱酢酸の際に生じた acetic acid- d_1 によって rotundone- d_3 のカルボニルの α 位が重水素化されて副生したと考えられた。なお、rotundone- d_2 のカルボニルの α 位が重水素化されて生じた rotundone- d_3 ももちろん存在していたと考えられるが、GC-MS 分析では判別できなかった。これらの副生物は rotundone- $d_{2,3}$ が acetic acid- d_1 と加熱されたことで生じたと推測されるため、副生物を含む rotundone- $d_{2,3}$ に acetic acid を加え加熱すれば元に戻ると考えられた。そこで、rotundone- d_4 を含む rotundone- $d_{2,3}$ に acetic acid を加え、熱分解の際と同様の条件で加熱反応を行ったところ、 m/z 222 で抽出したイオンクロマトグラムにおいてピークがシャープになり、rotundone- d_4 の消失が確認され、純粋な rotundone- $d_{2,3}$ を得ることができた (図 4-4)。

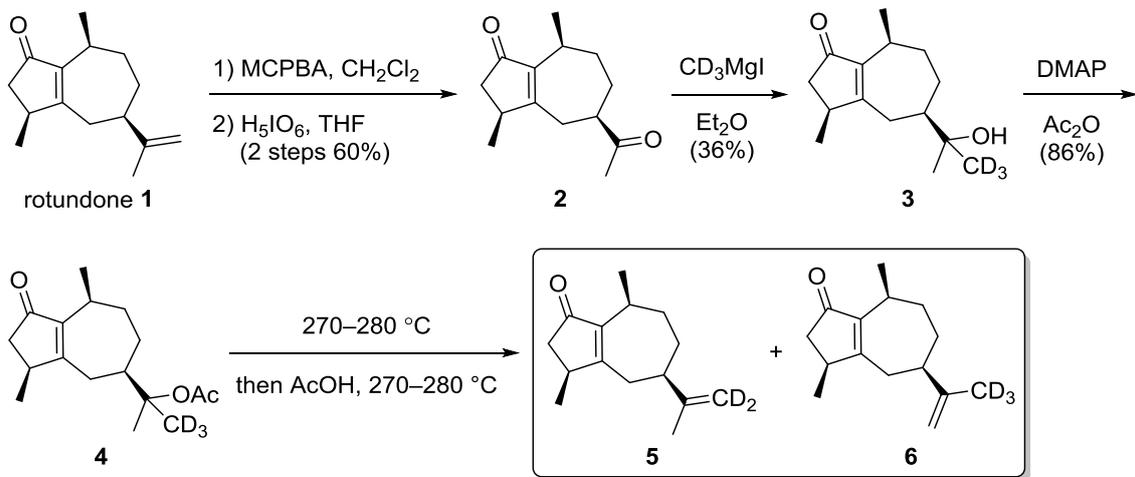
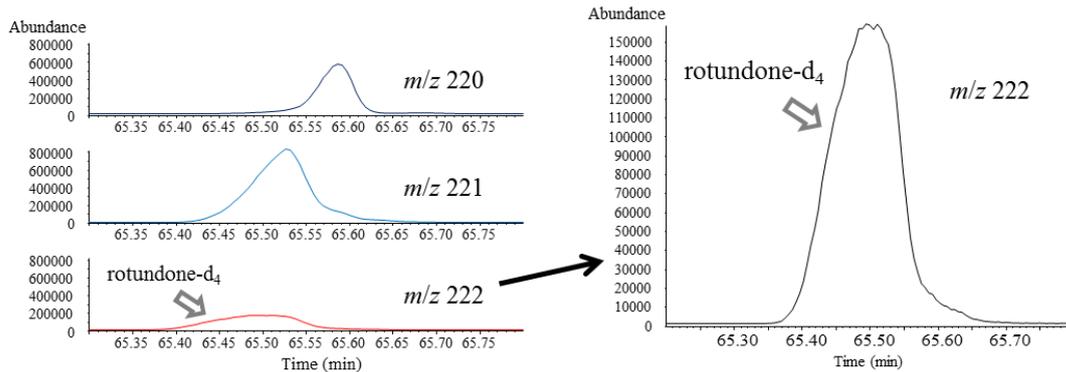


図 4-3 Rotundone-*d*_{2,3} の合成

before acetic acid treatment



after acetic acid treatment

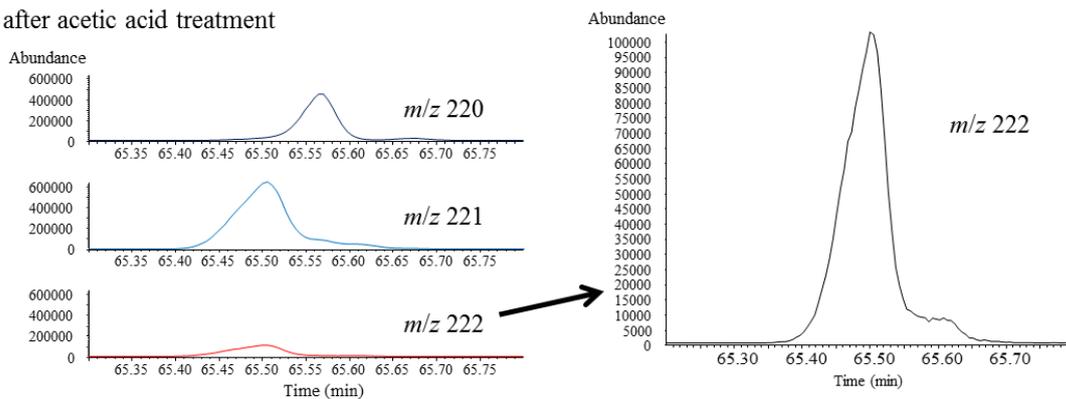


図 4-4 Acetic acid 処理前後の rotundone-*d*_{2,3} のイオンクロマトグラム

Rotundone と rotundone- $d_{2,3}$ の混合割合 (1:10~6:1) と、それぞれの混合割合における GC-MS 測定のピーク面積値の比から作成した検量線は非常に良い直線性 ($R^2=0.9998$) を示したため (図 4-5)、rotundone- $d_{2,3}$ を内部標準として用いてホワイトグレープフルーツおよびピンクグレープフルーツの果皮および果汁に対して SIDA を行った。なお、グレープフルーツ香気濃縮物の HPLC 分画物に対し、MD-GC-MS を使用して chemical ionization による rotundone および rotundone- $d_{2,3}$ の検出を試みたが、構造不明な不純物が目的のピークに重なってしまうことが分かったため、測定は GC-MS を使用して EI による SIM モード (m/z 218.2, 220.2, 221.2) での分析を選択した (図 4-6)。定量の結果、rotundone 存在量は果汁より果皮の方が多いことが分かった (表 4-4)。一般的に柑橘類の香気量は果汁よりも果皮の方が多いことが知られており、今回の定量結果はこのことと合致した。文献記載の rotundone の水中での閾値 (8 ng/kg)⁷⁶⁾ と今回の定量結果より、OAV を算出した。存在量の少ない果汁であっても OAV は 1 以上を示したことから、rotundone はホワイトグレープフルーツおよびピンクグレープフルーツの果皮および果汁において香气的に貢献している重要香気成分であることが証明された。

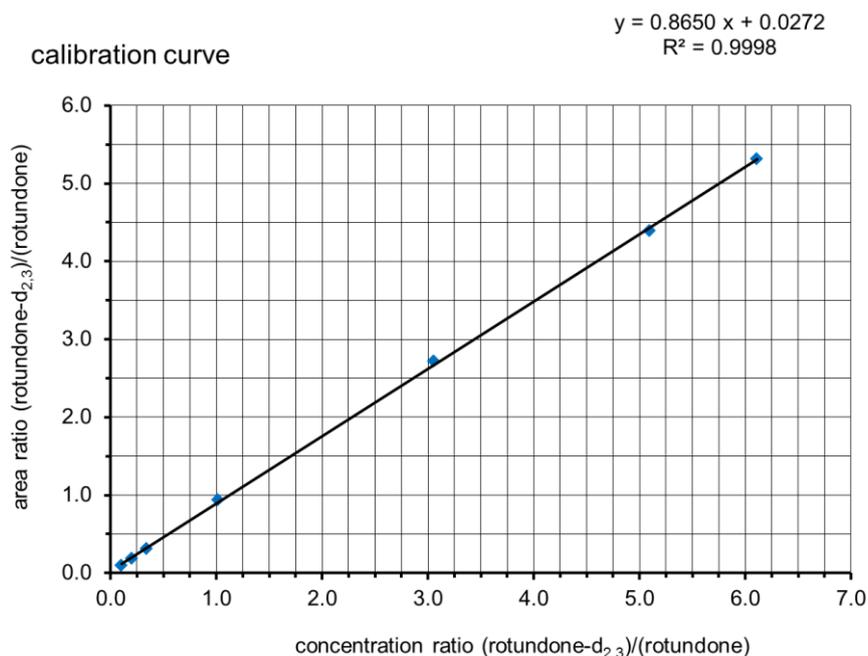


図 4-5 Rotundone と rotundone- $d_{2,3}$ の混合割合と GC-MS 面積比による検量線

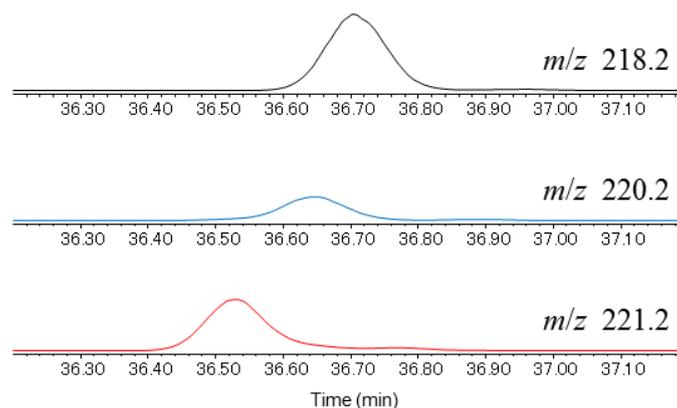


図 4-6 Rotundone および rotundone- d_2 、rotundone- d_3 の SIM モードでのイオンクロマトグラム (m/z 218.2, 220.2, 221.2)

表 4-4 ホワイトグレープフルーツ果皮、ピンクグレープフルーツ果皮、ホワイトグレープフルーツ果汁およびピンクグレープフルーツ果汁中の rotundone 存在量および odor activity value (OAV)

| | concentration (ng/kg) | OAV ^a |
|------------------------------|-----------------------|------------------|
| white grapefruit peel (WGP) | 2180 | 273 |
| pink grapefruit peel (PGP) | 1920 | 240 |
| white grapefruit juice (WGJ) | 29.6 | 4 |
| pink grapefruit juice (PGJ) | 49.8 | 6 |

^a Calculated with the odor threshold in water (8 ng/kg).

^b The relative standard deviations are as follows;

WGP: 9.89, PGP: 7.24, WGJ: 12.4, and PGJ: 26.9.

