信州大学審査学位論文

ユズおよびコーヒーフレーバーの香気特性に寄与する微量成分に関する研究

平成２６年３月

宮　里　博　成

第 1 章　緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

第 2 章　ユズ果皮ヘキサン抽出物中の微量アルデヒドの同定と評価

2. 1.　背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10

2. 2.　実験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12

2. 3.　結果および考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25

2. 4.　結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

第 3 章　ユズ果皮ヘキサン抽出物中の微量カルボン酸の同定と評価

3. 1.　背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・51

3. 2.　実験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・51

3. 3.　結果および考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・59

3. 4.　結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・63

第 4 章　ドリップコーヒーの固相抽出物中の微量環状 1,4-ジケトンおよび
微量カルボン酸の同定と評価

4. 1.　背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・74

4. 2.　実験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・76

4. 3.　結果および考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・88

4. 4.　結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・101

第 5 章　総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・125

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・131

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・133

略号

AEDA: aroma extract dilution analysis（アロマ抽出物希釈分析）

AOS: allene oxide synthase（アレンオキシド合成酵素）

CIS: cooled injection system（クールドインジェクションシステム）

CTS: cryogenic trapping system（クライオトラップシステム）

DES: divinyl ether synthase（ジビニルエーテル合成酵素）

DET: diethyl tartrate（酒石酸ジエチル）

DMF: *N*,*N*-dimethylformamide（*N*,*N*-ジメチルホルムアミド）

EDA: 1,2-ethylenediamine（1,2-エチレンジアミン）

EI: electron ionization（電子イオン化）

enantio-MDGC-MS: enantioselective multidimensional gas chromatography-mass spectrometry（エナンチオ選択的多次元ガスクロマトグラフィー質量分析）

Et_2O: diethyl ether（ジエチルエーテル）

FD: flavor dilution（香気希釈）

FID: flame ionization detector（水素炎イオン化検出器）

GC: gas chromatography（ガスクロマトグラフィー）

GC-MS: gas chromatography-mass spectrometry（ガスクロマトグラフィー質量分析）

GC-O: gas chromatography-olfactometry（におい嗅ぎガスクロマトグラフィー）

HPL: hydroperoxide lyase（ヒドロペルオキシドリアーゼ）

HPLC: high-performance liquid chromatography（高速液体クロマトグラフィー）

(13*S*)-HPOT: (9*Z*,11*E*,13*S*,15*Z*)-hydroperoxy-9,11,15-octadecatrienoic acid

IEC: ion exchange chromatography（イオン交換クロマトグラフィー）

IR: infrared spectroscopy（赤外分光法）

LAH: lithium aluminum hydride（水素化アルミニウムリチウム）

LC: liquid chromatography（液体クロマトグラフィー）

LOX: lipoxygenase（リポキシゲナーゼ）

*m*CPBA: *m*-chloroperoxybenzoic acid（*m*-クロロ過安息香酸）

MCS2: multi column switching system（マルチカラムスイッチングシステム）

MDGC-MS: multidimensional gas chromatography-mass spectrometry（多次元ガスクロマトグラフィー質量分析）

NMR: nuclear magnetic resonance（核磁気共鳴）

RI: retention index（保持指標）

RT: retention time（保持時間）

SDE: simultaneous steam distillation extraction（連続水蒸気蒸留抽出）

TBHP: *tert*-butyl hydroperoxide（*tert*-ブチルヒドロペルオキシド）

TBME: *tert*-butyl methyl ether（*tert*-ブチルメチルエーテル）

TDS: thermal desorption system（加熱脱着システム）

THF: tetrahydrofuran（テトラヒドロフラン）

TIC chromatogram: total ion current chromatogram（全イオン電流クロマトグラム）

Tributyrin: glycerol tributanoate

ユズおよびコーヒーフレーバーの香気特性に寄与する微量成分に関する研究

第 1 章　緒論

香りは私たちの暮らしの中で身近に存在し、衣食住といったあらゆる場面に深く係わり、私たちの暮らしを豊かなものにしている。特に、香りは食との関係が非常に深く、鼻をつまんで食べ物を食べたときに味がわからなくなるように、食べ物の風味やおいしさに対して重要な要素であり、食に楽しさという感動を与えてくれるものでもある。

近年、飲料、菓子、冷菓などの数多くの加工食品が普及している。加工食品は、暮らしの利便性を高め、人々の経済活動を活発化させ、そして社会の発展に大きく貢献している。しかしながら、多大な恩恵をもたらした一方で、多くの加工食品の香りや風味は食品素材がもつものとは大きく異なっており、本来のおいしさが損なわれている。この負の側面を補うために種々の食品添加物が利用されており、フレーバー（食品香料）もその一つである。香料産業界は、フレーバーを通じて人々に良好な香り、風味、おいしさをもつ加工食品を提供し、人々の暮らしの豊かさに貢献することを目指して、より付加価値の高いフレーバーを創製することに日々努めている。

天然に広く存在する香りは、1 種類の香気成分からなるのではなく、何百から何千という多くの揮発性の有機化合物から構成されている。そのため、香気成分の組成はガスクロマトグラフィー（GC）を中心とした分析法を用いて解明され

てきた。食品素材中の香気成分の分析も、水素炎イオン化検出器（FID）付ガスクロマトグラフやガスクロマトグラフ質量分析計などの分析装置が用いられてきた。加工食品に利用されているフレーバーは、そのような香りの科学的な分析知見をもとにして生み出されたものである。しかし、従来の分析法から得られた知見のみでは、本来の食品素材がもつ香りを再現した、本物感のあるフレーバーを創製することは極めて困難であった。つまり、主要な香気成分を中心とした分析だけでは、香りの特徴を完全には解明したことにならないとの結論に至った。

この問題は香気成分がもつ特性に起因するものであり、食品素材に多量に含まれる成分が、必ずしも全体の香りに大きく寄与するものではないということである。例えば、香気成分には多量でも香気が弱いもの、一方でごく微量でも香気が非常に強いもの、があるという特徴がある。そのため、全体の香りに対する各香気成分の香気寄与度を考える場合には、それぞれがもつ香りの閾値を考慮することが必要となる。閾値とは香気成分を鼻で知覚できる最低の濃度のことである。閾値の低い香気成分は、食品素材の香気寄与成分になりうるために重要である。そして、香りの特徴を完全に解明するためには、閾値の低い微量な香気寄与成分、いわゆる微量寄与成分を明らかにすることが課題となる。しかし、従来の分析法では微量寄与成分を検出することができないので、その成分の同定は非常に困難であった。

香料科学の分野において、全体の香りや風味に貢献する微量寄与成分の解明は、重要な研究課題の一つである。微量寄与成分は、におい嗅ぎガスクロマトグラフィー（GC-O）や多次元ガスクロマトグラフィー質量分析（MDGC-MS）などの新しい分析法（図 1-1）を用いることで同定することが可能となり、これまでにも多くの食品素材から新たな微量寄与成分が見出されている（McGorrin, 2012）。これらの微量寄与成分の中には、本来の食品素材がもつ香りを一つで表現できたも

の、または全体の香りに比べて異質な香りではあるが、他の成分と相互作用して全体の香りや風味に寄与したものが明らかにされている。しかし、GC-O や MDGC-MS においても微量寄与成分の同定を行うことは容易ではない。そのため、自然界にはまだ見出されていない微量寄与成分が存在することが示唆され、現在もあらゆる食品素材中の未知の微量寄与成分についての研究が精力的になされている。

本研究で取り上げたユズは、日本特有の香酸カンキツの一つであり、温州みかんなどの他の日本を代表するカンキツとは異なった独特な香りをもち、日本人に昔から親しまれている果実である。近年、ユズフレーバーを用いた飲料、冷菓、菓子、調味料などが広く普及して私たちの暮らしを豊かなものにしている。しかしながら、ユズフレーバーには、ユズ油以外のカンキツ油が主原料として使用されていることなどが要因で、香りと風味の本物感にもの足りなさがある。

一方、コーヒーは古くから世界中の人々に愛飲されている嗜好飲料の一つである。日本でも明治以降に飲まれるようになり、現在ではコーヒーを用いた加工飲料が広く普及して私たちの暮らしを豊かなものにしている。しかしながら、缶コーヒーのようなコーヒー飲料では、加工時の殺菌工程で焙煎コーヒーの香りや風味が消失しており、素材本来のものとはかけ離れたものである。香りや風味を補強する目的でコーヒーフレーバーが使用されているが、現存のコーヒーフレーバーには香りや風味の本物感にもの足りなさがあり、必ずしもその目的を果たしていない。

近年、人々の本物志向が高まるとともに、あらゆる食品に対して、「よりナチュラルな香りで、よりおいしく」といった素材本来もしくはそれ以上の香りや風味が要望されている。先述したユズやコーヒーの香りも例外ではない。人々のそのような要望に応えるためには、ユズフレーバーおよびコーヒーフレーバーの香

りと風味に対する本物感についての解決が求められている。

しかしながら、これまでに見出されているユズおよびコーヒーの香気成分、香気寄与成分、ならびに微量寄与成分を用いても、素材本来に近いフレーバーの創製には至っていない。そこで、著者は、本物感のあるフレーバーを創製するためには、本来のユズおよびコーヒーがもつ香りの特徴をより詳細に解明することが必要であると考え、さらにフレーバー創出の鍵になる未知の微量寄与成分に焦点をあてることが重要であると考えた。以上の理由から、本研究においては、ユズおよびコーヒーからそれぞれの香りに貢献する未知の微量寄与成分を同定し、各フレーバーへの添加効果を評価することにした。

ユズおよびコーヒーの香気寄与成分はこれまでにも研究されているが、GC で検出することのできない成分、特に閾値の低い微量寄与成分についてはいまだ十分に明らかにされていない。そこで、著者は、未知の微量寄与成分を解明するために、GC-O を利用したアロマ抽出物希釈分析（AEDA）ならびに MDGC-MS などの新しい分析法を活用した。

AEDA 法は、GC-O を用いて素材中の香気寄与成分のスクリーニングを行う分析法である。GC-O は、GC 装置から流出した香気成分を人間の鼻で直接嗅いで検出する分析法であり（図 1-1）、質量分析計、FID、炎光光度検出器、窒素リン検出器などの化学的な検出器では検出されない微量の香気成分を検出することが可能である。さらに、GC-O は香りの閾値の低い微量寄与成分の解明に対して非常に有効な分析法である（van Ruth, 2001）。AEDA 法の操作としては、任意の倍率（例えば、4 倍, 16 倍, 64 倍, ・・・）で段階的に希釈した試料溶液をそれぞれ GC-O に供して、各香気成分のにおいの有無を調べる。このとき、希釈度が高くても検出された香気成分が、全体の香りに対して香気寄与度の高い成分であると評価することができる。つまり、各成分のにおいが感じられる最大の希釈倍率を

FD ファクター（flavor dilution factor）と定義することで、FD ファクターが大きい香気成分ほど全体の香りに対する香気寄与度が高い成分として決定することができる（Grosch, 1993）。本研究においては、AEDA 法を活用することで、ユズおよびコーヒーの未知の微量寄与成分を見出すことができた。

次に、未知の微量寄与成分の同定を試みた。同定には質量スペクトルが必要である。そこで、著者は、様々な分画法を駆使して微量寄与成分を濃縮することによって、ガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）による質量スペクトルの取得を可能とした。それでも不可能な場合に MDGC-MS を活用した。

MDGC-MS 装置は、検出器が質量分析計であり、2 台の GC 装置を連結した分析装置である（図 1-1）。複雑な試料を 2 台の GC 装置を用いて分離することによって、GC-MS では検出されない香気成分の質量スペクトルを取得することが可能となる。また、キラルキャピラリーカラムを装着した GC 装置を片方に用いることによって、エナンチオ選択的 MDGC-MS（enantio-MDGC-MS）が可能となる。さらに、GC 装置の連結部で冷却トラップによる微量成分の濃縮が可能であるので、MDGC-MS は微量寄与成分の検出および対応する質量スペクトルの取得に対して非常に有効な分析法である（Marriott *et al*., 2012; Tranchida *et al*., 2012; Seeley and Seeley, 2013）。

本研究において、MDGC-MS による微量寄与成分の質量スペクトルの取得を達成した。得られた質量スペクトルから未知の微量寄与成分の化学構造を推定した。さらに、推定した候補化合物を立体選択的またはエナンチオ選択的な合成法を用いて化学合成することにより、微量寄与成分の立体化学を含めた化学構造を明らかにした。最後に、新規に見出された化合物のフレーバーに対する添加効果を評価した。

第 2 章では、天然ユズの果皮ヘキサン抽出物中の新規な微量寄与成分(4*S*,5*S*)-

trans-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal [IUPAC 名：(2*E*)-3-{(2*S*,3*S*)-3-[(2*Z*)-pent-2-en-1-yl]oxiran-2-yl}prop-2-enal]の特定について述べる。

天然ユズ果皮からヘキサン浸漬抽出によって香気成分を含むヘキサン抽出物を得て、AEDA 法によって抽出物中の未知の微量寄与成分のスクリーニングを行った。その結果、アルベド様香気をもつ微量寄与成分 **1** を検出した。**1** はヘキサン抽出物を GC-MS に供しても検出されなかった。そこで、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、続く分取高速液体クロマトグラフィー（分取 HPLC）によりヘキサン抽出物を分画し、得られた画分を GC-MS に供することによって、**1** の化学構造を推定した。候補化合物の立体異性体を立体選択的およびエナンチオ選択的に化学合成し、さらにキラル分析を行った結果、**1** の立体化学を含めた構造を(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal と決定した。また、生成モデル実験により **1** の生成経路を推定した。くわえて、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal のユズフレーバーに対する添加効果を評価した。

第 3 章では、第 2 章のユズ果皮ヘキサン抽出物中の汗臭をもつ新規の微量寄与成分(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の特定について述べる。

先述の AEDA 法によって汗臭をもつ微量寄与成分 **2** を検出した。ヘキサン抽出物を GC-MS に供しても **2** は検出されなかったので、酸塩基処理、続くイオン交換クロマトグラフィー（IEC）によりヘキサン抽出物を分画し、得られた酸性画分を MDGC-MS に供することによって、**2** の化学構造を推定した。候補化合物の立体異性体を立体選択的に化学合成することによって、**2** の立体化学を含めた化学構造を(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid と決定した。最後に、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid のユズフレーバーに対する添加効果を評価した。

第 4 章では、ドリップコーヒーの固相抽出物中の 2 種の微量寄与成分 *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione および(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の特定について述

べる。

まず焙煎コーヒー粉末から熱水抽出によりドリップコーヒーを調製した。次にドリップコーヒーから固相抽出法により香気成分を含む固相抽出物を得て、AEDA 法によって未知の微量寄与成分のスクリーニングを行った。その結果、刺激的な香気をもつ微量寄与成分 **3** を検出した。**3** は GC-MS では検出されなかったので、焙煎コーヒー粉末から得られたコーヒー精油をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、得られた画分を enantio-MDGC-MS に供することによって、**3** の化学構造を推定した。候補化合物の各位置異性体を化学合成し、くわえて、GC の分析データから幾何異性に関する立体化学を決定した。その結果、**3** の立体化学を含めた化学構造を *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione と決定した。また、生成モデル実験により **3** の生成経路を推定した。最後に、合成した 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione のコーヒー飲料に対する添加効果を評価した。

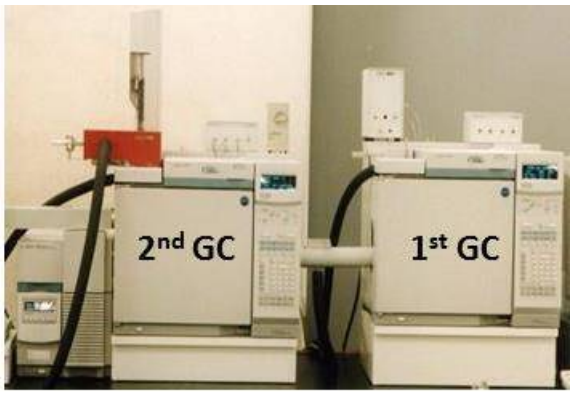
一方、汗臭をもつ微量寄与成分 **4** も AEDA において固相抽出物から検出した。**4** も GC-MS では検出されなかったので、コーヒー精油を IEC により分画し、得られた酸性画分を MDGC-MS に供することによって、**4** の化学構造を推定した。その結果、**4** の構造を、**2** と同様に、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid と決定した。さらに、生成モデル実験により **4** の生成経路を推定した。最後に、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid のコーヒー飲料ならびにオレンジ、グレープフルーツ、レモン、ホップ、および茶などの加工飲料に対する添加効果を評価した。

第 2 章から第 4 章で特定した化合物はいずれも微量であり、通常の GC-MS では検出できない成分であった。従来の分析法に加えて、GC-O を用いた AEDA 法、種々の分画法、MDGC-MS もしくは enantio-MDGC-MS などの分析法、そして立体選択的またはエナンチオ選択的な合成などの精密な化学合成法を組み合わせて活用することによって、ユズおよびコーヒーの未知の微量寄与成分を特定する

ことができた。

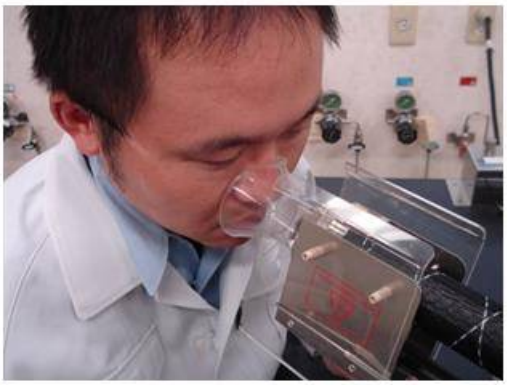
本研究の成果は、ユズおよびコーヒーの香りに対する知見をより深めるものであり、香りの特徴を解明することに大きく貢献するものである。さらに、本研究で初めて見出された微量寄与成分は、現存のユズフレーバーおよびコーヒーフレーバーを本物感のあるものへと改善し、くわえて、これらの成分がユズやコーヒー以外のあらゆる食品素材のフレーバーに幅広く応用されることによって、より付加価値の高いフレーバーの創製につながることが期待される。

(1) GC-O



(2) MDGC-MS

スニッフィングポート



GC-O風景

(1) GC-O, gas chromatography-olfactometry; (2) MDGC-MS, multidimensional gas chromatography-mass spectrometry

図 1-1. 新しい **GC** 装置

第 2 章　ユズ果皮ヘキサン抽出物中の微量アルデヒドの同定と評価

2. 1.　背景

ユズ（*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka）はスダチ（*Citrus sudachi*）やカボス（*Citrus sphaerocarpa*）とともに古来より日本人に親しまれている香酸カンキツの一つである。近年、ユズを用いた加工食品が普及して、私たちの暮らしを豊かなものにしている。ユズフレーバーはそのような加工食品を創り出すために重要な役割を担っているが、「よりナチュラルな香りで、よりおいしく」といった人々の要望に対してはもの足りなさがある。著者は、人々の要望に応えられたユズフレーバーを創製するためには、天然のユズがもつ香りの特徴を詳細に解明することが重要であると考えた。

ユズの香りの解明は、Shinoda ら（1970）により先駆的になされている。GC-MS のような一般的な分析法を用いることによって、図 2-1 に示したように、ユズの主な香気成分は、モノテルペン炭化水素類の limonene、γ-terpinene、α-pinene、β-pinene、myrcene や含酸素成分の linalool と thymol などであることが明らかにされている。しかしながら、これらの化合物はレモン、オレンジ、グレープフルーツなどの他のカンキツ類にも共通して含まれており、ユズのみに含まれる成分ではない。その後、ユズの特徴的な微量香気成分の解明がなされ、1,3,5-undecatriene や 1,3,5,7-undecatetraene などの直鎖不飽和炭化水素類（太島ら, 1992）、(*S*)-6-methyloctanal、8-methylnonanal、(*S*)-8-methyldecanal などの分枝メチル基をもつ脂肪族アルデヒド類（Tajima *et al*., 1990; 大久保ら, 2006）、1-*p*-menthen-8-thiol（IUPAC 名: 2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)propane-2-thiol）のよ

うな含硫化合物（湯川ら，1994）などのいくつかの微量香気成分が見出されている。さらに、2000 年以降、AEDA 法による香気寄与成分の解明が精力的になされ（Song *et al*., 2000; Miyazawa *et al*., 2009; Tomiyama *et al*., 2012）、dimethyl trisulfide、6-methyl-5-hepten-2-ol、(*E*)-4-nonenal、4-mercapto-4-methyl-2-pentanone、(*E*)-6-nonenal、(*Z*,*E*)-6,8,10-undecatrien-3-one、(*Z*,*E*)-6,8,10-undecatrien-4-ol、(*Z*)-3–hexenal、3*R*-(−)-linalool、3*S*,3a*S*,7a*R*- (−)-wine lactone、(*Z*)-methyl epi-jasmonate などの香気寄与成分が見出されている。そして、現在までにユズの香りを構成する香気成分として 300 成分以上が同定されている（Nijssen *et al*., 2012）。

しかしながら、これまでの精力的な解明にもかかわらず、見出された香気成分および香気寄与成分だけでは本来のユズの香りを再現することはできない。つまり、ユズの香りの特徴はいまだに十分に解明されていないということである。そのため、著者は、香りや風味に寄与する微量成分がまだ発見されずに存在するのではないかと考えた。

本研究では、まず、GC-O を用いた AEDA 法によって未知の微量寄与成分のスクリーニングを行った。次に、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC などの分画法を用いて微量寄与成分が濃縮された画分を得て、得られた画分を GC-MS に供することによって未知の微量寄与成分の化学構造を推定した。推定した候補化合物の立体選択的かつエナンチオ選択的な化学合成を行い、さらにキラル分析を行うことによって未知の微量寄与成分の立体化学を含めた化学構造を決定した。くわえて、生成モデル実験を行うことによって本成分のユズにおける生成経路を推定するとともに、ユズフレーバーへの添加効果を評価することによって本成分の市場的な価値を評価した。

2. 2.　実験

2. 2. 1.　試料

2. 2. 1. 1.　ユズ果実

市販の徳島県産の黄色のユズ果実を用いた。

2. 2. 1. 2.　ユズ果皮ヘキサン抽出物の調製

ユズ果実から果物ナイフを用いて剥皮し、果皮（3.9 kg）を得た。果皮をヘキサン（7.0 kg）に浸漬し、室温で 15 日間静置した。その後、残さを分離し、浸漬液を硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシムをろ紙（No.2, ADVANTEC）でろ別した後、溶媒をロータリーエバポレーター(減圧度: 30 mmHg, ウォーターバス温度: 38 °C, Rotavapor R-114, Büchi）で留去し、ユズ果皮ヘキサン抽出物（9.3 g）を収油率 0.24%で得た。

2. 2. 2.　AEDA 法によるユズ果皮ヘキサン抽出物中の香気寄与成分のスクリーニング

GC-O は、ガスクロマトグラフ（GC-17A, 島津製作所)、質量分析計（GCMS-QP5050, 島津製作所)、スニッフィングポート（OP275, ジーエルサイエンス）を接続した分析装置を用いて行った。キャピラリーカラムとして高極性カラムの InertCap WAX（polyethylene glycol, 60 m × 0.32 mm i.d., 膜厚: 0.25 µm, ジーエルサイエンス）を用いて、キャリアガス流量は 3.8 mL/min（ヘリウム, ≥99.99995%)、オーブン昇温プログラムを 70 °C（5 min）から 240 °C（3 °C/min）に設定し、スニッフィングポートの温度を 260 °C に保ちながらにおい嗅ぎを行った。各希釈溶液 1 µL をスプリット比 1:20 で分析装置に導入した。

AEDA は、ユズ果皮ヘキサン抽出物を 99.5%エタノール（ナカライテスク）により 2 倍ずつ段階的に希釈して（2 倍, 4 倍, 8 倍, 16 倍, 32 倍, 64 倍, 128 倍, 256 倍, 512 倍, 1024 倍）、各希釈溶液を順次 GC-O に供して行った。最後まで検出された各香気寄与成分の希釈倍率（n）からユズの香りに対する香気寄与度を示す FD ファクター（2^n）を求めた。

香気寄与成分の保持指標（RI）は、各成分と直鎖飽和炭化水素類（C6～C27）の保持時間（RT）から、Kováts（1958）の方法を参考にして算出した。

2. 2. 3.　ユズ果皮ヘキサン抽出物の分画

2. 2. 3. 1.　フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲル（51 g, 230–400 mesh Ultra Pure Silica Gel, SiliCycle）をヘキサンで湿潤し、ガラスカラム管に詰めた（長さ 15.5 cm × 直径 3.4 cm）。ユズ果皮ヘキサン抽出物（5.2 g）をカラム上部から加えて、ヘキサン（300 mL）、ジエチルエーテル（Et_2O）（300 mL）、メタノール（200 mL）を順に流した。Et_2O 溶出液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 ℃）で濃縮し、エーテル画分（0.7 g）を得た。以降、得られたエーテル画分を用いた。

2. 2. 3. 2.　分取 HPLC

上述のエーテル画分を 99.5%エタノールで 2 倍に希釈し、オートサンプラー（SIL-10A, 島津製作所）を用いて、エーテル画分の希釈溶液 50 μL を HPLC 装置に導入した。

分取 HPLC は、高速液体クロマトグラフ（LC-10A, 島津製作所）に吸収波長 254 nm に設定した紫外吸光検出器（SPD-10, 島津製作所）と分析用逆相 HPLC カラム Spherisorb 5 μm ODS2（4.6 × 250 mm, Nihon Waters）を取り付けた分析装置を

用いて行った。移動相溶媒として、蒸留水（LC 用, ナカライテスク）および 99.5% エタノールを用いた。オーブン温度は 40 °C、移動相の流速を 1.0 mL/min に設定した。分画は次のようなグラジエント条件下で行った。グラジエント条件は、0–20%（RT: 0–8 min, 8 分間）、20–50%（8–28 min, 20 分間）、続く 50–100%（28–40 min, 12 分間）のように 99.5%エタノールの濃度を上げていき、続いて 100%（40–45 min, 5 分間）で保持し、最後の 15 分間（45–60 min）で 99.5%エタノールの濃度を 0%まで下げた。分画操作のうち RT = 20 分から 44 分の間の溶出液を 1 分（1 mL）ごとに分取し、計 24 画分（各 1 mL）を得た。一画分が 100 mL になるまで同様の操作を繰り返した（つまり、計 100 回の同様の分画・分取操作を行った）。各溶出液（100 mL）に飽和食塩水（200 mL）を加え、ペンタン/ Et_2O（50/50, v/v）混合溶液（2 × 100 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水（2 × 200 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した後、ろ液をロータリーエバポレーター（760 mmHg, 38 °C）で濃縮することによって各画分（～100 μL）を得た。目的の成分を含む 3 画分（RT = 29 分から 32 分）を合わて画分 **A** とし、以降の分析に用いた。

2. 2. 4. 分取 HPLC により得られた画分の GC-MS

GC-MS は、ガスクロマトグラフ（5890GC, Agilent Technologies）と質量分析計（5972MSD, Agilent Technologies）を接続した分析装置を用いて行った。キャピラリーカラムとして InertCap WAX（60 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm, ジーエルサイエンス）を用いた。キャリアガス流量は 1.2 mL/min（ヘリウム, ≥99.99995%）、オーブン昇温プログラムは 70 °C（5 min）から 240 °C（3 °C/min）に設定した。分取 HPLC により得られた画分 **A** 2 μL をスプリットレス（1 min）で分析装置に導入した。

2. 2. 5. *trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の立体選択的な化学合成

Corey ら（1980）の 11,12-epoxyeicosatetraenoic acid の全合成を参考にして、(1) 銅触媒アルキル–アルキニルクロスカップリング反応、(2) 三重結合の *trans*-二重結合への位置選択的かつ立体選択的な還元、（3）*m*-chloroperoxybenzoic acid（*m*CPBA）を用いた Prilezhaev エポキシ化、(4) 非共役三重結合の *Z*-二重結合への Lindlar 還元、(5) Dess-Martin 酸化、最後に（6）Wittig 反応の 6 段階で、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal を化学合成した。

2. 2. 5. 1. 銅触媒アルキル–アルキニルクロスカップリング反応

Magnesium（5.8 g, 238 mmol）を含むEt_2O（10 mL）にbromoethane（25.3 g, 231 mmol）の テトラヒドロフラン（THF）溶液（70 mL）を室温で滴下し、1時間撹拌して、ethylmagnesium bromideのTHF溶液（ab. 2.88 mol/L）を得た。その溶液に propargyl alcohol（6.0 g, 106 mmol）の THF 溶液（10 mL）を−10 °C で加えた。混合溶液を室温で1.5時間撹拌した後、copper(I) chloride（CuCl）（203 mg, 2 mmol）、1-bromo-2-pentyne（10 g, 66 mmol）、THF（20 mL）を−10 °Cで加えた。混合溶液を12時間還流した後、0.2 mol/L硫酸水溶液（200 mL）にてクエンチした。有機層と水層を分離した後、水層から反応生成物を*tert*-ブチルメチルエーテル（TBME）（3 × 100 mL）で抽出した。合わせた有機層を1.0 mol/L炭酸水素ナトリウム水溶液（2 × 200 mL）および飽和食塩水（2 × 200 mL）で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した後、ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮して、2,5-octadiyn-1-ol（8.7 g）を得た。

Mass spectrum (EI, 70 eV, *m*/*z*): 39 (42), 51 (33), 53 (27), 63 (23), 65 (34), 77 (100), 78 (40), 79 (40), 91 (62), 103 (39), 104 (85), 121 (7), 122 (M^+, 7).

2. 2. 5. 2.　三重結合の*trans*-二重結合への位置選択的かつ立体選択的な還元

Lithium aluminium hydride（LAH）（3.0 g, 79 mmol）を含むEt_2O溶液（150 mL）に2,5-octadiyn-1-ol（8.7 g）を含むEt_2O溶液（50 mL）を0 °Cで滴下した。混合溶液を室温で5時間撹拌した後、0 °C で水（300 mL）および1.0 mol/L塩酸水溶液（300 mL）を加えた。有機層と水層を分離した後、水層から反応生成物をTBME（4 × 200 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水（3 × 100 mL）で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した後、ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮し、黄色の粗生成物（6.1 g）を得た。粗生成物を分別蒸留（86 °C boiling point/5 mmHg）で精製し、*trans*-2-octen-5-yn-1-ol（5.0 g, 40 mmol）を収率61%（2段階）で得た。

Mass spectrum (EI, 70 eV, *m*/*z*): 39 (52), 41 (38), 51 (24), 53 (26), 57 (38), 65 (30), 67 (36), 77 (76), 79 (100), 91 (60), 95 (85), 109 (32), 123 (5), 124 (M^+, 1).

2. 2. 5. 3.　*m*CPBAを用いたPrilezhaevエポキシ化

trans-2-Octen-5-yn-1-ol（5.0 g, 40 mmol）を含むジクロロメタン溶液（100 mL）に*m*CPBA（75%, 20.8 g, 92 mmol, ナカライテスク）および20%炭酸ナトリウム水溶液（130 mL）を0 °Cで加えた。混合溶液を0 °Cで3時間撹拌した。有機層と水層を分離した後、水層から反応生成物をジクロロメタン（1 × 100 mL）で抽出した。有機層を10%炭酸ナトリウム水溶液（3 × 100 mL）および飽和食塩水（3 × 100 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。その後、ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮し、黄色の粗生成物を得た。粗生成物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル = 30/70, v/v）で精製し、*trans*-2,3-epoxy-5-octyn-1-ol（2.6 g, 19 mmol）を収率48%で得た。

Mass spectrum (EI, 70 eV, *m*/*z*): 39 (82), 41 (100), 43 (34), 51 (34), 53 (63), 57 (27), 65 (45), 66 (26), 67 (48), 77 (50), 79 (70), 81 (32), 83 (24), 109 (76), 111 (24), 125 (2), 140 (M^+, 0.2).

2. 2. 5. 4.　非共役三重結合の*Z*-二重結合へのLindlar還元

Lindlar触媒（5% Pd/$CaCO_3$ poisoned with lead, 0.1 g, Sigma-Aldrich）とquinoline（0.1 g）を含むTHF溶液（50 mL）に*trans*-2,3-epoxy-5-octyn-1-ol（2.6 g, 19 mmol）を加えた。上層を水素に置換し、大気圧下で室温で3時間撹拌した。このとき、水素220 mLを消費した。反応混合溶液をセライト（CAS No.: 91053-39-3, Sigma-Aldrich）を用いて減圧下（30 mmHg）でろ過した後、ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮し、黄赤色の粗生成物（2.6 g）を得た。粗生成物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル = 50/50, v/v）で精製した。溶出液を1.0%硫酸水溶液（2 × 100 mL）、1.0 mol/L炭酸水素ナトリウム水溶液（1 × 100 mL）、飽和食塩水（1 × 100 mL）で順に洗浄することによって残存したquinolineを除去した。溶出液を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した後、ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮し、*trans*-2,3-epoxy-(*Z*)-5-octen-1-ol（1.9 g, 13 mmol）を収率68%で得た。

Mass spectrum (EI, 70 eV, *m*/*z*): 39 (51), 41 (89), 43 (39), 53 (23), 55 (62), 57 (23), 67 (100), 68 (40), 69 (30), 81 (35), 82 (30), 111 (8), 141 (0.02), 142 (M^+, not detected).

