

## 論文の内容の要旨

論文題目 葉たばこに含まれる高極性フレーバー関連成分の分析と  
生成機構に関する有機化学的研究

氏名 伊藤 研児

本論文では、たばこのフレーバー関連成分の内、高極性配糖体成分及び非酵素的褐変反応生成物について検討を加えた。配糖体成分は、近年フレーバー成分前駆体としての役割が注目されており、植物性食品・飲料の製造工程における酵素反応・化学反応によるフレーバー成分の生成メカニズムが示されているため、たばこにおいてもフレーバー成分前駆体として重要な役割を果たしていることが推定される。また、非酵素的褐変反応生成物は特徴的なフレーバーを持ち閾値が低い成分を多数含むことから、香料・食品科学分野を中心に精力的に研究が進められており、たばこにおいても製造工程におけるこの反応の関与が示唆されている。しかしながら、これらの高極性フレーバー関連成分は、単離・精製あるいは分析が困難で、さらに非酵素的褐変反応に関しては複雑な反応を伴うため、たばこ成分としてのみならず他の食品・飲料その他の分野においても未解明の部分が多く残されている。著者は、これらのたばこにおける役割を明らかにすることを目的として、高極性フレーバー関連成分の研究を行った。

第1章においては、黄色種葉たばこを素材として、分離が困難な高極性配糖体成分と他の高極性成分との分離に対して有効な分画手法を構築し、この方法を用いて配糖体成分を単離・同定した。さらに、同定した配糖体のフレーバー成分前駆体としての効果を評価するため、各配糖体成分をたばこへ添加してその香嗅味効果を調べた。

たばこ中には、ニコチン等の塩基性成分、糖・アミノ酸等の高極性成分他多数の成分が共存し、配糖体成分の精製が非常に困難であった。そこで、これら成分の分離に効果的な溶媒系として、葉たばこのメタノール抽出(タンパク質等ポリマー成分との分離)、塩基性条件におけるエーテル抽出(ニコチン等塩基性成分の除去)、酢酸エチル/エタノール/水(2/1/2)混合液の上相部による抽出(高極性成分との分離)を適用した。さらに逆相系カラムクロマトグラフィー(ダイアイオン HP 20)により分画することで、高極性配糖体成分を効率的に精製することを可能とした。

この分画法を黄色種葉たばこに適用し、分取高速液体クロマトグラフィーにより12種の配糖体成分を単離、そのうち10種を同定した。これら配糖体の内、ホモバニリル-β-D-グルコシドは植物での存在がはじめて確認され、シリンギン、コニフェリン、*p*-ヒドロキシフェネチル-β-D-グルコシド、テルペン(イオン)系配糖体であるキウイオノシドがたばこ新規の配糖体(図1)として、ベンジル-β-D-グルコシド及びベンジルアルコールニ糖配糖体2種、*m*-ヒドロキシフェネチル-β-D-グルコシドに関してはアグリコンとしては報告があるが配糖体としてはじめて単離された。既知のチコリン及びテルペン(イオン)系配糖体であるブルメノール A β-D-グルコシド(ロゼオシド)、5,6-エポキシ-5,6-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-β-イオニル-β-D-グルコシドについても単離されたが、ロゼオシドについては2種の異性体の存在が示唆された。

単離された配糖体の中で芳香族アルコール配糖体に関しては、たばこにおける香嗅味効果が不明であったため、香料を添加していない低タール・低ニコチンたばこへ添加して調べたところ、各配糖体とも黄色種たばこに特徴的なフレーバーを有し、喫煙時におけるたばこフレーバー生成の中で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これらの香嗅味効果として、シリンギル構造を有するものはたばこのインパクト、グアイアシル構造を有するものはバニラ様の甘臭味、フェノール(フェニル)構造を有するものはフローラルな甘臭味を付与する効果を有し、芳香環に付く置換基の位置によって香嗅味効果をおおまかに分類することができた。そこで、同様の官能基を有する化合物についても、その香嗅味効果を確認したところ、同様の香嗅味効果が得られた。