4.3.3 グレープフルーツ香気における rotundone の効果の検証

グレープフルーツ香気における rotundone の効果を検証するために、ホワイトグレープフルーツ果汁中の定量結果 (29.6 ng/kg) を用いて官能評価を行った。評価試料としては、搾りたてのホワイトグレープフルーツ果汁とホワイトグレープフルーツ香気再構築液の rotundone 無添加品 (香気再構築液 A) と添加品 (rotundone を 29.6 ng/kg 添加, 香

気再構築液 B) を用意した。なお、興味深いことに、香気再構築液 B には rotundone が閾値以上添加されているにもかかわらず、直接 woody 香気が感じられることはなかった。これは他の香気成分との相互作用によるものと考えている。

官能評価の結果、香気再構築液 B は香気再構築液 A に比べ、「fresh」「juicy」「peely」「harmonious」の項目が有意に向上し、ホワイトグレープフルーツ果汁のスコアに近づくことが分かった (図 4-7)。すなわち、rotundone は、天然中の存在量でグレープフルーツ香気に添加しても自身の持つ woody 香気が付与されることはなく、グレープフルーツの様々な香気特徴に影響し天然感を増強させることから、搾りたてのホワイトグレープフルーツの香りの再現に非常に有用な成分であると結論された。

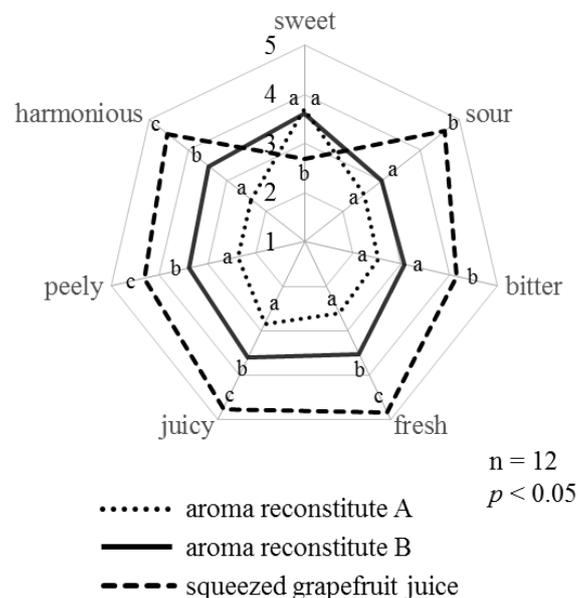


図 4-7 ホワイトグレープフルーツ香気再構築液に対する rotundone の添加効果 (異なる文字の付いている項目では有意に異なる)

4.4 結論

本研究では、香料産業的に需要が多いグレープフルーツに着目し、ホワイトグレープフルーツおよびピンクグレープフルーツの果皮、果汁の香りにおける rotundone の貢献度や存在量を AEDA や SIDA により詳細に調べた。各グレープフルーツの果皮の香り濃縮物の極性画分および果汁の香り濃縮物の GC-O および AEDA を行ったところ、rotundone はいずれにおいても高い FD factor を示した。SIDA を行うにあたり、果汁のような比較的酸性が強い条件下でもプロトン化が起こらないような安定同位体標識化合物として rotundone- $d_{2,3}$ を合成した。Rotundone- $d_{2,3}$ を内部標準物質として用い SIDA により各グレープフルーツの果皮、果汁中の rotundone の存在量を測定したところ、ホワイトグレープフルーツ果皮: 2180 ng/kg、ピンクグレープフルーツ果皮: 1920 ng/kg、ホワイトグレープフルーツ果汁: 29.6 ng/kg、ピンクグレープフルーツ果汁: 49.8 ng/kg であり、果汁より果皮の方が多いたことが分かった。一般的に柑橘類の香気量は果汁よりも果皮の方が多いたことが知られており、今回の定量結果と合致した。また、存在量を文献記載の閾値(8 ng/kg)で割った値である OAV は果汁であっても 1 以上を示すことから、rotundone が香气的に貢献していることが証明された。グレープフルーツの香りにおいて rotundone が大きく寄与していることを明らかにしたのは、本研究が初めてである。

グレープフルーツ香りにおける rotundone の効果を検証するために、搾りたてのホワイトグレープフルーツ果汁と文献記載の定量値から調製したホワイトグレープフルーツ香り再構築液の rotundone 無添加品(香り再構築液 A)と添加品(29.6 ng/kg 添加, 香り再構築液 B)を用いて官能評価を行った。官能評価の結果、香り再構築液 B は香り再構築液 A に比べ、「fresh」「juicy」「peely」「harmonious」の項目が有意に向上し、ホワイトグレープフルーツ果汁のスコアに近づくことが分かった。

以上のことから、rotundone はグレープフルーツ香りの再現に効果的な重要香り成分であり、rotundone を用いることによって、より天然感のある新規なグレープフルーツ

フレーバーの創生が可能となったと考える。

第五章

果物の新規香気成分としての rotundone 立体異性体の解明とその有用性評価¹¹²⁾

5.1 序

セスキテルペンは天然に広く存在し、フェロモン活性や抗腫瘍活性、抗ウイルス活性など様々な生物活性を有しているものが多い¹¹³⁾。芳香性のセスキテルペンもいくつか知られているが、特に含酸素セスキテルペンは精油において重要香気成分であることが多い。グレープフルーツ様の香気を有する *nootkatone* やパチョリ様の香気を有する *patchoulol*、オレンジ様の香気を有する α -*sinensal* や β -*sinensal* などの様々な芳香性含酸素セスキテルペンが知られている。セスキテルペンは3ユニットの *isoprene* から構成されているため構造的多様性が高く、さらに、構造が複雑なため天然からの単離や有機化学による合成も難しく、新規のセスキテルペンの構造解明は非常に困難である。しかしながら、未だ天然には新規の芳香性セスキテルペンが多く存在しており、それらの解明は香気分析分野や香料業界における重要なテーマの一つである。

第三章、第四章で研究対象であった rotundone は *guaiene* 骨格を有する含酸素セスキテルペンである。3つの不斉中心を有しているため(3*S*,5*R*,8*S*)-体である rotundone を含め8つの立体異性体が存在するが、rotundone の立体異性体に関しては、未だ天然からの同定や有機化学による合成などの報告はない。第三章、第四章でのグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴの GC-MS 分析において、rotundone と類似の RI およびマススペクトルを有する構造不明の成分が検出され、その物性より rotundone の立体異性体と推測された。Rotundone はグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴの香気に天然感を増強させる有用な成分であり、その立体異性体にも同様あるいはそれ以上の有用性があることが期待される。そこで本章では、この rotundone の立体異性体と推測される構造不明成分を解明し、その香気特性を明らかにすることを目的に検討を行った。

5.2 試料および実験方法

5.2.1 試料および試薬・化合物

5.2.1.1 試料

オレンジ精油の高沸点留分およびグレープフルーツ、リンゴ、マンゴーは、3.2.1.1 および 4.2.1.1 に記載のものを使用した。

5.2.1.2 試薬・化合物

Rotundone は 3.2.1.3 で合成したものを使用した。Sodium ethoxide は東京化成工業株式会社から、99.5% EtOH は純正化学株式会社から購入した。その他の試薬は分析グレードのものを使用した。

5.2.1.3 3-*epi*-Rotundone の調製

Sodium ethoxide の 1.0 M EtOH 溶液 (5 mL) に rotundone (150 mg, 0.687 mmol) を加え、室温で 2 日間攪拌を行った。反応溶液を飽和 NH₄Cl 溶液に注ぎ、AcOEt で抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ にて乾燥して、減圧下濃縮した。濃縮物 (146 mg) に対し分取 HPLC を行った。分取 HPLC は Shimadzu LC-20AR、Shimadzu SIL-20AC、Shimadzu CTO-20A、Shimadzu SPD-M20A、Shimadzu CBM-20A (島津製作所) から構成されたシステムを用い、以下に示した条件で行った。

表 5-1 HPLC 分画条件

| | |
|--------|---|
| 原料： | 5% <i>n</i> -hexane/EtOH=95/5 溶液 |
| カラム： | TCI Chiral CH-S (5 μm particle size, 250 mm × 4.6 mm i.d.; 東京化成工業) × TCI Chiral CH-S (5 μm particle size, 250 mm × 4.6 mm i.d.; 東京化成工業) × CHIRALPAK IA (5 μm particle size, 250 mm × 4.6 mm i.d.; ダイセル) |
| 移動相： | <i>n</i> -hexane/EtOH=99/1 (0~10 min) |
| 流速： | 2.0 mL/min |
| カラム温度： | 30 °C |
| 分取時間： | rotundone: 7.35~7.55 min, 3- <i>epi</i> -rotundone : 8.35~8.60 min |

得られた留分に対し、減圧下溶媒を除去し、rotundone (24.3 mg、純度>99.9% by GC-FID) および 3-*epi*-rotundone (21.4 mg、純度>99.9% by GC-FID) を得た。

3-*epi*-Rotundone : ¹H NMR: δ 4.74 (1H, q, *J* = 0.8, 12-H_a), 4.71 (1H, quint, *J* = 1.6, 12-H_b), 2.98 (1H, ddq, *J* = 11.2, 3.6 and 7.6, 10-H), 2.66 (1H, app quint, *J* = 6.8, 4-H), 2.59 (1H, ddd, *J* = 0.8, 6.4 and 18.8, 3-H_a), 2.54 (1H, dd, *J* = 15.6 and 11.6, 6-H_β), 2.41 (1H, dt, *J* = 15.2 and 2.4, 6-H_α), 2.00 (1H, dd, *J* = 18.4 and 1.6, 3-H_β), 1.92 (1H, m, 7-H), 1.87–1.74 (3H, overlapping m, 8-H and 9-H_α), 1.77 (3H, t, *J* = 0.8, 13-H), 1.52 (1H, m, 9-H_β), 1.17 (3H, d, *J* = 6.8, 14-H), 1.03 (3H, d, *J* = 7.2, 15-H). ¹³C NMR: δ 208.1 (C₂), 177.4 (C₅), 150.8 (C₁₁), 145.4 (C₁), 109.0 (C₁₂), 46.2 (C₇), 43.1 (C₃), 37.2 (C₄), 36.1 (C₆), 32.6 (C₉), 30.9 (C₈), 26.9 (C₁₀), 20.4 (C₁₃), 19.3 (C₁₄), 16.7 (C₁₅). (NMR のアサイメントには、文献⁷⁶⁾に記載の炭素番号を使用した。図 5-7 参照。)

GC-MS: 219 (16), 218 (M⁺, 100), 203 (42), 176 (9), 175 (28), 163 (14), 162 (18), 161 (28), 148 (13), 147 (38), 137 (25), 135 (16), 134 (21), 133 (24), 121 (15), 120 (18), 119 (30), 109 (11), 107 (19), 105 (31), 95 (12), 93 (20), 91 (38), 81(9), 79 (22), 77 (24), 69 (11), 67 (17), 65 (11), 55 (13), 53 (11), 41 (21), 39 (13). HRMS (EI) calculated for C₁₅H₂₂O 218.16706, found 218.16501. [α]_D²⁰ -66 (*c* 0.57, CHCl₃).

3-*epi*-Rotundone の RI は 2305 (InertCap WAX) および 1680 (InertCap 1MS) であった。また、得られた rotundone の NOESY のデータより、文献記載⁷⁶⁾の rotundone の 6-H_αと

6-H_βのアサインメントは逆であることが判明した。

5.2.2 果物中での構造不明成分の検出

「3.2.2 構造不明成分の解明」および「3.2.3 グレープフルーツ、リンゴ、マンゴーにおける rotundone の同定」ならびに「4.2.5 SIDA による rotundone の定量」において、rotundone のマススペクトルの検出を目的とした GC-MS 分析を行ったところ、目的の構造不明成分が常に rotundone に隣接した状態で検出された (図 5-1, 5-2)。香気濃縮物の調製および分析条件は、3.2.2 および 3.2.3、4.2.5 に示したとおりである。

5.2.3 機器分析

5.2.3.1 GC-MS

「5.2.1.3 3-*epi*-Rotundone の調製」における GC-MS 測定は、Agilent 5975 質量検出器 (Agilent Technologies) と FID が接続された Agilent 7890 ガスクロマトグラフにて行った。カラムは、InertCap WAX (0.25 mm i.d. × 60 m, 0.25 μm film thickness ; ジーエルサイエンス株式会社) を使用した。カラム末端は 2 つに分岐し、不活性キャピラリーカラムにて質量検出器および FID に分配した。注入口温度は 250 °C に設定し、各試料はスプリット比 50:1 にて 1 μL 注入した。オーブンは最初の 5 分間 40 °C で保持した後、3 °C /min にて 230 °C まで昇温し、キャリアガスにはヘリウムを使用し、1.8 mL/min の一定流量とした。マススペクトルは EI モードで 70 eV のイオン化電圧にて測定を行った。各化合物の RI は C5 から C30 の直鎖アルカンの保持時間を基準に算出した。合成品の化学純度は FID によって得られるクロマトグラムの面積値より算出した。

5.2.3.2 HRMS

HRMS は、AccuTOF GCv 4G（日本電子）にて測定した。カラム、注入口温度、試料注入量、スプリット比、オープン昇温条件、キャリアガス、流量は 5.2.3.1 記載の GC-MS 測定と同一の条件で行った。