2. 2. 5. 5.　Dess-Martin酸化

反応はLinら（1999）の方法を参考にして行った。Dess-Martin periodinaneの15 wt%ジクロロメタン溶液（20 g, 7.1 mmol, Acros Organics）と炭酸水素ナトリウム（8.0 g, 95 mmol）を含むジクロロメタン溶液（50 mL）を室温で10分間撹拌した。混合

溶液に*trans*-2,3-epoxy-(*Z*)-5-octen-1-ol（0.7 g, 5.1 mmol）のジクロロメタン溶液（50 mL）を加え、室温で24時間撹拌した。沈澱物が溶解するまで飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えた。有機層と水層を分離した後、水層から反応生成物をTBME（2 × 100 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（2 × 100 mL）および飽和食塩水（2 × 100 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮し、固液状の生成物を得た。生成物をペンタン（2 × 50 mL）およびベンゼン（50 mL）で洗浄し、デカンテーションで分離した。合わせた有機層をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮し、粗生成物（1.3 g）を得た。さらに、粗生成物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ベンゼン）で精製し、*trans*-2,3-epoxy-(*Z*)-5-octenal（0.6 g, 4.3 mmol）を収率84%で得た。

Mass spectrum (EI, 70 eV, *m*/*z*): 39 (56), 41 (93), 43 (24), 53 (26), 55 (65), 67 (49), 68 (39), 71 (100), 79 (22), 81 (70), 93 (14), 111 (5), 139 (0.07), 140 (M^+, not detected).

2. 2. 5. 6. Wittig反応

反応はLinら（1999）の方法を参考にして行った。*trans*-2,3-Epoxy-(*Z*)-5-octenal（0.6 g, 4.3 mmol）と(triphenylphosphoranylidene)acetaldehyde（2.2 g, 7.2 mmol, Sigma-Aldrich）をベンゼン（50 mL）に溶解し、混合溶液を3時間還流した。ベンゼンを留去した後、濃縮物をヘキサン（100 mL）で洗浄した。デカンテーションで分離した後、有機層をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮した。得られた粗生成物（0.5 g）をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル = 90/10, v/v）で精製し、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal（0.4 g, 2.4 mmol）を収率56%で得た。全収率は9.4%（6段階）であった。

Mass spectrum (EI, 70 eV, *m*/*z*): 39 (64), 41 (66), 55 (21), 67 (89), 68 (100), 69 (31), 81 (25), 94 (8), 109 (5), 123 (6), 137 (3), 150 (0.3), 165 (0.04), 166 (M^+, not detected).

IR (neat, cm^{-1}): 3014 w, 2965 s, 2935 w, 2875 w, 1694 vs, 1641 m, 1433 m, 1163 m, 1104 s, 974 s, 926 m, 883 m, 758 w, 720 w.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, δ): 9.57 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, C<u>H</u>=O), 6.55 (1H, dd, *J* = 15.6, 6.9 Hz, C<u>H</u>=CHCH=O), 6.39 (1H, dd, *J* = 16.0, 7.8 Hz, CH=C<u>H</u>CH=O), 5.59 (1H, m, CH_3CH_2C<u>H</u>=CH), 5.36 (1H, m, CH_3CH_2CH=C<u>H</u>), 3.37 (1H, dd, *J* = 6.9, 1.8 Hz, O-C<u>H</u>CH=CH), 3.00 (1H, ddd, *J* = 5.5, 5.0, 1.8 Hz, CH_2C<u>H</u>-O), 2.49 (1H, m, C<u>H</u>$_2$CH-O), 2.41 (1H, m, C<u>H</u>$_2$CH-O), 2.06 (2H, m, CH_3C<u>H</u>$_2$CH=CH), 0.99 (3H, t, *J* = 7.8 Hz, C<u>H</u>$_3$$CH_2$CH=CH).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, δ): 192.25 (CH, <u>C</u>H=O), 152.59 (CH, <u>C</u>H=CHCH=O), 135.33 (CH, CH_3CH_2<u>C</u>H=CH), 133.34 (CH, CH=<u>C</u>HCH=O), 121.30 (CH, CH_3CH_2CH=<u>C</u>H), 60.87 (CH, CH_2<u>C</u>H-O), 55.35 (CH, O-<u>C</u>HCH=CH), 29.19 (CH_2, <u>C</u>H_2CH-O), 20.49 (CH_2, CH_3<u>C</u>H_2CH=CH), 13.92 (CH_3, <u>C</u>$H_3$$CH_2$CH=CH).

2. 2. 6. (4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal [IUPAC 名: (2*E*)-3-{(2*S*,3*S*)-3-[(2*Z*)-pent-2-en-1-yl]oxiran-2-yl}prop-2-enal]のエナンチオ選択的な化学合成

trans-2-Octen-5-yn-1-ol から出発して、(1) Katsuki-Sharpless 不斉エポキシ化、(2) Lindlar 還元、(3) Dess-Martin 酸化、最後に (4) Wittig 反応の 4 段階で、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal をエナンチオ選択的に化学合成した。

2. 2. 6. 1. Katsuki-Sharpless 不斉エポキシ化

Katsuki-Sharpless不斉エポキシ化反応はGaoら（1987）の方法を参考にして行った。活性モレキュラーシーブ4Å粉末（0.15 g, ナカライテスク）、L-(+)-diethyl tartrate

（L-(+)-DET, 0.07 g, Sigma-Aldrich）、蒸留精製したtitanium(IV) isopropoxide（Ti(O-*i*-Pr)$_4$, 0.07 g, ナカライテスク）のジクロロメタン溶液（40 mL）に*tert*-butyl hydroperoxide（TBHP）の5.5 mol/Lデカン溶液（2 mL, Sigma-Aldrich）を–10 °Cで加えた。30分間撹拌した後、*trans*-2-octen-5-yn-1-ol（0.63 g, 5 mmol）を–20 °Cで加え、混合溶液を3.5時間撹拌した。反応終了後、1.2 mol/L硫酸鉄と0.6 mol/L酒石酸の混合溶液（5 mL）を–5 °C で加え、反応混合溶液を10分間撹拌した。有機層と水層を分離した後、水層から反応生成物をTBME（2 × 50 mL）で抽出した。合わせた有機層を30 wt%水酸化ナトリウムとともに0 °Cで1時間撹拌した。有機層と水層を分離した後、水層から反応生成物をTBME（2 × 50 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水（2 × 50 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター（20 mmHg, 40 °C）で濃縮し、(2*S*,3*S*)-*trans*-2,3-epoxy-5-octyn-1-ol [IUPAC 名 : [(2*S*,3*S*)-3-(pent-2-yn-1-yl)oxiran-2-yl]-methanol]を含む粗生成物（1.88 g）を得た。

2. 2. 6. 2. Lindlar 還元

Lindlar触媒（0.13 g）とquinoline（0.14 g）を含むTHF溶液（20 mL）に粗生成物（1.88 g）を加えた。上層を水素で置換した後、混合溶液を大気圧下で室温で1.5時間撹拌した。このとき水素210 mLを消費した。反応混合溶液をセライト（CAS No.: 91053-39-3）を用いて減圧下（30 mmHg）でろ過した後、ろ液をロータリーエバポレーター（20 mmHg, 40 °C）で濃縮し、(2*S*,3*S*)-*trans*-2,3-epoxy-(*Z*)-5-octen-1-ol [IUPAC名 : {(2*S*,3*S*)-3-[(2*Z*)-pent-2-en-1-yl]oxiran-2-yl}methanol] を含む粗生成物（1.78 g）を得た。

2. 2. 6. 3.　Dess-Martin 酸化

粗生成物（1.78 g）とDess-Martin periodinaneの15 wt%ジクロロメタン溶液（16.3 g）と炭酸水素ナトリウム（7.0 g）をジクロロメタン（200 mL）に溶解し、混合溶液を室温で24時間撹拌した。沈殿物が溶解するまでチオ硫酸ナトリウム飽和水溶液を加えた。有機層と水層を分離し、水層から反応生成物をTBME（2 × 50 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（2 × 100 mL）および飽和食塩水（2 × 100 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した後、ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮した。得られた固液状の粗生成物をペンタン（2 × 50 mL）およびベンゼン（50 mL）で洗浄した。デカンテーションで分離した後、合わせた有機層をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮し、粗生成物（1.51 g）を得た。粗生成物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル = 95/5, v/v）で精製し、(2*R*,3*S*)-*trans*-2,3-epoxy-(*Z*)-5-octenal [IUPAC 名 : (2*R*,3*S*)-3-[(2*Z*)-pent-2-en-1-yl]-oxirane-2-carbaldehyde]（0.42 g, 3 mmol）を収率60%（3段階）で得た。

2. 2. 6. 4.　Wittig 反応

(2*R*,3*S*)-*trans*-2,3-Epoxy-(*Z*)-5-octenal（0.42 g, 3 mmol）と(triphenylphosphoranylidene)acetaldehyde（1.50 g）のベンゼン溶液（50 mL）を3時間還流した。ベンゼンを留去した後、残った濃縮物をヘキサン（80 mL）で洗浄した。デカンテーションで分離した後、有機層をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮した。得られた粗生成物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル = 90/10, v/v）で精製し、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal（0.08 g, 0.5 mmol）を収率17%で得た。全収率は10%（4段階）、鏡像体過剰

率は96%e.e.（by enantio-MDGC-MS, **2.2.7.**の分析条件）、比旋光度は$[\alpha]_D^{25}$ = –23.2°（*c* 0.4, hexane）であった。

2. 2. 6. 5. (4*R*,5*R*)-*trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal [IUPAC 名: (2*E*)-3-{(2*R*,3*R*)-3-[(2*Z*)-pent-2-en-1-yl]oxiran-2-yl}prop-2-enal]のエナンチオ選択的な化学合成

(4*R*,5*R*)-*trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal（0.11 g）は、4*S*,5*S* 体の合成における 1 段階目の反応を D-(–)-DET（Sigma-Aldrich）を用いた Katsuki-Sharpless 不斉エポキシ化に替えることによって、エナンチオ選択的に化学合成した。全収率は 13%（4 段階）、鏡像体過剰率は 96%e.e.（by enantio-MDGC-MS, **2.2.7.**の分析条件）、比旋光度は$[\alpha]_D^{25}$ = +21.0°（*c* 0.4, hexane）であった。

2. 2. 7. enantio-MDGC-MS によるキラル分析

enantio-MDGC-MS は、2 台のガスクロマトグラフ（1 次および 2 次オーブン）（ともに 6890GC, Agilent Technologies）をクライオトラップシステム（CTS1, Gerstel）で連結し、検出器として 1 次オーブンに FID（Agilent Technologies）、2 次オーブンに質量分析計（5973MSD, Agilent Technologies）を接続した分析装置を用いて行った。キャピラリーカラムとして、1 次オーブンに高極性カラムの TC-WAX（polyethylene glycol, 30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 µm, ジーエルサイエンス）、2 次オーブンにキラルキャピラリーカラムの Supelco GAMMA DEX 225（25% 2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-γ-cyclodextrin in SPB-20 poly（20% phenyl/80% dimethylsiloxane）phase, 30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 µm, Sigma-Aldrich）を用いた。キャリアガス流量は 1.2 mL/min（ヘリウム, ≥99.99995%）に設定した。オーブン昇温プログラムは、1 次オーブンは 70 °C（5 min）から 240 °C（3 °C/min）、2 次オーブンは 110 °C に設定した。CTS1 の温度は 250 °C に設定し

た。分取 HPLC により得られた画分 3 μL をスプリットレス（1 min）で分析装置に導入した。1 次オーブンでのハートカット操作は、マルチカラムスイッチングシステム（MCS2, Gerstel）を用いて、1 次カラム（TC-WAX）における RT = 43.0 分から 44.0 分の 1 分間で行った。光学異性体比はピーク面積比から算出した（3 回の平均値）。

2. 2. 8. 生成モデル実験

Kumazawa ら（2006）の手法を参考にした。α-Linolenic acid（10.6 mg）と硫酸鉄（II）七水和物（$FeSO_4$・$7H_2O$）（3.4 mg）の glycerol tributanoate（tributyrin）溶液（5 mL）を 150 °C で 1 時間加熱した。反応物に内標準物質として ethyl decanoate の 100 mg/L tributyrin 溶液（1.0 mL）を加えた。また、(9*Z*,11*E*,13*S*,15*Z*)-hydroperoxy-9,11,15-octadecatrienoic acid（(13*S*)-HPOT）（100 μg, フナコシ）と $FeSO_4$・$7H_2O$（0.1 mg）の tributyrin 溶液（50 μL）を 150 °C で 1 時間加熱した。内標準物質として ethyl decanoate の 100 mg/L tributyrin 溶液（10 μL）を加えた。加熱脱着システム（TDS, Gerstel）内で各反応物を昇温速度 50 °C/min で 20 °C から 120 °C に加熱して揮発性成分を気化させた（ベント流量: 50 mL/min, パージ流量: 95 mL/min）。気化した揮発性成分をクールドインジェクションシステム（CIS, –150 °C）で捕集した後、再び 250 °C で気化させて、スプリットレス（1 min）で GC-MS 装置（6890N/5973MSD, Agilent Technologies）に導入した。キャピラリーカラムとして、高極性カラムの InertCap Pure-WAX（polyethylene glycol, 60 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm, ジーエルサイエンス）を用いた。キャリアガス流量は 1.9 mL/min（ヘリウム, ≥99.99995%）、オーブン昇温プログラムは 70 °C（5 min）から 240 °C（3 °C/min）に設定した。

2. 2. 9.　評価

2. 2. 9. 1.　香気特性

trans-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal のオルソネーザルな香りの閾値および香調を分析した。水中の閾値および GC-O 装置のスニッフィングポートから気化したとき（空気中）の閾値の二種類を測定した。水中の閾値の測定方法は Simian ら（2004）の方法、一方、空気中の閾値は Ullrich と Grosch（1987）の方法を参考にして行った。また、*cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal および *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal をそれぞれ Kumazawa ら（2006）の方法および Lin ら（1999）の方法を参考にして化学合成し、それぞれの香りの閾値および香調を分析し、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal と比較した。

2. 2. 9. 2.　ユズフレーバーへの添加効果

(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal のユズフレーバーへの添加効果を評価した。3 名のパネラー（男性, 30 代～40 代）により優れている点と優れていない点を用語により評価した。試験サンプルの業務用のユズフレーバーは以下のようにして調製した。含水アルコール（水/95%エタノール = 40/60, 100 g）にユズ油（1.6 g）とマンダリン油（2.4 g）を添加して室温で 3 時間撹拌した。混合液を冷凍庫内（–19 °C）で終夜静置した後、ろ過して、ユズフレーバーを得た（収率 86%）。得られたユズフレーバー（100 μL）をイオン交換水（100 mL）に添加して、その溶液に 4*S*,5*S* 体のエタノール溶液（10 μL, 濃度: 1 μL/L）を添加して試験サンプルを調製した。コントロール品は 4*S*,5*S* 体の代わりに 99.5%エタノール（10 μL）を添加して調製した。調製した各試験サンプルのオルソネーザルな香りを評価した。

2. 3.　結果および考察

2. 3. 1.　試料

本研究で用いたユズ果実は天然ユズの特徴的な香りを有していた。その果皮からヘキサン浸漬抽出によって香気成分を含むユズ果皮ヘキサン抽出物を調製した。得られたユズ果皮ヘキサン抽出物は良好な香りを有していたので、これを用いて、以下の分析を行った。

2. 3. 2.　AEDA 法によるユズ果皮ヘキサン抽出物中の香気寄与成分のスクリーニング

AEDA 法によりユズ果皮ヘキサン抽出物中の香気寄与成分のスクリーニングを行った。その結果、FD ファクター32 から 1024 までの 28 種の香気寄与成分を検出した（表 2-1）。また、得られた FD ファクターから FD クロマトグラムを作成し、全イオン電流（TIC）クロマトグラムとともに図 2-2 に示した。

FD ファクターが 1024 と最も大きい値を示した香気成分は linalool（spicy, floral）であった（表 2-1）。次に大きい FD ファクター512 を示した *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は、これまでにユズから検出されているが（Miyazawa *et al*., 2009; Tomiyama *et al*., 2012）、本研究ではカンキツ果皮の内側の白く柔らかい綿状または繊維質（図 2-3, アルベド, albedo）のような香気で全体の香りに寄与することを確認した（表 2-1）。このエポキシアルデヒドは、オレンジ（Hinterholzer and Schieberle, 1998）やグレープフルーツ（Buettner and Schieberle, 1999）といった他のカンキツ類および小麦のパン（Schieberle and Grosch, 1991）、ポップコーン（Schieberle, 1991）、トマト（Mayer *et al*., 2008）などからも見出されている。その幾何異性体の *cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal も FD ファクター128 で検出し、アルベ

ド様香気で全体の香りに寄与することを確認した（表 2-1）。両化合物は脂質、主に linoleic acid の酸化により生成することが報告されている（Selke *et al*., 1980; Gassenmeier and Schieberle, 1994; Kumazawa *et al*., 2006）。

著者が注目した成分は、FD ファクター128 を示し、アルベド様香気（albedo-like）をもつ未知の微量寄与成分 **1**（RI (InertCap WAX) = 2071）、そして FD ファクター128 を示し、汗臭（sweaty）をもつ未知の微量寄与成分 **2**（RI (InertCap WAX) = 2052）であった（表 2-1, 図 2-2）。微量寄与成分 **1** は、様々な食品素材の香気寄与成分として知られている *cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal および *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal と類似したアルベド様香気をもつので注目した。一方、微量寄与成分 **2** はカンキツの香りとして異質な香りをもつので注目した。例えば、悪臭をもつ indole（fecal, 糞臭）が花の香りに寄与する成分であるように、異質な香りをもつ成分でも重要となる。ユズの香りの特徴を解明するために微量寄与成分 **1** および **2** の同定を試みた。本章では、微量寄与成分 **1** について取り上げて、**2** については第 3 章で取り上げることにした。

2. 3. 3.　既知のエポキシアルデヒドとの照合による成分同定の検討

trans-4,5-Epoxy-(*E*)-2-heptenal から *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-dodecenal までの一連の 4,5-エポキシ-α,β-不飽和アルデヒド類の香気特性は、炭素数に関わらず、類似した香調をもつことが報告されている（Buettner and Schieberle, 2001）。微量寄与成分 **1** も *cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal および *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal と類似したアルベド様の香調をもつことから、エポキシアルデヒドであると推定した。*trans*-4,5-Epoxy-(*E*)-2-undecenal はバターミルクのオフフレーバー成分（Heiler and Schieberle, 1996）およびピンクグァバの香気寄与成分（Steinhaus *et al*., 2008）として見出されている。しかしながら、Lin ら（1999）の方法を参考にして、

trans-2-nonenal のエポキシ化、続く Wittig 反応により *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-undecenal を化学合成し、確認したところ、香調はアルベド様であったものの、RI（InertCap WAX）= 2130 であり、微量寄与成分 **1** の RI = 2071 と異なったので、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-undecenal ではないと判断した。したがって、微量寄与成分 **1** を同定するためには質量スペクトルが必要であると考え、次に GC-MS による分析を行った。

2. 3. 4.　ユズ果皮ヘキサン抽出物の分画

ユズ果皮ヘキサン抽出物を GC-MS に供したところ、微量寄与成分 **1** は微量であるため検出されず、同定に必要な質量スペクトルを取得することができなかった。そのため、微量寄与成分 **1** を検出するためには、ユズ果皮ヘキサン抽出物を主成分であるテルペン系炭化水素部と少量成分の含酸素部に分画して、微量寄与成分 **1** を可能なかぎり濃縮する必要があると考えた。そこで、ユズ果皮ヘキサン抽出物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。GC-O の結果、エーテル画分つまり含酸素部に微量寄与成分 **1** が含まれていることを確認した。しかしながら、エーテル画分を GC-MS に供しても、微量寄与成分 **1** の質量スペクトルを取得することができなかった。

そこで、分取 HPLC によるエーテル画分の分画を検討した。分取 HPLC はシリカゲルカラムクロマトグラフィーよりもより細かく分画することができるために香気成分分析において広く利用されている（Barron and Pabst, 1991）。分取 HPLC によりエーテル画分を 24 画分に分画し、GC-O に供した結果、RT = 29 分から 32 分の間に得られた 3 画分に微量寄与成分 **1** のアルベド様香気を確認した。したがって、3 画分を合わせたものを画分 **A** とし、RI（InertCap WAX）= 2071 で検出した微量寄与成分 **1** を同定するために、次に画分 **A** を GC-MS に供した。

2. 3. 5.　GC-MS による微量寄与成分 1 の化学構造の推定

画分 **A** を GC-MS に供した結果、微量寄与成分 **1** の質量スペクトルが得られた（図 2-4）。得られた質量スペクトルから **1** の化学構造を推定した。

質量スペクトルにおいて、主要なフラグメントイオンは *m/z* 68 であり、4,5-エポキシ-α,β-不飽和アルデヒド類の特徴と一致した。その他のフラグメントイオン（*m/z* 39, 41, 67, 69）により非共役二重結合の存在が示唆された。電子イオン化（EI）法によるイオン化では 4,5-エポキシ-α,β-不飽和アルデヒド類の分子イオンピークは得られないことが知られている（Buettner and Schieberle, 2001）。微量寄与成分 **1** の質量スペクトルにおいても分子イオンピークが得られなかったので、**1** は 4,5-エポキシ-α,β-不飽和アルデヒド類であることが強く示唆された。さらに、*m/z* 165 のフラグメントイオンはアルデヒド基の水素原子の消失により生じたと考えられたので、微量寄与成分 **1** の分子量は 166 であると推定した。このことから 4,5-エポキシ-α,β-不飽和アルデヒド類のような共役不飽和アルデヒド基の存在が示唆された。したがって、質量スペクトルより微量寄与成分 **1** は分子量 166 で、α,β-不飽和結合をもつ 4,5-epoxydecadienal であると推定した。しかし、もう一つの二重結合の位置は質量スペクトルから判断することができなかった。

一方、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は linoleic acid の酵素的な酸化および自動酸化による分解生成物であることが報告されている（Selke *et al*., 1980; Gassenmeier and Schieberle, 1994; Kumazawa *et al*., 2006）。当然、linoleic acid と同様に α-linolenic acid の酸化分解も起こると考えられた。図 2-2 に示したように、ユズ果皮ヘキサン抽出物中には linoleic acid および α-linolenic acid が含まれている。そして、表 2-1 に示したように、ユズ果皮ヘキサン抽出物から linoleic acid の酸化分解生成物である *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal が見出されている。したがって、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal が α-linolenic acid から類似の経路で生成すると推察した。

この化合物は、分子量 166 であり、α,β-不飽和結合をもつ 4,5-epoxydecadienal であるので、微量寄与成分 **1** は *trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal であると推定した。次に、化学構造を決定するために、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal を化学合成した。

2. 3. 6. *trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の立体選択的な化学合成

trans-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal には、8 種の幾何異性体が存在するので、立体選択的な化学合成が必要であると考えた。化学合成は Corey ら（1980）の 11,12-epoxyeicosatetraenoic acid の全合成を参考にして行った。図 2-5 に示したように、まず propargyl alcohol と 1-bromo-2-pentyne との銅触媒クロスカップリング反応により 2,5-octadiyn-1-ol を得て、続いて LAH で三重結合を位置選択的かつ立体選択的に還元して *trans*-2-octen-5-yn-1-ol を得た。次に、*m*CPBA で二重結合を Prilezhaev エポキシ化して *trans*-2,3-epoxy-5-octyn-1-ol を得て、続く Lindlar 還元により 5 位の三重結合を *Z*-二重結合に還元して *trans*-2,3-epoxy-(*Z*)-5-octen-1-ol を得た。その後の反応は Lin ら（1999）の方法を参考にして行い、すなわち Dess-Martin 酸化、続く Wittig 反応を行うことにより目的の *trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal を全収率 9.4%（6 段階）で立体選択的に化学合成した。

合成した *trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の化学構造は、赤外吸収スペクトルおよび ^{1}H-および ^{13}C-核磁気共鳴（NMR）スペクトルを測定して決定した。*E*-*Z* 幾何異性は、^{1}H-NMR スペクトルにおける隣接カップリング定数（*J*）で決定した。C2–C3 二重結合のカップリング定数は 16.0 Hz で、C7–C8 二重結合は 11.0 Hz であった（図 2-6）。一般的に 0–12 Hz は *Z* 体で、12–18 Hz は *E* 体である。したがって、C2–C3 二重結合は *E* 体で、C7–C8 二重結合は *Z* 体であると決定した。くわえて、エポキシ環の C4–C5 の隣接カップリング定数は 1.8 Hz であった（図 2-6）。

この値は*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenalの1.8 Hzと同じで、一方、*cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenalの4.6 Hzと異なったので、エポキシ環の立体配置は*trans*体であると決定した。したがって、新しく開発した合成法により目的の*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal を化学合成したことを確認した。本研究において、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalの立体選択的な化学合成を初めて達成した。

2. 3. 7. (4*S*,5*S*)-および(4*R*,5*R*)-*trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalのエナンチオ選択的な化学合成

trans-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalは4位と5位に不斉炭素中心をもつので、4*S*,5*S*体と4*R*,5*R*体の二つの光学異性体が存在する。微量寄与成分**1**の立体化学を明らかにするために、各光学異性体をエナンチオ選択的に化学合成した。

両光学異性体は、ラセミ体の化学合成における Prilezhaev エポキシ化反応をKatsuki-Sharpless不斉エポキシ化反応（Gao *et al*., 1987）に替えて、エナンチオ選択的に化学合成した。図 2-7 に示したように、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalは、1段階目でL-(+)-DETを用いたKatsuki-Sharpless不斉エポキシ化反応を行うことにより、全収率10%（4段階）、鏡像体過剰率96%e.e.でエナンチオ選択的に化学合成した。また、4*R*,5*R*体は、1段階目の反応をD-(–)-DET を用いたKatsuki-Sharpless不斉エポキシ化に替えることで、全収率13%（4段階）、鏡像体過剰率 96%e.e.でエナンチオ選択的に化学合成した。したがって、本研究において、(4*S*,5*S*)-および(4*R*,5*R*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalのエナンチオ選択的な化学合成を初めて達成した。

2. 3. 8.　微量寄与成分 1 の同定

同定は Molyneux と Schieberle（2007）の報告を参考にして行った。つまり、微量寄与成分 **1** と化学合成した *trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal を、質量スペクトル（図 2-4 および図 2-8）、RI（InertCap WAX）= 2071、そして香調（albedo-like, by GC-O）の三点のデータについて照合した結果、一致することを確認した。したがって、微量寄与成分 **1** を *trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal であると同定した。

2. 3. 9.　微量寄与成分 1 のキラル分析

光学異性体によって香気特性（香調および香りの閾値）は異なることが多いため、素材中の香気成分のキラリティーを確認することは重要である（Mosandl, 1988; Bentley, 2006）。特に、香気寄与成分のキラリティーは全体の香りへの寄与に大きく影響するので、その光学異性体比を明らかにすることが必要である。本研究において最も大きい FD ファクターを示した linalool は、*R* 体であることが報告されている（宮里, 2009）。微量寄与成分 **1** についても FD ファクターが 128 と比較的大きいので、天然ユズ中の **1** の光学異性体比を調べることは重要であると考えた。そこで、エナンチオ選択的に化学合成した(4*S*,5*S*)-および(4*R*,5*R*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal を用いて、ユズ果皮ヘキサン抽出物中の微量寄与成分 **1** の光学異性体比を確認することによって、その立体化学を明らかにすることを試みた。

enantio-MDGC-MS は、光学活性な香気成分の光学異性体比を調べることに対して非常に有効な分析法である（Schomburg *et al*., 1984; Werkhoff *et al*., 1993）。本研究では、octakis(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-γ-cyclodextrin のキラルキャピラリーカラムを用いて、分取 HPLC により得られた画分 **A** を enantio-MDGC-

MS に供した。その結果、図 2-9 に示したように、微量寄与成分 **1** は 4*S*,5*S* 体（100 %）であることを確認し、一方の光学異性体のみが優先的に存在することが明らかになった。つまり、微量寄与成分 **1** を(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal と同定した。

2. 3. 10.　微量寄与成分 1 の推定生成経路

2. 3. 5.で述べたように、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal は α-linolenic acid の酸化分解生成物であると推測した。それを確認するために、まず α-linolenic acid を用いたモデル酸化分解反応を行った。二価の鉄イオンの存在下で α-linolenic acid を tributyrin 中 150 °C で 1 時間加熱した。しかしながら、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の生成を確認することはできなかった（表 2-2）。

そこで、酸化効率が悪かったと考え、α-リノレン酸過酸化物(13*S*)-HPOT を出発基質としたモデル酸化分解反応を行った。二価の鉄イオンの存在下で(13*S*)-HPOT を tributyrin 中 150 °C で 1 時間加熱した。得られた反応物を GC-MS に供した結果、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の生成を確認した（表 2-2）。

2. 3. 9.に示したように、微量寄与成分 **1** は 4*S*,5*S* 体であることが判明したので、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal は、α-linolenic acid の非酵素的な自動酸化よりも、酵素的な酸化分解によってエナンチオ選択的に生成することが示唆された。したがって、以下のような生成経路を推定した。

図 2-10 に示したように、まず脂質の加水分解により遊離した α-linolenic acid が、13-lipoxygenase（13-LOX）によりエナンチオ選択的に過酸化され、(13*S*)-HPOT が生成する。次に、hydroperoxide lyase（HPL）、divinyl ether synthase（DES）、allene oxide synthase（AOS）のような酵素の働きにより、生成した(13*S*)-HPOT の 13 位に反応性の高いアルコキシラジカルが発生し、隣接した 12 位の不飽和炭素と炭

素－酸素結合を形成する。このとき、13 位の絶対立体配置 *S* を保持したかたちで 12,13(*S*)-エポキシドが生成する。同時に生じた 11 位のエポキシアリル炭素ラジカルは、アリル転位により 9 位のエポキシアリル炭素ラジカルを生じた後、おそらく 9-LOX により過酸化され、エポキシペルオキシドが生成する。続くモノアセタールの変換機構は確かではないが、おそらく 9-HPL により進行し、最後に加水分解して、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal が生成すると推定した。

植物体内の酵素的な脂質酸化において、LOX、HPL、DES、AOS などの酵素が働いて、さまざまなオキシリピン類が生成されることが知られている（Mosblech *et al*., 2009; Stumpe and Feussner, 2006）。したがって、これらの酵素が(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の生成に関与していると推測した。推定生成経路から、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal は非酵素的な自動酸化よりも酵素的な脂質酸化により生合成されることが強く示唆される。くわえて、生成モデル実験から、微量寄与成分 **1** は脂質を含む他の食品素材にも存在し、ユズに限定的な成分ではないということが示唆される。

2. 3. 11.　評価

2. 3. 11. 1.　香気特性

ヒトが知覚する香りには、口に含んだ際に喉越しから鼻に抜ける香りの口腔香気（レトロネーザルアロマ）と、口に含む前の鼻先から入ってくる香りの鼻腔香気（オルソネーザルアロマ）の二種類がある。本研究では後者のオルソネーザルアロマについて分析した。

表 2-3 に示したように、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の水中のオルソネーザルな香りの閾値は 0.5 μg/L であり、*cis* 体の閾値 10 μg/L よりも低く、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal（0.5 μg/L）と同じであることを確認した。また、*trans*-4,5-epoxy-

(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の空気中の閾値は 3.2–16.8 × 10^{-4} ng/L であり、Buettner と Schieberle（2001）が報告した *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal の閾値 6–25 × 10^{-4} ng/L とほぼ同じであることを確認した。

香調については、高濃度（15 mg/L, エタノール溶液）では fatty、green、grassy な香りであった。一方、閾値より 30 倍高い濃度（0.015 mg/L, エタノール溶液）では、albedo-like、citrus-like の香調をもち、濃度が高くなるにつれて fatty、green、grassy な香調が加わることを確認した。