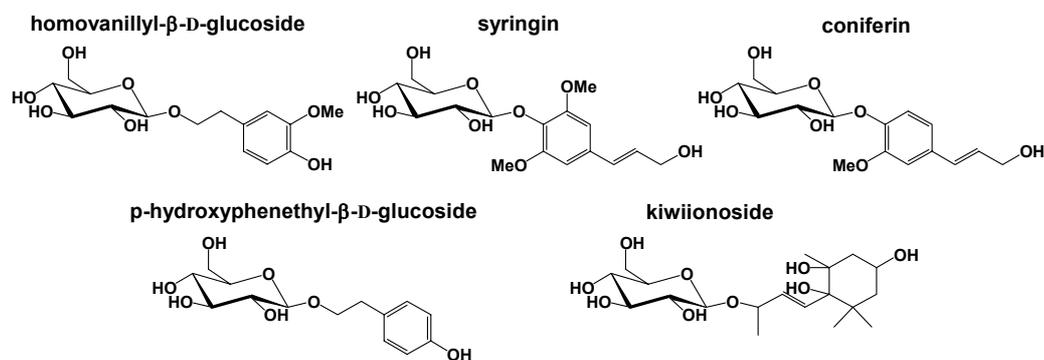


図1 黄色種葉たばこからはじめて単離された配糖体

第2章では、たばこ製造工程で起こりうる成分変化の1つとして非酵素的褐変反応に着目した。たばこ製造工程におけるこの反応の関与は幾つかの報文で指摘されているが、その詳細については明らかになっていない。また、非酵素的褐変反応に関する既往の研究の問題点として、(i)多数成分を定量的に扱う良い方法が無い、(ii)反応への pH の影響を pH 一定条件で調べたものがほとんど無い、(iii)マルトース等還元末端をもつ二糖・オリゴ糖の反応に関する情報が少ない、(iv)特徴的なフレーバーを有するピラジン類の比較的低温(100 °C以下)における生成を糖-アミノ酸モデルで調べたものが無い、等の問題点が挙げられる。そこで、まず非酵素的褐変反応で生成する高極性揮発性成分を一斉に定量する分析法を構築した。この分析法及び反応溶液の pH を一定に保つ装置を用いて、糖-アミノ酸水溶液加熱モデル反応で生成するフレーバー成分の糖種による差異及び pH 依存性を調べ、これら反応で生成する主要フレーバー成分の生成経路を推定した。

非酵素的褐変反応で生成する揮発性成分は、極性が高く容易に分解する性質を持つ成分を多数含み、微量の上、前処理の過程でさらに変化することが想定されたため、固相抽出(SPE)-ガスクロマトグラフィー(GCMS)法の適用を検討した。その結果、試料溶液の pH と内部標準物質の異なる3種の SPE 前処理と2種の GC 条件を用いるにより、代表的な非酵素的褐変反応生成物である有機酸・レダクトン・フラン・ピロール及びピラジン類がほぼ定量的に分析可能となり、糖-アミノ酸モデル反応生成物を定量的に取り扱うことができるようになった。また、有機酸・レダクトン・フラン類に関しては、アルコール飲料への適用も考慮し、エタノールの SPE 回収率への影響も調べ、分析する化合物によって回収率の低下の度合いは大きく異なるものの、適当な希釈によって分析可能であることが示された。

モデル系を用いた実験では、100 °C以下の温度条件下におけるマルトース(二糖)の反応を中心として、そのプロリン、グルタミンとの主要反応生成物を扱い、単糖と二糖の生成物の差異と化合物生成の pH 依存性に着目した。その際、反応液の急激な pH の低下の影響を防ぐため、滴定装置と pH 電極を組み合わせた反応中の pH を一定に保つ装置を用いて実験した。