5.2.3.3 NMR

^1H NMR（400 MHz）、 ^{13}C NMR（100 MHz）、H-H COSY、HMQC、HMBC および NOESY は、JEOL JNM-ECX400（日本電子）にて測定した。測定は CDCl_3 中、tetramethylsilane を内部標準化合物として用いた ($\delta = 0.00$ ppm)。ケミカルシフトは ppm、カップリング定数 (J 値) は Hz で記載した。 ^1H NMR および ^{13}C NMR の各シグナルのアサイメントには、図 5-7 の化合物に記載された番号を使用した。

5.2.3.4 比旋光度

比旋光度は、P-2300 polarimeter（日本分光）にて測定した。

5.2.4 閾値測定

文献^{76,114})を参考に、水中での 3-*epi*-rotundone と rotundone の匂いの閾値を測定した。3-*epi*-Rotundone の閾値測定の際は 32 人（男性 22 人、女性 10 人）、rotundone の閾値測定の際は 25 人（男性 16 人、女性 9 人）の長谷川香料株式会社 総合研究所の所員をパネルリストとして評価を行った。3-*epi*-Rotundone に関しては、12.8、64、320、1600、8000、40000、200000 および 1000000 ng/kg の濃度の試料を調製した。Rotundone に関しては、0.00512、0.0256、0.128、0.64、3.2、16、80、400、2000 および 10000 ng/kg の濃度の試料を調製した。最も濃い濃度の試料は、3-*epi*-rotundone あるいは rotundone の EtOH 溶液を水で 10000 倍に希釈して調製した。ブランクの試料には、同量の EtOH を加えた。試

料 2 g を 30 mL の瓶（ねじタイプ）入れ、3 桁の乱数を記入した。3-*epi*-Rotundone あるいは rotundone の試料 1 本とブランク試料 2 本の計 3 本をセットにして、濃度の低い順にパネリストに提示した。パネリストには、瓶の蓋を開け、匂いを嗅いで、匂いの異なるものを評価用紙に記載するように指示した。同時に、パネリストには識別に成功した試料の匂いを評価してもらった。実験は 23 °C に設定された静かな部屋で行った。各パネリストの閾値を以下の式により計算し、最も濃い濃度での試験に正解することのできたパネリスト（3-*epi*-rotundone : 男性 15 人、女性 9 人, rotundone : 男性 13 人、女性 9 人）に対し、各パネリストの閾値を幾何平均して 3-*epi*-rotundone あるいは rotundone の閾値とした。

各パネリストの閾値 =

$$\sqrt{\text{パネリストが正解した最も低い濃度} \times \text{パネリストが間違えた最も高い濃度}}$$

5.3 結果および考察

5.3.1 様々な果物中での構造不明成分の検出

これまでの第三章、第四章における rotundone の検出を目的とした GC-MS 分析において、rotundone と類似のマススペクトルを有する構造不明の成分が常に rotundone と一緒に検出された。本成分は極性カラム (InertCap WAX) での GC 測定において rotundone より少し大きい RI を有し (rotundone : 2300、構造不明成分 : 2305)、 m/z 203 のイオン強度が異なること以外は、両者のマススペクトルは非常に類似していた。3.3.1 において、オレンジ精油の高沸点留分から rotundone を単離した際にも、単離した rotundone 中に本成分は存在しており (図 5-1)、さらに 3.3.2 のグレープフルーツ、リンゴ、マンゴーでの rotundone の同定や 4.3.2 のグレープフルーツの果皮および果汁での rotundone の定量においても、存在割合はそれぞれの果物・部位によって異なっていたが、常に本成分は rotundone に隣接して検出された (図 5-2)。本成分は無極性カラム (InertCap 1MS) では rotundone と分離せず、極性カラム (InertCap WAX) でも強い woody 香を放つ rotundone の直後に検出されるため、GC-O で本成分の香気を評価することは困難であった。RI やマススペクトルから本成分は rotundone の立体異性体であると推測したが、トータルイオンクロマトグラムでのピーク面積値から果物香気中での存在量は rotundone よりも少ないと考えられたので、果物から単離し構造決定することは困難であると考えた。

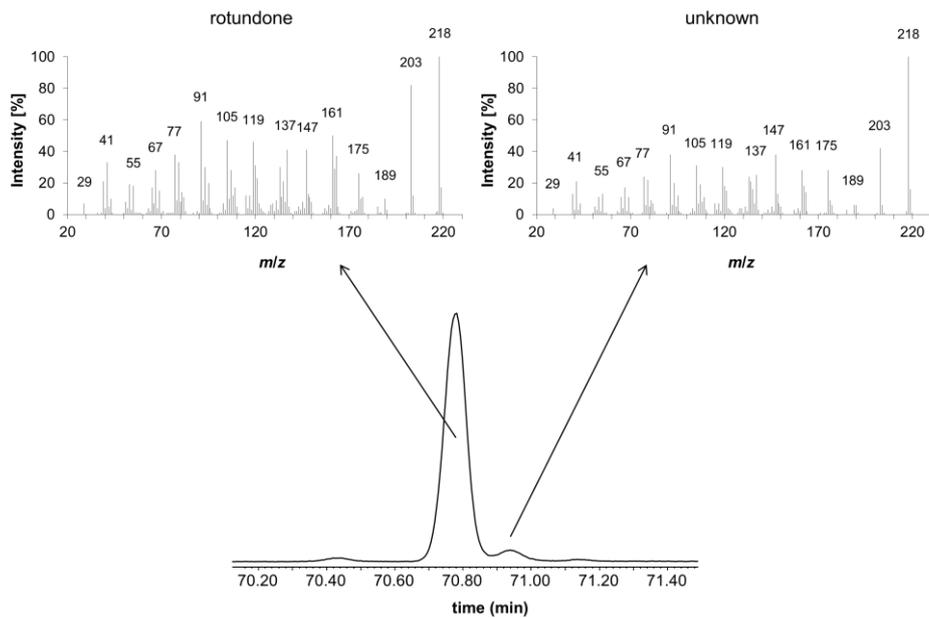


図 5-1 オレンジ精油の高沸点留分より単離した rotundone の GC-MS 測定

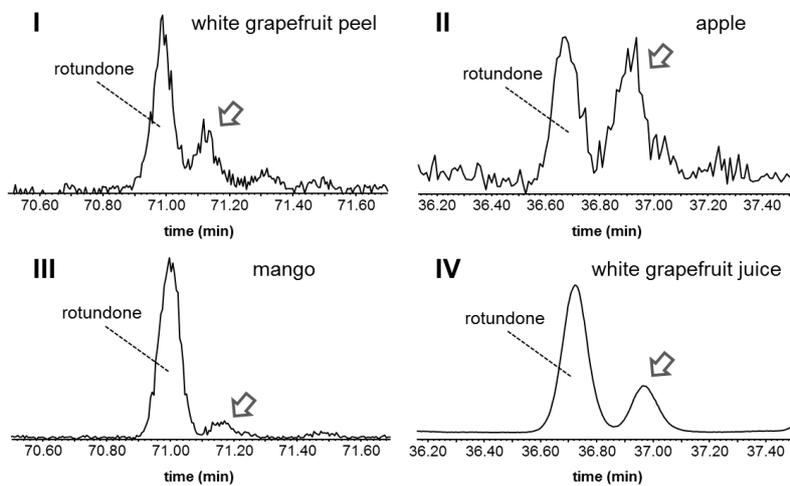


図 5-2 各果物中の rotundone の GC-MS 測定

I, II, III は scan モードで測定し、 m/z 218 で抽出したイオンクロマトグラム
 IV は m/z 218.2 の SIM モードで測定したイオンクロマトグラム
 ・オープン温度条件
 I, III: 40 °C で 5 分保持して、3 °C/min で 230°C まで昇温
 II, IV: 40 °C で 3 分保持して、10 °C/min で 180 °C まで昇温

5.3.2 構造不明成分の解明

SIDA 用の rotundone の安定同位体標識化合物として Siebert らから報告されている rotundone- d_5 は、rotundone に対し 1M NaOEt/ethanol- d_6 溶液で処理することで調製されている (図 5-3)⁷⁸⁾。この合成を実際に行ったところに、rotundone- d_5 の他に rotundone- d_5 に類似のマススペクトルを示す副生成物が生成することが分かった (図 5-4)。この副生成物と rotundone- d_5 とのマススペクトルの違いは、先の構造不明成分と rotundone のマススペクトルの違いと類似しており、この副生成物の重水素化されていないものが目的の構造不明成分であると考えられた。Rotundone- d_5 を SIDA で使用している文献は数多くあるものの^{78,99-111)}、この副生成物に関して言及している報告は無かったが、rotundone- d_5 の生成機構から考察すると、中間体 A を通って rotundone- d_5 が生成する際に、理論的には同時に 3-*epi*-rotundone- d_5 も生成すると考えられた (図 5-5)。このことから、副生成物は 3-*epi*-rotundone- d_5 であり、すなわち目的の成分は 3-*epi*-rotundone であると推測した (図 5-6)。