2. 3. 11. 2.　ユズフレーバーへの添加効果

表 2-4 に示したように、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の添加により、シトラスの香りは弱まるものの、天然のユズがもつ青草様の香りおよびスパイシーな香りが強まり、ユズの甘い香りと本物感のある果汁感が強く付与され、さらにアルベド様のカンキツ独特の脂肪感が増強されることを確認した。特に、脂肪感は剥き立てのユズを感じさせるといった有効な添加効果を示すことを確認した。しかしながら、アルベド様の脂肪感がマイナス評価につながる傾向も見受けられた。これについては嗜好的な要因によるものと考えられた。類似化合物の *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal はユズの果皮感を強めるが、それとは異なる風味への効果があることが判明した。

2. 4.　結論

本章では、ユズ果皮ヘキサン抽出物中の新規の微量寄与成分 **1** について述べた。まず、AEDA 法を用いてユズ果皮ヘキサン抽出物中の香気寄与成分のスクリーニ

ングを行い、微量寄与成分 **1** を検出した。次に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、続く分取 HPLC によりヘキサン抽出物を分画した。得られた画分を GC-MS に供し、得られた質量スペクトルから微量寄与成分 **1** の化学構造を推定した。確認のために候補化合物を化学合成した。くわえて、enantio-MDGC-MS による微量寄与成分 **1** のキラル分析を行った。その結果、微量寄与成分 **1** はアルベド様香気をもつ(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal であると特定した。

これまでに類似化合物のアルベド様香気をもつ*cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenalおよび*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenalは、多くの食品素材から見出されている。それに対して、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalは初めて見出された。このことは香料科学に有益な知見をもたらすものである。

また、ラセミ体の*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalおよび光学異性体の(4*S*,5*S*)-および(4*R*,4*R*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalを新しい合成法により化学合成することができた。つまり、8種の幾何異性体のうち*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalを立体選択的に化学合成することを達成した。また、Katsuki-Sharpless 不斉エポキシ化反応を鍵とする新しい合成法を開発して、(4*S*,5*S*)-および(4*R*,5*R*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalをエナンチオ選択的に化学合成することを達成した。この成果は、天然ユズ中に微量成分として含まれる本化合物を大量に入手することを可能とし、香料産業界における本化合物の応用を可能とすると期待される。

さらに、キラル分析および生成モデル実験の結果から、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienalは酵素的な脂質酸化によりエナンチオ選択的に生合成されることが強く示唆される。くわえて、本化合物はユズのみに存在するのではなく、脂質を含む様々な食品素材に存在することが示唆される。

最後に、業務用のユズフレーバーへの添加効果を評価した結果、(4*S*,5*S*)-*trans*-

4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal は、ユズ本来の青草様およびスパイシーな香りを強め、ユズの甘い香りと果汁感を強く付与し、さらにアルベド様の香りによる剥き立てのユズを想起させ、本物感を強める効果があることが判明し、ユズフレーバーの香気特性を高めることを確認した。本成果から、飲料、菓子、冷菓、ジャムなどの加工製品に幅広く応用できるユズフレーバーの創出が期待される。

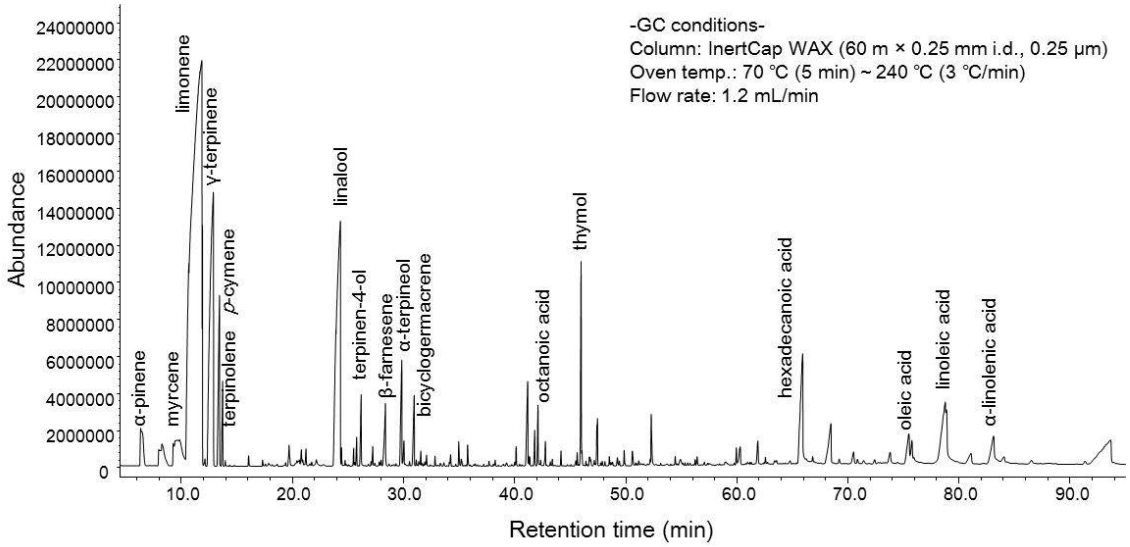
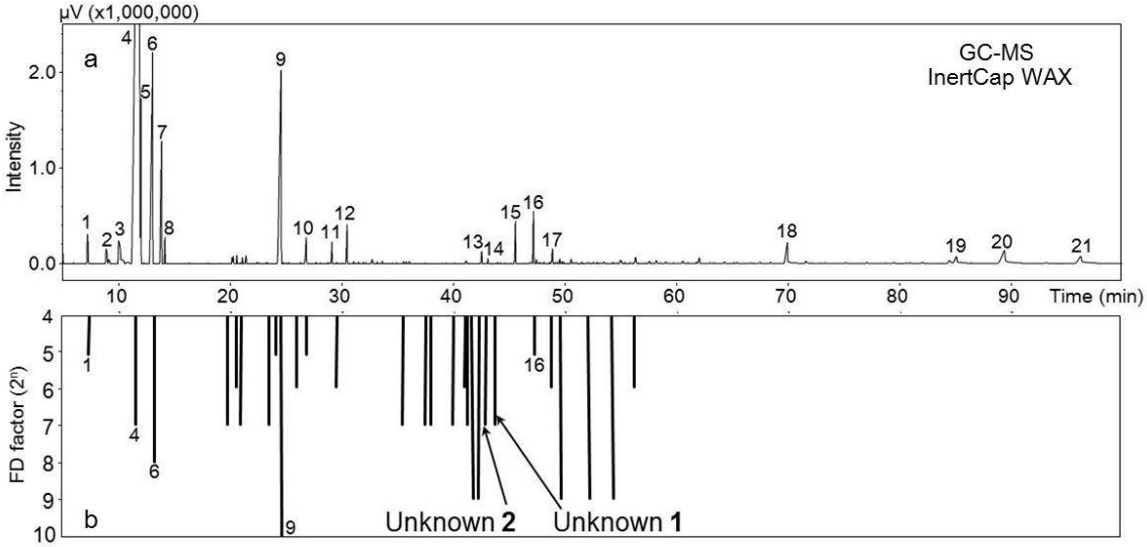


図 2-1. ユズ果皮ヘキサン抽出物の **GC** クロマトグラム



1, α-pinene (0.7%); 2, β-pinene (0.5%); 3, myrcene (1.4%); 4, limonene (61.1%); 5, β-phellandrene* (2.3%); 6, γ-terpinene (8.2%); 7, *p*-cymene (3.1%); 8, terpinolene (0.4%); 9, linalool (8.7%); 10, terpinen-4-ol (0.6%); 11, β-farnesene* (0.4%); 12, α-terpineol (0.8%); 13, (*Z*)-9-dodecen-12-olide* (0.3%); 14, octanoic acid (0.1%); 15, spathulenol* (0.9%); 16, thymol (0.9%); 17, α-cadinol* (0.3%); 18, hexadecanoic acid (1.2%); 19, oleic acid (0.4%); 20, linoleic acid (1.6%); 21, α-linolenic acid (1.0%) (The asterisks indicate tentatively identified compounds)

図 2-2. ユズ果皮ヘキサン抽出物の **TIC** クロマトグラム（**a**）および **FD** クロマトグラム（**b**）

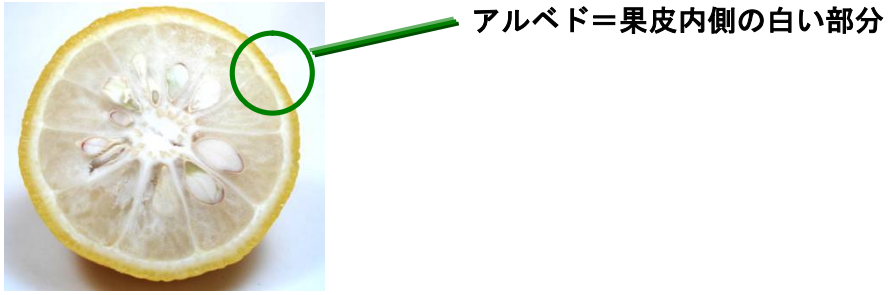


図 **2-3.** ユズ果実の断面図

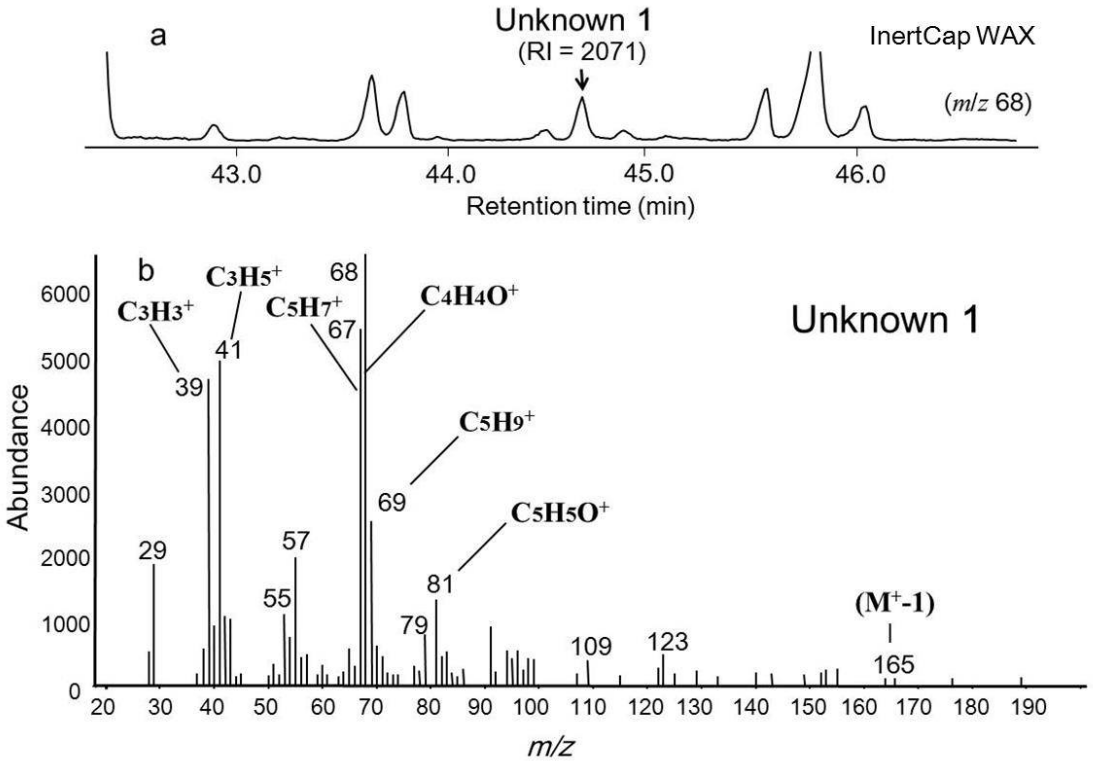


図 2-4. ユズ果皮ヘキサン抽出物の分取 **HPLC** 画分 **A** の **GC-MS** により得られた微量寄与成分 **1** の質量スペクトル

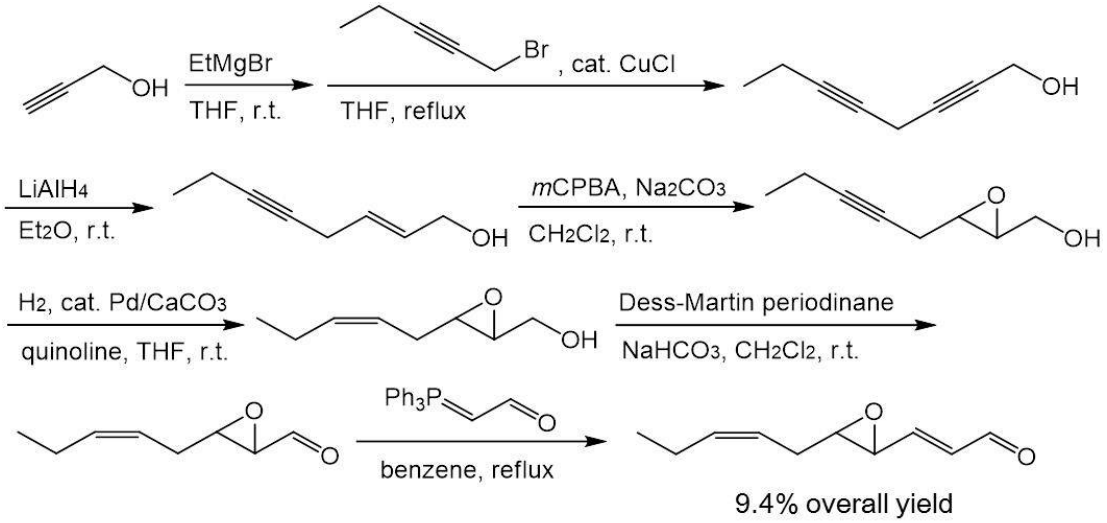


図 2-5. *trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の立体選択的な化学合成

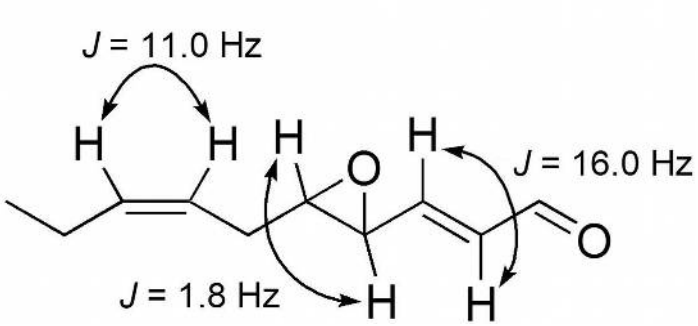


図 2-6. 化学合成した *trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の *J* 値

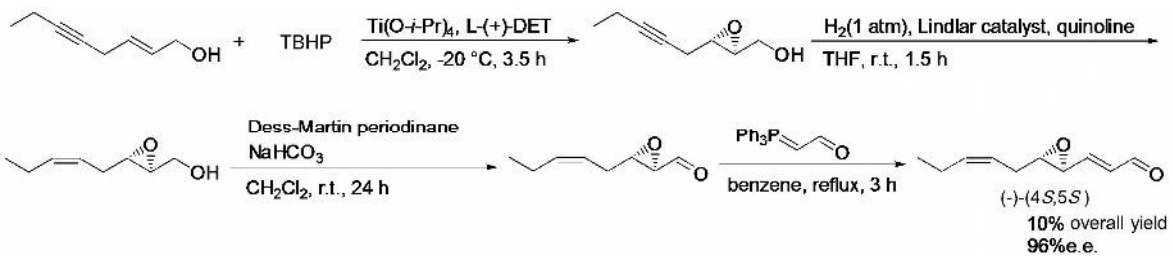


図 **2-7. (4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal** のエナンチオ選択的な化学合成

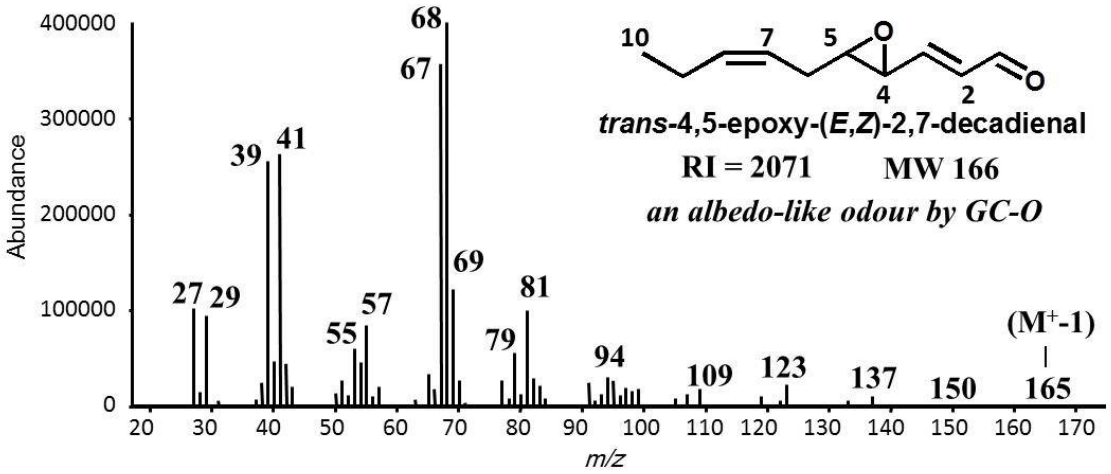


図 2-8. 化学合成した ***trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal** の質量スペクトル

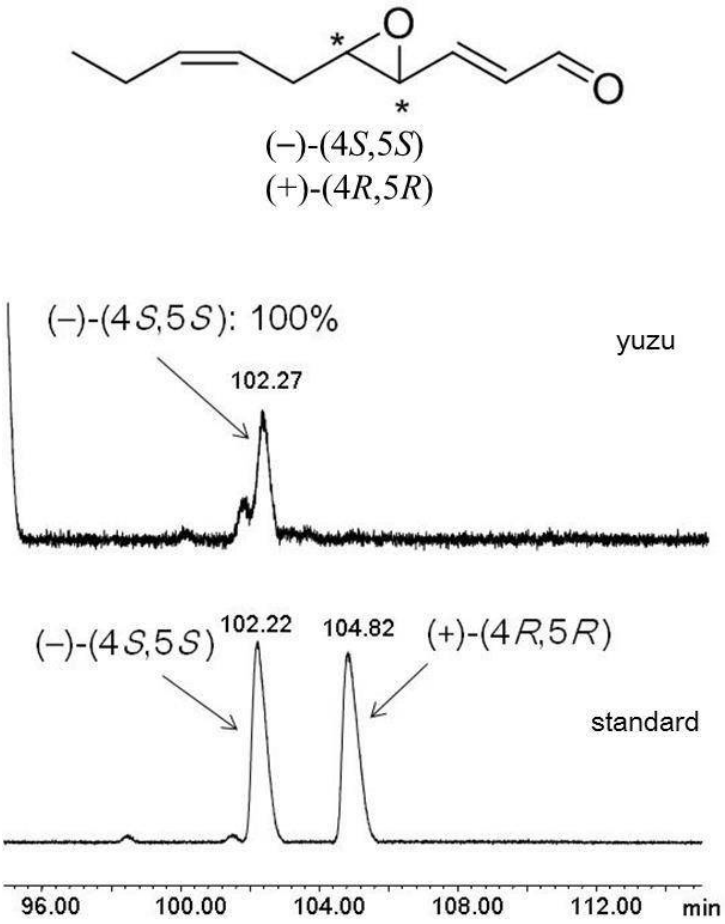


図 2-9. ユズ果皮ヘキサン抽出物の分取 **HPLC** 画分 **A** 中の ***trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal** の光学異性体比（**by enantio-MDGC-MS, GAMMA DEX 225**）

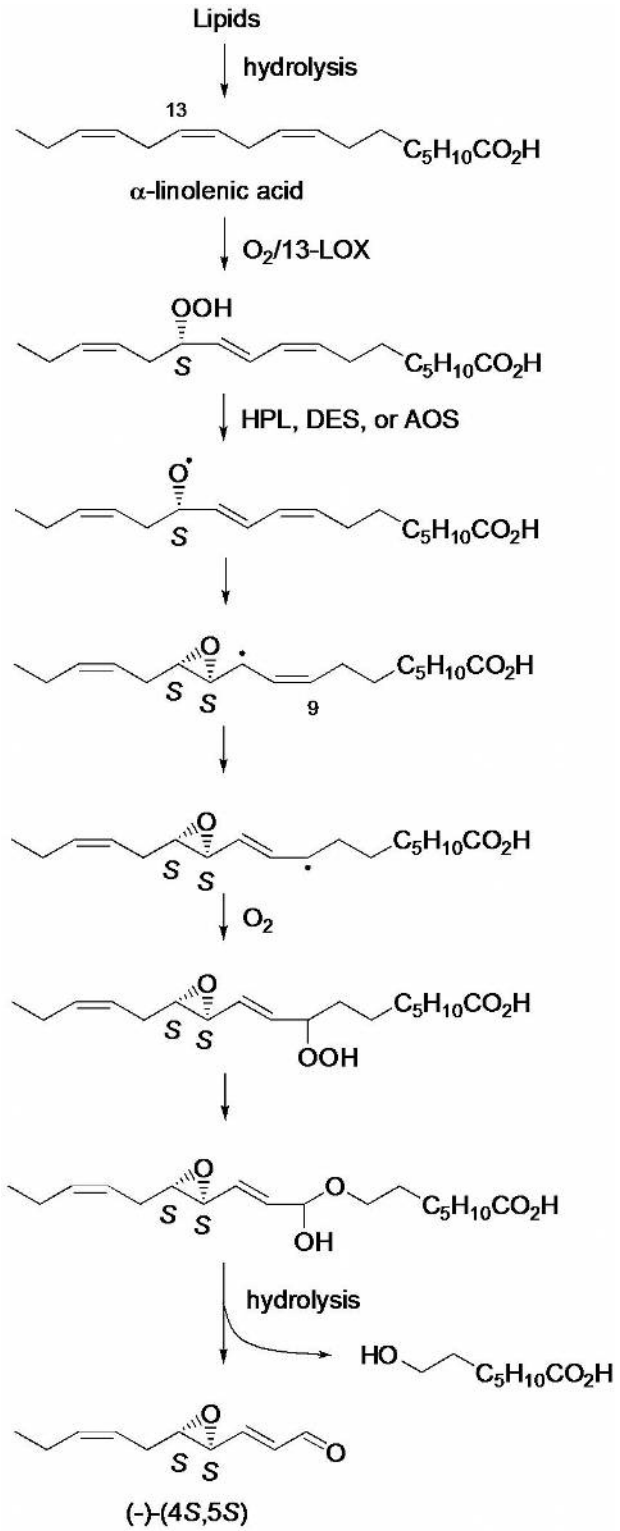


図 2-10. 天然ユズにおける酵素的な脂質酸化による**(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal** の推定生成経路

表 **2-1. AEDA** 法によるユズ果皮ヘキサン抽出物中の香気寄与成分（**FD** ファクター**32** 以上）の検出

No.	Odour quality [a]	Odorous compounds [b]	RI (InertCap WAX)	FD factor	Identification criteria
1	terpene-like	(*R*/*S*)-α-pinene	1026	32	RI, MS, GC-O
2	citrus	(*R*)-limonene [c]	1207	128	RI, MS, GC-O
3	camphor-like, phenolic	γ-terpinene	1255	256	RI, MS, GC-O
4	grassy	(*E*,*Z*)-1,3,5-undecatriene	1398	128	RI, MS, GC-O
5	camphor-like	dehydro-*p*-cymene	1444	64	RI, MS, GC-O
6	grassy	(*E*,*Z*,*Z*)-1,3,5,8-undecatetraene	1457	128	RI, MS, GC-O
7	spicy, woody, mossy, wetty	unknown	1533	128	GC-O
8	fried chiken-like, waxy	(*Z*)-4-decenal	1555	32	RI, MS, GC-O
9	spicy, floral	(*R*)-linalool [c]	1556	1024	RI, MS, GC-O
10	grassy	unknown	1578	64	GC-O
11	camphor-like	β-caryophyllene	1602	32	RI, MS, GC-O
12	orange-like, sweet	unknown	1666	64	GC-O
13	fruity, sweet	(*E*)-β-damascenone [d]	1850	128	RI, GC-O
14	grassy	(*Z*,*E*)-6,8,10-undecatrien-3-one	1909	128	RI, MS, GC-O
15	spicy, flowery	unknown	1911	128	GC-O
16	violet-like	β-ionone	1924	128	RI, MS, GC-O
17	grassy	(*Z*,*E*)-6,8,10-undecatrien-4-ol [d]	1994	64	MS, GC-O
18	albedo-like	*cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal	1995	128	RI, MS, GC-O
19	albedo-like	*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal	2003	512	RI, MS, GC-O
20	sugar-like	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furnaone [d]	2044	512	RI, GC-O
21	sweaty	unknown **2**	2052	128	GC-O
22	albedo-like	unknown **1**	2071	128	GC-O
23	medicine, phenolic	thymol	2185	32	RI, MS, GC-O
24	spicy	unknown	2211	64	GC-O
25	coconut-like	unknown	2242	512	GC-O
26	orange-like, sweet	unknown	2305	512	GC-O
27	orange-like, sweet	unknown	2406	512	GC-O
28	orange-like, sweet	unknown	2585	64	GC-O

[a] The description of the odour quality perceived by GC-O

[b] The odorous compound was identified by comparison of identification criteria such as retention index (RI), mass spectrum (MS), and odour quality by GC-O with that of the authentic reference substance

[c] The absolute configurations of (*R*)-limonene and (*R*)-linalool were confirmed using a chiral GC-MS equipped with β- or γ-cyclodextrin capillary columns

[d] Tentatively identified compound

表 2-2. α-Linolenic acid および(13*S*)-HPOT からの酸化分解による *trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の生成

Odorant	Amount (μg) [b]	
	α-linolenic acid	(13*S*)-HPOT
trans-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal	n.d. [c]	0.005

[a] α-Linolenic acid- or (13*S*)-HPOT-containing mixtures were heated at 150 °C for 1 h in the presence of ferrous ion

[b] Ethyl decanoate was used as the internal reference

[c] n.d. = not determined

表 2-3. *trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal と類似したエポキシアルデヒド類の香気特性

Odorant	RI(InertCap WAX)	Odour quality		Odour threshold [c]			
				This work		Literature [f]	
		This work [a]	Literature [b]	In water [d]	In air [e]	In water	In air
trans-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal	2003	albedo-like, fatty, citrus, green	fatty, metallic, citrus, peely, juicy, sweet	0.5	—	0.038 (0.13 [g])	(6–25) × 10^{-4}
cis-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal	1995	albedo-like, sweet, green	citrus, peely, albedo-like, juicy, sweet, metallic	10	—	—	—
trans-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal	2071	albedo-like, citrus, fatty, grassy, green	—	0.5	(3.2–16.8) × 10^{-4}	—	—

[a] The evaluation was performed by three panellists at the following concentrations: 0.1–10 mg/L ethanol for *cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal and *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal and 0.015–15 mg/L ethanol for *trans*-4,5- epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal

[b] A description is given in refs. Miyazawa *et al*. (2009), Buettner and Schieberle (2001), and Kumazawa *et al*. (2006)

[c] The odour threshold is the orthonasal detection value (in water, μg/L; in air, ng/L)

[d] The evaluation was performed by seven panellists according to the method by Simian *et al*. (2004)

[e] The evaluation was performed by three panellists according to the method by Ullrich and Grosch (1987)

[f] Data from refs. Buettner and Schieberle (2001) and Czerny *et al*. (2008)

[g] The value is the recognition odour threshold given by Czerny *et al*. (2008)

表 2-4. (4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-Epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の業務用のユズフレーバーへの添加効果

4*S*,5*S* 体を添加したときのユズフレーバーに対する評価コメント
◎ユズの甘い香り（果汁感）が強まる。
○果皮のアルベド由来の香り、柑橘独特の脂っぽさが強まる。
△青草様・スパイシー香気がわずかに強まる。
×シトラスの香りは弱くなる。
×脂っぽさが好ましくない。

第 3 章　ユズ果皮ヘキサン抽出物中の微量カルボン酸の同定と評価

3. 1.　背景

第 2 章において、AEDA 法による香気寄与成分のスクリーニングを行った結果、ユズ果皮ヘキサン抽出物から微量寄与成分 **1** とともに、FD ファクター128 を示し、汗臭（sweaty）をもつ未知の微量寄与成分 **2** を検出した（表 2-1 および図 2-2）。本章では、ユズ果皮ヘキサン抽出物を酸塩基処理し、続いて酸性画分を IEC により分画した。得られた酸性画分を MDGC-MS に供して微量寄与成分 **2** の化学構造を推定し、候補化合物を化学合成することによって化学構造を決定した。くわえて、ユズフレーバーへの添加効果を評価し、微量寄与成分 **2** の市場的な価値を評価した。

3. 2.　実験

3. 2. 1.　試料

試料は **2. 2. 1.** と同じものを用いた。

3. 2. 2.　ユズ果皮ヘキサン抽出物の分画

3. 2. 2. 1.　酸塩基処理

ユズ果皮ヘキサン抽出物（3.0 g）を Et_2O（200 mL）に溶解した。その溶液に 10%炭酸水素ナトリウム水溶液（500 mL）を加えて、室温で 18 時間撹拌した。

有機層と水層を分離して、水層を Et_2O（2 × 100 mL）で洗浄し、不けん化物を除去した。濃塩酸（塩酸 35%含有）の 50%希釈水溶液を加えて水層を酸性にし、水層から反応生成物を Et_2O（2 × 100 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水（4 × 100 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過した後、溶媒をロータリーエバポレーター（760 mmHg, 38 °C）で留去し、酸性画分（0.23 g）を得た。

3. 2. 2. 2.　IEC による分画

Akutsu ら（2006）の方法を参考にして、逆相－陰イオン交換ミックスモードポリマーの固相カートリッジである Oasis MAX（Nihon Waters）を用いて IEC を行った。IEC を行う前に、メタノール（1 mL）および蒸留水（1 mL）でカートリッジのコンディショニングを行った。ユズ果皮ヘキサン抽出物（1.1 g）を **3. 2. 2. 1.** と同様の酸塩基処理に供して、酸性成分の溶解した塩基性水溶液を得た。得られた塩基性水溶液（50 mL）を Oasis MAX に流し、酸性成分を吸着した。その後、蒸留水（5 mL）、酢酸ナトリウム水溶液（1 mL, 50 mmol/L, pH 7.0）、メタノール（2 mL）、メタノール–2%ギ酸溶液（2 mL）を順に流した。メタノール–2%ギ酸溶液に飽和食塩水（50 mL）を加えて、Et_2O（50 mL）で酸性成分を抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した後、溶媒をロータリーエバポレーター（760 mmHg, 40 °C）で留去することによって、酸性画分 **B**（～50 μL）を得た。

3. 2. 3.　IEC により得られた酸性画分の MDGC-MS

MDGC-MS は、2 台のガスクロマトグラフ（1 次および 2 次オーブン）（ともに 6890GC）を CTS1 で連結し、検出器として 1 次オーブンに FID、2 次オーブンに質量分析計（5973MSD）を接続した分析装置を用いて行った。キャピラリーカラ

ムとして、1 次オーブンに高極性カラムの TC-WAX（polyethylene glycol, 30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm）、2 次オーブンに低極性カラムの InertCap 1（100% methylpolysiloxane, 60 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm, ジーエルサイエンス）を用いた。キャリアガス流量は 1.2 mL/min（ヘリウム, ≥99.99995%）に設定した。オーブン昇温プログラムは、1 次オーブンは 70 °C（5 min）から 240 °C（3 °C/min）、2 次オーブンは 70 °C（45 min）から 240 °C（3 °C/min）に設定した。CTS1 の温度は 250 °C に設定した。 IEC により得られた酸性画分 **B** 3 μL をスプリットレス（1 min）で導入した。1 次オーブンにおけるハートカット操作は、MCS2 を用いて、1 次カラム（TC-WAX）における RT = 42.0 分から 43.8 分（1.8 分間）で行った。

3. 2. 4. (*E*)-4-Methyl-3-hexenoic acid の立体選択的な化学合成

(*E*)-4-Methyl-3-hexenoic acid は、(1) ホモプロパルギルアルコールの鉄触媒位置選択的アルキル化反応、続く（2）Jones 酸化の 2 段階で立体選択的に化学合成した。

3. 2. 4. 1. ホモプロパルギルアルコールの鉄触媒位置選択的アルキル化反応

Zhang と Ready（2006）が開発した反応を利用して、(*E*)-4-methyl-3-hexen-1-ol を立体選択的に化学合成した。3-Pentyn-1-ol（1.68 g, 20 mmol）と iron(III) acetylacetonate（$Fe(acac)_3$）(1.47 g, 4 mmol, Sigma-Aldrich) を含むトルエン溶液（100 mL）に 1.0 mol/L ethylmagnesium bromide の THF 溶液（100 mL, 100 mmol, Sigma-Aldrich）を−78 °C で加えた。混合溶液を−78 °C で 30 分間撹拌し、続いて室温で 15 時間撹拌した。その後、−78 °C で ヘキサン（50 mL）と飽和塩化アンモニウム水溶液（200 mL）を加えた。有機層と水層を分離し、水層から反応生成

物をヘキサン（3 × 100 mL）で抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した後、ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮し、赤色の粗生成物を得た。粗生成物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル = 90/10, v/v）で精製し、(*E*)-4-methyl-3-hexen-1-ol（*E*/*Z* = 94/6 by GC, 0.61 g）を収率 27%で得た。

Mass spectrum (EI, 70 eV, *m*/*z*): 39 (20), 41 (42), 43 (10), 53 (10), 55 (100), 67 (11), 70 (14), 81 (15), 83 (23), 114 (M^+, 11).