マルトースのプロリン共存下及び非共存下における揮発性生成物の主な差異として、マルトールがプロリン共存下でのみ生成したのに対し、2-フランメタノールではプロリン共存下及び非共存下双方とも顕著に生成したことが挙げられる。そこでこれら揮発性生成物の pH 依存性について詳細に調べ、さらにメイラード反応の中間体であるプロリン-マルチュロース(アマドリ化合物)及びカラメル化反応中間体と考えられるマルチュロースを用いた同様のモデル系についても生成する揮発性成分を比較し、マルトールは既知のごとく主にメイラード反応を経由して生成するのにに対し、2-フランメタノールの生成では糖のカラメル化反応が大きく関与し、3-デオキシペンチュロースを経由して環化・脱水する経路が主要経路の1つであることが示唆された。また、2-フルフラールは3-デオキシペンチュロースを経由して、環化・脱水により生じると考えたが、Canizzaro型の反応を介した2-フルフラールの不均化による2-フランメタノールの生成経路は、本モデル反応条件下においては否定された(図2)。

一方、糖とグルタミンとの反応では、今まで報告の無い 100 °C 以下でのピラジン類の生成に着目し、揮発性反応生成物を分析した。その結果、フラクトース、グルコース、マルトースいずれの系においても、90 °C と比較的低温の条件下でアルキル・アセチル・ビスフリルピラジン類が他の揮発性成分（フラン・レダクトン類）と共に検出され、“煮る”“蒸す”といった調理条件下においても、特徴的なフレーバーを有するピラジン類が生成することが示された。

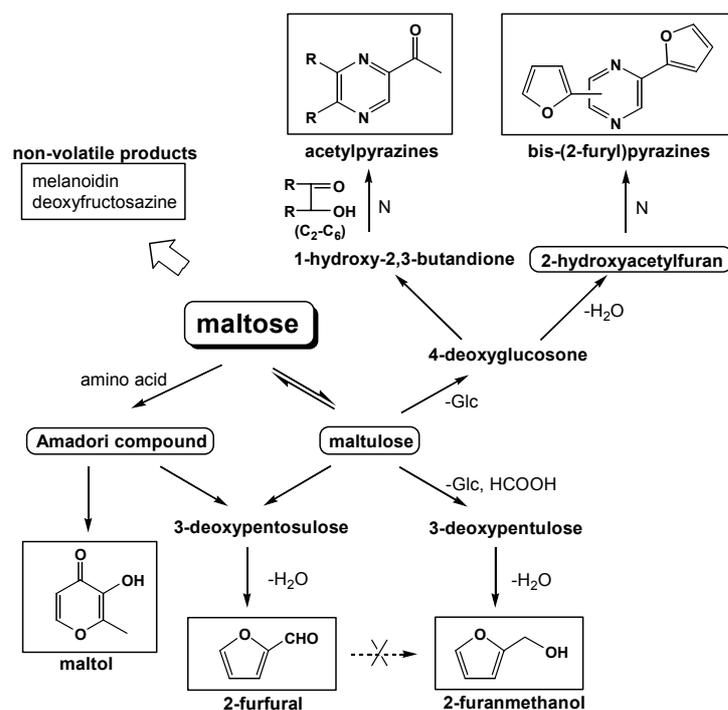


図2 マルトースの非酵素的褐変反応

pH 8 一定条件下の反応ではフラン・レダクトン類に較べピラジン類の生成が優勢となったが、単糖ではアルキルピラジン類、二糖ではアセチルピラジン類の生成が顕著となり、単糖と二糖で異なる生成パターンを示した。また、ピラジン類生成の pH 依存性を調べたところ、アルキル・アセチルピラジン類は中～弱塩基性側 (pH 7~8)、ビスフリルピラジン類では弱酸性側 (pH 4~6) で生成しやすい傾向にあった。マルトースの系で顕著に生成したアセチル/ビスフリルピラジン類の生成においては、糖の 4 位につく糖鎖の  $\beta$ -脱離、レトロアルドール反応の関与が示唆され、4-デオキシグルコソンを中間体とする経路を推定した(図2)。

今回取り扱った配糖体成分及び非酵素的褐変反応により生成する揮発性成分は、たばこに限らず多数の植物性食品・飲料中に存在しているものである。本研究では、これら成分の効果的な単離・精製法及び分析法を確立し、これを葉たばこ及び糖-アミノ酸モデル反応系に適用することで新たな知見を得た。ここで得られた知見及び新たに構築した方法は、たばこ香嗅味の理解に重要な情報となると共に、他の食品・香料分野の研究にも幅広く応用可能であると考えられる。