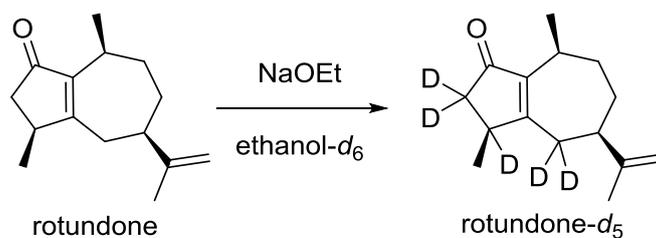


図 5-3 Rotundone- d_5 の合成

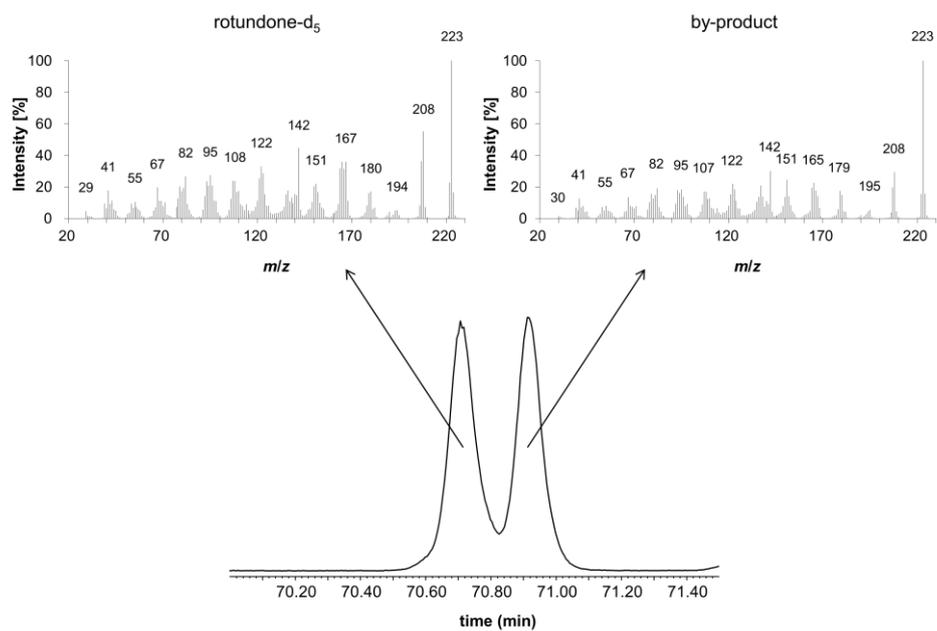


図 5-4 Rotundone-d₅ 調製時の GC-MS 測定

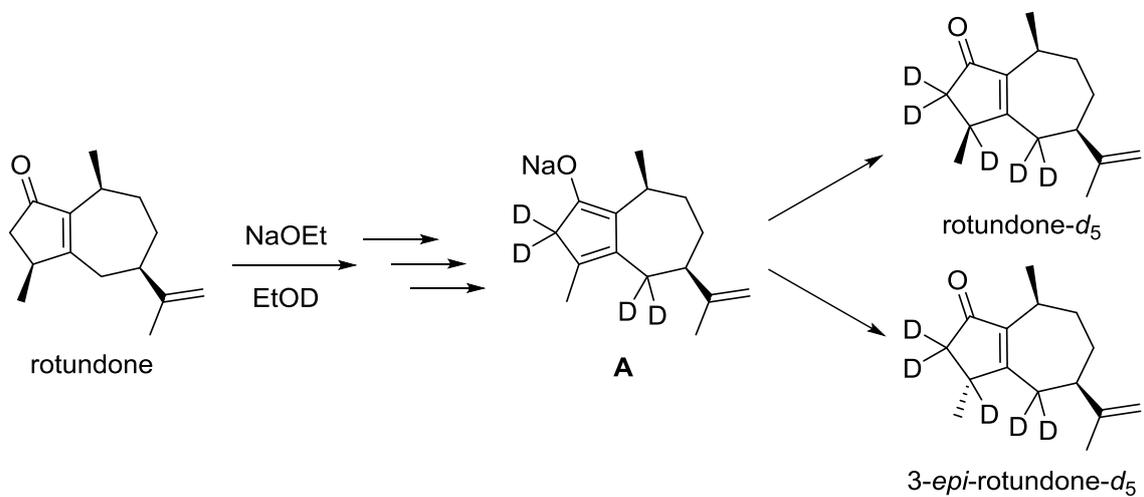


図 5-5 Rotundone-d₅ の生成機構

この推測を検証するため、rotundone-*d*₅ の調製方法と同様に、rotundone に NaOEt を作用させて目的成分が生成するか検討した。Rotundone を 1M NaOEt/EtOH 溶液で処理した結果、目的成分と同じマススペクトルおよび RI を有する成分 B が rotundone と約 1:1 の混合物として得られることが分かった (図 5-6)。構造解明を行うために必要な NMR データを得るために、分取 HPLC を用い、rotundone と成分 B の分離を試みた。Rotundone は非常に低い閾値 (8 ng/kg, 水中) を有しており、極微量の rotundone が混在しただけで成分 B の香気に影響を及ぼすことが考えられたため、HPLC でなるべく完全に分離するような条件を探索した。Rotundone と成分 B は類似の極性を有していたため、立体異性体の分離に有効なキラルカラムを用いることとし、両者が最大限分離するように 3 つのキラルカラム (2 つの Chiral CH-S と CHIRALPAK IA) を直結に繋いで使用することで、純粋な成分 B の単離に成功した。

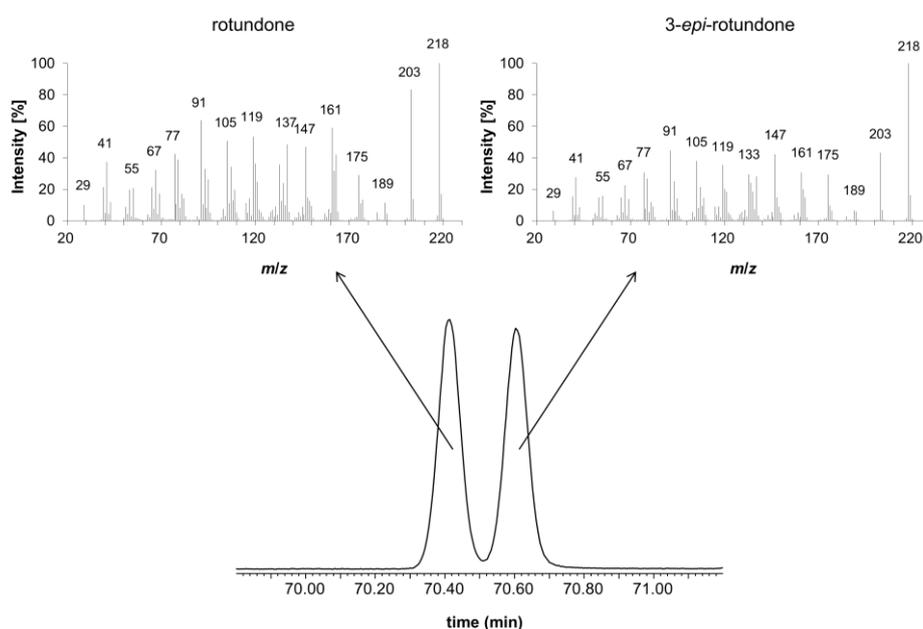


図 5-6 Rotundone を 1M NaOEt/EtOH 溶液で処理した際の GC-MS 分析

成分 B の各種 NMR データは rotundone の NMR データと類似しており、成分 B が rotundone の立体異性体であることを支持していた。成分 B の立体を決定するため、rotundone と成分 B の NOESY の比較を行った (図 5-7)。Rotundone と成分 B の 14-H における NOE を比較すると、rotundone は 3-H_β、4-H、6-H_α、6-H_β に相関があるのに対し、成分 B は 3-H_α、3-H_β、4-H、6-H_α、7-H に相関があり、rotundone の立体化学に基づいて考えると、成分 B は 3-*epi*-rotundone [(3*R*,5*R*,8*S*)-5-isopropenyl-3,8-dimethyl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1(2*H*)-azulenone] であると決定した。先に述べたように、成分 B は果物中に含まれる目的の構造不明成分とマススペクトルおよび RI が一致しており、このことから目的成分は 3-*epi*-rotundone であると同定した。

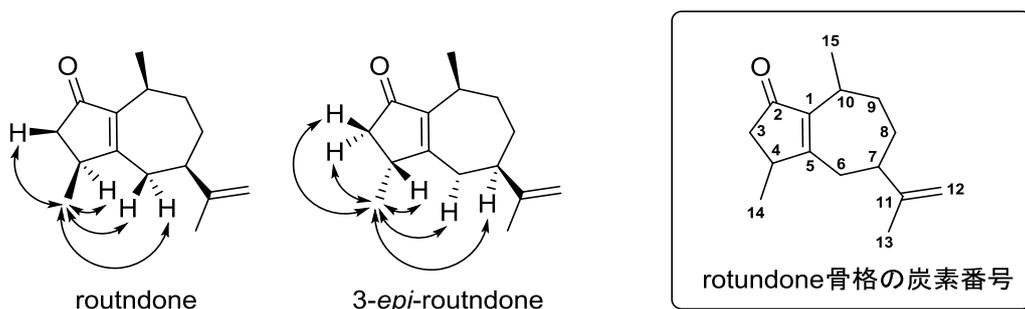


図 5-7 Rotundone と 3-*epi*-rotundone の H₁₄ における NOE 相関

5.3.3 3-*epi*-Rotundone の香気特性

Rotundone の香気特性に関しては、3.3.3 で述べたように、強い匂いの順応性、低い閾値および GC-O における濃度依存の香気変化といった独特な香気特性を有している。また、Wood らによる水中閾値の測定において、約 20% のパネリストが最も濃い濃度の試料 (4000 ng/kg) に関して rotundone の匂いを検知できなかったと報告されている⁷⁶⁾。このような香気特性が立体異性体である 3-*epi*-rotundone も有しているのか検証するため、rotundone と 3-*epi*-rotundone の閾値測定および香気評価を行い比較することとした。

Wood らの報告⁷⁶⁾に倣い、3-*epi*-rotundone と rotundone の水中での閾値を三点比較法 (triangle test) にて測定した。我々が行った閾値試験においても、rotundone に関しては 32 人中 8 人 (25%)、3-*epi*-rotundone に関しては 25 人中 3 人 (12%) が最も濃い濃度でそれぞれの匂いを検知することができなかった。そのため、最も濃い濃度も検知できたパネリストのサブグループでの閾値を算出した (表 5-2)。今回の試験で算出した rotundone の閾値 (5 ng/kg) は、Wood らが報告した閾値 (8 ng/kg) と非常に近い値が得られた。一方で、3-*epi*-rotundone の閾値 (19100 ng/kg = 19.1 µg/kg) は、rotundone と比較すると約 4000 倍も高い値であったが、食品中に含まれる一般的な香気成分の中では 2-acetylpyridine (19 µg/kg)¹⁰⁹⁾ や *trans*-2-hexenal (17 µg/kg)¹¹⁰⁾、γ-decalactone (11 µg/kg)¹¹¹⁾ などと同程度の比較的低い部類の閾値であった。閾値測定と同時にに行った閾値付近での香気評価において、rotundone は「woody, spicy, peppery」と評価されたのに対し、3-*epi*-rotundone は「woody, spicy, peppery, citrus, grapefruit-like, powdery, celery-like」と評価された。「woody, spicy, peppery」は両方で共通するものの、3-*epi*-rotundone は rotundone に比べ、複雑な香気を有していることが分かった。また今回の一連の香気評価において、3-*epi*-rotundone においても、希釈されていない状態では匂いを検知しづらく (ほぼ無臭に感じられる)、匂いの順応も起こることが確認された。以上のことから、3-*epi*-rotundone は閾値を除いて、rotundone と類似の香気特性を有していることが分かった。

表 5-2 Rotundone と 3-*epi*-rotundone の水中での閾値と閾値付近での香気評価

| | RI on InertCap WAX | threshold (ng/kg) in water ^a | odor description ^b |
|--------------------------|-----------------------|--|---|
| 3- <i>epi</i> -rotundone | 2305 | 19100 | woody, spicy, peppery, citrus, grapefruit-like, powdery, celery-like |
| rotundone | 2300 | 5 | woody, spicy, peppery |

^a Calculated as recognition threshold

^b Evaluated at the concentrations around each threshold

3-*epi*-Rotundone の果物中の存在量に関しては、図 5-2 から判断すると rotundone 以下であり、今回測定した閾値を考慮すると 3-*epi*-rotundone の果物の香気への寄与はあまり大きくないと予想される。しかしながら、3-*epi*-rotundone は一般的な香気成分の中では比較的低い部類の閾値を有し、rotundone と比べ「woody, spicy, peppery, citrus, grapefruit-like, powdery, celery-like」といった、より複雑な香気を有しているため、新規の合成香料としては充分有用な素材であると考えられる。特に、「citrus, grapefruit-like」の香調を有していることから、シトラスフレーバーにおいて天然感の高い増強効果が期待される。実際に合成香料として使用するに当たっては、より効率的に調製できる方法の開発が必須である。今後、より容易に入手可能になった段階で、様々なフレーバーへの応用を検討したい。

5.4 結論

本章では、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの香気中に存在する rotundone の立体異性体と推測される構造不明成分の構造および香気特性の解明を行った。目的の成分は各種果物香気中では極微量のため単離することは困難であると考えられたが、rotundone を 1M NaOEt/EtOH 溶液で処理すると生成することを見出し、分取 HPLC により単離した。Rotundone との 1D, 2D NMR および NOESY の比較により、本成分を(3*R*,5*R*,8*S*)-体である 3-*epi*-rotundone であると決定した。天然から 3-*epi*-rotundone を同定したのは今回の研究が初めてである。

Rotundone と 3-*epi*-rotundone の水中での閾値を測定した結果、それぞれ 5 ng/kg と 19100 ng/kg であった。また、rotundone と 3-*epi*-rotundone の香気評価の結果、両者は閾値を除いて類似の香気特性を有していることが分かった。3-*epi*-Rotundone は rotundone と比較すると高い閾値を有しているものの、食品中に含まれる一般的な香気成分の中では低い部類の閾値であり、「woody, spicy, peppery, citrus, grapefruit-like, powdery, celery-like」といった、より複雑な香気を有していることから、新規の合成香料として充分有用な素材であると考えられる。特に、rotundone と比べ「citrus, grapefruit-like」の香調を有していることから、シトラスフレーバーにおいて高い天然感増強効果が期待される。

本研究は rotundone の立体異性体に関する初めての研究であり、今後より効率的に調製できる方法の開発を行い、様々なフレーバーへの応用を検討し、研究を進めていきたいと考えている。

第六章 総括

消費者の嗜好性が多様化し、消費者意識が変化し続けている現代において、消費者視点から市場を分析し要求に応じていくことは、産業界にとって大変重要なことである。現代の消費者の食の志向は「健康」や「安全」へと向けられており、それによって飲食品業界においては「天然」を訴求した製品が多く開発されている。そのため、香料業界へは実際の食品の香気を再現したような天然感のあるフレーバーが強く要求されるようになった。天然感のあるフレーバーの開発を行うに当たっては、実際の食品の香気分析を行い、その食品の香気に寄与する重要香気成分を解明することが必須である。特に微量重要香気成分に関しては、極微量であるがために構造解明に必要な分析データを得ることが難しく同定するのが非常に困難である一方で、微量重要香気成分の解明は食品の香気の完全な再現への道を開き、天然感のある高品質のフレーバーの創成には欠かせないものとなっている。