3. 2. 4. 2.　Jones 酸化

(*E*)-4-Methyl-3-hexen-1-ol（128 mg, 1.1 mmol）のアセトン溶液（50 mL）に Jones 試薬（440 μL）を 0 °C でゆっくり加えた。混合溶液を 0 °C で 30 分間撹拌した。その後、過剰の Jones 試薬を 2-プロパノールでクエンチし、混合溶液を炭酸水素ナトリウムで中和した。緑色の固体をろ別した後、ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮し、緑色の粗生成物を得た。粗生成物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル = 80/20, v/v）で精製し、目的の生成物(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid（*E*/*Z* = 96/4 by GC, 27 mg）を収率 19%で得た。全収率は 5%（2 段階）であった。本生成物を分取ガスクロマトグラフィー（分取 GC）で精製した。

Mass spectrum (EI, 70 eV, *m*/*z*): 39 (20), 41 (52), 43 (16), 53 (15), 55 (100), 56 (14), 67 (32), 68 (15), 69 (47), 71 (13), 82 (26), 83 (36), 110 (16), 128 (M^+, 54).

IR (neat, cm^{-1}): 2967 w, 1714 vs, 1414 m, 1299 m, 1224 m, 1155 w, 1072 w, 934 m, 840 m.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, TMS, δ): 5.30 (1H, dd, *J* = 7.3, 6.0 Hz, C=C<u>H</u>CH_2), 3.10 (2H, d, *J* = 6.4 Hz, =CHC<u>H</u>$_2$C=O), 2.05 (2H, q, *J* = 7.3 Hz, CH_3C<u>H</u>$_2$C=), 1.64 (3H, s,

$C\underline{H}_3C$=), 1.02 (3H, t, J = 7.3 Hz, $C\underline{H}_3CH_2$). ^{1}H NMR データ（溶媒 CCl_4）は Kawashima ら（1988）により報告されている。

^{13}C NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$, δ): 178.72 (<u>C</u>OOH), 141.56 (=<u>C</u>=), 113.58 (=<u>C</u>HCH_2), 33.42 ($CH\underline{C}H_2COOH$), 32.21 ($CH_3\underline{C}H_2C$=), 16.27 ($\underline{C}H_3C$=), 12.42 ($\underline{C}H_3CH_2$).

3. 2. 4. 3.　分取 GC による合成した(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の精製

分取 GC は、熱伝導度検出器を接続した GC 装置（GC-14B, 島津製作所）を用いて行った。キャピラリーカラムとして、高極性カラムの InertCap WAX （30 m × 0.53 mm i.d., 膜厚: 1.00 µm, ジーエルサイエンス）を用いた。キャリアガスにヘリウム（99.9995%）を用いて、キャリアガス流量は 2.5 mL/min に設定した。(*E*)-4-Methyl-3-hexenoic acid の粗合成品 0.4 µL をダイレクト注入法により導入した。オーブン昇温プログラムは 50 °C（5 min）から 230 °C（任意の昇温速度）に設定した。注入口と検出器の温度は 250 °C に設定した。GC 装置の出口（ベント部）に、切断した DB-WAX キャピラリーカラム（polyethylene glycol, 18 cm × 0.53 mm i.d., 膜厚: 1.00 µm, J & W Scientific）を接続し、流出した(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid を捕集した（分取した RT: 30−32 min, 昇温速度: 4.0 °C/min）。

3. 2. 5.　(*Z*)-4-Methyl-3-hexenoic acid の立体選択的な化学合成

(*Z*)-4-Methyl-3-hexenoic acid は、(1) ホモプロパルギルアルコールの鉄触媒位置選択的アルキル化反応、続く (2) Jones 酸化の 2 段階で立体選択的に化学合成した。

3. 2. 5. 1.　ホモプロパルギルアルコールの鉄触媒位置選択的アルキル化反応

(*Z*)-4-Methyl-3-hexen-1-ol は *E* 体と同様の反応で化学合成した。3-Hexyn-1-ol

（2.75 g, 28 mmol）と $Fe(acac)_3$（1.94 g, 5.5 mmol）を含むトルエン溶液（150 ml）に 1.4 mol/L methylmagnesium bromide の THF–トルエン（1/3）混合溶液（100 mL, 140 mmol, Sigma-Aldrich）を加えた。混合溶液を−78 °C で 30 分間撹拌し、続いて室温で 15 時間撹拌した。反応処理後、得られた粗生成物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル = 90/10, v/v）で精製し、(*Z*)-4-methyl-3-hexen-1-ol（*E*/*Z* = 3/97 by GC, 0.74 g）を収率 23%で得た。

Mass spectrum (EI, 70 eV, *m*/*z*): 39 (20), 41 (43), 43 (10), 53 (10), 55 (100), 67 (12), 70 (15), 81 (18), 83 (22), 114 (M^+, 11).

3. 2. 5. 2. Jones 酸化

(*Z*)-4-Methyl-3-hexenoic acid も *E* 体と同様の反応で化学合成した。(*Z*)-4-Methyl-3-hexen-1-ol（128 mg, 1.1 mmol）のアセトン溶液（50 mL）に Jones 試薬（440 μL）を 0 °C でゆっくり加えた。混合溶液を 0 °C で 30 分間撹拌した。反応処理後、得られた粗生成物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル = 80/20, v/v）で精製し、(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid（*E*/*Z* = 7/93 by GC, 57 mg）を収率 36%で得た。全収率は 8%（2 段階）であった。本生成物をさらに分取 GC（条件は *E* 体と同様で **3. 2. 4. 3.**に示した）で精製した（分取した RT: 47−49 min, 昇温速度: 2.0 °C/min）。

Mass spectrum (EI, 70 eV, *m*/*z*): 39 (21), 41 (54), 43 (17), 45 (11), 53 (17), 55 (100), 56 (14), 60 (10), 67 (34), 68 (18), 69 (48), 71 (15), 73 (11), 82 (27), 83 (32), 110 (18), 128 (M^+, 52).

IR (neat, cm^{-1}): 2967 w, 1712 vs, 1414 m, 1302 m, 1223 m, 1153 w, 1073 w, 932 m, 828 m.

^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, TMS, δ): 5.27 (1H, dd, *J* = 7.3, 6.9 Hz, C=C<u>H</u>CH_2), 3.09

(2H, d, J = 6.4 Hz, =CHC$\underline{H}_2$C=O), 2.05 (2H, dd, J = 15.0, 7.8 Hz, $CH_3C\underline{H}_2C$=), 1.75 (3H, d, J = 1.4 Hz, $C\underline{H}_3C$=), 0.99 (3H, t, J = 7.8 Hz, $C\underline{H}_3CH_2$).

^{13}C NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$, δ): 178.63 (<u>C</u>OOH), 141.84 (=<u>C</u>=), 114.51 (=<u>C</u>HCH_2), 33.08 ($CH\underline{C}H_2COOH$), 24.99 ($CH_3\underline{C}H_2C$=), 15.20 ($\underline{C}H_3C$=), 12.43 ($\underline{C}H_3CH_2$).

3. 2. 6. その他のカルボン酸類の化学合成

(*E*)-3-Methyl-2-hexenoic acid は、Akutsu ら（2006）の方法を参考にして、2-pentanone と ethyl diethylphosphonoacetate の Horner-Wadsworth-Emmons 反応、続くケン化により化学合成した。

(*E*)-3-Methyl-3-hexenoic acid は、3-hexyn-1-ol と methylmagnesium bromide の反応による(*E*)-3-methyl-3-hexen-1-ol の合成、続く Jones 酸化で化学合成した。

(*E*)-5-Methyl-2-hexenoic acid は pyridine/piperidine 存在下 malonic acid と 3-methylbutanal の Knoevenagel 縮合により化学合成した。

(*E*)-2-Methyl-2-hexenoic acid は、butanal と[1-(ethoxycarbonyl)ethylidene]triphenyl-phosphorane の Wittig 反応、続くケン化により化学合成した。

(*E*)-4-Methyl-2-hexenoic acid は、pyridine/piperidine 存在下 malonic acid と 2-methylbutanal の Knoevenagel 縮合により、以下のようにして化学合成した。Malonic acid（20.8 g, 200 mmol）を含む pyridine 溶液（31.9 g, 400 mmol） に 2-methylbutanal（22.0 g, 255 mmol）および触媒量の piperidine を加えて、混合溶液を室温で 2 日間撹拌した。その後、20%硫酸水溶液を 0 °C で加え、酸性溶液を得た。酸性溶液から反応生成物をヘキサン（3 × 100 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水（3 × 100 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 38 °C）で濃縮し、無色の粗生成物を得た。粗生成物を分別蒸留（92–93 °C boiling point/3 mmHg）で精製し、

(*E*)-4-methyl-2-hexenoic acid（*E*/*Z* = 100/0 by GC, 11.5 g）を収率 45%で得た。

3. 2. 7.　評価

3. 2. 7. 1.　香気特性

(*E*)-4-Methyl-3-hexenoic acid および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid の香りの閾値および香調を分析した。オルソネーザルな香りの閾値については、水中のものおよび GC-O 装置のスニッフィングポートから気化したもの（空気中）の二種類を測定した。水中の閾値の測定方法は Simian ら（2004）の方法、空気中の閾値は Ullrich と Grosch（1987）の方法をそれぞれ参考にして行った。

3. 2. 7. 2.　ユズフレーバーへの添加効果

(*E*)-4-Methyl-3-hexenoic acid のユズフレーバーへの添加効果を評価した。業務用のユズフレーバーは以下のように調製した。ユズ油（2.0 g）、カンキツ様フレーバー（12.0 g）、オレンジ油（14.0 g）、タンジェリン油（24.0 g）、中鎖脂肪酸エステル（47.0 g）、そして *E* 体の 0.01%エタノール溶液（1.0 g）を混合して、ユズフレーバー（100 g）を調製した。コントロール品は *E* 体の代わりに 95%エタノール（1.0 g）を添加して同様に調製した。試験サンプルのユズ風味飲料は、各ユズフレーバー（1.0 g）を糖酸液（1000 g, Brix 値: 7.5, 酸度: 0.17）に添加することで調製し、その香りと風味を評価した。パネラー3 名（男性, 30 代～40 代）により優れている点を用語にして評価した。

3. 3.　結果および考察

3. 3. 1.　ユズ果皮ヘキサン抽出物の分画

微量寄与成分 **2** を同定するためには質量スペクトルが必要である。しかしながら、微量寄与成分 **2** は微量であるため、ユズ果皮ヘキサン抽出物を GC-MS に供しても質量スペクトルを取得することができなかった。したがって、ユズ果皮ヘキサン抽出物を分画して、微量寄与成分 **2** を濃縮する必要があると考えた。

微量寄与成分 **2** の香りは汗臭である。汗臭をもつ香気成分といえば、3-methylbutanoic acid および 2-methylbutanoic acid のような分枝メチル基をもつ飽和カルボン酸（Brennand *et al*., 1989）、あるいは 3-methyl-2-hexenoic acid のような分枝メチル基をもつ不飽和カルボン酸（Akutsu *et al*., 2006）が知られている。したがって、汗臭という香調から微量寄与成分 **2** は揮発性のカルボン酸であると推測した。そこで、ユズ果皮ヘキサン抽出物を酸塩基処理に供して酸性画分を得た。得られた酸性画分を GC-O に供した結果、ヘキサン抽出物と同じく RI（InertCap WAX）= 2052 に微量寄与成分 **2** の汗臭を確認した。つまり、推測したとおりに微量寄与成分 **2** はカルボン酸であることが判明した。しかしながら、得られた酸性画分を GC-MS および MDGC-MS に供しても質量スペクトルを取得することができなかった。

酸塩基処理は煩雑な操作であるので酸性成分以外の夾雑物が含まれていた。そこで、IEC による分画を行い、酸性画分を精製した。得られた酸性画分 **B** を GC-O に供したところ、微量寄与成分 **2** の汗臭を確認したので、次に酸性画分 **B** を MDGC-MS に供した。

3. 3. 2.　MDGC-MS による微量寄与成分 2 の化学構造の推定

酸性画分 **B** を MDGC-MS に供した結果、微量寄与成分 **2** を検出し、対応する質量スペクトルを取得した（図 3-1）。

図 3-1 に示したように、質量スペクトルにおいて、フラグメントイオン（*m/z* 60 と 73）から微量寄与成分 **2** はカルボン酸であると推定した。また、フラグメントイオン（*m/z* 39, 41, 67, 69）から二重結合の存在が示唆され、分子イオンピークは *m/z* 128 であるので、微量寄与成分 **2** は炭素数 7 の不飽和カルボン酸であると推定した。さらに、前述したように汗臭をもつカルボン酸には分枝メチル基をもつものが多いので、(*E*)-3-methyl-2-hexenoic acid、(*E*)-3-methyl-3-hexenoic acid、(*E*)-5-methyl-2-hexenoic acid、(*E*)-2-methyl-2-hexenoic acid、(*E*)-4-methyl-2-hexenoic acid のような分枝メチル基をもつ炭素数 7 の不飽和カルボン酸であると推定した。確認のために、これらの 5 種のカルボン酸を化学合成した。しかしながら、いずれのカルボン酸の質量スペクトルおよび RI（InertCap WAX）のデータも微量寄与成分 **2** と一致しなかった（図 3-2）。したがって、微量寄与成分 **2** はこれらの 5 種のカルボン酸ではないということが判明した。

そこで、微量寄与成分 **2** は分子量 128 をもつ他のカルボン酸であると推定し、(*E*)-4-methyl-2-hexenoic acid の化学合成における副生成物に注目した。

(*E*)-4-Methyl-2-hexenoic acid の化学合成において、ともに *m/z* 128 を示す副生成物 **X** および **Y** を検出した（図 3-3）。このうち、副生成物 **X** の質量スペクトル、RI（InertCap WAX）、そして香調の三点のデータが微量寄与成分 **2** と一致することが判明した。つまり、微量寄与成分 **2** は(*E*)-4-methyl-2-hexenoic acid の副生成物 **X** と同一の化合物であることを確認した。

ここで、副生成物の生成機構について考察した。(*E*)-4-Methyl-2-hexenoic acid は pyridine 存在下 malonic acid と 2-methylbutanal の Knoevenagel 縮合反応によって

化学合成した。Hann and Lapworth 機構（Hann and Lapworth, 1904）によると、Knoevenagel 縮合反応は中間体として aldol 型 β-ヒドロキシジカルボン酸を経由して進行し、続く 1,2-および 2,3-脱水反応により、α,β-不飽和カルボン酸（つまり 4-methyl-2-hexenoic acid）および β,γ-不飽和カルボン酸（つまり 4-methyl-3-hexenoic acid）の両カルボン酸が生成する可能性がある（図 3-4）。また、Yamanaka ら（1983）は triethylamine のような嵩高い塩基を用いて Knoevenagel 縮合反応を行うと β,γ-不飽和カルボン酸の生成が促進されることを明らかにしている。本研究においても、triethylamine 存在下で malonic acid と 2-methylbutanal の Knoevenagel 縮合反応を行ったところ、副生成物が増加した（data not shown）。したがって、副生成物は 4-methyl-3-hexenoic acid であると推定した。4-Methyl-3-hexenoic acid は *E* 体と *Z* 体の二つの幾何異性体をもつ。ここでは、図 3-3 の副生成物 **X** および **Y** が二つの幾何異性体に対応することは明らかであったものの、どちらが *E* 体もしくは *Z* 体であるかを判断することはできなかった。

上述したように、副生成物 **X** は微量寄与成分 **2** と同一の化合物であることを確認した。したがって、これまでの考察によると、微量寄与成分 **2** は(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid のどちらかであると推定した。次に、それを確認するために、両異性体を化学合成した。

3. 3. 3. (*E*)-および(*Z*)-4-Methyl-3-hexenoic acid の立体選択的な化学合成

(*E*)-および(*Z*)-4-Methyl-3-hexenoic acid の立体選択的な化学合成は、Zhang と Ready（2006）が開発した位置選択的なアルキル化反応を利用して、(*E*)-4-methyl-3-hexen-1-ol および(*Z*)-4-methyl-3-hexen-1-ol を立体選択的に化学合成し、続いて Jones 酸化により達成した（図 3-5）。このとき、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid は全収率 5%（2 段階）、(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid は全収率 8%（2 段階）で化学合成

した。

合成した(*E*)-および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid の化学構造の決定は、赤外吸収スペクトル、^{1}H-および ^{13}C-NMR スペクトル、そして質量スペクトルを測定して行った。*E*-*Z* 幾何異性は ^{1}H-NMR スペクトルにおけるプロトン（C3）とメチルプロトン（C7）の間のアリルカップリング定数で決定した。カップリング定数 1.4 Hz を示した異性体を *Z* 体と決定し、一方、アリルカップリングがない異性体を *E* 体と決定した（図 3-6）。

これまでに 4-methyl-3-hexenoic acid の化学合成例はあるものの、立体異性体の混合物として得られるのみであった（Linstead and Mann, 1930; Kawashima *et al*., 1988）。本研究において、(*E*)-および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid の立体選択的な化学合成を初めて達成した。

3. 3. 4.　微量寄与成分 2 の同定

同定は Molyneux と Schieberle（2007）の報告を参考にして行った。つまり、微量寄与成分 **2** と化学合成した(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid を、質量スペクトル（図 3-1 および図 3-7）、RI（InertCap WAX）= 2052、そして香調（sweaty, by GC-O）の三点のデータについて照合した結果、一致することを確認した。したがって、微量寄与成分 **2** を(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid であると同定した。くわえて、(*E*)-4-methyl-2-hexenoic acid の化学合成における副生成物 **X**（図 3-3）は *E* 体であり、もう一方の副生成物 **Y**（図 3-3）は *Z* 体であることを確認した。

3. 3. 5.　評価

3. 3. 5. 1.　香気特性

表 3-1 に示したように、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の水中のオルソネーザルな

香りの閾値は0.01 mg/Lであり、*Z*体の閾値0.5 mg/Lよりも低いことを確認した。また、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidの空気中の閾値は1.8–4.5 ng/Lであり、*Z*体の45–180 ng/Lよりも低いことを確認した。したがって、*E*体は*Z*体よりも10倍から100倍も閾値が低いことが判明した。香調については、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidは濃度1 mg/L（エタノール溶液）で強いsweaty、urine-likeであることを確認した。一方、*Z*体は高濃度（neatの状態）でもsweatyな香調が弱いことが判明した。

3. 3. 5. 2.　ユズフレーバーへの添加効果

表3-2に示したように、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidを添加することにより、搾りたてを想起させる新鮮な香りが付与され、果汁感と酸味が増し、ナチュラルな風味が向上することを確認した。本化合物はカンキツの香りに対して汗臭という異質な香りではあるものの、以上のように有効な添加効果があることが判明し、香りよりも風味に大きく寄与することを確認した。

3. 4.　結論

本章では、ユズ果皮ヘキサン抽出物中の新規の微量寄与成分**2**について述べた。第2章で述べたAEDA法による香気寄与成分のスクリーニングの結果、微量寄与成分**2**を検出した。次に、酸塩基処理、続いてIECによりヘキサン抽出物を分画して、得られた酸性画分をMDGC-MSに供した。得られた質量スペクトルから微量寄与成分**2**の化学構造を推定し、確認のために全ての候補化合物を化学合成した。その結果、微量寄与成分**2**は汗臭をもつ(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidであると特定した。

本化合物は微量成分であるため、天然のユズから単離して産業的に応用することは難しいと考えられる。本研究では、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidの2段階での立体選択的な化学合成法を開発することができた。この成果は、本化合物の大量入手を可能とし、本化合物の産業的な利用を可能とすると期待される。

さらに、ユズフレーバーへの添加効果を評価した結果、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid は、搾りたてを想起させる新鮮な香りを付与し、果汁感と酸味を増強する効果があり、ナチュラルな風味を付与し、本物感を強める効果があることを確認した。本研究で初めて見出された汗臭をもつ(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid は、ユズ全体の香りに対して異質な香りではあるものの、現存のユズフレーバーの香気特性を高めることが判明した。本成果から市場価値の高いユズフレーバーを創製することができると期待される。なお、本化合物は弊社のフレーバー製品に実用化されている。

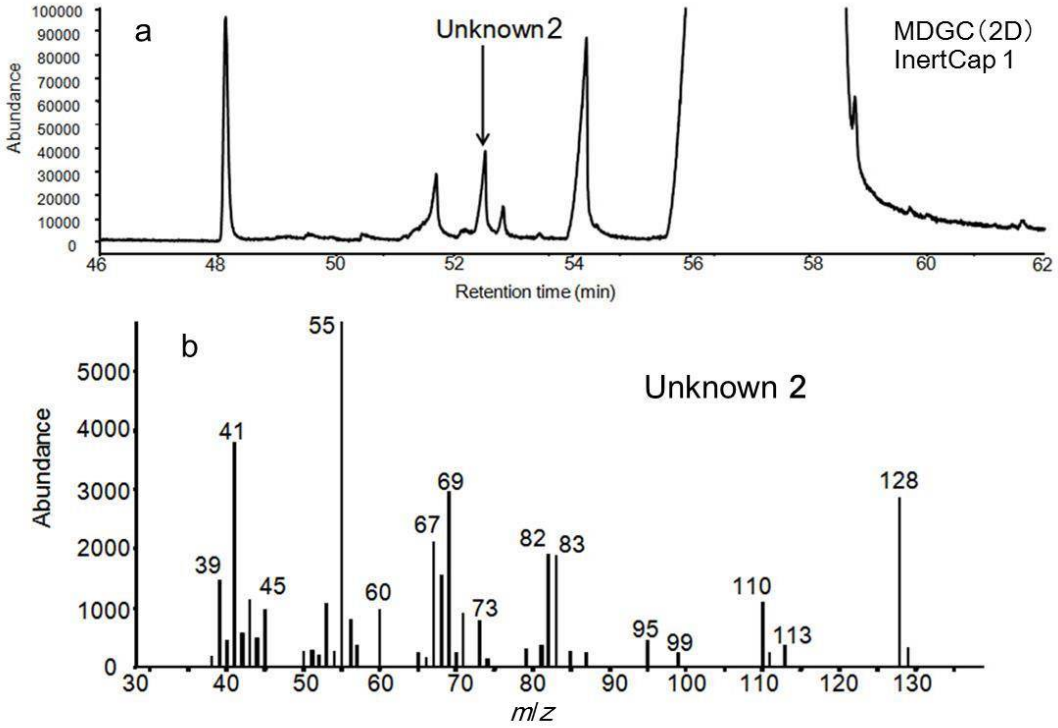


図 3-1. ユズ果皮ヘキサン抽出物の **IEC** 画分 **B** の **MDGC-MS** により得られた微量寄与成分 **2** の質量スペクトル

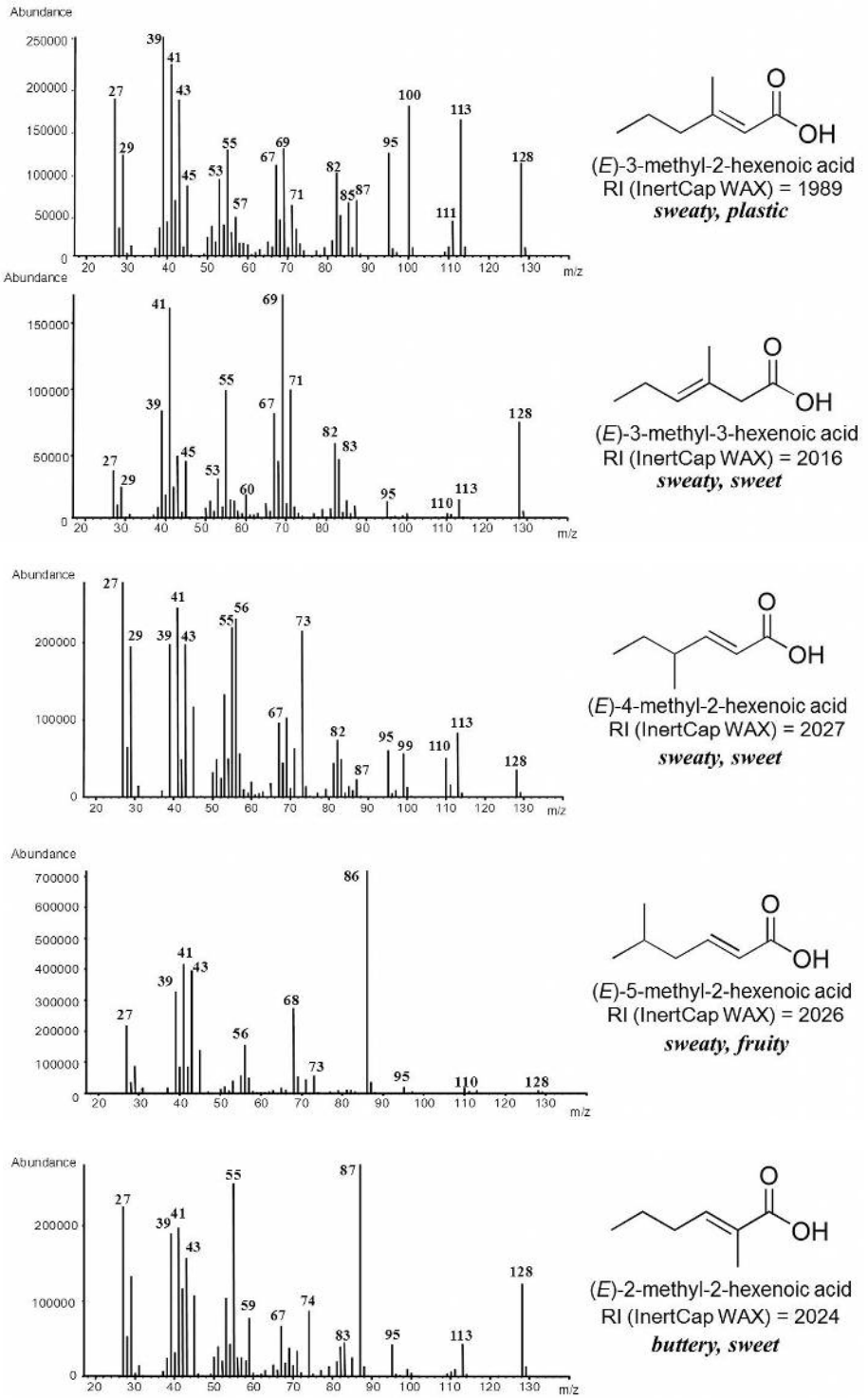
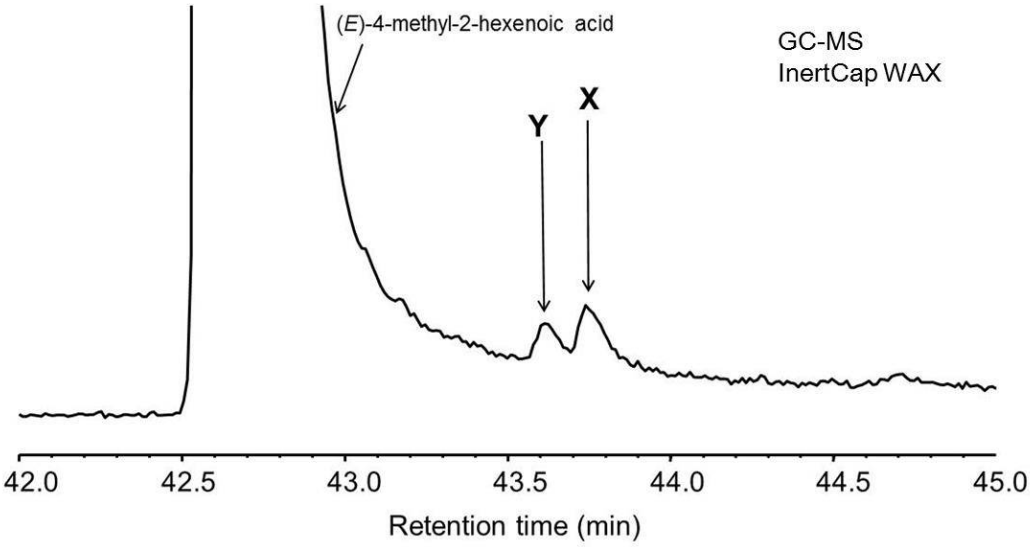


図 3-2. 炭素数 **7** の分枝メチル基をもつ不飽和カルボン酸類の質量スペクトル・**RI**・香調



X, **Y**: the sweaty-smelling byproducts in the synthesis of (*E*)-4-methyl-2-hexenoic acid

図 3-3. 化学合成した(*E*)-4-methyl-2-hexenoic acid の副生成物（X および Y）

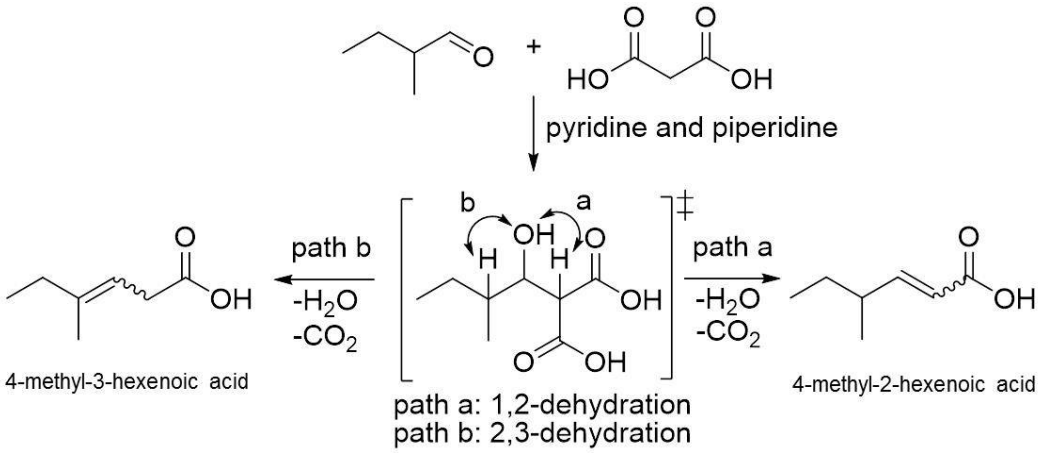


図3-4. 4-Methyl-2-hexenoic acidの化学合成における**4-methyl-3-hexenoic acid**の推定生成機構

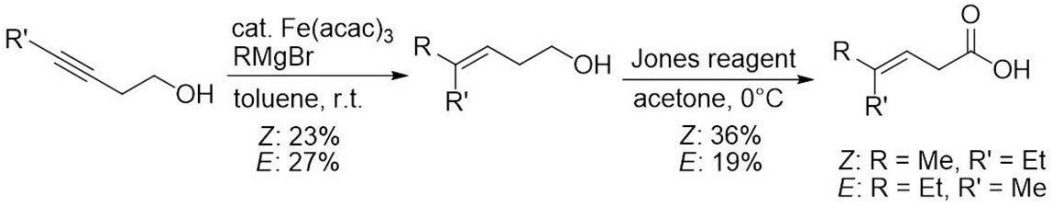


図 3-5. (*E*)-および(*Z*)-4-Methyl-3-hexenoic acid の立体選択的な化学合成

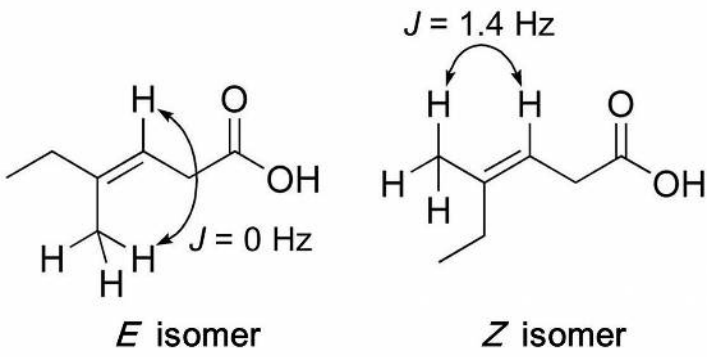


図 **3-6.** 化学合成した **4-methyl-3-hexenoic acid** の ***E*** 体および ***Z*** 体の ***J*** 値の比較

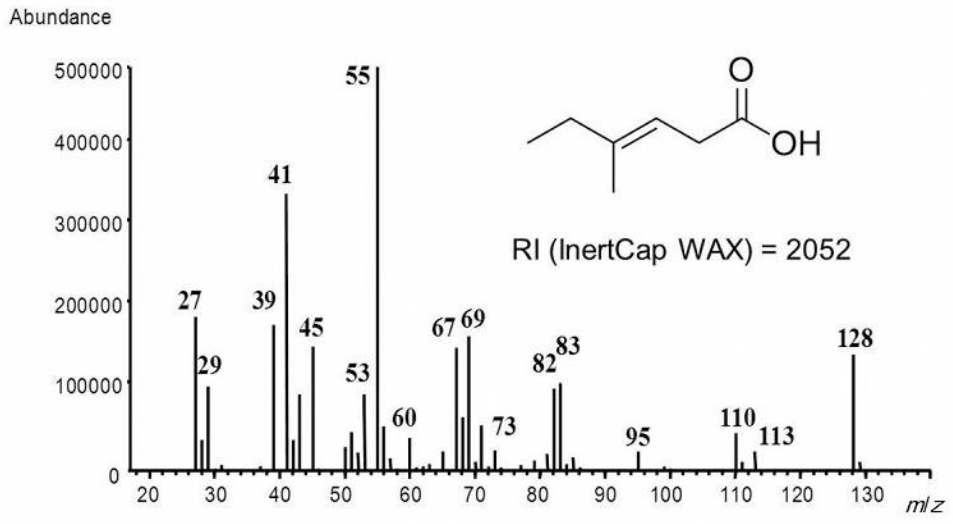


図 3-7. 化学合成した(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の質量スペクトル

表3-1. (*E*)-および(*Z*)-4-Methyl-3-hexenoic acidの香気特性

Compound	RI[a] (InertCap WAX)	RT[b] (InertCap 1)	Odour quality	Orthonasal detection odour threshold	
				mg/L in water[c]	ng/L in air[d]
(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid	2047	52.0	sligtly sweaty, plastic (neat)	0.5	45-180
(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid	2052	52.4	strongly sweaty, urine-like (1 mg/L)	0.01	1.8-4.5

[a] Retention indices on an InertCap WAX column are given

[b] Retention times on an InertCap 1 column, using MDGC(2D), are given

[c] The evaluation was performed by seven panellists using the method described by Simian *et al*. (2004)

[d] The evaluation was performed by seven panellists using the method described by Ullrich and Grosch (1987)

表 3-2. (*E*)-4-Methyl-3-hexenoic acid のユズフレーバーへの添加効果

E 体を添加したときのユズ風味飲料の香りおよび風味に対する評価コメント
◎ユズの新鮮な香りが強まる。
◎ナチュラルな果汁感（果肉感）が強まる。
◎全体的にナチュラル感（本物感）が強まる。
○酸味感がほどよく増長する。
△甘味に対しては効果があまりみられない。

第 4 章　ドリップコーヒーの固相抽出物中の微量環状 1,4-ジケトンおよび微量カルボン酸の同定と評価

4. 1.　背景

コーヒー豆は、アカネ科のコフィア属の常緑木本であるコーヒーノキ、その木になるコーヒーの実（コーヒーチェリー）に含まれる種子のことである。コーヒーノキの分類学上の代表的な種としてアラビカ種（*Coffea arabica* L.）がある。アラビカ種の焙煎コーヒー豆は、甘く芳醇な香りをもち、品質と風味がよいことから世界中で広く生産され、主にレギュラーコーヒーにして飲用されている。日本人のコーヒーの週間消費量がおよそ 11 杯であるという統計結果（2012 年, 社団法人全日本コーヒー協会）が示すように、コーヒーは日本人に愛飲されている飲料である。

近年、多くのコーヒーの加工食品が出回り、特にコーヒー飲料は種類が豊富にあり広く普及している。しかしながら、コーヒー飲料は淹れたてのレギュラーコーヒーに比べて香りや風味が劣るとされる。その一因は、加工製造時に殺菌工程があるためである。殺菌工程中に香りや風味は劣化してしまい、コーヒー本来のものではなくなってしまう。

コーヒーフレーバーは、コーヒー飲料に対してレギュラーコーヒーのような香りや風味に近づけるために使用されている。コーヒーフレーバーの重要な役割は、殺菌工程中で消失して不足した香りや風味を補うことである。しかしながら、現存のコーヒーフレーバーには、「よりナチュラルな香りで、よりおいしく」

といった人々の要望に対してもの足りなさがある。ここで、著者は、人々の要望に応えられたコーヒーフレーバーを生み出すためには、コーヒー本来の香りの特徴をより詳しく解明することが重要であると考えた。

焙煎コーヒーの香気成分は、図 4-1 に示したように、GC-MS のような一般的な分析法を用いて解明され、これまでに 850 種以上の香気成分が見出されている（Flament, 2001）。一方、焙煎コーヒーの香気寄与成分は、以前より AEDA 法のような GC-O を用いた香気寄与成分のスクリーニング法によって明らかにされている（Holscher *et al*., 1990; Blank *et al*., 1992; Czerny *et al*., 1999; Kumazawa *et al*., 2003; Akiyama *et al*., 2007）。その成果として、2-furfurylthiol、3-mercapto-3-methylbutyl formate、3-mercapto-3-methylbutyl acetate 、2-isobutyl-3-methoxypyrazine、2-ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine、2,3-diethyl-5-methylpyrazine、2-ethenyl-3,5-dimethylpyrazine、2-ethenyl-3-ethyl-5-methylpyazine、2-acetyl-1-pyrroline、4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanone (raspberry ketone) 、 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (Furaneol) 、 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanone (sotolon) 、 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5*H*)-furanone (abhexone)などの香気寄与成分が見出されている。

しかしながら、これまでに見出された香気成分および香気寄与成分のみでは、本来の焙煎コーヒーの香りや風味を再現することはできない。Semmelroch と Grosch（1996）は、23 種の香気寄与成分でコーヒーのモデル抽出液を作成して香りの評価を行ったところ、23 成分だけでは本来のコーヒーの香りを完全に再現することはできないことを報告している。つまり、コーヒーの香りの特徴がいまだに十分に解明されていないということである。ここで、著者は、焙煎コーヒーの香りに貢献する未知の微量寄与成

分が存在すると考え、その微量寄与成分を特定することによってコーヒーの香りの特徴を解明することができると考えた。その微量寄与成分は本物感のあるコーヒーフレーバーを創製するための鍵となると期待される。本研究では、未知の微量寄与成分を同定するとともにフレーバーへの添加効果を評価した。

手法は以下のようである。つまり、1）GC-O を用いた AEDA 法による未知の微量寄与成分のスクリーニング、2）シリカゲルカラムクロマトグラフィーまたは IEC による抽出物の分画、3）enantio-MDGC-MS または MDGC-MS による化学構造の推定、4）推定した候補化合物の化学合成、そして 5）立体化学を含めた化学構造の決定といった手法を用いて、未知の微量寄与成分を特定した。さらに、生成モデル実験を行い、焙煎過程における目的の微量寄与成分の生成経路を推定した。くわえて、微量香気成分のコーヒーまたは他の様々な食品素材に対する添加効果を評価して、本成分の市場的な価値を評価した。

4. 2.　実験

4. 2. 1.　微量環状 1,4-ジケトンの同定と評価

4. 2. 1. 1.　試料

4. 2. 1. 1. 1.　焙煎コーヒー豆

焙煎したコーヒー豆（商品名: ブラジルサントス No.2）をユニカフェより購入した。コーヒー豆の原種はアラビカ種（*Coffea arabica* L.）で、産地国はブラジルで、焙煎度合いを表す L 値（川上, 1995）は 18（深煎り）であった。

4. 2. 1. 1. 2.　ドリップコーヒー

焙煎コーヒー豆をミルミキサー（IFM-700G, 岩谷産業）で粉末にした。得られた粉末（30.0 g）を市販のコーヒー用フィルターペーパー（100%バージン紙）に詰め、上から熱水（300 mL, 温度: ～90 °C）を注ぎ入れて、ドリップコーヒー（200 mL）を得た。

4. 2. 1. 1. 3.　ドリップコーヒーの固相抽出物の調製

ドリップコーヒー（200 mL）を室温まで冷却し、固相抽出用カートリッジの InertSep PLS-2（styrene-divinylbenzene, ジーエルサイエンス）にゆっくり流し、コーヒーの揮発性成分を吸着した。その後、固相カートリッジを逆さまにして Et_2O（10 mL）をゆっくり流して揮発性成分を回収した。窒素ガスによって Et_2O を留去し、ドリップコーヒーの香気成分を含む固相抽出物 **A**（～200 μL）を得た。

4. 2. 1. 1. 4.　コーヒー精油の調製

コーヒー粉末（251 g）を Likens-Nickerson 装置を用いて、2 時間、連続水蒸気蒸留抽出（SDE）に供した。抽出溶媒としてペンタン/Et_2O（50/50, v/v）の混合溶液（100 mL）を用いた。得られた抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムをろ紙（No.2, ADVANTEC）でろ別した後、ろ液をロータリーエバポレーター（760 mmHg, 40 °C）で濃縮し、コーヒー精油 **B**（～200 μL）を得た。

4. 2. 1. 2.　AEDA 法によるドリップコーヒーの固相抽出物中の香気寄与成分のスクリーニング

GC-O は、ガスクロマトグラフ（GC-17A）、質量分析計（GCMS-QP5050）、そしてスニッフィングポート（OP275）を接続した分析装置を用いて行った。キャ

ピラリーカラムは高極性カラムの InertCap WAX（polyethylene glycol, 60 m × 0.32 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm）または低極性カラムの InertCap 1（100% methylpolysiloxane, 60 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm）を用いた。キャリアガス流量は 3.8 mL/min（ヘリウム, ≥99.99995%）、オーブン昇温プログラムは 70 °C（5 min）から 240 °C（3 °C/min）に設定した。スニッフィングポートの温度は 260 °C に設定した。試料 2 μL をスプリット比 1:10 で分析装置に導入した。

AEDA は、得られた固相抽出物を 99.5%エタノールで 3 倍ずつ段階的に希釈して（3 倍, 9 倍, 27 倍, 81 倍, 243 倍, 729 倍）、各希釈溶液を順次 GC-O に供して行った。最後まで検出された各香気寄与成分の希釈倍率（n）から FD ファクター（3^n）を求めた。

香気成分の RI は、各成分と直鎖飽和炭化水素類（C6～C27）の RT から、Kováts（1958）の方法を参考にして算出した。

4. 2. 1. 3. ドリップコーヒーの固相抽出物の GC-MS

GC-MS は、**4. 2. 1. 2.**の分析装置を用いて行った。キャピラリーカラムは高極性カラムの InertCap WAX（polyethylene glycol, 60 m × 0.32 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm）を用いた。キャリアガス流量は 3.8 mL/min（ヘリウム, ≥99.99995%）、オーブン昇温プログラムは 70 °C（5 min）から 240 °C（3 °C/min）に設定した。試料のドリップコーヒーの固相抽出物 **A** 2 μL をスプリット比 1:10 で分析装置に導入した。

4. 2. 1. 4. フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーによるコーヒー精油の分画

カラムクロマトグラフィーは Blank ら（1992）の手法を参考にして行った。シリカゲルカラム（50 g）をペンタンで湿潤し、ガラスカラム管に詰めた（長さ 14.5

cm × 直径 3.4 cm)。上部にコーヒー精油 **B**（～200 μL）をチャージして、ペンタン（200 mL)、ペンタン/Et_2O（95/5, v/v）（300 mL)、ペンタン/Et_2O（75/25, v/v）（200 mL)、ペンタン/Et_2O（50/50, v/v）（200 mL)、Et_2O（300 mL）の順に流した。各流出液をロータリーエバポレーター（760 mmHg, 40 °C）で濃縮し、各画分を得た。このときペンタン/Et_2O（50/50, v/v）の画分（～100 μL）を得た。この画分を画分 **C** とした。

4. 2. 1. 5. シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより得られた画分の enantio-MDGC-MS

enantio-MDGC-MS は、2 台のガスクロマトグラフ（1 次および 2 次オーブン）（ともに 6890GC）を CTS1 で連結し、1 次オーブンに FID、2 次オーブンに質量分析計（5973MSD）を接続した分析装置を用いて行った。キャピラリーカラムとして、1 次オーブンに高極性カラムの TC-WAX（polyethylene glycol, 30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm)、2 次オーブンにキラルカラムの Supelco BETA DEX 225（25% 2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-β-cyclodextrin in SPB-20 poly（20% phenyl/80% dimethylsiloxane）phase, 30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm, Sigma-Aldrich）を用いた。キャリアガス流量は 1.2 mL/min（ヘリウム, ≥99.99995%）に設定した。オーブン昇温プログラムは、1 次オーブンは 70 °C（5 min）から 240 °C（3 °C/min)、2 次オーブンは 90 °C（37 min）から 200 °C（1 °C /min）に設定した。CTS1 の温度を 250 °C に設定した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより得られた画分 **C** 4 μL をスプリット比 1:5 で分析装置に導入した。1 次オーブンにおけるハートカット操作は、MCS2 を用いて、1 次カラム（TC-WAX）における RT = 36.8 分から 37.4 分（0.6 分間）で行った。

4. 2. 1. 6.　2,6-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione の化学合成

2,6-Dimethyl-1,4-cyclohexanedioneは、（1）ヒドロキノンの*O*-メチル化、（2）Benkeser還元、最後に（3）酸触媒加水分解の3段階で化学合成した。

4. 2. 1. 6. 1.　ヒドロキノンの*O*-メチル化

2,6-Dimethylhydroquinone（7.0 g, 50 mmol）とiodomethane（10 mL, 160 mmol）の*N*,*N*-ジメチルホルムアミド（DMF）溶液（250 mL）に炭酸カリウム（104.1 g, 750 mmol）を加えた。混合溶液を室温で22時間撹拌した。水（600 mL）とTBME（100 mL）を加えて撹拌した後、有機層と水層を分離した。水層から反応生成物をTBME（2 × 100 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水（3 × 200 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。これをろ過し、ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 40 °C）で濃縮した。減圧ポンプ（3 mmHg）で乾燥し、1,4-dimethoxy-2,6-dimethylbenzene（7.2 g）を得た。

4. 2. 1. 6. 2.　Benkeser還元

1,4-Dimethoxy-2,6-dimethylbenzene（7.2 g, 43 mmol）と*n*-propylamine（65 mL）と1,2-ethylenediamine（EDA, 43 mL）の混合溶液にlithium（1.8 g, 228 mmol）と*tert*-amyl alcohol（5 × 5.1 mL）を0 °Cで注意しながら加えた。混合溶液を0 °Cで1時間撹拌した。塩化アンモニウム（25 g）を0 °Cで加え、TBME（200 mL）および飽和塩化アンモニウム水溶液（400 mL）を加えて撹拌した。有機層と水層を分離した後、水層から反応生成物をTBME（2 × 100 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和塩化アンモニウム水溶液（2 × 100 mL）および飽和食塩水（2 × 100 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 40 °C）で濃縮し、黒色の粗生成物を得た。粗生成物を分別蒸留（123−126 °C

bath temp./10 mmHg）で精製し、1,4-dimethoxy-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexadiene（2.6 g, 15 mmol）を収率30%（2段階）で得た。

4. 2. 1. 6. 3.　酸触媒加水分解

1,4-Dimethoxy-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexadiene（2.3 g, 14 mmol）を溶解した diglyme 溶液（100 mL）に 0.5 mol/L 塩酸水溶液（100 mL）を 0 °C で注意深く加えた。混合溶液を室温で 2 時間撹拌した。TBME（200 mL）と飽和食塩水（500 mL）を加えて撹拌した。有機層と水層を分離した後、水層から反応生成物を TBME（2 × 200 mL）で抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水（2 × 100 mL）で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した後、ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 40 °C）で濃縮し、粗生成物（3.5 g）を得た。粗生成物をペンタンで洗浄した後、減圧乾燥（20 mmHg）し、白色固体の 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexane-dione（*cis*/*trans* = 75/25 by GC, 0.9 g, 6 mmol）を収率 43%で得た。3 段階の全収率は 12%であった。融点は 85−89 °C（参考データ: 87.5−88 °C（Stolow *et al*., 1972））であった。

4. 2. 1. 7.　その他の環状 1,4-ジケトン類の化学合成

2,5-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione（*cis*/*trans* = 48/52 by GC）は d'Angelo ら（1986）の方法を参考にして化学合成した。つまり、dimethyl 1,4-cyclohexanedione-2,5-di-carboxylate の 2 点の活性メチレン基のメチル化、続く脱カルボキシル化の 2 段階で化学合成した。

2,3-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione は 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione と同様にして 3 段階で化学合成した。Iodomethane（10 mL, 160 mmol）で 2,3-dimethyl-hydroquinone（7.0 g, 50 mmol）を *O*-メチル化して 1,4-dimethoxy-2,3-dimethyl-

benzene（7.9 g）を得た。次に、*n*-propylamine/EDA の存在下 lithium（1.8 g, 228 mmol）と *tert*-amyl alcohol（5 × 5.1 mL）による Benkeser 還元を行い、1,4-dimethoxy-2,3-dimethyl-1,4-cyclohexadiene（99−100 °C bath temp./3 mmHg, 1.7 g, 10 mmol）を 2 段階の収率 20%で得た。続いて、1,4-dimethoxy-2,3-dimethyl-1,4-cyclohexadiene（1.5 g, 9 mmol）の酸触媒加水分解により黄色液状の粗生成物（1.0 g）を得た。粗生成物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル = 80/20−70/30, v/v）で精製し、淡黄色で固液状の 2,3-dimethyl-1,4-cyclohexanedione（*cis*/*trans* = 46/54 by GC, 0.7 g, 5 mmol）を収率 56%で得た。

4. 2. 1. 8.　生成モデル実験

4. 2. 1. 8. 1.　糖の熱分解

糖の熱分解は、Nishimura と Mihara（1990）の反応条件を参考にした。糖は 4 種類の単糖類（D-(+)-glucose, D-(–)-fructose, D-(+)-xylose, L-(+)-rhamnose）および二糖類の sucrose を用いた。糖（0.04 mol）と水酸化ナトリウム（0.04 mol）の水溶液（20 mL）を 200 mL 容の広口ガラス瓶（マヨネーズビン 225g, 日本山村硝子）内で混合し、密栓した。混合溶液をオートクレーブ（ES-315, トミー精工）中で 130 °C で 1 時間加熱した。水（100 mL）を加えた後、6 mol/L 塩酸水溶液で反応混合物の pH を 5.0 に調整してから、反応生成物を酢酸エチル（100 mL）で抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥した後、ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 40 °C）で濃縮し、反応濃縮物（～200 μL, ただし酢酸エチル溶液）を得た。反応濃縮物を enantio-MDGC-MS に供した。分析条件は **4. 2. 1. 5.**と同様にして、反応濃縮物 2 μL をスプリット比 1:5 で分析装置に導入した。

4. 2. 1. 8. 2.　糖の加熱生成物を用いた加熱縮合反応

広口ガラス瓶（200 mL 容）内で、Moriarty と Hou（1984）の方法により化学合成した 2-hydroxy-3-pentanone（10 μL）と 1-hydroxy-2-propanone（60 μL）を 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液（10 mL）に溶解し、密栓した後、混合溶液をオートクレーブ中で 130 °C で 1 時間加熱した。反応終了後、0.5 mol/L 塩酸水溶液で pH 6.0 に調整してから、反応生成物を酢酸エチル（10 mL）で抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した後、ろ液をロータリーエバポレーター（30 mmHg, 40 °C）で濃縮し、反応濃縮物（～200 μL, ただし酢酸エチル溶液）を得た。反応濃縮物を enantio-MDGC-MS に供した。分析条件は **4. 2. 1. 5.**と同様にして、反応濃縮物 3 μL をスプリット比 1:5 で分析装置に導入した。

4. 2. 1. 9.　評価

4. 2. 1. 9. 1.　香気特性

Methyl corylone（2-hydroxy-3,4-dimethyl-2-cyclopenten-1-one, Givaudan Japan K.K.）および1,4-cyclohexanedione（Sigma-Aldrich）、2,3-dimethyl-1,4-cyclohexanedione、2,5-dimethyl-1,4-cyclohexanedione、2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedioneの4種の環状1,4-ジケトン類の香りの閾値および香調を分析した。香りの閾値はオルソネーザルな香りで、水中のものおよびGC-O装置のスニッフィングポートから気化したもの（空気中）の二種類を測定した。水中の閾値の測定方法はSimianら（2004）の方法、一方、空気中の閾値はUllrichとGrosch（1987）の方法を参考にして行った。

4. 2. 1. 9. 2.　コーヒー飲料への添加効果

化学合成した 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione（*cis*/*trans* = 75/25）のコーヒー飲料への添加効果を評価した。3 名のフレーバーリストと 3 名のパネラー（全員男性, 20 代～40 代）により、口に含んだ時のロースト香、砂糖様の香り、コーヒー

香、苦味、酸味、甘味、味のキレ、味の厚みの計 8 点の評価項目について、－5 点（弱い）から 5 点（強い）までの点数をつけて評価した。このとき、コントロール品に対する評価は全て 0 点として比較した。試験サンプルのコーヒー飲料として、以下のようにして調製した 100%アラビカ種コーヒーベースの缶コーヒーを用いた。焙煎コーヒー豆は、三産地（コロンビア産, ブラジル産, グアテマラ産）の各コーヒー豆（アラビカ種, L 値: 20）を 2:2:1 の比でブレンドしたものを用いた。その豆からコーヒー固形分（14.0 g）を抽出した。炭酸水素ナトリウム（1.0 g）で pH 6.66 に調整した後、イオン交換水で全重量を 1000 g に調整した。2,6-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione のエタノール溶液（濃度: 1 μL/L）を 1/10000 の割合で添加し、10 分間撹拌した後、180 mL ずつスチール缶に充填した。オートクレーブ中で 121 °C で 20 分間加熱殺菌した。コントロール品は 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione の替わりに 95%エタノールを添加して調製した。調製した缶コーヒーの香りおよび風味に対する添加効果を評価した。

4. 2. 2.　微量カルボン酸の同定と評価

4. 2. 2. 1.　試料

試料は **4. 2. 1. 1.**と同じものを用いた。

4. 2. 2. 2.　AEDA 法によるドリップコーヒーの固相抽出物中の香気寄与成分のスクリーニング

AEDA 法によるスクリーニングは **4. 2. 1. 2.**と同じである。

4. 2. 2. 3.　IEC によるコーヒー精油の分画

IEC は Akutsu ら（2006）の方法を参考にして行った。コーヒー精油 **B**（～100 μL）をコンディショニング済みの固相カートリッジ Oasis MAX（Nihon Waters）に流した後、酢酸ナトリウム水溶液（1 mL, 50 mmol/L, pH 7.0）、メタノール（2 mL）、メタノール–2%ギ酸溶液（2 mL）を順に流した。流出したメタノール–2%ギ酸溶液に飽和食塩水（50 mL）を加え、水層から酸性成分を Et_2O（50 mL）で抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した後、ろ液をロータリーエバポレーター（760 mmHg, 40 °C）で濃縮し、酸性画分 **D**（～50 μL）を得た。

4. 2. 2. 4.　IECにより得られた酸性画分のMDGC-MS

MDGC-MSは、**4. 2. 1. 5.**で示した分析装置を用いて行った。キャピラリーカラムとして、1次オーブンに高極性カラムのTC-WAX（polyethylene glycol, 30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm）、2次オーブンに低極性カラムのInertCap 1（100% methyl-polysiloxane, 60 m × 0.25 mm i.d., 膜厚: 0.25 μm）を用いた。キャリアガス流量は1.2 mL/min（ヘリウム, ≥99.99995%）に設定した。オーブン昇温プログラムは、1次オーブンは70 °C（5 min）から240 °C（3 °C/min）、2次オーブンは70 °C（5 min）から240 °C（3 °C/min）に設定した。IECにより得られた酸性画分**D** 3 μLをスプリット比1:5で分析装置に導入した。1次オーブンにおけるハートカット操作は、MCS2を用いて、1次カラム（TC-WAX）におけるRT = 42.0分から43.8分（1.8分間）で行った。同じハートカット操作を4回繰り返して、1.8分間の流出分をCTS1で濃縮した。本操作中、CTS1の温度は–20 °Cに保った。最後に、CTS1を昇温速度25 °C/sで250 °Cまで昇温して、濃縮された流出分を2次カラムに導入した。

4. 2. 2. 5.　生成モデル実験

4. 2. 2. 5. 1.　アミノ酸と糖の Maillard 反応

アミノ酸は L-isoleucine、glycine、L-α-alanine、L-valine、L-leucine の 5 種類を用いた。糖は 4 種類の単糖類（D-(+)-xylose, D-(–)-fructose, D-(+)-glucose, L-(+)-rhamnose）および二糖類の sucrose を用いた。200 mL 容の広口ガラス瓶内でアミノ酸（25 mmol）と糖（25 mmol）を pH 6.0 のリン酸緩衝液（50 mL, ナカライテスク）に溶解し、密栓した後、混合溶液をオートクレーブ中で 120 °C で 1 時間加熱した。食塩（10 g）と Et_2O（100 mL）を加えて、混合溶液を室温で 24 時間撹拌した。エーテル層を分離し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過した。ろ液をロータリーエバポレーター（760 mmHg, 40 °C）で濃縮し、反応濃縮物（～2 mL, ただし Et_2O 溶液）を得た。

得られた各反応濃縮物を GC-O に供した。分析条件は **4. 2. 1. 2.**と同様にして、反応濃縮物 4 μL をスプリット比 1:5 で分析装置に導入した。

また、L-isoleucine と xylose の反応濃縮物を MDGC-MS に供した。分析条件は **4. 2. 2. 4.**と同様にして、反応濃縮物 1 μL をスプリット比 1:5 で分析装置に導入した。ハートカット操作を 3 回繰り返した。

4. 2. 2. 5. 2.　その他の Maillard 反応および関連した反応

L-Isoleucine の Strecker 分解生成物である 2-methylbutanal の存在下で、glycine と各糖（上記の 5 種）の Maillard 反応を行った。200 mL 容の広口ガラス瓶内で、2-methylbutanal（10 mmol）、glycine（10 mmol）、そして糖（10 mmol）を pH 6.0 のリン酸緩衝液（50 mL）に溶解し、密栓した後、混合溶液をオートクレーブ中で 120 °C で 1 時間加熱した。その後の抽出操作は **4. 2. 2. 5. 1.**に従った。得られた各反応濃縮物を GC-O に供した。分析条件は **4. 2. 1. 2.**と同様にして、反応濃縮物

4 μL をスプリット比 1:5 で分析装置に導入した。

また、L-isoleucine と 6 種の糖の加熱生成物（glyoxal, 2-oxopropanal, 2,3-butanedione, 2,3-pentanedione, 1-hydroxy-2-propanone, 3-hydroxy-2-butanone）の反応を行った。200 mL 容の広口ガラス瓶内で、L-isoleucine（10 mmol）と糖の加熱生成物（10 mmol）を pH 6.0 のリン酸緩衝液（50 mL）に溶解し、密栓した後、混合溶液をオートクレーブ中で 120 °C で 1 時間加熱した。その後の抽出操作は **4. 2. 2. 5. 1.**に従った。得られた各反応濃縮物を GC-O に供した。分析条件は **4. 2. 1. 2.**と同様にして、反応濃縮物 4 μL をスプリット比 1:5 で分析装置に導入した。

さらに、2-methylbutanal の存在下で glycine と上記の 6 種の糖の加熱生成物の反応を行った。200 mL 容の広口ガラス瓶内で、glycine（10 mmol）、2-methylbutanal（10 mmol）、そして糖の加熱生成物（10 mmol）を pH 6.0 のリン酸緩衝液（50 mL）に溶解し、密栓した後、混合溶液をオートクレーブ中で 120 °C で 1 時間加熱した。その後の抽出操作は **4. 2. 2. 5. 1.**に従った。得られた各反応濃縮物を GC-O に供した。分析条件は **4. 2. 1. 2.**と同様にして、反応濃縮物 4 μL をスプリット比 1:5 で分析装置に導入した。

4. 2. 2. 6.　評価

(*E*)-4-Methyl-3-hexenoic acid のコーヒーおよびその他の食品素材に対する添加効果を評価した。1 名のフレーバーリストと 1 名のパネラー（ともに男性, 30～40 代）が用語により評価した。試験サンプルとして、以下の市販の飲料製品を任意に選択した。つまり、オレンジ風味飲料（商品名: ローソンプレミアムオレンジ, なっちゃん!オレンジ)、グレープフルーツ風味飲料（商品名: ローソンプレミアムグレープフルーツ, アクエリアス)、レモン風味飲料（商品名: カルピスほっとレモン, ビタミンウォーター)、ノンアルコールビールテイスト飲料（商品名: キ

リンフリー)、茶飲料（商品名: おーいお茶, おーいほうじ茶)、そして缶コーヒー飲料(商品名: ブラック無糖, ジョージアエメラルドマウンテンブラック, ボスブラック）の計 12 点を用いた。各飲料製品に(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid のエタノール溶液（濃度: 1 μL/L）を 1/2000 または 1/1000 の割合で添加して、香りおよび風味に対する添加効果を評価した。

4. 3. 結果および考察

4. 3. 1. 微量環状 1,4-ジケトンの同定と評価

4. 3. 1. 1. 試料

コーヒーは飲料として食されることが多い。特に、レギュラーコーヒーのように挽いた豆をドリップして抽出したコーヒーが好まれて飲まれている。飲食時のコーヒーの香りこそ私たちが普段感じるコーヒーの香りであることから、その香りの解明が重要であると考えた。そこで、ブラジル産の焙煎コーヒー粉末（L 値: 18）からドリップコーヒーを調製した。

有機溶媒抽出法や水蒸気蒸留法などによる揮発性成分の抽出において、コーヒーの香りの成分バランスは変化しやすい。したがって、なるべくその変化の少ない抽出法を選択する必要があった。そこで、逆相系の固相抽出用カートリッジを用いた固相抽出法を選択した。得られたドリップコーヒーの固相抽出物 **A** の香りは、コーヒー本来の香りに類似したので、これを用いて AEDA 法による香気寄与成分のスクリーニングを行った。

また、固相抽出物 **A** には不揮発性成分も混在するため、揮発性成分の濃度が低

いと考えた。そこで、Holscher ら（1990）の手法を参考にして、SDE 法により焙煎コーヒー粉末から揮発性成分を抽出した。得られたコーヒー精油 **B** を用いて未知の微量寄与成分の同定を行った。

4. 3. 1. 2.　AEDA 法によるドリップコーヒーの固相抽出物中の香気寄与成分のスクリーニング

AEDA 法による焙煎コーヒーの香気寄与成分の解明は以前よりなされている（Holscher *et al*., 1990; Blank *et al*., 1992）。そこで、本研究でも同様に AEDA 法を用いて香気寄与成分のスクリーニングを行った。その結果、FD ファクター 27 から 729 までの 34 種の香気寄与成分を検出した（表 4-1）。くわえて、FD ファクターから FD クロマトグラムを作成した（図 4-2）。

FD ファクターが 729 と最も大きい値を示した香気寄与成分は、guaiacol（phenolic, medical, smoked）、3-phenylpropionic acid（honey-like）、未知の微量寄与成分 **4**（sweaty）であった。コーヒーの香りの特徴的な香気成分とされる 2-furfurylthiol（Tressl, 1989）は、FD ファクター81 を示し、香気寄与度がそれほど高くないことを確認した。

FD ファクター243 を示した methyl corylone は、焦げた砂糖様（burnt sugar-like）の香りをもち、以前より焙煎コーヒーの香気寄与成分として同定されている（Blank *et al*., 1992）。しかしながら、本研究では、methyl corylone のピーク部分（RI (InertCap WAX) = 1839）を嗅ぐと、焦げた砂糖様の香りに加えて、刺激的な香気（pungent）をあわせて検知した。つまり、InertCap WAX カラムにおいて methyl corylone と同じ RI をもつ未知の微量寄与成分 **3** を検出した（表 4-1）。

本研究において、著者が注目した成分は、FD ファクター243 を示し、刺激的な香気（pungent）をもつ未知の微量寄与成分 **3**（RI (InertCap WAX) = 1839）、そし

て FD ファクター729 を示し、汗臭（sweaty）をもつ未知の微量寄与成分 **4**（RI (InertCap WAX) = 2060）であった（表 4-1, 図 4-2）。SDE で得られたコーヒー精油 **B** からも GC-O によって微量寄与成分 **3** および **4** を検出した（data not shown）。