本論文では、「天然感を増強させる微量重要香気成分の解明とその有用性に関する研究」と題し、日本食材として特に人気のある柚子とワサビ、また、定番の果物であるグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの香気分析を行った際に見出した微量重要香気成分の解明とその有用性に関してまとめた。

第一章では、本研究の背景として、香料、食品の香気分析、重要香気成分に関してまとめた。また、本研究の動機付けとなった、柚子の微量重要香気成分 (6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-3-one (YUZUNONE[®]) と (6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-4-ol (YUZUOL[®]) の解明と有用性の評価に関して、重要香気成分の解明の例として述べた。

第二章では、ワサビの最高品種の一つである「真妻」を分析試料として、すりおろしたてのワサビの香気に寄与する微量重要香気成分の解明とワサビ香気への有用性に関してまとめた。ワサビ香気濃縮物の GC-O および AEDA を行い、FD factor 256 および

1024 を示す 9 種の重要香気成分を同定した。9 成分の内、allyl isothiocyanate、4-pentenyl isothiocyanate、5-hexenyl isothiocyanate、6-(methylthio)hexyl isothiocyanate、vanillin は容易に同定することができたが、2-isopropyl-3-methoxypyrazine、3-methyl-2,4-nonanedione、(Z)-1,5-octadien-3-one、cis-3-methyl-4-decanolide はワサビ香気濃縮物中での存在量が微量であったため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる濃縮・精製を駆使し同定した。ワサビ中から初めて見出された cis-3-methyl-4-decanolide の絶対立体配置を、全立体異性体の合成および AcTBDMSBCD カラムを用いたキラル GC-MS 分析によって、(3R,4R)-3-methyl-4-decanolide であると決定した。(3R,4R)-3-Methyl-4-decanolide が天然物から同定されたのは、今回の分析が初めてである。同定した上述の 8 種の重要香気成分から調製したワサビ香気再構築液 A、ワサビ香気再構築液 A に (3R,4R)-3-methyl-4-decanolide を添加したワサビ香気再構築液 B、およびワサビ香気濃縮物を用いて官能評価を行った。その結果、ワサビ香気再構築液 B はワサビ香気再構築液 A と比較し、「creamy」のスコアの向上および「pungent」のスコアの減少が見られ、いずれの評価用語においても、ワサビ香気濃縮物のスコアと有意な差が無くなった。すなわち、(3R,4R)-3-methyl-4-decanolide は、再構築液の香気特性を天然のワサビの香気濃縮物の香気特性に近づける効果を有することが示された。以上のことから、(3R,4R)-3-methyl-4-decanolide がワサビをすりおろした時に立ち上がる特有の香りの再現に非常に有用な成分であると結論づけた。

第三章では、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの微量重要香気成分の解明とその有用性に関してまとめた。グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの GC-O において共通して強く検知される woody 香を有する構造不明な微量重要香気成分の解明を行った。オレンジ精油の高沸点留分 約 800 g を使用し、減圧蒸留、3 回のシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび 2 回の分取 HPLC を行い、純度 36.7% で目的の成分 1.7 mg を単離した。高分解能 MS および 1D, 2D NMR から構造解析を行い、

本成分を rotundone と推定した。市販の(-)-guaiol より文献を参考に rotundone を合成し、合成標品と構造不明成分の各種分析データが一致したことから、オレンジ中の不明成分の構造を rotundone と決定した。グレープフルーツ、リンゴ、マンゴー中の同じく woody 香を有する構造不明の成分に関しては、各香気濃縮物に対し分取 HPLC による分画を行うことにより、MS を得ることに成功し、MS、2 種のカラムでの retention index および匂いの質の全てが rotundone と同一であったことから rotundone と同定した。文献記載の定量値からグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーのモデル飲料を調製し、rotundone を添加し官能評価を行ったところ、rotundone は閾値付近の微量な添加であっても各果物モデル飲料の風味に大きく影響を及ぼし、いずれのモデル飲料においても「complex flavor of natural fruits」と定義した「complex」のスコアが向上し、「unpleasant taste or artificial flavor (unnatural)」と定義した「discordant」のスコアが減少したことから、果物飲料の風味を天然の果物の風味に近づける効果があることが示された。以上のことから、rotundone をフルーツフレーバーへ使用することにより、より天然感のあるフルーツフレーバーおよび果物飲料の開発が可能となったと結論づけた。

第四章では、香料産業的に需要が多いグレープフルーツに着目し、ホワイトグレープフルーツおよびピンクグレープフルーツの果皮、果汁の香気における rotundone の貢献度貢献度や存在量を AEDA や SIDA により詳細に調べた。各グレープフルーツの果皮の香気濃縮物の極性画分および果汁の香気濃縮物の GC-O および AEDA を行ったところ、rotundone はいずれの試料においても高い FD factor を示した。SIDA を行うにあたり、果汁のような比較的酸性が強い条件下でもプロトン化が起こらないような安定同位体標識化合物として rotundone- $d_{2,3}$ を合成した。Rotundone- $d_{2,3}$ を内部標準物質として用い SIDA により各グレープフルーツの果皮、果汁中の rotundone の存在量を測定したところ、ホワイトグレープフルーツ果皮: 2180 ng/kg、ピンクグレープフルーツ果皮: 1920 ng/kg、ホワイトグレープフルーツ果汁: 29.6 ng/kg、ピンクグレープフルーツ果汁: 49.8 ng/kg で

あり、果汁より果皮の方が多いたことが分かった。また、存在量を文献記載の閾値(8 ng/kg)で割った値である OAV は果汁であっても 1 以上を示すことから、rotundone が香気的に貢献していることが証明された。グレープフルーツ香気における rotundone の効果を検証するために、搾りたてのホワイトグレープフルーツ果汁と文献記載の定量値から調製したホワイトグレープフルーツ香気再構築液の rotundone 無添加品(香気再構築液 A)と添加品(29.6 ng/kg 添加, 香気再構築液 B)を用いて官能評価を行った。官能評価の結果、香気再構築液 B は香気再構築液 A に比べ、「fresh」「juicy」「peely」「harmonious」の項目が有意に向上し、ホワイトグレープフルーツ果汁のスコアに近づくことが分かった。以上のことから、rotundone はグレープフルーツ香気の再現に効果的な重要香気成分であり、rotundone を用いることによって、より天然感のある新規なグレープフルーツフレーバーの創生が可能となったと結論づけた。

第五章では、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの香気中に存在する rotundone の立体異性体と推測される構造不明の成分の構造および香気特性の解明に関してまとめた。目的の成分は各種果物香気中では極微量のため単離することは困難であると考えられたが、rotundone を 1M NaOEt/EtOH 溶液で処理すると生成することを見出し、分取 HPLC により単離した。Rotundone との 1D, 2D NMR および NOESY の比較により、本成分の構造を(3R,5R,8S)-体である 3-*epi*-rotundone であると決定した。Rotundone と 3-*epi*-rotundone の水中での閾値を測定した結果、それぞれ 5 ng/kg と 19100 ng/kg であった。また、rotundone と 3-*epi*-rotundone の香気評価の結果、両者は閾値を除いて類似の香気特性を有していることが分かった。3-*epi*-Rotundone は rotundone と比較すると高い閾値を有しているものの、食品中に含まれる一般的な香気成分の中では低い部類の閾値であり、「woody, spicy, peppery, citrus, grapefruit-like, powdery, celery-like」といった、より複雑な香気を有していることから、新規の合成香料として充分有用な素材であると

考えられる。特に、rotundone と比べ「citrus, grapefruit-like」の香調を有していることから、シトラスフレーバーにおいて高い天然感増強効果が期待される。

食品の香気分析については、これまでに多くの報告があるものの、いまだその食品の香気の完全の再現には至っていないものも多い。本研究において見出された YUZUNONE[®]、YUZUOL[®]、*cis*-3-methyl-4-decanolide [(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide]、rotundone および 3-*epi*-rotundone は、「食品の香気を再現したような天然感のあるフレーバー」の開発に有用な素材であり、いずれの成分も各食品中で新規の香気成分であるため、特許を出願し、権利化を行っている¹¹⁸⁻¹²³⁾。実際の製品としては、製造および供給の問題から YUZUNONE[®]、3-methyl-4-decanolide (*cis/trans* 混合品) および rotundone が実用されているが、YUZUNONE[®]が配合されたユズフレーバーや rotundone が配合されたフルーツフレーバーは飲料(炭酸飲料、果実飲料、アルコール飲料など)や菓子(キャンディー、ガムなど)などに、3-methyl-4-decanolide が配合されたワサビフレーバーはチューブわさびや業務用わさびなどに、それぞれ検討されている。これらの成分を実際の香料に使用することによって、これまでにないオリジナルの天然感のあるフレーバーを創生することが可能となったが、さらに、香料産業における究極の目標である香気の完全な再現に、これらの成分が一助となれば幸いである。これからも、天然感のある高品質のフレーバーの創成に繋がるような食品の香気の解明を行っていきたい。

Summary

Study on elucidation of trace odor-active compounds that enhance natural flavor and their usefulness

Akira Nakanishi

A consumer trend survey conducted by the Japan Finance Corporation found that current consumers have a high preference for healthy food, and are more likely to be highly oriented toward health and safety in the future, in this regard. Health and safety are recent global trends in the processed food market, and food and beverage manufacturers are actively developing processed foods that appeal to “natural” according to these trends. There is an increasing demand for high-quality flavorings with natural flavor such as duplicating the flavor of natural foods. There is high demand for popular fruit flavorings widely used in beverages and confectioneries as well as for Japanese food flavorings because of the global Japanese food boom. To develop a flavoring with natural flavor, it is essential to analyze the aroma of natural foods in detail and elucidate odor-active compounds contributing to the aroma of these foods.

This study focused on yuzu and wasabi, which are particularly popular Japanese foods, and popular fruits such as grapefruit, orange, apple, and mango. Although a lot of studies on the aroma of these foods have been reported, we were not satisfied with duplicating the aroma of these natural foods. Therefore, we conducted further research on important odor-active compounds in these foods. First, we investigated the aroma of yuzu to identify (6*Z*,8*E*)-undeca-6,8,10-trien-3-one (YUZUNONE[®]) and (6*Z*,8*E*)-undeca-6,8,10-trien-4-ol (YUZUOL[®]) as trace odor-active components having peely, balsamic odor. The current study revealed that these compounds enhance the balsamic odor, which is a characteristic attribute of yuzu aroma, and other attributes; the study also revealed that they are useful odorants that express the characteristics of yuzu aroma. It was very difficult to identify trace odor-active compounds such as YUZUNONE[®] and YUZUOL[®] because sufficient analytical data for their structural analysis could not be obtained as they are found in trace amounts in nature, despite being key components in the reconstruction of the aroma of foods and being used as indispensable ingredients for the creation of high-quality flavorings with natural flavor.

Taking advantage of the research methods used in the aroma analysis of yuzu, we conducted the current studies to elucidate trace odor-active compounds of wasabi and four kinds of fruits and evaluate their usefulness as flavoring ingredients.

Elucidation of a novel trace odor-active compound in wasabi and evaluation of its usefulness for wasabi aroma

We investigated trace odor-active compounds contributing to the aroma of freshly grated wasabi using *Maduma*, one of the finest cultivars, as analytical samples. Nine odor-active compounds were identified by gas chromatography-olfactometry (GC-O) and aroma extract dilution analysis (AEDA) of wasabi aroma concentrate. Among them, allyl isothiocyanate, 4-pentenyl isothiocyanate, 5-hexenyl isothiocyanate, 6-(methylthio)hexyl isothiocyanate and vanillin were identified readily; however, 2-isopropyl-3-methoxypyrazine, 3-methyl-2,4-nonanedione, (*Z*)-1,5-octadien-3-one, and *cis*-3-methyl-4-decanolide were identified by obtaining their mass spectrum (MS) with silica gel column chromatography purification because they were present at trace levels in the wasabi aroma concentrate. The latter two components were identified for the first time in wasabi. There has been no report on the determination of the absolute configuration of *cis*-3-methyl-4-decanolide in natural products, therefore, four stereoisomers of 3-methyl-4-decanolide were synthesized, and the absolute configuration of 3-methyl-4-decanolide in wasabi was investigated. Chiral GC-mass spectrometry (GC-MS) analyses of all stereoisomers and wasabi aroma concentrate revealed that (3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide (*cis*-form) and (3*S*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide (*trans*-form) predominantly existed in wasabi. This is the first time that (3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide was identified in nature. When compared with the odors of the synthesized stereoisomers, (3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide had a characteristic odor (creamy, celery-like). Sensory analysis was performed using wasabi aroma reconstitute A which was composed of above eight odorants, aroma reconstitute B which was additionally contained (3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide, and wasabi aroma concentrate. As a result, wasabi aroma reconstitute B showed increased “creamy” score and decreased “pungent” score than wasabi aroma reconstitute A, and was not significantly different in all attributes from wasabi aroma concentrate. Wasabi aroma reconstitute was closer in odor profile to the natural wasabi aroma concentrate when (3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide was added. These revealed that (3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide was a very useful component for duplicating the characteristic aroma of freshly grated wasabi.