以下、コーヒーの香りの特徴を解明するために微量寄与成分 **3** および **4** の同定を行った。微量寄与成分 **4** については **4. 3. 2.**で述べる。

4. 3. 1. 3.　GC-MS による微量寄与成分 3 の化学構造の推定

ドリップコーヒーの固相抽出物 **A** の GC-MS によって得られた TIC クロマトグラムをイオン抽出処理して、詳しく解析した。その結果、微量寄与成分 **3** に対応するピークを検出し、分子量は 140 もしくは 154 であると推測した（図 4-3）。このとき、分子量 154 の化合物は 3-ethyl-2-hydroxy-4,5-dimethyl-2-cyclopenten-1-one であることが判明した。しかし、香調は methyl corylone と類似した焦げた砂糖様・カラメル様であり、微量寄与成分 **3** と一致しなかった。したがって、微量寄与成分 **3** の分子量は 140 であると推定した。しかし、methyl corylone やその他の成分と重なっていたので、微量寄与成分 **3** の質量スペクトルを取得することができなかった。

4. 3. 1. 4.　シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるコーヒー精油の分画

微量寄与成分 **3** の質量スペクトルを取得するために、**3** を可能なかぎり濃縮する必要があると考えた。そこで、SDE 法により得られたコーヒー精油 **B** をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより 5 画分に分画した。GC-O により、ペンタン/Et_2O（50/50, v/v）画分に微量寄与成分 **3** が含まれることを確認した。この画分を画分 **C** して、以下の分析に用いた。

4. 3. 1. 5.　enantio-MDGC-MS による微量寄与成分 3 の化学構造の推定

微量寄与成分 **3** の質量スペクトルを得るために、画分 **C** を enantio-MDGC-MS に供した。このとき、質量スペクトルに加えて立体化学に関する情報を得るために、2 次カラムとして heptakis(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-β-cyclodextrin のキラルキャピラリーカラムを用いた。その結果、微量寄与成分 **3** の質量スペクトルを取得した（図 4-4）。

得られた質量スペクトルに対して、市販の質量スペクトルライブラリー（Wiley 275 および NIST 02）を用いてシミラリティ検索を行った。その結果、微量寄与成分 **3** は 2,5-dimethyl-1,4-cyclohexanedione であることが示唆された。くわえて、位置異性体の 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione および 2,3-dimethyl-1,4-cyclohexanedione も候補化合物として考えられた。したがって、微量寄与成分 **3** はこれら 3 種の環状 1,4-ジケトンのいずれかであると推定した。確認するために、全ての環状 1,4-ジケトンを化学合成した。

4. 3. 1. 6.　環状 1,4-ジケトンの化学合成

2,5-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione は d'Angelo ら（1986）の方法を参考にして化学合成した。2,6-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione は 2,6-dimethylhydroquinone から出発して、ヒドロキノンの *O*-メチル化、Benkeser 還元、続く酸触媒加水分解の 3 段階で、全収率 12%で化学合成した（図 4-5）。2,3-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione については、Khan と Zoretic（1985）による合成法が知られている。しかしながら、アンモニアおよび極低温条件を必要とする Birch 還元を用いるので困難であった。そこで、Birch 還元をより穏和な反応条件下で進行する Benkeser 還元に替えて、2,3-dimethylhydroquinone から 3 段階で化学合成した。

4. 3. 1. 7.　微量寄与成分 3 の同定

同定は Molyneux と Schieberle（2007）の報告を参考にして行った。つまり、微量寄与成分 **3** の質量スペクトル、RI（InertCap WAX）、そして香調（by GC-O）の三点のデータについて、化学合成した各環状ジケトンと照合した。その結果、微量寄与成分 **3** は 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione であることを確認した。

ところで、2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione には *cis* 体と *trans* 体の二つの幾何異性体が存在する。微量寄与成分 **3** の立体化学を含めた化学構造の特定を行うために、GC-MS および enantio-MDGC-MS により得られた RI および RT に関するデータを活用した。

化学合成した 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione を GC-MS に供した結果、幾何異性体の関係にある二つのピークを 75/25 のピーク面積比で検出した（図 4-6, a）。そして、主成分が微量寄与成分 **3** の RI（InertCap WAX）= 1839 と一致することを確認した（図 4-6, a）。しかしながら、どちらが *cis* 体または *trans* 体であるかを確認することはできなかった。

ジメチル基で置換された 1,4-cyclohexanedione の立体化学において、*cis* 体は *meso* 体で、*trans* 体は一対の光学異性体の関係にある。化学合成した 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione を heptakis(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-β-cyclodextrin のキラルキャピラリーカラムを装着した enantio-MDGC-MS に供した結果、三つのピークを検出した（図 4-6, b）。主成分は *meso* 体で、残りの二つの成分は光学異性体の関係にあることが判明した。つまり、主成分は *cis* 体であることが判明した。したがって、微量寄与成分 **3** を *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione であると同定した（図 4-7）。

図 4-4 に示したように、コーヒー精油 **B** の分画により得られた画分 **C** において、*cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione のみを検出した。したがって、焙煎コーヒー

中には *trans* 体は存在せず、*cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione のみが立体選択的に存在することが示唆される。

4. 3. 1. 8.　微量寄与成分 3 の推定生成経路

コーヒーの生豆は、当初は灰緑色であるが、185–240 ℃の温度で焙煎することで、茶褐色で艶のある焙煎豆になる。焙煎コーヒーの多くの香気成分はコーヒー生豆の焙煎過程で生成する（Tressl, 1989）。生豆には、脂質、炭水化物（多糖類や遊離糖）、タンパク質、遊離アミノ酸などが含まれており、焙煎過程ではこれらが様々な化学反応を起こすことが知られている（Holscher and Steinhart, 1994）。例えば、アミノ酸と糖の Maillard 反応からピリジン類、ピラジン類、硫黄化合物、フラノン類が生成する。L-Isoleucine、L-leucine、L-phenylalanine などのアミノ酸の Strecker 分解により、2-methylbutanal、3-methylbutanal、phenylacetaldehyde などのアルデヒド（Cremer *et al*., 2000; Weenen and van der Ven, 2001）および 2-methylbutanoic acid、3-methylbutanoic acid、phenylacetic acid などのカルボン酸が生成する（Hofmann *et al*., 2000）。糖の熱分解から α-ジカルボニル化合物、α-ヒドロキシケトン類、そしてシクロテン類が生成する（Nishimura and Mihara, 1990）。他にも、フェノール酸の分解、脂質酸化、カロテノイドの分解などの化学反応が起こる。

コーヒー生豆から得られた精油を GC-O に供した結果、微量寄与成分 **3** を検出しなかった（data not shown）。したがって、微量寄与成分 **3** は焙煎過程で生成すると推察した。

Methyl corylone のようなシクロテン類は sucrose の熱分解により生成する（Nishimura and Mihara, 1990）。先行実験において、微量寄与成分 **3** と同じ RI で検出された 3-ethyl-2-hydroxy-4,5-dimethyl-2-cyclopenten-1-one も sucrose の熱分解

により生成することを確認した（data not shown）。この実験の反応条件を拡張して、糖の熱分解における *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione の生成について検討した。

反応には 4 種の単糖類（glucose, fructose, xylose, rhamnose）と二糖類（sucrose）を用いた。各糖はコーヒー生豆に含まれている（Flament, 2001）。例えば、ブラジル産アラビカ種のコーヒー生豆には、sucrose（7.07%）、fructose（0.39%）、glucose（0.23%）、rhamnose とその他（～0.01%）が含まれていることが報告されている（Knopp *et al*., 2006）。

各糖を塩基性条件下、オートクレーブ中、130 °C で 1 時間加熱した。反応濃縮物を enantio-MDGC-MS に供した結果、全ての単糖類から 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione が生成することを確認した（図 4-8）。つまり、単糖類の熱分解において *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione が *trans* 体とともに生成することを初めて確認した。一方、二糖類の sucrose からは生成しなかった（図 4-8）。

生成モデル実験から、微量寄与成分 **3** はコーヒー生豆の焙煎過程における単糖類の熱分解で生成することが示唆される。しかしながら、**4. 3. 1. 7.**で述べたように、*cis* 体のみが立体選択的に生成する理由については不明である。

次に、2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedioneの生成に対して鍵となる化合物の特定を検討した。糖を加熱すると、glyoxal、2-oxopropanal、2,3-butanedione、2,3-pentanedione などのα-ジカルボニル化合物および1-hydroxy-2-propanone、3-hydroxy-2-butanone、3-hydroxy-2-pentanone、2-hydroxy-3-pentanoneなどのα-ヒドロキシケトン類が生成して様々な反応に関与することが知られている（Nishimura and Mihara, 1990; Hollnagel and Kroh, 1998; Novotný *et al*., 2007）。したがって、糖の熱分解における 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedioneの生成には、これらの低分子の糖の加熱生成物が関与すると推測した。

そこで、糖の加熱生成物である2-hydroxy-3-pentanoneと1-hydroxy-2-propanoneを混合して、塩基性条件下、オートクレーブ中、130 ℃で1時間加熱した。反応濃縮物をenantio-MDGC-MSに供した結果、2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedioneの生成を確認した（図4-8）。

この結果から図4-9に示したような生成経路を推定した。つまり、2-hydroxypropanal（1-hydroxy-2-propanoneの1,2-エノール化で生成）と2-hydroxy-3-pentanoneの4位のα-炭素でのaldol反応によって、β-ヒドロキシケトンが生成し、続く5位のヒドロキシ基の脱水反応によりβ,γ-不飽和ケトンが生成し、さらにケトーエノール互変異性により3,6-ジケトンが生成する。3,6-ジケトンは2,3-エノール化により2,6-ジケトンに異性化し、続く7位のα-炭素と2位のカルボニル基の分子内環化により六員環が形成される。その後、脱水して、続くケトーエノール互変異性により2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedioneが生成する。

以前より、2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione の構造類似体である 1,4-cyclo-hexanedione が焙煎コーヒーから見出され、焙煎過程におけるキナ酸の熱分解により生成することが報告されている（Moon and Shibamoto, 2010）。類似した化学構造の化合物が全く異なる経路で生成することは興味深いことである。

4. 3. 1. 9.　評価

4. 3. 1. 9. 1.　香気特性

表 4-2 に示したように、化学合成した 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione（*cis*/*trans* = 75/25）の水中のオルソネーザルな香りの閾値は 0.025 mg/L であり、methyl corylone（0.1 mg/L）、1,4-cyclohexanedione（1 mg/L）、2,3-dimethyl-1,4-cyclohexane-dione（*cis*/*trans* = 46/54, 5 mg/L）、2,5-dimethyl-1,4-cyclohexanedione（*cis*/*trans* = 48/52, 10 mg/L）よりも低いことを確認した。また、*cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione

の空気中の閾値は 0.002–0.007 ng/L であり、methyl corylone（0.9–1.8 ng/L）に比べて非常に低いことを確認した（表 4-3）。さらに、2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione（*cis*/*trans* = 75/25）の香調は、高い濃度（10,000 mg/L, エタノール溶液）でカビ臭を示した（表 4-2）。*cis*-2,6-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione の香調は、低い濃度（0.07 ng/L air）では刺激的な香気（pungent）で温感のある香気（warming）もしくは鼻を突き刺すような香調を示すことを確認した（表 4-3）。

4. 3. 1. 9. 2.　コーヒー飲料への添加効果

表 4-4 に示したように、2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione（*cis*/*trans* = 75/25）を缶コーヒーに添加することにより、コーヒーの砂糖様の香りが軽減されたものの、コーヒーの特徴であるロースト香が増し、コーヒー感つまり本物感が強まることを確認した。さらに、酸味と甘味に対してはあまり有効な添加効果が見られなかったものの、コーヒー独特の苦味が強まり、味のキレと厚みが向上することを確認した。

4. 3. 2.　微量カルボン酸の同定と評価

4. 3. 2. 1.　IEC によるコーヒー精油の分画

AEDA 法によりドリップコーヒーの固相抽出物から微量寄与成分 **4** を検出した（表 4-1 および図 4-2）。しかしながら、微量寄与成分 **4** は微量であるため、GC-MS では検出されなかった。したがって、コーヒー精油 **B** を分画して、微量寄与成分 **4** を可能なかぎり濃縮する必要があると考えた。微量寄与成分 **4** は汗臭をもつことから第 3 章のような揮発性のカルボン酸であると推測した。そこで、IEC によ

りコーヒー精油 **B** を分画して、酸性画分 **D** を得た。GC-O により画分 **D** に微量寄与成分 **4** が含まれることを確認したので、画分 **D** を以下の分析に供した。

4. 3. 2. 2.　MDGC-MS による微量寄与成分 4 の化学構造の推定

微量寄与成分 **4** の質量スペクトルを取得するために、画分 **D** を MDGC-MS に供した。その結果、図 4-10 に示したように、微量寄与成分 **4** を検出した。得られた質量スペクトルから、微量寄与成分 **4** は(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid であると推定した。このとき、GC-O では検出されないが、**4** と同じ質量スペクトルをもつ微量成分 **4'** も検出され（図 4-10）、(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid であると推定した。

4. 3. 2. 3.　微量寄与成分 4 の同定

同定は Molyneux と Schieberle（2007）の報告を参考にして行った。微量寄与成分 **4** は、高極性カラム（InertCap WAX）および低極性カラム（InertCap 1）における RI = 2060 および 1071 が(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid と一致し、さらに汗臭という香調も一致することを確認した（表 4-5）。そして、図 4-11 に示したように、微量寄与成分 **4** と(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の質量スペクトルが一致した。したがって、微量寄与成分 **4** を(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid であると同定した。また、微量成分 **4'** を 4-methyl-3-hexenoic acid の *Z* 体であると同定した（図 4-12）。

微量寄与成分 **4** は、第 3 章でユズから見出された微量寄与成分 **2** と同一の化合物であることが判明した。ユズと焙煎コーヒー以外に、本化合物はカボス果汁の抽出物（Tomiyama *et al*., 2012）やホップ精油（Miyazato, 2013）からも見出されている。特にホップからは、methyl (*E*)-4-methyl-3-hexenoate（sweaty, fruity）および *S*-methyl (*E*)-4-methyl-3-hexenethioate（sweaty, rubber）のような(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid のメチルエステルやメチルチオエステルが初めて見出されている

（Miyazato, 2013）。食物以外では、Takeuchi ら（2012）が(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid および *Z* 体を洗濯衣類の生乾き臭の原因物質として見出している。したがって、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid は広く自然界に存在するものと示唆される。

4. 3. 2. 4.　微量寄与成分 4 の推定生成経路

コーヒー生豆から得られた精油を GC-O に供した結果、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid を検出した（data not shown）。本化合物は myrcene（Mikami, 1988）および linalool（水谷ら, 1971）から立体選択的に生合成されることが示唆されている。したがって、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid はコーヒー生豆中で生合成されると推察した。

しかしながら、興味深いことに、ユズおよびホップ（Miyazato, 2013）とは異なり、(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid も同時に検出した（図 4-10）。このことから 4-methyl-3-hexenoic acid の異なる生成経路が存在すると考えた。ここで(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid は *Z* 体とともに焙煎過程で生成すると推測した。

焙煎コーヒーから見出されたカルボン酸は、焙煎過程で起こる Strecker 分解（Hofmann *et al*., 2000）や糖の熱分解（Ginz *et al*., 2000）などの化学反応から生成し、生豆よりも含有量が増加する（Wöhrmann *et al*., 1997）。また、コーヒー生豆中にカルボン酸の糖付加体が存在することが知られており（Weckerle *et al*., 2002）、それからカルボン酸が遊離して生成すると考えられる。本研究では、焙煎過程で起こる Maillard 反応に注目して、以下の生成モデル実験を行った。

まず、L-isoleucine、glycine、L-α-alanine、L-valine、L-leucine のような 5 種のアミノ酸と xylose の Maillard 反応を行った。用いた各アミノ酸はコーヒー生豆に含まれている（Arnold *et al*., 1994）。各アミノ酸と xylose を pH 6.0 の条件下、オートクレーブ中、120 ℃ で 1 時間加熱した。得られた反応濃縮物を GC-O および

MDGC-MS に供した結果、L-isoleucine と xylose の Maillard 反応から(*E*)-および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid が生成することを確認した（表 4-6 および図 4-13）。さらに、糖を fructose、glucose、rhamnose、sucrose に替えて同条件下で反応を行い、各反応濃縮物を GC-O に供した。その結果、L-isoleucine と全ての糖の Maillard 反応から(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid が生成することを確認した（表 4-6）。これらの結果から、L-isoleucine が(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の生成に強く関与することが判明した。

さらに、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の生成に対して鍵となる化合物を特定するために、以下のような一連の生成モデル実験を行った。まず、L-isoleucine の Strecker 分解生成物である 2-methylbutanal の存在下で、glycine と糖の Maillard 反応を行った。また、L-isoleucine と 6 種の糖の加熱生成物（glyoxal, 2-oxopropanal, 2,3-butanedione, 2,3-pentanedione, 1-hydroxy-2-propanone, 3-hydroxy-2-butanone）の反応を行った。さらに、2-methylbutanal の存在下で glycine と 6 種の糖の加熱生成物の反応を行った。得られた各反応濃縮物を GC-O に供した結果、全ての反応濃縮物から(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid が生成することを確認した（表 4-6）。これらの結果から、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の生成に対して鍵となる化合物は、2-methylbutanal および glyoxal、2-oxopropanal、2,3-butanedione、2,3-pentanedione、1-hydroxy-2-propanone、3-hydroxy-2-butanone などの糖の加熱生成物であることが判明した。

生成モデル実験の結果から、以下のような(*E*)-および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid の生成経路を推定した（図4-14）。経路Aでは、2-methylbutanalとα-ジカルボニル化合物のaldol反応、続くβ,γ-脱水反応、最後にα-ジカルボニル基の酸化的解裂（Davídek *et al*., 2006）により、(*E*)-および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acidが生成すると推定した。このとき、glyoxalは2-oxopropanalや2,3-butanedioneに変換して反応に

関与すると考えられる（Yaylayan and Keyhani, 1998）。経路Bでは、2-methylbutanalとα-ヒドロキシケトンのヒドロキシ基と結合していないα-炭素でのaldol反応、β,γ-脱水反応、α-ヒドロキシケトンの酸化（Novotný *et al*., 2007)、最後に生じたジカルボニル基の酸化的解裂により、(*E*)-および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acidが生成すると推定した。さらに、1-hydroxy-2-propanoneの場合、経路Cも考えられた。つまり、二つのα-炭素でaldol反応が起こり、最終的に3-methylpentanoic acidとともに(*E*)-および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acidが生成すると推定した。なお、3-methylpentanoic acidはコーヒー精油**B**から得られた酸性画分**D**および生成モデル実験における反応濃縮物から見出された（data not shown）。

生成モデル実験から、コーヒー生豆中の生合成のような酵素的な経路に加えて、焙煎過程で起こるMaillard反応のような非酵素的な経路によっても、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidが生成することが示唆される。

4. 3. 2. 5.　評価

4. 3. 2. 3.で述べたように、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidはユズおよびコーヒー以外に幅広く自然界に存在することが示唆される。したがって、ここでは、本化合物のコーヒーおよびその他の食品素材の香りおよび風味に対する添加効果を評価した。

表4-7に示したように、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid は様々な食品素材に対して有効な添加効果があることを確認した。オレンジ風味飲料（商品名: ローソンプレミアムオレンジ, なっちゃん!オレンジ）に対しては、酸味と苦味を強め、オレンジの果汁感を強める効果があることを確認した。グレープフルーツ風味飲料（商品名: ローソンプレミアムグレープフルーツ, アクエリアス）に対しては、トロピカルな香りを付与し、サワー感を強め、クレープフルーツの果汁感を強め

る効果があることを確認した。レモン風味飲料（商品名: カルピスほっとレモン, ビタミンウォーター）に対しては、酸臭、酸味を強め、レモンの果皮感を強める効果があることを確認した。ノンアルコールビールテイスト飲料（商品名: キリンフリー）に対しては、ホップの枯草様の香りを強め、ビール独特の苦味を強め、ビール感を向上させる効果があることを確認した。茶飲料（商品名: おーいお茶, おーいほうじ茶）に対しては、緑茶独特の渋味を強め、ほうじ茶特有の香ばしさを強める効果があることを確認した。そして、缶コーヒー飲料（商品名: ブラック無糖, ジョージアエメラルドマウンテンブラック, ボスブラック）に対しては、コーヒーの特徴であるロースト香を強め、味の厚みとコクを向上させる効果があることを確認した。(*E*)-4-Methyl-3-hexenoic acid は香りよりも風味に対してより有効な添加効果を示すことが判明した。

4. 4.　結論

本章では、ドリップコーヒーの固相抽出物中の 2 種の新規の微量寄与成分 **3** および微量寄与成分 **4** について述べた。

まず、AEDA 法を用いてドリップコーヒーの固相抽出物中の香気寄与成分のスクリーニングを行い、微量寄与成分 **3** および微量寄与成分 **4** を検出した。

次に、微量寄与成分 **3** に対しては、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりコーヒー精油を分画して、得られた画分を enantio-MDGC-MS に供した。得られた質量スペクトルから微量寄与成分 **3** の化学構造を推定し、確認のために推定した全ての候補化合物を化学合成した。その結果、微量寄与成分 **3** は刺激的な香気をもつ *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione であると特定した。

一方、微量寄与成分 **4** に対しては、IEC によりコーヒー精油を分画して、得られた酸性画分を MDGC-MS に供した。得られた質量スペクトルから、微量寄与成分 **4** は第 3 章でユズから見出された微量寄与成分 **2** と同一の化合物であり、汗臭をもつ(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid であると特定した。

これまでに香気成分として見出されている環状 1,4-ジケトン類は、1,4-cyclohexanedione と 2,6,6-trimethyl-1,4-cyclohexanedione の 2 種のみである。したがって、本成果は、香料科学に新しい知見をもたらすものである。

cis-2,6-Dimethyl-1,4-cyclohexanedioneは微量成分であるため、コーヒーから単離して産業的に応用することは困難であると考えられる。本研究では、*cis*体と*trans*体の混合物ではあったが、2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedioneの3段階での化学合成法を新たに見出すことができた。この成果は、*cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedioneの大量入手を可能とし、本化合物の産業的な利用が期待される。

さらに、*cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione および *trans* 体は、単糖類（glucose, fructose, xylose, rhamnose）の熱分解において、2-hydroxy-3-pentanone と 1-hydroxy-2-propanone のような低分子の糖の加熱生成物の加熱縮合反応から生成することを確認した。したがって、*cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione はコーヒー生豆を焙煎する過程で生成することが示唆される。しかしながら、本化合物の立体選択的な生成についてはいまだ不明である。

一方、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid は *Z* 体とともに、L-isoleucine と糖の Maillard 反応において、L-isoleucine 由来の 2-methylbutanal と低分子の糖の加熱生成物（glyoxal、2-oxopropanal、2,3-butanedione、2,3-pentanedione、1-hydroxy-2-propanone、3-hydroxy-2-butanone）の反応から生成することを確認した。(*E*)-4-Methyl-3-hexenoic acid の生成については、コーヒー生豆における生合成経路が強く示唆されている。本研究では、生合成経路以外の生成経路を初めて明らかにし、生合成

のような酵素的な反応と Maillard 反応のような非酵素的な反応という二つの異なる経路から、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid が生成するという非常に興味深い知見を見出すことができた。

以上のように、*cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione および(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid は焙煎過程で生成することが示唆されることから、コーヒー以外のローストナッツ、ローストアーモンド、煎じたゴマなどの同じような焙煎過程を経るもの、または糖の熱分解および Maillard 反応が起こるような加熱調理した食品にも、これらの微量寄与成分は存在すると示唆される。

最後に、*cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione および(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の添加効果を評価した。

化学合成した 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione（*cis*/*trans* = 75/25）を缶コーヒーに添加することにより、焙煎コーヒーの特徴であるロースト香が強まり、コーヒー感、本物感が強まることを確認した。さらに、コーヒー独特の苦味を強め、味のキレと厚みを向上させる効果があることを確認した。つまり、本研究で初めて見出された *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione はコーヒーフレーバーの香気特性を高めることが判明した。

さらに、ユズとコーヒーから共通して見出された(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid は、ユズとコーヒー以外に、オレンジ、グレープフルーツ、レモン、ホップ、茶などの様々な食品素材の風味を良好にし、本物感を強める効果があることを確認した。本化合物は様々な食品素材のフレーバーに有効に利用できることが判明した。

以上の成果から、より付加価値の高いフレーバーを市場に提供することができると期待される。

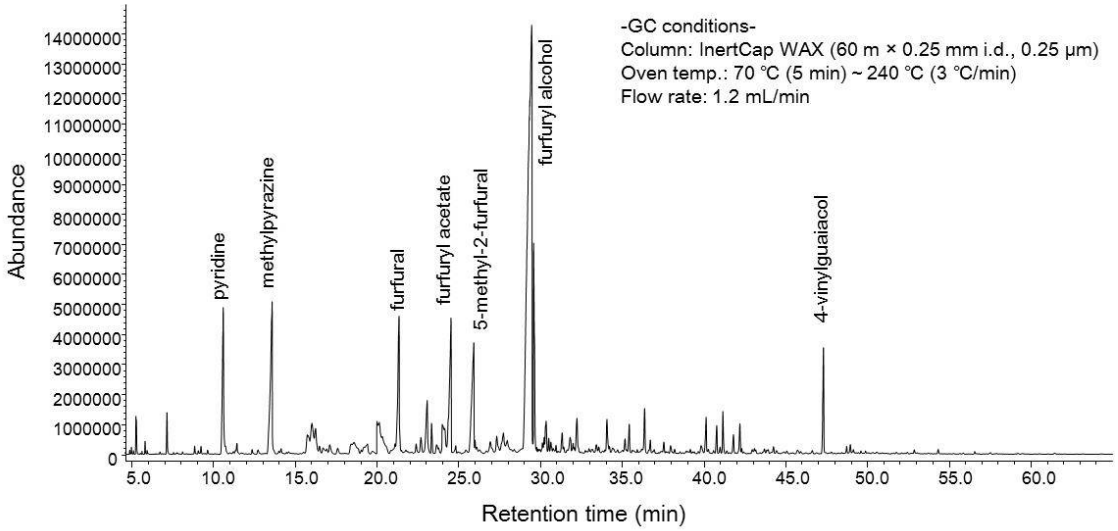


図 4-1. 挽いた焙煎コーヒー豆の水蒸気蒸留により得られた精油の **GC** クロマトグラム

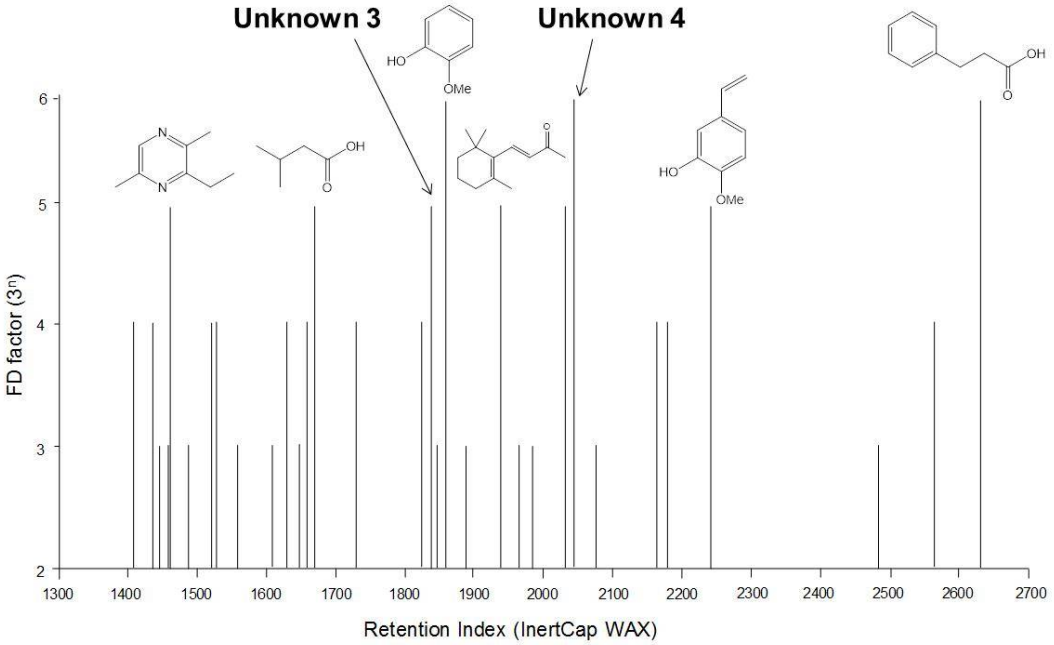


図 **4-2.** ドリップコーヒーの固相抽出物 **A** の **FD** クロマトグラム

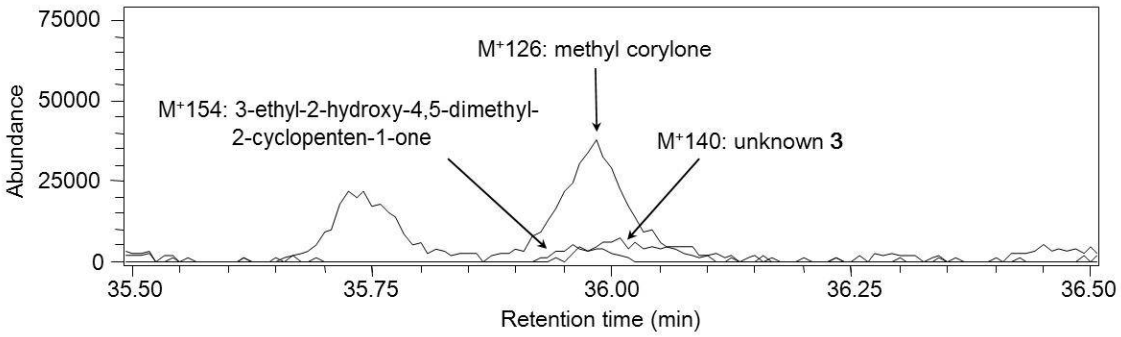


図 4-3. ドリップコーヒーの固相抽出物 **A** の **TIC** クロマトグラムから抽出したイオンクロマトグラム（***m/z*** **126, 140, 154; RT = 35.5** 分から **36.5** 分**, InertCap WAX**）

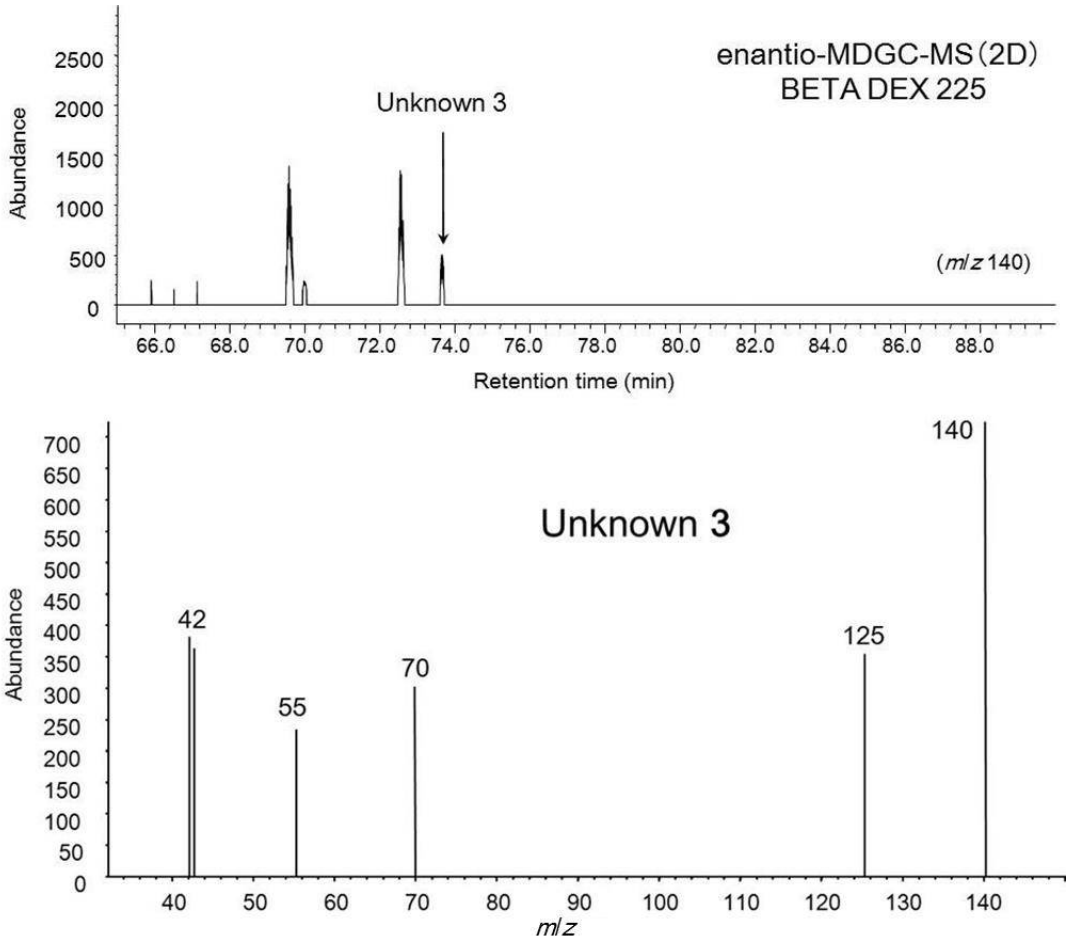


図 4-4. enantio-MDGC-MS によるコーヒー精油 B のシリカゲルカラムクロマトグラフィー画分 C のイオンクロマトグラム（*m/z* 140; BETA DEX 225（2 次オーブン））（上）および微量寄与成分 3 の質量スペクトル（下）