Elucidation of a novel trace odor-active compound in fruits and evaluation of its usefulness for fruit flavor

In this study, we elucidated an unknown compound having a strong woody odor which was commonly detected in GC-O of the aroma concentrate of grapefruit, orange, apple, and

mango. Because of its trace amount in each fruit, approximately 800 g of a high-boiling fraction of an orange essential oil, which is commercially available, was used as starting material, followed by vacuum distillation, silica gel column chromatography (three times), and preparative HPLC (two times); 1.7 mg of the target unknown compound was isolated with a purity of 36.7%. Based on high resolution mass spectrum and NMR data, the unknown compound was assumed to be rotundone. Rotundone was synthesized from the commercially available (-)-guaiol with reference to the literature, and the unknown compound in an orange was determined as rotundone because all analysis data of the isolate and the synthetic sample were identical. To elucidate the unknown compounds in grapefruit, apple, and mango, mass spectra of the unknown compounds were successfully obtained through fractionation by preparative HPLC on each aroma concentrate. By matching the mass spectra, retention indices on two columns of different polarity, and odor qualities, the unknown compounds in grapefruit, apple, and mango were determined to be rotundone. Model beverages of grapefruit, orange, apple, and mango were prepared based on quantitative data reported in the literature, and sensory analyses were carried out using model beverages with or without rotundone. Even when added at a sub-threshold level, rotundone had significant effects on several flavors in the model beverages. In particular, after addition of rotundone, the overall flavors approximated the natural flavor of the fruits due to decrease of “discordant” defined as “unpleasant taste or artificial flavor (unnatural)” and increases of “complex” defined as “complex flavor of natural fruits”. Rotundone has been identified as an odor-active component in patchouli oil, Shiraz wine, Shiraz grape (a special grape used as a raw material for Shiraz wine), spices, oak aged spirits, frankincense oil, and cypriol oil. The current study achieved the first identification of rotundone as an odor-active compound in popular fruits. Thus, it became possible to create fruit flavorings and fruit beverages with more natural flavor by using rotundone.

Quantitation of rotundone in grapefruit and evaluation of its usefulness for grapefruit aroma

The current study focused on grapefruit, which is in high demand in the flavor industry, and investigated the contribution and concentration of rotundone in peels and juices of white and pink grapefruits in detail. As a result of GC-O and AEDA of the polar parts of the aroma concentrates of each grapefruit peel and the aroma concentrates of each grapefruit juice, rotundone showed high odor contribution among all. A stable isotope-labeled compound, rotundone- $d_{2,3}$, for which there were no concerns that protonation would occur even under relatively acidic conditions such as a grapefruit juice, was designed and synthesized for quantification. Using rotundone- $d_{2,3}$ as an internal standard, rotundone in the peels and juices of

each grapefruit were quantitated by a stable isotope dilution assay: the levels were 2180 and 29.6 ng/kg in white grapefruit peel and juice, and 1920 and 49.8 ng/kg in pink grapefruit peel and juice, indicating that the concentrations of rotundone in the peels were higher than those in the juices. It is known that the aroma of citrus is more abundant in their peels than in the juices, and the quantitation result correlates positively with this fact. Odor activity values, which are obtained by dividing the concentration by the literature threshold (8 ng/kg), were one or more, even for juice, and they proved that rotundone contributed to grapefruit aroma. This is the first study revealing that rotundone greatly contributes to grapefruit aroma. To assess the effects of rotundone on grapefruit aroma, sensory analysis was performed using the white grapefruit juice aroma reconstitute prepared based on quantitative data reported in the literature with or without rotundone (aroma reconstitute A and B) and the freshly squeezed white grapefruit juice. As a result, we found that the scores for fresh, juicy, peely, and harmonious of aroma reconstitute A were significantly increased and were closer to those of the freshly squeezed white grapefruit juice. These results show that rotundone is an essential odorant effective for duplicating the grapefruit aroma, and it becomes possible to create a grapefruit flavoring with more natural flavor by using rotundone.

Elucidation of the stereoisomer of rotundone as a novel odorant of fruits and evaluation of its usefulness

The current study elucidated the structure and odor characteristics of the unknown component presumed to be a stereoisomer of rotundone. Rotundone, whose configuration is (3*S*,5*R*,8*S*), has eight stereoisomers; however, there are no reports yet on natural identification or organic synthesis of stereoisomers of rotundone. In our previous GC-MS analyses of the aromas of grapefruit, orange, apple, and mango, we noted an unknown trace compound, which we assumed to be one of the stereoisomers of rotundone. The target unknown compound seemed to be difficult to isolate from the aroma concentrates of these fruits because of its trace amount present in them. Since the unknown compound was generated when rotundone was treated with a 1M NaOEt/EtOH solution, it was isolated from the reaction mixture by preparative HPLC. The unknown compound was confirmed as 3-*epi*-rotundone whose configuration is (3*R*,5*R*,8*S*) by comparing the 1D and 2D NMR and nuclear Overhauser effect spectroscopy spectra with those of rotundone. The odor threshold of 3-*epi*-rotundone in water was determined to be 19.1 µg/kg. This was higher than that of rotundone, but the same level as 2-acetylpyridine (19 µg/kg) and *trans*-2-hexenal (17 µg/kg), which are popular odorants in foods, and is relatively low in the class of food-related odorants. Because 3-*epi*-rotundone has

citrus and grapefruit-like odor compared with rotundone, it is expected to have a higher potential to enhance natural flavor in citrus flavoring. This study is the first on the stereoisomer of rotundone. In the future, after developing a more efficient synthetic method of 3-*epi*-rotundone, we would like to apply it to various kinds of flavorings.

Results of these current studies show that trace odor-active compounds identified in yuzu, wasabi, and fruits are useful materials for the development of flavorings with natural flavor such as duplicating the flavor of natural foods. Because these compounds are novel odorants in each food, we applied for the rights acquisition of these compounds by patent. We believe that the compounds will help create unprecedented high-quality flavorings with natural flavor and contribute greatly to the development of processed foods that have great natural appeal.

参考文献

- 1) *香料の科学*, 長谷川香料株式会社 著; 講談社: 東京, 日本, 2013.
- 2) *においの化学*, 長谷川香料株式会社 編; 裳華房: 東京, 日本, 1988.
- 3) Belitz, H. -D.; Grosch, W.; Schieberle, P. In *Food Chemistry, 4th revised and extended edition*; Belitz, H. -D.; Grosch, W.; Schieberle, P., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2009; pp 361.
- 4) 日本香料工業会 香料統計, <http://www.jffma-jp.org/profile/statistics.html> (2017年8月8日)
- 5) Reineccius, G. In *Flavor Chemistry and Technology, 2nd edition*; CRC press, Florida, 2006; pp 33–58.
- 6) VCF Volatile Compounds in Food : database / Nijssen, L. M.; Ingen-Visscher, C. A. van; Donders, J. J. H., Eds. – Version 16.3 – Zeist (The Netherlands): Triskelion, 1963–2016.
- 7) Likens, S. T.; Nickerson, G. B. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* **1964**, *5*, 5–13.
- 8) Chaintreau, A. Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity – review. *Flavour Fragrance J.* **2001**, *16*, 136–148.
- 9) Engel, W.; Bahr, W.; Schieberle, P. Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 237–241.
- 10) Demole, E.; Lederer, E.; Mercier, D. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45*, 675–685.

- 11) Acree, T. E.; Nishida, R.; Fukami, H. Odor thresholds of the stereoisomers of methyl jasmonate. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 425–427.
- 12) Yamanishi, T.; Kosuge, M.; Tokitomo, Y.; Maeda, R. Flavor constituents of pouchong tea and a comparison of the aroma pattern with jasmine tea. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 2139–2142.
- 13) Tokitomo, Y.; Ikegami, M.; Yamanishi, T.; Juan, I.-M.; Chiu, T. -F. Effects of withering and mass-rolling processes on the formation of aroma components in pouchong type semi-fermented tea. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 87–91.
- 14) Kobayashi, A.; Tachiyama, K.; Kawakami, M.; Yamanishi, T.; Juan, I.-M.; Chiu, W. T. -F. Effects of solar-withering and turn over treatment during indoor-withering on the formation of pouchong tea aroma. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 1655–1660.
- 15) Wang, D.; Kubota, K.; Kobayashi, A. Optical Isomers of methyl jasmonate in tea aroma. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 508–510.
- 16) Tamogami, S.; Awano, K.; Amaike, M.; Takagi, Y.; Kitahara, T. Development of an efficient GLC system with a mixed chiral stationary phase and its application to the separation of optical isomer. *Flavour Fragrance J.* **2001**, *16*, 349–352.
- 17) Reineccius, G. In *Flavor Chemistry and Technology, 2nd edition*; CRC press, Florida, 2006; pp 58–61.
- 18) Schieberle, P. In *Characterization of Food: Emerging Methods*, Gaonkar, A. G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1995, pp 403–431.
- 19) Patton, S.; Josephson, D. V. A method for determining significance of volatile flavor compounds in foods. *Food Res.* **1957**, *22*, 316–318.
- 20) Acree, T. E.; Barnard, J.; Cunningham, D. G. A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluent. *Food Chem.* **1984**, *14*, 273–283.

- 21) Ullrich, F.; Grosch, W. Identification of the most intense volatile flavor compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 277–282.
- 22) Schieberle, P.; Grosch, W. Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *185*, 111–113.
- 23) Grosch, W. Determination of potent oclourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour Fragrance J.* **1994**, *9*, 147–158.
- 24) Schieberle, P.; Grosch, W. Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crusts using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 252–257.
- 25) Molyneux, R. J.; Schieberle, P. Compound identification: a *Journal of Agricultural and Food Chemistry* perspective. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4625–4629.
- 26) Miyazawa, N.; Tomita, N.; Kurobayashi, Y.; Nakanishi, A.; Ohkubo, Y.; Maeda, T.; Fujita, A. Novel character impact compounds in yuzu (*Citrus junos* Sieb. Ex Tanaka) peel oil. *J. Agric Food Chem.* **2009**, *57*, 1990–1996.
- 27) Shinoda, N.; Shiga, M.; Nishimura, K. Constituents of yuzu (*Citrus junos*) oil. *Agric. Biol. Chem.* **1970**, *34*, 234–242.
- 28) Matsuura, Y.; Hata, G.; Abe, S.; Sakai, I.; Abe, A. A novel 13-membered macrolide. A flavour component of yuzu (*Citrus junos*) oil. In *Proceedings of the 8th International Congress of Essential Oils*, Cannes-Grasse, France, Oct 12–17; Fedarom: Grasse, France, 1980; pp 497–499.
- 29) Tajima, K.; Tanaka, S.; Yamaguchi, T.; Fujita, M. Analysis of green and yellow yuzu peel oils (*Citrus junos* Tanaka). Novel aldehyde components with remarkably low odor

- thresholds. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1544–1548.
- 30) Tajima, K.; Fukuda, K.; Hasegawa, Y.; Toi, N. Research on new key odorants in yuzu peel oil (*Citrus junos* Tanaka). In *Proceedings of the 36th Symposium on the Chemistry of Terpenes, Essential Oils, and Aromatics*, Nishinomiya, Japan, Nov 14–16, 1992; pp 28–30.
- 31) Song, H. S.; Sawamura, M.; Ito, T.; Kawashimo, K.; Ukeda, H. Quantitative determination and characteristic flavor of Citrus junos (yuzu) peel oil. *Flavour Fragrance J.* **2000**, *15*, 245–250.
- 32) Miyazato, H.; Hashimoto, S.; Hayashi, S. Research on new key odorants in yuzu peel oil (*Citrus junos* Tanaka). In *Proceedings of the 51st Symposium on the Chemistry of Terpenes, Essential Oils, and Aromatics*, Nagahama, Japan, Nov 10–12, 2007; pp 79–81.
- 33) 日本政策金融公庫(2016)「平成 27 年度下半期消費者動向調査」『消費者：食の志向』 https://www.jfc.go.jp/n/findings/pdf/topics_160229a.pdf (2017 年 10 月 20 日)
- 34) 日本貿易振興機構 農林水産・食品調査課(2013)「日本食品に対する海外消費者意識アンケート調査」 https://www.jetro.go.jp/ext_images/jfile/report/07001256/kaigaishohisha_Rev.pdf (2017 年 10 月 20 日)
- 35) Nakanishi, A.; Miyazawa, N.; Haraguchi, K.; Watanabe, H.; Kurobayashi, Y.; Nammoku, T. Determination of the absolute configuration of a novel odour-active lactone, *cis*-3-methyl-4-decanolide, in wasabi (*Wasabia japonica* Matsum.). *Flavour Fragrance J.* **2014**, *29*, 220–227.
- 36) Nakanishi, A.; Miyazawa, N.; Haraguchi, K.; Watanabe, H.; Kurobayashi, Y.; Komai, T. (3*R*,4*R*)-3-Methyl-4-decanolide, a novel lactone contributing to fresh wasabi (*Wasabia japonica*) flavor. In *Importance of Chirality to Flavor Compounds*; Engel, K.- H.,

- Takeoka, G., Eds.; ACS Symposium Series 1212; American Chemical Society: Washington, DC, 2015; pp 99–108.
- 37) 岐阜大学 応用生物科学部 生産環境科学過程 応用植物化学コース 植物遺伝育種学研究室, <http://www1.gifu-u.ac.jp/~kyamane/wasabiKitamichi2.html> (2017年8月8日)
- 38) エスビー食品株式会社 わさび・からしに関する Q&A, <https://www.sbfoods.co.jp/customer/faq/wasabi.html> (2017年8月8日)
- 39) 伊奈和夫, わさび、からし類の揮発性成分 (辛味成分を中心とした), 香料, **1982**, 136, 45–52.
- 40) Etoh, H.; Nishimura, A.; Takasawa, R.; Yagi, A.; Saito, K.; Sakata, K.; Kishima, I.; Ina, K. ω -Methylsulfinylalkyl isothiocyanates in wasabi, *Wasabia japonica* Matsum. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, 54, 1587–1589.
- 41) Ina, K.; Ina, H.; Ueda, M.; Yagi, A.; Kishima, I. ω -Methylthioalkyl isothiocyanates in wasabi. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, 53, 537–538.
- 42) Sultana, T.; Savage, G. P.; McNeil, D. L.; Porter, N. G.; Clark, B. Comparison of flavor compounds in wasabi and horseradish. *J. Food Agric. Environ.* **2003**, 1, 117–121.
- 43) Masuda, H.; Harada, Y.; Tanaka, K.; Nakajima, M.; Tanabe, H. Characteristic odorants of wasabi (*Wasabia japonica* matum), Japanese horseradish, in comparison with those of horseradish (*Armoracia rusticana*). In *Biotechnology for Improved Foods and Flavours*; Takeoka, G. R., Teranishi, R., Williams, P. J., Kobayashi, A., Eds.; ACS Symposium Series 637; American Chemical Society: Washington, DC, 1996; pp 67–78.
- 44) 大川統, 池田誠司, *FFI ジャーナル*, **2008**, 213, 768–771.
- 45) 今関友実, ワサビの新鮮なグリーンの香り, 香料, **2012**, 254, 37–42.
- 46) Nikishin, G. I.; Spektor, S. S.; Glukhovtsev, V. G. Free-radical addition of alcohols and

- glycols to α,β -unsaturated acids and their esters. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1971**, 389–393.
- 47) Okui, S.; Uchiyama, M.; Mizugaki, M. Metabolism of hydroxy fatty acids: II. Intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by genus *Candida*. *J. Biochem.* **1963**, *54*, 536–540.
- 48) Blin-Perrin, C.; Molle, D.; Dufosse, L.; Le-Quere, J.-L.; Viel, C.; Mauvais, G.; Feron, G. Metabolism of ricinoleic acid into γ -decalactone: β -oxidation and long chain acyl intermediates of ricinoleic acid in the genus *Sporidiobolus* sp.. *FEMS Microbiology Letters* **2000**, *188*, 69–74.
- 49) Waché, Y.; Aguedo, M.; Niicaud, J.-M.; Belin, J.-M. Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 393–404.
- 50) Shimotori, Y.; Miyakoshi, T. Synthesis of (*S*)- γ -lactones with a combination of lipase-catalyzed resolution and Mitsunobu reaction. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 1570–1582.
- 51) Shimotori, Y.; Miyakoshi, T. Combination of Novozym 435-catalyzed hydrolysis and Mitsunobu reaction for production of (*R*)- γ -lactones. *Synth. Commun.* **2010**, *40*, 1607–1613.
- 52) Burks, H. E.; Kliman, L. T.; Morken, J. P. Asymmetric 1,4-dihydroxylation of 1,3-dienes by catalytic enantioselective diboration. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9134–9135.
- 53) Devalankar, D. A.; Chouthaiwale, P. V.; Sudalai, A. Organocatalytic sequential α -aminoxylation and *cis*-Wittig olefination of aldehydes: synthesis of enantiopure γ -butenolides. *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 240–244.
- 54) Evans, P.; Leffray, M. Asymmetric dihydroxylation of vinyl sulfones: routes

- toenantioenriched α -hydroxyaldehydes and the enantioselective syntheses of furan-2(5*H*)-ones. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7973–7981.
- 55) Fujii, M.; Fukumura, M.; Hori, Y.; Hirai, Y.; Akita, H.; Nakamura, K.; Toriizuka, K.; Ida, Y. Chemoenzymatic synthesis of optically active γ -alkyl- γ -butenolides. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2292–2298.
- 56) (\pm)-**10**: Morikawa, T.; Nishiwaki, T.; Iitaka, Y.; Kobayashi, Y. Radical cyclization to fluorinated double bonds: 5-exo ring closure of bromoacetals derived from fluoroallyl alcohols. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 671–674.
- 57) Wu, Y.; Shen, X.; Tang, C.-J.; Chen, Z.-L. An expeditious access to enantiomerically pure *cis*-dialkyl-substituted γ - and δ -lactones. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3428–3432.
- 58) Wu, Y.; Shen, X.; Tang, C.-J.; Chen, Z.-L.; Hu, Q.; Shi, W. Synthesis of natural fragrant molecules *cis*-3-methyl-4-decanolide and aerangis lactone. General enantioselective routes to β,γ -*cis*-disubstituted γ -lactones and γ,δ -*cis*-disubstituted δ -lactones. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3802–3810.
- 59) Zhang, X.; Fu, C.; Yu, Y.; Ma, S. Stereoselective iodolactonization of 4-allenoic acids with efficient chirality transfer: development of a new electrophilic iodination reagent. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 13501–13509.
- 60) Aishima, T. Laboratory methods for sensory analysis of food: part 1. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2001**, *48*, 311–320.
- 61) Aishima, T. Laboratory methods for sensory analysis of food: part 2. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2001**, *48*, 378–392.
- 62) Aishima, T. Laboratory methods for sensory analysis of food: part 3. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2001**, *48*, 453–466.
- 63) Aishima, T. Laboratory methods for sensory analysis of food: part 4. *Nippon Shokuhin*

- Kagaku Kogaku Kaishi* **2001**, *48*, 539–548.
- 64) Aishima, T. Laboratory methods for sensory analysis of food: part 5. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2001**, *48*, 637–642.
- 65) Aishima, T. Laboratory methods for sensory analysis of food: part 6. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2001**, *48*, 697–703.
- 66) Kaiser, R. In *The Scent of Orchids: Olfactory and Chemical Investigations*; Roche, Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1993, pp 128.
- 67) Masuzawa, Y.; Tamogami, S.; Kitahara, T. Synthesis of both enantiomers of *cis*-3-methyl-4-decanolide, a key component for the scent of African orchids. *Nat. Prod. Lett.* **1999**, *13*, 239–246.
- 68) Maurer, B.; Hauser, A. In *IXth International Congress of Essential Oils*, 13-17, March 1983, Singapore, Book 3, pp 69–76.
- 69) Naef, R.; Velluz, A. Identification of *trans*-3-methyl-4-decanolide in blood orange juice and mandarin peel. *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 681–682.
- 70) Takahisa, E.; Engel, K.H. 2,3-Di-*O*-methoxymethyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- γ -cyclodextrin: a new class of cyclodextrin derivatives for gas chromatographic separation of enantiomers. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1063*, 181–192.
- 71) Bicchi, C.; Artuffo, G.; D'Amato, A.; Pellegrino, G.; Galli, A.; Galli, GC separation of γ - and δ -lactones on a mixture of 2,6-dimethyl-3-trifluoroacetyl- γ -cyclodextrin and OV-1701. *J. High Res. Chromatogr.* **1991**, *14*, 701–704.
- 72) Dietrich, A.; Maas, B.; Karl, V.; Kreis, P.; Lehmann, D.; Mosandl, A. Stereoisomeric flavor compounds part. LV: Stereodifferentiation of some chiral volatiles on heptakis(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin. *J. High Res. Chromatogr.* **1992**, *15*, 176–179.

- 73) Tamogami, S.; Awano, K.; Amaike, M.; Takagi, Y.; Kitahara, T. Development of an efficient GLC system with a mixed chiral stationary phase and its application to the separation of optical isomer. *Flavour Fragrance J.* **2001**, *16*, 349–352.
- 74) Nakanishi, A.; Fukushima, Y.; Miyazawa, N.; Yoshikawa, K.; Maeda, T.; Kurobayashi, Y. Identification of rotundone as a potent odor-active compound of several kinds of fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4464–4471.
- 75) Kaiser, R. Agarwood – the wood of the gods. In *Meaningful Scents around the World. Olfactory, Chemical, Biological and Cultural Considerations*; Kisakürek, M. V., Ed.; Verlag Helvetica Chimica Acta/Wiley-VCH: Zürich, Switzerland/Weinheim, Germany, 2006; pp 59–64.
- 76) Wood, C.; Siebert, T. E.; Parker, M.; Capone, D. L.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P.; Eggers, M.; Meier, M.; Vössing, T.; Widder, S.; Krammer, G.; Sefton, M. A.; Herderich, M. J. From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3738–3744.
- 77) Genthner, E. R. *Identification of rotundone as an important contributor to the flavor of oak aged spirits*. Ph.D. Dissertation, University of Illinois at Urbana–Champaign, IL, USA, 2014.
- 78) Niebler, J.; Zhuravlova, K.; Minceva, M.; Buettner, A. Fragrant sesquiterpene ketones as trace constituents in frankincense volatile oil of *Boswellia sacra*. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1160–1164.
- 79) Clery, R. A.; Cason, J. R. L.; Zelenay, V. Constituents of cypriol oil (*Cyperus scariosus* R. Br.): N-containing molecules and key aroma components. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 4566–4573.
- 80) Buettner, A.; Schieberle, P. Evaluation of key aroma compounds in hand-squeezed

- grapefruit juice (*Citrus paradise Macfayden*) by quantitation and flavor reconstitution experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1358–1363.
- 81) Buettner, A.; Schieberle, P. Evaluation of aroma difference between hand-squeezed juice from valencia late and navel oranges by quantitation of key odorants and flavor reconstitution experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2387–2394.
- 82) Steinhaus, M.; Bogen, J.; Schieberle, P. Key aroma compounds in apple juice – changes during juice concentration. In *Flavour Science: Recent Advances and Trends*; Bredie, W. L. P., Peterson, M. A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; pp189–192.
- 83) Boonbumrung, S.; Tamura, H.; Mookdasanit, J.; Nakamoto, H.; Ishihara, M.; Yoshizawa, T.; Varayanond, W. Characteristic aroma components of the volatile oil of yellow keaw mango fruits determined by limited odor unit method. *Food Sci. Technol. Res.* **2001**, *7*, 200–206.
- 84) Kapadia, V. H.; Naik V. G.; Wadia, M. S.; Dev, S. Sesquiterpenoids from the essential oil of *Cyperus rotundus*. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 4661–4667.
- 85) Ishihara, M.; Tsuneya, T.; Uneyama, K. Guaiane sesquiterpenes from agarwood. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3343–3347.
- 86) Ishihara, M.; Tsuneya, T.; Uneyama, K. Components of the volatile concentrate of agarwood. *J. Essent. Oil Res.* **1993**, *5*, 283–289.
- 87) Naef, R. The volatile and semi-volatile constituents of agarwood, the infected heartwood of *Aquilaria* species. *Flavour Fragrance J.* **2011**, *26*, 73–89.
- 88) Tajuddin, S. N.; Yusoff, M. M. Chemical composition of volatile oils of *Aquilaria malaccensis* (*Thymelaeaceae*) from Malaysia. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1965–1968.