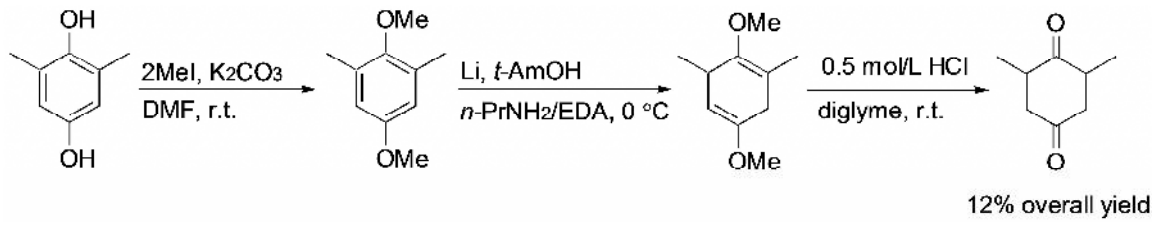


図 4-5. 2,6-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione の合成スキーム

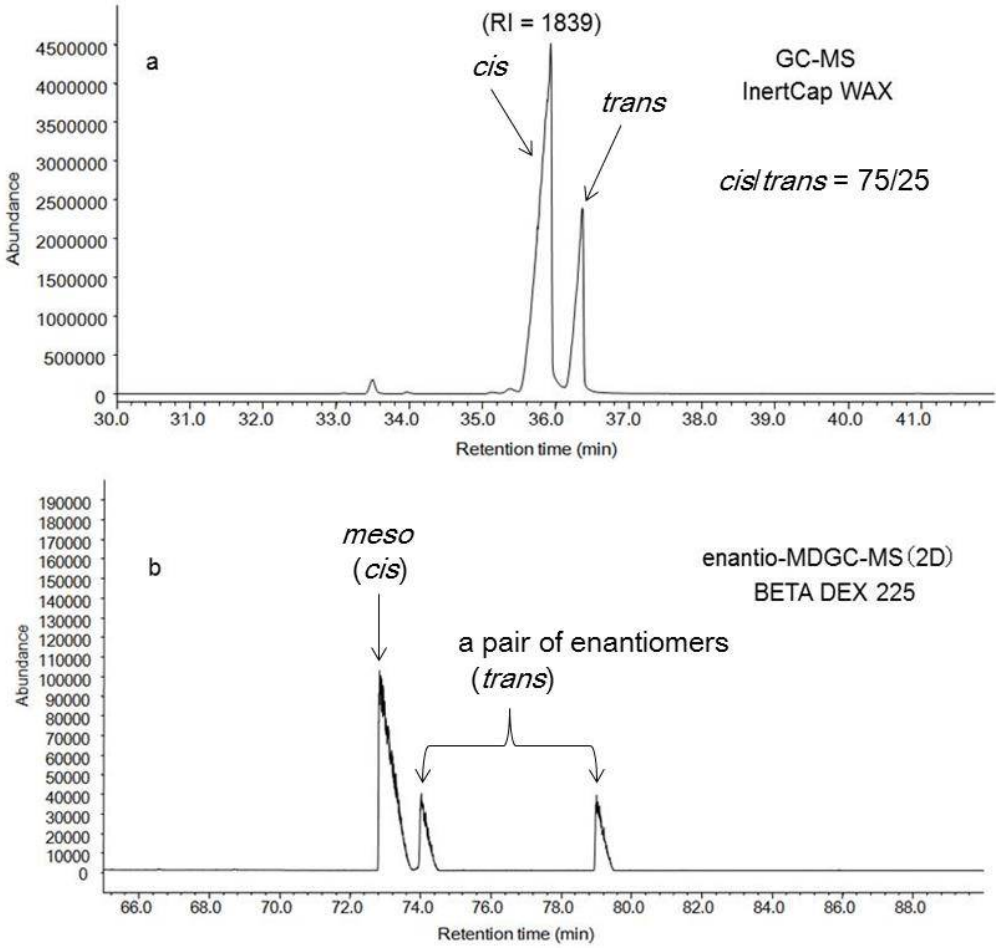


図 4-6. GC-MS（上）および enantio-MDGC-MS（下）による化学合成した 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione の TIC クロマトグラム（a, InertCap WAX, by GC-MS; b, BETA DEX 225, by enantio-MDGC-MS）

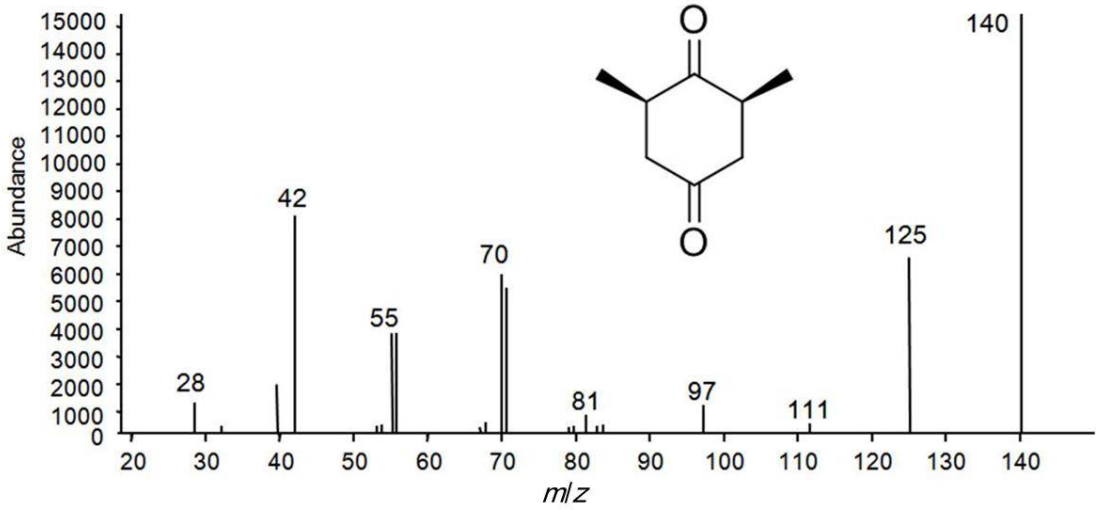


図 4-7. *cis*-2,6-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione の質量スペクトル

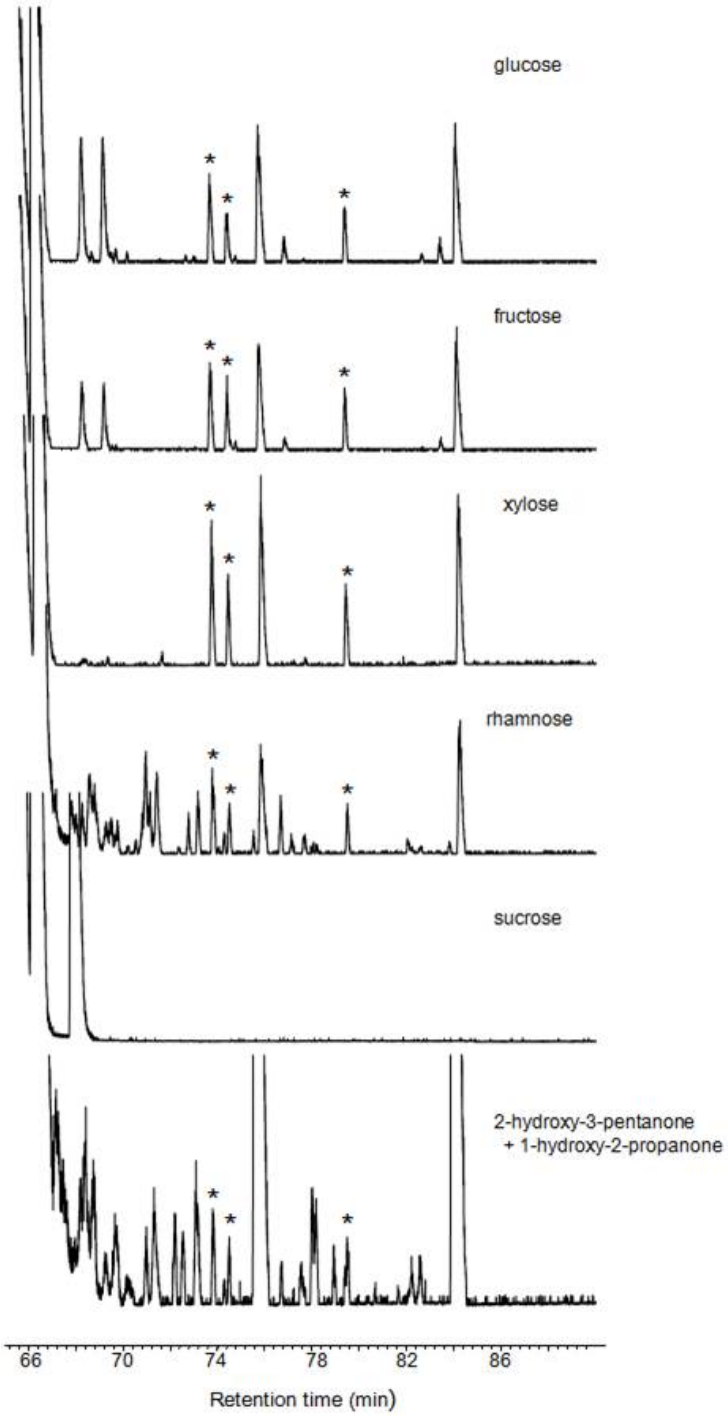


図 4-8. 各種糖類の熱分解および **2-hydroxy-3-pentanone** と **1-hydroxy-2-propanone** の加熱縮合反応による **2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione**（＊）の生成（**by enantio-MDGC-MS, BETA DEX 225**）

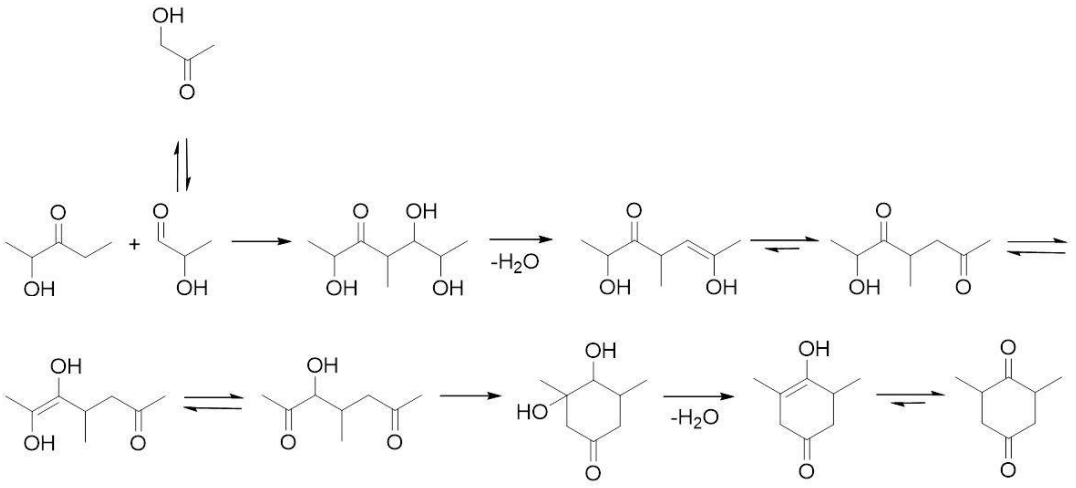


図 4-9. 2-Hydroxy-3-pentanone と 1-hydroxy-2-propanone からの 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione の推定生成経路

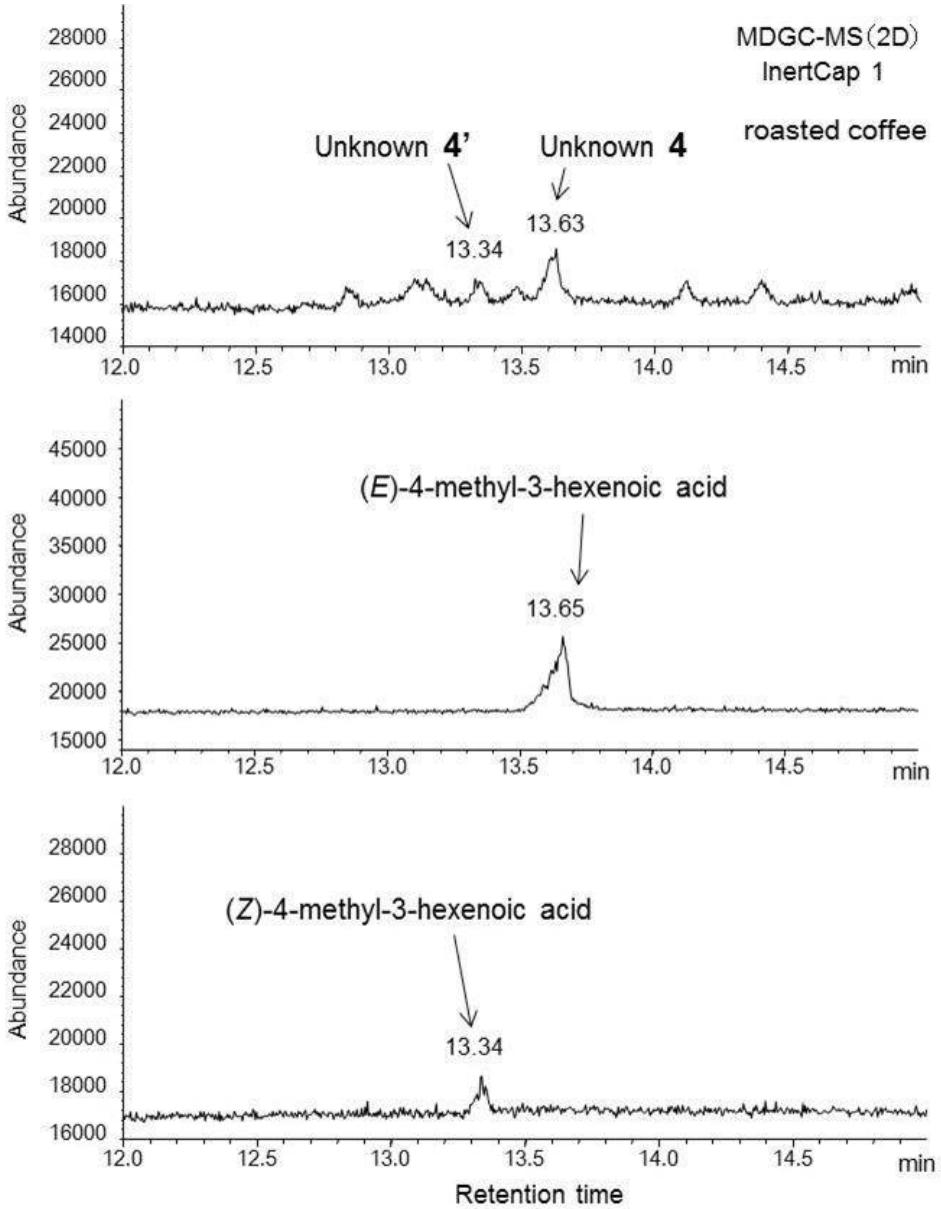


図 4-10. MDGC-MS によるコーヒー精油 B の IEC 画分 D および化学合成した(*E*)-および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid の TIC クロマトグラム（InertCap 1（2 次オーブン））

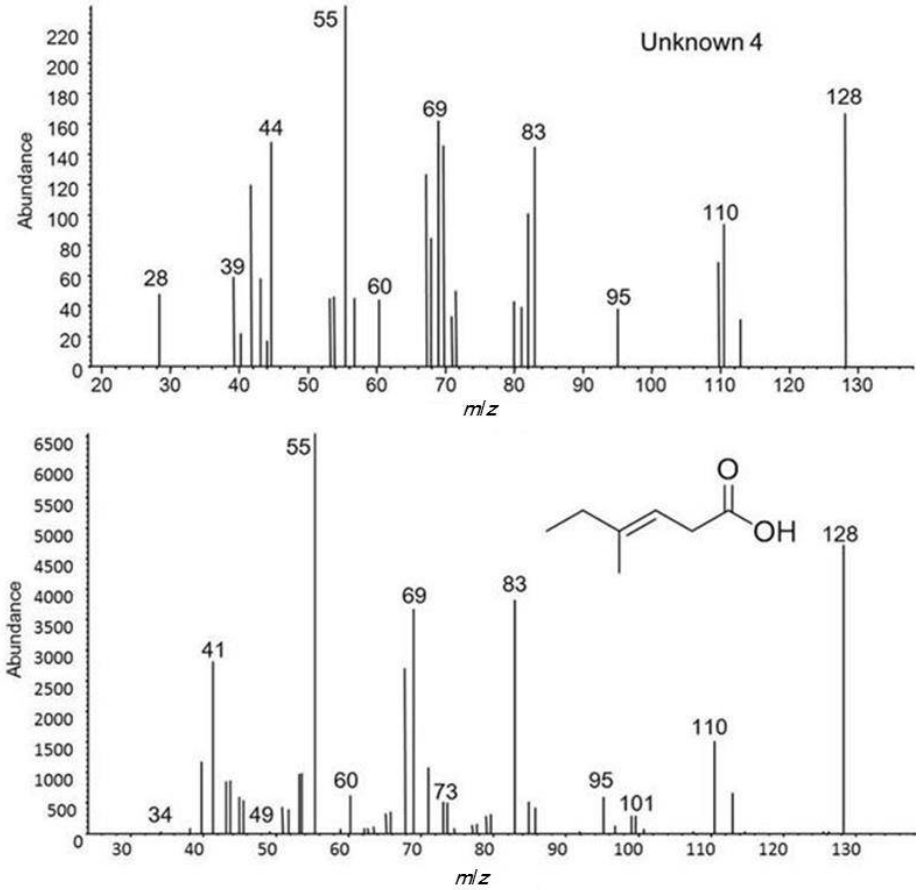


図 **4-11.** 微量寄与成分 **4**（上）および化学合成した**(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid**（下）の質量スペクトル

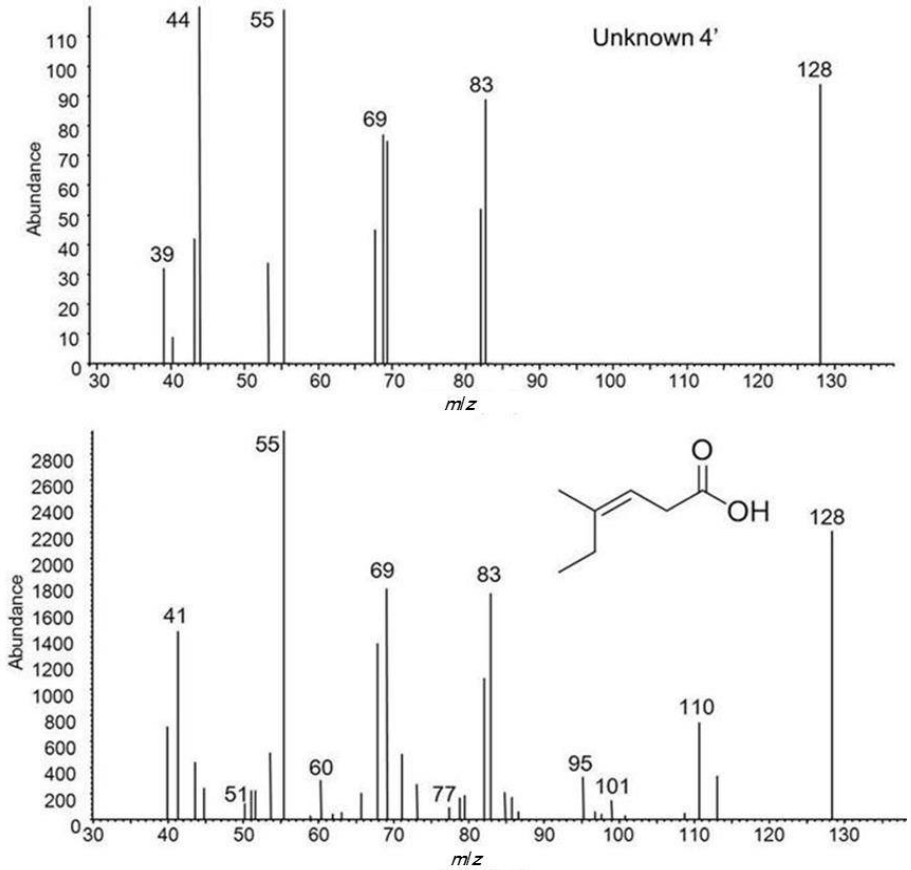


図 4-12. 微量成分 4'（上）と化学合成した(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid（下）の質量スペクトル

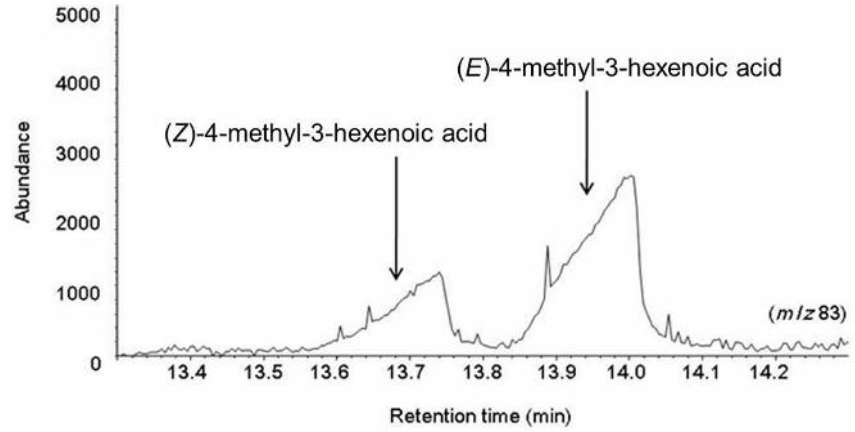


図 4-13. MDGC-MS による Maillard 反応濃縮物のイオンクロマトグラム（*m*/*z* 83; RT = 13.3 分から 14.3 分, InertCap 1）: L-isoleucine と xylose の反応からの(*E*)-および(*Z*)- 4-methyl-3-hexenoic acid の生成

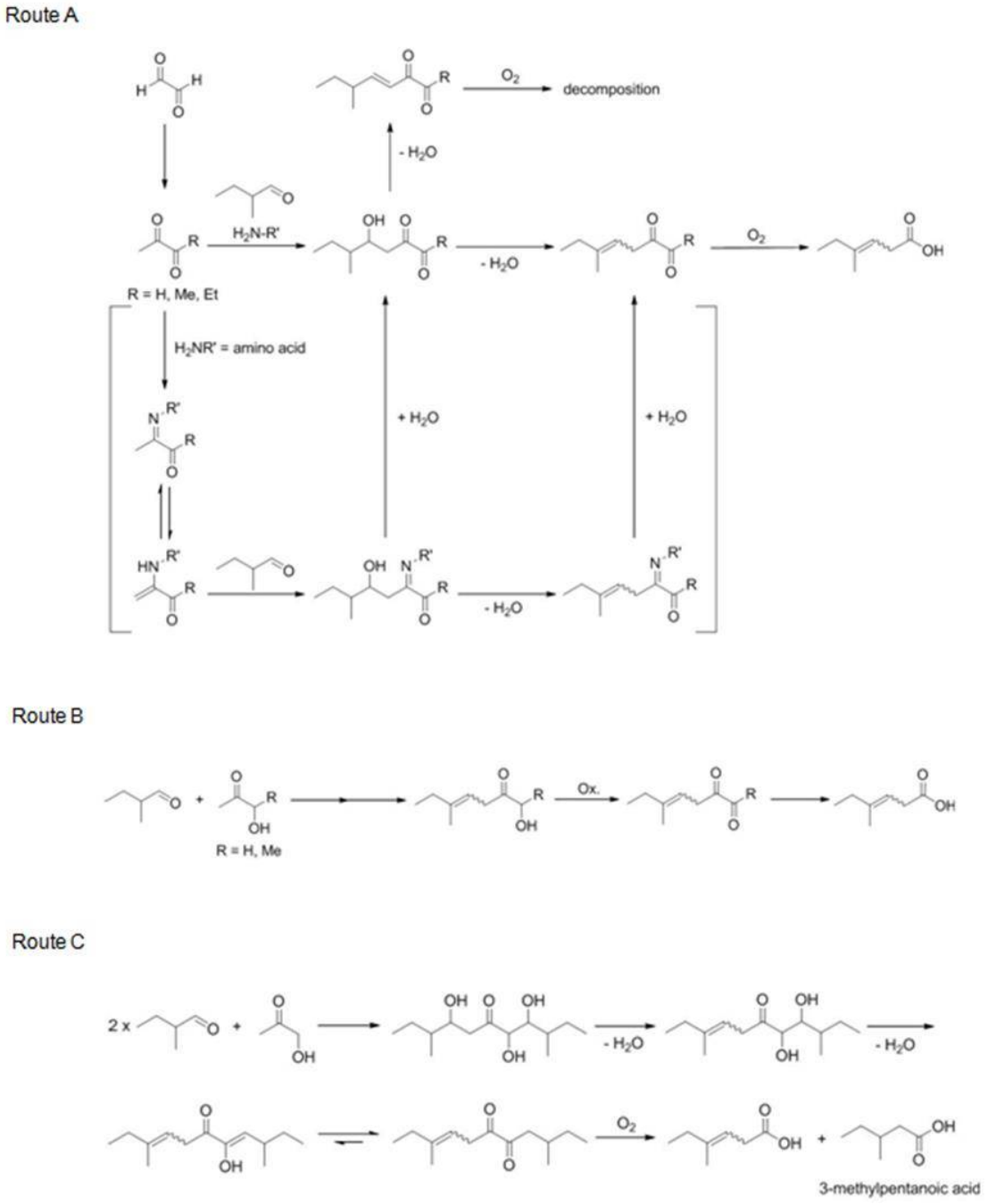


図 **4-14. 2-Methylbutanal** と糖の加熱生成物（**glyoxal, 2-oxopropanal, 2,3-butanedione, 2,3-pentanedione, 1-hydroxy-2-propanone, 3-hydroxy-2-butanone**）からの**(*E*)-**および**(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid** の推定生成経路

表 **4-1. AEDA** 法によるドリップコーヒーの固相抽出物中の香気寄与成分（**FD** ファクター**27** 以上）の検出

No.	Odour quality[a]	Odorant[b]	RI[c]	FD factor	Identification criteria
1	natty, roasty	unknown	1402	81	GC-O
2	coffee-like, roasty	2-furfurylthiol	1435	81	RI, MS, GC-O
3	earthy	unknown	1451	27	GC-O
4	potato-like	methional[d]	1460	27	RI, GC-O
5	natty, roasty	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	1464	243	RI, MS, GC-O
6	natty, roasty, chocolate-like	2,3-diethyl-5-methylpyrazine	1493	27	RI, MS, GC-O
7	fruity, roasty	3-mercapto-3-methylbutyl formate	1520	81	RI, MS, GC-O
8	earthy	2-isobutyl-3-methoxypyrazine[d]	1525	81	RI, GC-O
9	natty, earthy	unknown	1560	27	GC-O
10	roasty	2-acetylpyridine	1607	27	RI, MS, GC-O
11	earthy, roasty	6,7-dihydro-5-methyl-5(*H*)-cyclopentapyrazine	1631	81	RI, MS, GC-O
12	roasty	acetylpyrazine[d]	1650	27	RI, GC-O
13	broth-like	3-mercapto-3-methylbutanol[d]	1661	81	RI, GC-O
14	cheese-like	isovaleric acid	1669	243	RI, MS, GC-O
15	cheese-like	2-methylbutanoic acid	1669	243	RI, MS, GC-O
16	broth-like	unknown	1729	81	GC-O
17	fruity, sweet	(*E*)-β-damascenone[d]	1821	81	RI, GC-O
18	burnt sugar-like, caramel-like	methyl corylone (2-hydroxy-3,4-dimethyl-2-cyclopenten-1-one)	1839	243	RI, MS, GC-O
19	pungent, spicy	unknown **3**	1839	243	GC-O
20	fruity, sweet	unknown	1846	27	GC-O
21	phenolic, medical, smoked	guaiacol	1858	729	RI, MS, GC-O
22	phenolic, jasmin-like	unknown	1892	27	GC-O
23	green tea-like, violet	β-ionone[d]	1939	243	RI, GC-O
24	sugar-like, sweet	maltol[d]	1968	27	RI, GC-O
25	matsutake mushroom-like	unknown	1984	27	GC-O
26	caramel-like	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone[d]	2050	243	RI, GC-O
27	sweaty	unknown **4**	2060	729	GC-O
28	phenolic	4-methylphenol	2083	27	RI, MS, GC-O
29	phenolic	3-ethylphenol	2182	81	RI, MS, GC-O
30	phenolic, banana-like, sweet	unknown	2190	81	GC-O
31	phenolic, banana-like, sweet	5-vinylguaiacol	2241	243	RI, MS, GC-O
32	faecal-like	3-methylindole	2493	27	RI, MS, GC-O
33	chocolate-like	phenylacetic acid	2568	81	RI, MS, GC-O
34	honey-like	3-phenylpropionic acid	2629	729	RI, MS, GC-O

[a] The description of the odour quality perceived by GC-O

[b] The odorous compound was identified by comparison of identification criteria such as retention index (RI), mass spectrum (MS), and odour quality by GC-O with that of the authentic reference substance

[c] Determined on InertCap WAX (60 m × 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 μm) column

[d] Tentatively identified compound

表 4-2. 2,6-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione と関連した環状ジケトン類の香気特性

Compound[a]	RI (InertCap WAX)[b]	RT (BETA DEX 225)[c]		Odour quality[d]	Orthonasal detection odour threshold[e]
		cis	*trans*		mg/L, water
methyl corylone	1839			burnt sugar	0.1 (0.02)[f]
1,4-cyclohexanedione	1927			medicine	1
2,5-dimethyl-1,4-cyclohexanedione (48/52)	1803 (1871)	74.39	81.27, 86.98	fermentation odour	10
2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione (75/25)	1839 (1850)	72.82	73.98, 79.00	musty, mouldy	0.025
2,3-dimethyl-1,4-cyclohexanedione (46/54)	1859 (1900)	81.68	82.19, 85.41	leaf mould-like	5

[a] The parenthetical value is the ratio of stereoisomers (*cis*/*trans*) estimated by GC-MS peak area

[b] The parenthetical value is attributed to the *trans* isomer; outside is a single or the *cis* isomer

[c] Retention time (min) on BETA DEX 225 (30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm) column

[d] The evaluation was performed by three panellists at the high concentration of 10,000 mg/L ethanol

[e] The evaluation was performed by seven panellists, based on Simian *et al*. (2004)

[f] The parenthetical value noted was previously reported by Nishimura and Mihara (1990)

表 4-3. *cis*-2,6-Dimethyl-1,4-cyclohexanedione と methyl corylone の香気特性

Compound	Orthonasal detection odour threshold[a] ng/L, air	Odour quality (by GC-O)
methyl corylone	0.9-1.8 (0.05-0.1)[b]	burnt sugar
cis -2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione	0.002-0.007	pungent, warming[c]

[a] The evaluation was performed by three panellists, based on Ullrich and Grosch. (1987)

[b] The parenthetical value noted was previously reported by Blank *et al.* (1992)

[c] The evaluation was performed by three panellists at a concentration of 0.07 ng/L air by GC-O

表 **4-4.** 化学合成した **2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione**（***cis*/*trans* = 75/25**）の缶コーヒーへの添加効果