- 89) Pandey, A. K.; Chowdhury, A. R. Essential oil of *Cyperus scariosus* R. Br. tubers from Central India. *Indian Perfum.* **2002**, *46*, 325–328.
- 90) Nakanishi, A; Fukushima, F.; Miyazawa, N.; Yoshikawa, K.; Maeda, T.; Kurobayashi, Y. Quantitation of rotundone in grapefruit (*Citrus paradisi*) peel and juice by stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 5026–5033.
- 91) Macleod, W. D., Jr.; Buigues, N. M. Sesquiterpenes. I. Nootkatone, a new grapefruit flavor constituent. *J. Food Sci.* **1964**, *29*, 565–568.
- 92) Coleman, R. L.; Lund, E. D.; Shaw, P. E. Analysis of grapefruit essence and aroma oils. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 100–103.
- 93) Demole, E.; Enggist, P.; Ohloff, G. 1-*p*-Menthene-8-thiol: a powerful flavor impact constituent of grapefruit juice (*Citrus paradisi* Macfayden). *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 1785–1794.
- 94) Lin, J.; Rouseff, R. L. Characterization of aroma-impact compounds in cold-pressed grapefruit oil using time-intensity GC-olfactometry and GC-MS. *Flavour Fragrance J.* **2001**, *16*, 457–463.
- 95) Buettner, A.; Schieberle, P. Characterization of the most odor-active volatiles in fresh, hand-squeezed juice of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfayden). *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 5189–5193.
- 96) Shaw, P. E.; Wilson, C. W., III. Importance of nootkatone to the aroma of grapefruit oil and the flavor of grapefruit juice. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 677–679.
- 97) Lehmann, D.; Dietrich, A.; Hener, U.; Mosandl, A. Stereoisometric flavor compounds. LXX: 1-*p*-Menthene-8-thiol: separation and sensory evaluation of the enantiomers by enantioselective gas chromatography-olfactometry. *Phytochem. Anal.* **1995**, *6*, 255–257.
- 98) Siebert, T. E.; Wood, C.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P. Determination of rotundone, the

- pepper aroma impact compound, in grapes and wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3745–3748.
- 99) Caputi, L.; Carlin, S.; Ghiglieno, I.; Stefanini, M.; Valenti, L.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F. Relationship of changes in rotundone content during grape ripening and winemaking to manipulation of the ‘peppery’ character of wine. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5565–5571.
- 100) Mattivi, F.; Caputi, L.; Carlin, S.; Lanza, T.; Minozzi, M.; Nanni, D.; Valenti, L.; Vrhovsek, U. Effective analysis of rotundone at below-threshold levels in red and white wines using solid-phase microextraction gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 483–488.
- 101) Capone, D. L.; Jeffery, D. W.; Sefton, M. A. Vineyard and fermentation studies to elucidate the origin of 1,8-cineole in Australian red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2281–2287.
- 102) Herderich, M. J.; Siebert, T. E.; Parker, M.; Capone, D. L.; Jeffery, D. W.; Osidacz, P.; Francis, I. L. Spice up your life: analysis of key aroma compounds in Shiraz. In *Flavor Chemistry of Wine and Other Alcoholic Beverages*; Qian, M. C., Shellhammer, T. H., Eds.; ACS Symposium Series 1104; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 2012; pp 3–13.
- 103) Scarlett, N. J.; Bramley, R. G. V.; Siebert, T. E. Within-vineyard variation in the ‘pepper compound’ rotundone is spatially structured and related to variation in the land underlying the vineyard. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2014**, *20*, 214–222.
- 104) Geffroy, O.; Dufourcq, T.; Carcenac, D.; Siebert, T.; Herderich, M.; Serrano, E. Effect of ripeness and viticultural techniques on the rotundone concentration in red wine made from *Vitis vinifera* L. cv. Duras. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2014**, *20*, 401–408.

- 105) Mayr, C. M.; Geue, J. P.; Holt, H. E.; Pearson, W. P.; Jeffery, D. W.; Francis, I. L. Characterization of the key aroma compounds in Shiraz wine by quantitation, aroma reconstitution, and omission studies. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4528–4536.
- 106) Takase, H.; Sasaki, K.; Shinmori, H.; Shinohara, A.; Mochizuki, C.; Kobayashi, H.; Saito, H.; Matsuo, H.; Suzuki, S.; Takata, R. Analysis of rotundone in Japanese Syrah grapes and wines using SBSE with heart-cutting two-dimensional GC/MS. *Am. J. Enol. Vitic.* **2015**, *66*, 398–402.
- 107) Huang, A.-C.; Sefton, M. A.; Taylor, D. K. Comparison of the formation of peppery and woody sesquiterpenes derived from α -guaiene and α -bulnesene under aerial oxidative conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1932–1938.
- 108) Davies, C.; Nicholson, E. L.; Böttcher, C.; Burbidge, C. A.; Bastian, S. E. P.; Harvey, K. E.; Huang, A.-C.; Taylor, D. K.; Boss, P. K. Shiraz wines made from grape berries (*Vitis vinifera*) delayed in ripening by plant growth regulator treatment have elevated rotundone concentrations and “pepper” flavor and aroma. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 2137–2144.
- 109) Zhang, P.; Barlow, S.; Krstic, M.; Herderich, M.; Fuentes, S.; Howell, K. Within-vineyard, within-vine, and within-bunch variability of the rotundone concentration in berries of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 4276–4283.
- 110) Zhang, P.; Howell, K.; Krstic, M.; Herderich, M.; Barlow, E. W. R.; Fuentes, S. Environmental factors and seasonality affect the concentration of rotundone in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz wine. *PLoS One* **2015**, *10*, e0133137.
- 111) Takase, H.; Sasaki, K.; Shinmori, H.; Shinohara, A.; Mochizuki, C.; Kobayashi, H.; Ikoma, G.; Saito, H.; Matsuo, H.; Suzuki, S.; Takata, R. Cytochrome P450 CYP71BE5

- in grapevine (*Vitis vinifera*) catalyzes the formation of the spicy aroma compound (-)-rotundone. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 787–798.
- 112) Nakanishi, A; Ito, M.; Yoshikawa, K.; Maeda, T.; Ishizaki, S.; Kurobayashi, Y. Identification and characterization of 3-epi-rotundone, a novel stereoisomer of rotundone, in several kinds of fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 5209–5214.
- 113) Li, D; Wang, K.-W. Natural new sesquiterpenes: structural diversity and bioactivity. *Curr. Org. Chem.* **2016**, *20*, 994–1042.
- 114) Meilgaard, M; Civille, G. V.; Carr, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*, 5th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2016; pp153–163.
- 115) Blank, I.; Sen, A.; Grosch, W. Aroma impact compounds of Arabica and Robusta coffee. Qualitative and quantitative data. In *14th International Conference on Coffee Science*; ASIC: Paris, France, 1991; pp 117–129.
- 116) Guadagni, D. G.; Buttery, R. G.; Okano, S. Odour thresholds of some organic compounds associated with food flavours. *J. Sci. Food Agric.* **1963**, *14*, 761–765.
- 117) Engle, K.-H.; Flath, R. A.; Buttery, R. G.; Mon, T. R.; Ramming, D. W.; Teranishi, R. Investigation of volatile constituents in nectarines. 1. Analytical and sensory characterization of aroma components in some nectarine cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 549–553.
- 118) 中西啓, 大久保康隆, 富田直己, 宮沢紀雄, 前田知子, 6, 8, 10-ウンデカトリエン-3-オンおよび香料組成物, 特許第 4057639 号, 2008-03-05.
- 119) 中西啓, 大久保康隆, 富田直己, 宮沢紀雄, 前田知子, 6, 8, 10-ウンデカトリエン-3 または 4-オールおよび香料組成物, 特許第 4143683 号, 2008-09-03.
- 120) 原口賢治, 宮沢紀雄, 田村仁, ワサビ風味増強剤, ワサビ香料組成物および食品のワサビ風味増強方法, 特許第 5000770 号, 2012-08-15.

- 121) 中西啓, 福島祐介, 吉川啓輔, 前田知子, 柑橘香味増強剤, 特許第 6262170 号,
2016-12-01.
- 122) 中西啓, 福島祐介, 吉川啓輔, 前田知子, 果実香味増強剤, 特許第 6262171 号,
2016-12-01.
- 123) 中西啓, (3R, 5R, 8S) - 5 - イソプロペニル - 3, 8 - ジメチル - 3,
4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 1 (2H) - アズレノンおよび香料組成
物, 特開 2017-206451, 2017-11-24.

謝辞

本研究を学位論文としてまとめるにあたり、東京農業大学総合研究所教授 お茶の水女子大学名誉教授 久保田紀久枝先生には常に御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました。深謝の意を表します。

本研究をまとめるにあたり、有益なご助言を賜ると共に、本論文の細部にわたりご指導を戴きました東京農業大学生物産業学部食香粧化学科教授 戸枝一喜先生、東京農業大学生物産業学部食香粧化学科准教授 妙田貴生先生、東京農業大学生命科学部分子生命化学科教授 石神健先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行う機会を賜り、格別なる御理解と御配慮を戴きました長谷川香料株式会社代表取締役会長 長谷川徳二郎氏、同社代表取締役副会長 近藤隆彦氏、同社代表取締役社長 海野隆雄氏、同社取締役専務執行役員 総合研究所長 斉藤司博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究を推進し、まとめるにあたり、御懇篤なる御指導と御助言を賜りました長谷川香料株式会社常務執行役員 総合研究所技術研究所長 駒井強博士、同社執行役員 総合研究所技術研究所副所長 黒林淑子博士、同社総合研究所技術研究所第二部長 石崎享博士、同上席研究員 吉川啓輔博士、同上席研究員 坂巻憲佐博士、同主任研究員 宮沢紀雄博士に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際して、共同研究者として多大なる御協力を戴きました長谷川香料株式会社元取締役専務執行役員 南木昂氏、同社総合研究所技術研究所第一部長 渡辺広幸博士、第五部主任研究員 福島祐介氏、香料基盤研究所第一部長 前田知子氏、同部主任研究員 原口賢治氏、同副主任研究員 伊藤麻紀子氏に心より感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御理解を戴き、また各種実験に御協力を戴きました長谷川香料株式会社総合研究所技術研究所第二部の皆様、同第一部の皆様、香料基盤研究所第一部の皆様に心より感謝申し上げます。

東京理科大学および東京大学大学院におきまして、熱心にご指導戴き、研究者としての基礎を築いて戴きました東京大学名誉教授 森謙治先生、東京大学名誉教授 北原武先生、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 教授 渡辺秀典先生、新潟薬科大学薬学部薬学科 助教 田代卓哉先生、長谷川香料株式会社総合研究所香料基盤研究所第一部主任研究員 増田唯博士に厚く御礼申し上げます。

長谷川香料株式会社において、入社当時から御指導と御鞭撻を賜りました高木恵一博士、藤田明博士、岩本実博士に深く御礼申し上げます。

本研究第二章におきまして、「真妻」を提供して戴きました静岡県農林技術研究所伊豆農業研究センターに御礼申し上げます。

最後に、常日頃から私を支えてくれている家族に心より感謝致します。

中西啓