評価項目	添加品(n=6)
① 口に含んだ時の香りについて	
ロースト香	2.9
砂糖様の香り	–1.4
コーヒー感	2.1
② 味について	
苦味	3.3
酸味	–0.4
甘味	–0.1
味のキレ	3.5
味の厚み	2.5

表 4-5. 微量寄与成分 4 と(*E*)-および(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid の RI と香気特性の比較

Compound	RI[a]	RI[b]	Odour description[c]	FD-factor[d]
Unknown **4**	2060	1071	sweaty	729
Standard compounds				
(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid	2059	1070	sweaty	
(*Z*)-4-methyl-3-hexenoic acid	2047	1062	sweaty	

[a] InertCap WAX (60 m × 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 μm)

[b] InertCap 1 (60 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm)

[c] Evaluated via GC-O

[d] Shown in Table 4-1

表 4-6. Maillard 反応および関連した反応からの(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の生成

No.	Amino acid	Sugar	Strecker aldehyde	(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid[d]
1[a,c]	L-isoleucine	xylose		+
2[a]	glycine	xylose		-
3[a]	L-α-alanine	xylose		-
4[a]	L-valine	xylose		-
5[a]	L-leucine	xylose		-
6[a]	L-isoleucine	fructose		+
7[a]	L-isoleucine	glucose		+
8[a]	L-isoleucine	rhamnose		+
9[a]	L-isoleucine	sucrose		+
10[b]	glycine	xylose	2-methylbutanal	+
11[b]	glycine	fructose	2-methylbutanal	+
12[b]	glycine	glucose	2-methylbutanal	+
13[b]	glycine	rhamnose	2-methylbutanal	+
14[b]	glycine	sucrose	2-methylbutanal	+
15[b]	L-isoleucine	glyoxal		+
16[b]	L-isoleucine	2-oxopropanal		+
17[b]	L-isoleucine	2,3-butanedione		+
18[b]	L-isoleucine	2,3-pentanedione		+
19[b]	L-isoleucine	1-hydroxy-2-propanone		+
20[b]	L-isoleucine	3-hydroxy-2-butanone		+
21[b]	glycine	glyoxal	2-methylbutanal	+
22[b]	glycine	2-oxopropanal	2-methylbutanal	+
23[b]	glycine	2,3-butanedione	2-methylbutanal	+
24[b]	glycine	2,3-pentanedione	2-methylbutanal	+
25[b]	glycine	1-hydroxy-2-propanone	2-methylbutanal	+
26[b]	glycine	3-hydroxy-2-butanone	2-methylbutanal	+

[a] Amino acids (25 mmol) and sugars (25 mmol) in phosphate buffer (pH 6.0) at 120 °C for 1 h in an autoclave

[b]Amino acids (10 mmol) and sugars or sugar degradation compounds (10 mmol), with or without aldehyde (10 mmol), in phosphate buffer (pH 6.0) at 120 °C for 1 h in an autoclave

[c]Analysed via MDGC-MS

[d] "+" indicates "presence", "-" indicates "absence" in GC-O analysis

表 4-7. (*E*)-4-Methyl-3-hexenoic acid の市販の飲料製品 12 点への添加効果

飲料製品	添加	評価	コメント
ローソンプレミアム オレンジ	1/1000	○	・酸味・苦味が強まる。 ・味に厚みが出る
ローソンプレミアム グレープフルーツ	1/1000	○	・トロピカルな香りが強まる。 ・香りの保留性が増す。
カルピス ほっとレモン	1/1000	○	・酸臭が強まる。 ・香りがよりシャープになる。
アクエリアス	1/2000～1/1000	◎	・果汁感が強まる。 ・サワー感・甘味が強まる。
なっちゃん！ オレンジ	1/2000～1/1000	○	・果汁感・サワー感が強まる。 ・熟したオレンジを想起させる。
ビタミンウォーター	1/2000～1/1000	○	・果皮感が強まる。 ・酸味が強まる。
キリンフリー	1/1000	◎	・ホップの枯草様の香りが強まる。 ・ビール感（本物感）が強まる。 ・苦味が強まる。
おーいお茶 緑茶	1/1000	○	・トップノートが強まる。 ・渋味が強まる。
おーいお茶 ほうじ茶	1/1000	◎	・香りの力価が強まる。 ・ほうじ茶の本物感が強まる。 ・香ばしさが強まる。
ブラック無糖	1/1000	○	・ミドルノートのロースト香が強まる。 ・味にコクが増す。
ジョージア エメラルドマウンテン ブラック	1/1000	△	・味に厚みが出る。 ・効果がわかりにくい。
ボス ブラック	1/1000	○	・濃厚な味わいになる。 ・味がしまる。

第 5 章　総括

現代社会において、加工食品が広く普及して、私たちの暮らしを豊かなものにしている。しかしながら、加工時に素材が本来もつ香りおよび風味が失われるなどして、おいしさが損なわれてしまっているものが多い。その損なわれた香りと風味を補強するためにフレーバーが用いられている。近年、人々の本物志向が高まる中、加工食品に対する「よりナチュラルな香りで、よりおいしく」といった素材本来もしくはそれ以上の香りと風味が求められている。そのため、香料産業界では、人々の要望に応えるために、本物感のあるフレーバーの開発が重要な課題とされている。

本研究の対象としたユズおよびコーヒーは人々の嗜好性が高く、関連した加工食品が広く普及している。しかしながら、加工食品に利用されている現存のユズフレーバーおよびコーヒーフレーバーは、人々の嗜好を満たすにはもの足りなさがある。

これまでに両素材の香気成分の解明はなされているものの、GC-MS のような従来の分析法で得られた分析データ、他の研究グループによる GC-O を用いた AEDA のような新しい分析法で得られた香気寄与成分に関する分析データをもとにしても、本来の香りを再現することはできず、本物感のあるユズフレーバーおよびコーヒーフレーバーを創製することは十分に達成されていない。

本研究では、この課題を解決するために、これまでに見出すことのできなかった全体の香りに貢献する未知の微量寄与成分に注目し、AEDA および MDGC-MS などの新しい分析法に加えて、精密な化学合成法を用いることによって未知の微量寄与成分を明らかにすることができた。

第 2 章では、ユズフレーバーの香気特性に寄与する微量成分として、アルベド

（albedo）様香気をもつ(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal [IUPAC 名: (2*E*)-3-{(2*S*,3*S*)-3-[(2*Z*)-pent-2-en-1-yl]oxiran-2-yl}prop-2-enal]を新たに見出した。まず、AEDA 法によってユズ果皮ヘキサン抽出物中の香気寄与成分のスクリーニングを行った結果、FD ファクター128 を示し、アルベド様香気をもつ微量寄与成分 **1** を見出した。微量寄与成分 **1** は微量であるため、ユズ果皮ヘキサン抽出物を GC-MS に供しても検出されず、同定に必要な質量スペクトルを取得することができなかった。そこで、ユズ果皮ヘキサン抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりテルペン系炭化水素部（ヘキサン画分）と含酸素部（エーテル画分）に分画し、さらに含酸素部を分取 HPLC により 24 画分に分画することによって、微量寄与成分 **1** を含む画分を得た。得られた画分を GC-MS に供して、微量寄与成分 **1** の質量スペクトルを取得した。化学構造を推定したところ、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal であると示唆された。そこで、クロスカップリング反応、LAH 還元、Prilezhaev エポキシ化、Lindlar 還元、Dess-Martin 酸化、Wittig 反応を用いて、本化合物を 6 段階で立体選択的に化学合成した。合成した *trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の質量スペクトル、RI、香調のデータ三点が微量寄与成分 **1** と一致することを確認した。さらに、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の両光学異性体（4*S*,5*S* 体および 4*R*,5*R* 体）をエナンチオ選択的に化学合成した。本化学合成は、鍵として Katsuki-Sharpless 不斉エポキシ化を用いて達成した。合成した光学異性体を用いてユズ果皮ヘキサン抽出物中の微量寄与成分 **1** のキラル分析を行った。enantio-MDGC-MS によるキラル分析の結果、微量寄与成分 **1** は 4*S*,5*S* 体であり、つまり、微量寄与成分 **1** を(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal であると同定した。また、*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal は α-リノレン酸過酸化物(13*S*)-HPOT の熱分解から生成することを確認した。最後に、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal の業務用のユズフレーバーに対する添加効果を評価し

た結果、全体の香りに果汁感やアルベド様の脂肪感を付与し、本物感を強める良好な効果をもつことを確認した。本成果はSpringerから発行されている*European Food Research and Technology*に論文として掲載された（Miyazato *et al*., 2012; Miyazato *et al*., 2013a）。

第 3 章では、ユズフレーバーの香気特性に寄与する微量成分として、汗臭（sweaty）をもつ(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidを初めて見出した。第2章のAEDAにより、FDファクター128を示し、汗臭をもつ未知の微量寄与成分**2**を見出した。微量寄与成分**2**は微量であるため、ユズ果皮ヘキサン抽出物をGC-MSに供しても検出されず、対応する質量スペクトルを取得することができなかった。そこで、ユズ果皮ヘキサン抽出物の酸塩基処理により酸性画分を得て、さらに得られた酸性画分をIECで精製することにより、微量寄与成分**2**を含む画分を得た。しかし、得られた画分をGC-MSに供しても微量寄与成分**2**を検出することができなかった。そこで、MDGC-MSに供した。その結果、微量寄与成分**2**の質量スペクトルを取得し、化学構造を推定したところ、4-methyl-3-hexenoic acidであると示唆された。*E*体および*Z*体を、位置選択的アルキル化によるホモアリルアルコールの合成、続くJones酸化の2段階で立体選択的に化学合成した。合成した(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidの質量スペクトル、RI、香調のデータ三点が微量寄与成分**2**と一致することを確認した。したがって、微量寄与成分**2**を(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidであると同定した。最後に、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acidの業務用のユズフレーバーに対する添加効果を評価した結果、全体の香りに搾りたてを想起させるような香りを付与し、果汁感と酸味を強め、本物感を強める良好な効果をもつことを確認した。本成果はJohn Wiley & Sonsから発行されている*Flavour and Fragrance Journal*に論文として掲載された（Miyazato *et al*., 2013b）。

第4章では、コーヒーフレーバーの香気特性に寄与する微量成分として、刺激

的な香気（pungent）をもつ *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione および汗臭（sweaty）をもつ(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid を初めて見出した。まず、AEDA 法によりドリップコーヒーの固相抽出物中の香気寄与成分のスクリーニングを行った結果、FD ファクター243 を示し、刺激的な香気をもつ微量寄与成分 **3**、そして FD ファクター729 を示し、汗臭をもつ微量寄与成分 **4** を検出した。微量寄与成分 **3** および **4** は微量であるため、固相抽出物を GC-MS に供しても検出されなかった。そこで、焙煎コーヒー粉末から得られたコーヒー精油を分画し、微量寄与成分 **3** および **4** を含む各画分を得た。

微量寄与成分 **3** を含む画分は、コーヒー精油をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで 5 画分に分画することにより得た。得られた画分を enantio-MDGC-MS に供し、微量寄与成分 **3** の質量スペクトルを取得し、化学構造を推定したところ、2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione であると示唆された。そこで、ヒドロキノンから出発して、*O*-メチル化、Benkeser 還元、そして酸触媒加水分解の 3 段階で本化合物を化学合成した。合成した 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione の質量スペクトル、RI、香調のデータ三点が微量寄与成分 **3** と一致することを確認した。したがって、微量寄与成分 **3** を 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione であると同定した。微量寄与成分 **3** の幾何異性については、化学合成した 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione の GC-MS および enantio-MDGC-MS の RI（InertCap WAX, by GC）および RT（BETA DEX 225, by enantio-MDGC-MS）のデータを用いて決定した。その結果、微量寄与成分 **3** は *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione であると特定した。また、2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione は、単糖類（glucose, fructose, xylose, rhamnose）の熱分解および 2-hydroxy-3-pentanone と 1-hydroxy-2-propanone の加熱縮合反応から生成することを確認した。最後に、缶コーヒーに対する 2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione の添加効果を評価した結果、焙煎コーヒーの特徴であるロースト香を

強め、コーヒー独特の苦味を強め、味のキレと厚みを向上させ、コーヒー感つまり本物感を強めることを確認した。本成果はELSEVIERから発行されている*Food Chemistry*に論文として掲載された（Miyazato *et al*., 2013c）。

一方、微量寄与成分 **4** を含む酸性画分はコーヒー精油から IEC によって得た。得られた画分を MDGC-MS に供して、微量寄与成分 **4** の質量スペクトルを取得した。微量寄与成分 **4** の質量スペクトル、RI、香調のデータ三点が、化学合成した(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid と一致したので、**4** を(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid であると同定した。また、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid は *Z* 体とともに L-isoleucine と糖（xylose, fructose, glucose, rhamnose, sucrose）の Maillard 反応から生成することを確認した。最後に、コーヒーおよびオレンジ、グレープフルーツ、レモン、ホップ、茶などの様々な食品素材の加工飲料に対する(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid の添加効果を評価した結果、それらの素材の風味を良好に向上させ、本物感を強める効果があることを確認した。本成果は Maxwell Scientific Organization から発行されている *Advance Journal of Food Science and Technology* に論文として掲載された（Miyazato *et al*., 2013d）。

最後に、本研究の成果は、香料科学の分野において、香りに対する知見をより深めるものであり、香りの特徴の解明に大きく貢献するものである。さらに、香料産業界において、本研究で初めて見出された化合物、(4*S*,5*S*)-*trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal、(*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid、*cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexane-dione が、現存のユズフレーバーおよびコーヒーフレーバーを本物感のあるものへと改善し、さらにその他の食品素材のフレーバーに応用されることができると考えられる。そして、「よりナチュラルな香りで、よりおいしく」といった人々の要望に応えられたフレーバーを創製することでき、人々の嗜好を満足させることのできる様々な加工食品を市場に提供することができると期待される。本研究

の成果は、人々が今よりも、輝かしく、彩のある、心豊かな暮らしを送ることへの一助になると考えられる。

謝辞

本論文を作成するにあたり、ご懇篤なご指導ご鞭撻を賜りました信州大学大学院農学研究科・藤田智之教授に心より感謝申し上げます。

本論文を作成するにあたり、ご指導ご助言を賜りました信州大学大学院農学研究科・真壁秀文教授、信州大学農学部・廣田満教授、信州大学農学部/信州大学大学院総合工学系研究科・後藤哲久教授、ならびに大阪府立大学大学院生命環境科学研究科・谷森紳治教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、NMR 分析装置を快くお貸しくださった大阪府立大学大学院理学系研究科・柳日馨教授ならびに福山高英准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ご協力くださった長岡香料株式会社技術開発研究所副所長・橋本清二博士ならびに技術開発研究所・中村道明課長に感謝申し上げます。

香りの評価にあたり、ご協力くださった技術開発研究所・田中賢一次長、竹内弘明課長、生形義人課長代理、花井洋志課長代理、辻泰宏課長代理、石川基樹係長、島田貴章係長、ならびに寒河江大輔研究員に御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、ご協力くださった技術開発研究所係長・杉本圭一郎博士に御礼申し上げます。

何かとご便宜を図ってくださった長岡香料株式会社の皆様に感謝申し上げます。

本論文を作成するにあたり、有意義なご助言ご指導を賜りました近畿大学名誉教授・亀岡弘先生に深く感謝申し上げます。

本研究にあたり、終始暖かく見守ってくださり励ましをいただきました長岡香料株式会社取締役副社長・林收一博士に心より感謝申し上げます。

このような貴重な機会を与えてくださった長岡香料株式会社・原田収代表取締役社長に心より感謝申し上げます。

最後に、応援してくれた両親と妻に心より感謝申し上げます。そして、長岡香料株式会社元顧問・故古川靖博士のご冥福をお祈りいたしますとともに本論文を捧げます。

引用文献

Akiyama, M., Murakami, K., Ikeda, M., Iwatsuki, K., Wada, A., Tokuno, K., Onishi, M., & Iwabuchi, H. (2007). Analysis of the headspace volatiles of freshly brewed Arabica coffee using solid-phase microextraction. *Journal of Food Science*, *72*, C388–C396.

Akutsu, T., Sekiguchi, K., Ohmori, T., & Sakurada, K. (2006). Individual comparisons of the levels of (*E*)-3-methyl-2-hexenoic acid, an axillary odor-related compound, in Japanese. *Chemical Senses*, *31*, 557–563.

Arnold, U., Ludwig, E., Kühn, R., & Möschwitzer, U. (1994). Analysis of free amino acids in green coffee beans I. Determination of amino acids after precolumn derivatization using 9-fluorenylmethylchloroformate. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *199*, 22–25.

Barron, D., & Pabst, A. (1991). Recent Advances in high-performance liquid chromatography of volatile natural products. In N. H. Fischer, M. B. Isman, & H. A. Stafford (Eds.), *Modern Phytochemical Methods* (pp. 33–74). New York: Plenum Press.

Bentley, R. (2006). The nose as a stereochemist. Enantiomers and odor. *Chemical Reviews*, *106*, 4099–4112.

Blank, I., Sen, A., & Grosch, W. (1992). Potent odorants of the roasted powder and brew of Arabica coffee. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *195*, 239–245.

Brennand, C. P., Kim Ha, J., & Lindsay, R. C. (1989). Aroma properties and thresholds of some branched-chain and other minor volatile fatty acids occurring in milkfat and meat lipids. *Journal of Sensory Studies*, *4*, 105–120.

Buettner, A., & Schieberle, P. (1999). Characterization of the most odor-active volatiles in fresh, hand-squeezed juice of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfayden). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 5189–5193.

Buettner, A., & Schieberle, P. (2001). Aroma properties of a homologous series of 2,3-epoxyalkanals and *trans*-4,5-epoxyalk-2-enals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 3881–3884.

Corey, E. J., Marfat, A., & Goto, G. (1980). Simple synthesis of the 11,12-oxido and 14,15-oxido analogues of Leukotriene A and the corresponding conjugates with glutathione and cysteinylglycine, analogues of Leukotrienes C and D. *Journal of the American Chemical Society*, *102*, 6607–6608.

Cremer, D. R., Vollenbroeker, M., & Eichner, K. (2000). Investigation of the formation of Strecker aldehydes from the reaction of Amadori rearrangement products with α-amino acids in low moisture model systems. *European Food Research and Technology*, *211*, 400–403.

Czerny, M., Christlbauer, M., Christlbauer, M., Fischer, A., Granvogl, M., Hammer, M., Hartl, C., Hernandez, N. M., & Schieberle, P. (2008). Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *European Food Research and Technology*, *228*, 265–273.

Czerny, M., Mayer, F., & Grosch, W. (1999). Sensory study on the character impact odorants of roasted Arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 695–699.

d'Angelo, J., Revial, G., Azerad, R., & Buisson, D. (1986). A short, efficient, highly selective synthesis of (1*R*,3*S*)-*cis*-chrysanthemic acid through the microbiological

reduction of 2,2,5,5-tetramethyl-1,4-cyclohexanedione. *The Journal of Organic Chemistry*, *51*, 40–45.

Davídek, T., Robert, F., Devaud, S., Vera, F. A., & Blank, I. (2006). Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative α-dicarbonyl cleavage pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 6677–6684.

Flament, I. (2001). *Coffee flavor chemistry*. (1st ed.). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Gao, Y., Hanson, R. M., Klunder, J. M., Ko, S. Y., Masamune, H., & Sharpless, K. B. (1987). Catalytic asymmetric epoxidation and kinetic resolution: modified procedures including in situ derivatization. *Journal of the American Chemical Society*, *109*, 5765–5780.

Gassenmeier, K., & Schieberle, P. (1994). Formation of the intense flavour compound *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal in thermally treated fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *71*, 1315–1319.

Ginz, M., Balzer, H. H., Bradbury, A. G. W., & Maier, H. G. (2000). Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. *European Food Research and Technology*, *211*, 404–410.

Grosch, W. (1993). Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis. *Trends in Food Science & Technology*, *4*, 68–73.

Hann, A. C. O., & Lapworth, A. (1904). VII.-Optically active esters of β-ketonic and β-aldehydic acids. Part IV. Condensation of aldehydes with menthyl acetoacetate. *Journal of the Chemical Society*, *Transactions*, *85*, 46–56.

Heiler, C., & Schieberle, P. (1996). Studies on the metallic off-flavour in buttermilk:

identification of potent aroma compounds. *Lebensmittelwissenschaft und -Technologie*, *29*, 460–464.

Hinterholzer, A., & Schieberle, P. (1998). Identification of the most odour-active volatiles in fresh, hand-extracted juice of Valencia Late oranges by odour dilution techniques. *Flavour and Fragrance Journal*, *13*, 49–55.

Hofmann, T., Münch, P., & Schieberle, P. (2000). Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by Strecker-type reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 434–440.

Hollnagel, A., & Kroh, L. W. (1998). Formation of α-dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *207*, 50–54.

Holscher, W., Vitzthum, O. G., & Steinhart, H. (1990). Identification and sensorial evaluation of aroma-impact-compounds in roasted Colombian coffee. *Café, Cacao, Thé*, *34*, 205–212.

Holscher, W., & Steinhart, H. (1994). Formation pathways for primary roasted coffee aroma compounds. In T. H. Parliment, M. J. Morello, & R. J. McGorrin (Eds.), *Thermally generated flavors* (pp. 206–217). Washington, DC: American Chemical Society.

川上 幸宏 (1995). コーヒーの香りと焙煎. 高砂香料時報, *120*, 15–27.

Kawashima, M., Sato, T., & Fujisawa, T. (1988). Regio- and stereoselective ring opening of *ω*-alkenyllactones using organocopper reagents. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, *61*, 3255–3264.

Khan, R. H., & Zoretic, P. A. (1985). Improved synthesis of 3,3-ethylenedioxy-4β, 5β-dimethyloctalin-9-en-8-one. *Indian Journal of Chemistry*, *24B*, 426–427.

Knopp, S., Bytof, G., & Selmar, D. (2006). Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. *European Food Research and Technology*, *223*, 195–201.

Kováts, E. (1958). Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimica Acta*, *41*, 1915–1932.

Kumazawa, K., & Masuda, H. (2003). Identification of odor-active 3-mercapto-3-methylbutyl acetate in volatile fraction of roasted coffee brew isolated by steam distillation under reduced pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 3079–3082.

Kumazawa, K., Wada, Y., & Masuda, H. (2006). Characterization of epoxydecenal isomers as potent odorants in black tea (Dimbula) infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 4795–4801.

Lin, J., Fay, L. B., Welti, D. H., & Blank, I. (1999). Synthesis of *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal and its deuterated analog used for the development of a sensitive and selective quantification method based on isotope dilution assay with negative chemical ionization. *Lipids*, *34*, 1117–1126.

Linstead, R. P., & Mann, J. T. W. (1930). CCLXVI.-Investigations of the olefinic acids. Part III. Homologues of teraconic, terebic, and pyroterebic acids. Further evidence of the effect of two-γ-alkyl groups on three-carbon tautomerism. *Journal of the Chemical Society*, 2064–2073.

Marriott, P. J., Chin, S.-T., Maikhunthod, B., Schmarr, H.-G, & Bieri, S. (2012). Multidimensional gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, *34*, 1–21.

Mayer, F., Takeoka, G. R., Buttery, R. G., Whitehand, L. C., Naim, M., & Rabinowitch, H.

D. (2008). Studies on the aroma of five fresh tomato cultivars and the precursors of *cis*- and *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenals and methional. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 3749–3757.

McGorrin, R. J. (2012). Character-impact flavor and off-flavor compounds in foods. In R. Marsili (Ed.), *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis, 2nd* (pp. 207–262). Boca Raton: CRC Press.

Mikami, Y. (1988). Microbial conversion of terpenoids. In S. Harding (Ed.), *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (Vol. 6, pp. 271–320). Wimborne, UK: Intercept Ltd.

宮里 博成 (2009). 唐柚子（Dangyooja）の香気成分. 香料, *241*, 33–42.

Miyazato, H. (2013). Identification of the compounds responsible for the sweat-like odor in hop (*Humulus lupulus* L.) volatile oil. *Journal of Food Research*, *2*, 34–47.

Miyazato, H., Hashimoto, S., & Hayashi, S. (2012). Identification of the odour-active aldehyde *trans*-4,5-epoxy-(*E*,*Z*)-2,7-decadienal in yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka). *European Food Research and Technology*, *235*, 881–891.

Miyazato, H., Hashimoto, S., & Hayashi, S. (2013a). Enantiomeric distribution of odour-active epoxyaldehydes in yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka). *European Food Research and Technology*, *237*, 933–942.

Miyazato, H., Hashimoto, S., & Hayashi, S. (2013b). First identification of the odour-active unsaturated aliphatic acid (*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid in yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka). *Flavour and Fragrance Journal*, *28*, 62–69.

Miyazato, H., Nakamura, M., Hashimoto, S., & Hayashi, S. (2013c). Identification of the odour-active cyclic diketone *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione in roasted Arabica coffee brew. *Food Chemistry*, *138*, 2346–2355.

Miyazato, H., Nakamura, M., Hashimoto, S., & Hayashi, S. (2013d). Odor-active (*E*)-4-methyl-3-hexenoic acid in roasted coffee generated in the Maillard reactions of L-isoleucine with sugars. *Advance Journal of Food Science and Technology*, *5*, 1367–1374.

Miyazawa, N., Tomita, N., Kurobayashi, Y., Nakanishi, A., Ohkubo, Y., Maeda, T., & Fujita, A. (2009). Novel character impact compounds in yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 1990–1996.

水谷 信一, 林 哲吾, 上田 博夫, 辰巳 忠次 (1971). テルペン類の微生物転換（第9報）リナロールの微生物転換. 日本農芸化学会誌, *45*, 368–373.

Molyneux, R. J., & Schieberle, P. (2007). Compound identification: a *Journal of Agricultural and Food Chemistry* perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 4625–4629.

Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2010). Formation of volatile chemicals from thermal degradation of less volatile coffee components: quinic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 5465–5470.

Moriarty, R. M., & Hou, K.-C. (1984). α-Hydroxylation of ketones using *o*-iodosylbenzoic acid. *Tetrahedron Letters*, *25*, 691–694.

Mosandl, A. (1988). Chirality in flavour chemistry-recent developments in synthesis and analysis. *Food Reviews International*, *4*, 1–43.

Mosblech, A., Feussner, I., & Heilmann, I. (2009). Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, *47*, 511–517.

Nijssen, L. M., Ingen-Visscher, C. A. van, & Donders, J. J. H. (Eds.) *VCF volatile compounds in food database*, *version 13.1* (1963–2011), TNO Triskelion, Zeist (The

Netherlands). http://www.vcf-online.nl/VcfHome.cfm. Accessed 2 May 2012.

Nishimura, O., & Mihara, S. (1990). Investigation of 2-hydroxy-2-cyclopenten-1-ones in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*, 1038–1041.

Novotný, O., Cejpek, K., & Velíšek, J. (2007). Formation of α-hydroxycarbonyl and α-dicarbonyl compounds during degradation of monosaccharides. *Czech Journal of Food Sciences*, *25*, 119–130.

大久保 康隆, 田村 浩, 立原 徹, 黒林 淑子, 冨田 直己, 平澤 浩信 (2006). ユズ中のアルデヒド両鏡像体の合成と香気特性. 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会講演要旨集, *50*, 61–63.

Schieberle, P. (1991). Primary odorants in popcorn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*, 1141–1144.

Schieberle, P., & Grosch, W. (1991). Potent odorants of the wheat bread crumb. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *192*, 130-135.

Schomburg, G., Husmanm, H., Hübinger, E., & König, W. A. (1984). Multidimensional capillary gas chromatography-enantiomeric separations of selected cuts using a chiral second column. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, *7*, 404–410.

Seeley, J. V., & Seeley, S. K. (2013). Multidimensional gas chromatography: fundamental advances and new applications. *Analytical Chemistry*, *85*, 557–578.

Selke, E., Rohwedder, W. K., & Dutton, H. J. (1980). Volatile components from trilinolein heated in air. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *57*, 25–30.

Semmelroch, P., & Grosch, W. (1996). Studies on character impact odorants of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 537–543.

Shinoda, N., Shiga, M., & Nishimura, K. (1970). Constituents of yuzu (*Citrus junos*) oil.

Agricultural and Biological Chemistry, *34*, 234–242.

Simian, H., Robert, F., & Blank, I. (2004). Identification and synthesis of 2-heptanethiol, a new flavor compound found in bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 306–310.

Song, H. S., Sawamura, M., Ito, T., Kawashimo, K., & Ukeda, H. (2000). Quantitative determination and characteristic flavour of *Citrus junos* (yuzu) peel oil. *Flavour and Fragrance Journal*, *15*, 245–250.

Steinhaus, M., Sinuco, D., Polster, J., Osorio, C., & Schieberle, P. (2008). Characterization of the aroma-active compounds in Pink Guava (*Psidium guajava*, L.) by application of the aroma extract dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 4120–4127.

Stolow, R. D., Giants, T. W., Krikorian, R. R., Litchman, M. A., & Wiley, D. C. (1972). The synthesis and configuration of *cis*-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione, *r*-2,*c*-6-dimethyl-*c*-4-hydroxycyclohexanone, and two related diols. *The Journal of Organic Chemistry*, *37*, 2894–2896.

Stumpe, M., & Feussner, I. (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, *5*, 347–357.

Takeuchi, K., Hasegawa, Y., Ishida, H., & Kashiwagi, M. (2012). Identification of novel malodour compounds in laundry. *Flavour and Fragrance Journal*, *27*, 89–94.

Tajima, K., Tanaka, S., Yamaguchi, T., & Fujita, M. (1990). Analysis of green and yellow yuzu peel oils (*Citrus junos* Tanaka). Novel aldehyde components with remarkably low odor thresholds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*, 1544–1548.

太島 勝比古, 福田 和之, 長谷川 義博, 戸井 直 (1992). 柚子の香気成分の研究（2）柚子ピールのヘッドスペース微量成分分析. 香料・テルペンおよび精油

化学に関する討論会講演要旨集, *36*, 28–30.

Tomiyama, K., Aoki, H., Oikawa, T., Sakurai, K., Kasahara, Y., & Kawakami, Y. (2012). Characteristic volatile components of Japanese sour citrus fruits: yuzu, sudachi and kabosu. *Flavour and Fragrance Journal*, *27*, 341–355.

Tranchida, P. Q., Sciarrone, D., Dugo, P., & Mondello, L. (2012). Heart-cutting multidimensional gas chromatography: A review of recent evolution, applications, and future prospects. *Analytica Chimica Acta*, *716*, 66–75.

Tressl, R. (1989). Formation of flavor components in roasted coffee. In T. H. Parliment, R. J. McGorrin, & C.-T. Ho (Eds.), *Thermal Generation of Aromas* (pp. 285–301). Washington, DC: American Chemical Society.

Ullrich, F., & Grosch, W. (1987). Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *184*, 277–282.

van Ruth, S. M. (2001). Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomolecular Engineering*, *17*, 121–128.

Weckerle, B., Gáti, T., Tóth, G., & Schreier, P. (2002). 3-Methylbutanoyl and 3-methylbut-2-enoyl disaccharides from green coffee beans (*Coffea arabica*). *Phytochemistry*, *60*, 409–414.

Weenen, H., & van der Ven, J. G. M. (2001). The formation of Strecker aldehydes. In G. R. Takeoka, M. Güntert, & K.-H. Engel (Eds.), *Aroma Active Compounds in Foods* (pp. 183–195). Washington, DC: American Chemical Society.

Werkhoff, P., Brennecke, S., Bretschneider, W., Güntert, M., Hopp, R., & Surburg, H. (1993). Chirospecific analysis in essential oil, fragrance and flavor research. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *196*, 307–328.

Wöhrmann, R., Hojabr-Kalali, B., & Maier, H. G. (1997). Volatile minor acids in coffee I. Contents of green and roasted coffee. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, *93*, 191–194.

Yamanaka, H., Yokoyama, M., Sakamoto, T., Shiraishi, T., Sagi, M., & Mizugaki, M. (1983). Influence of heteroaromatic amines to Knoevenagel condensation. *Heterocycles*, *20*, 1541–1544.

Yaylayan, V. A., & Keyhani, A. (1998). The origin and fate of α-dicarbonyls formed in Maillard model systems: mechanistic studies using ^{13}C- and ^{15}N-labelled amino acids. In J. O'Brien, H. E. Nursten, M. J. C. Crabbe, & J. M. Ames (Eds.), *The Maillard Reaction in Foods and Medicine* (pp. 51–56). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

湯川 千代樹, 大崎 和彦, 岩淵 久克 (1994). 柚子（*Citrus junos* Sieb. ex T. Tanaka）の香気成分に関する研究. 日本食品化学学会誌, *1*, 46–49.

Zhang, D., & Ready, J. M. (2006). Iron-catalyzed carbometalation of propargylic and homopropargylic alcohols. *Journal of the American Chemical Society*, *128*, 15050–15051.