

[J. Ferment. Technol., Vol. 50, No. 7, p. 486~493, 1972]

ガスクロマトグラフィーによる 清酒の揮発性アミン類の分離

梅津 雅裕・柴田 彩

(鳥取大学工学部工業化学科)

Separation of the Volatile Amines in Sake by Gas Chromatography

Masahiro Umezu and Aya Shibata

(Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
Tottori University, Koyama, Tottori)

Optimum conditions for the separation and identification of the volatile amines in sake by gas chromatography were investigated.

About twenty amines were separated, using three types of column: 5% KOH-10% Silicone DC 710 on Chromosorb W; 5% KOH-5% tetrahydroxyethylethylenediamine-15% tetraethylenepentamine (TEP) on Chromosorb W; and 10% (TEP-1% KOH) on porapak-Q.

This method was applied to the separation of the amines in various kinds of sake, and ten volatile amines were identified; methylamine, ethylamine, *iso*-propylamine, *tert*-butylamine, *iso*-amylamine, *n*-butylamine, trimethylamine, dimethylamine, triethylamine, and *sec*-butylamine.

緒 言

著者らは今まで主としてペーパークロマトグラフィーを用いて、清酒の揮発性アミン類として、カダベリン、エタノールアミン、 β -フェニルエチルアミン、イソブチルアミン、イソアミルアミンを分離、検出した。¹⁾

しかし、ペーパークロマトグラフィーを用いた場合には、アンモニアのスポットに妨害され、アンモニアの R_f に近い揮発性アミン類の分離同定は困難であった。したがって、アンモニアを感じせず、かつ、検出感度の高い水素炎イオン化検出器を備えたガスクロマトグラフを用いて、清酒中の揮発性アミン類を分離同

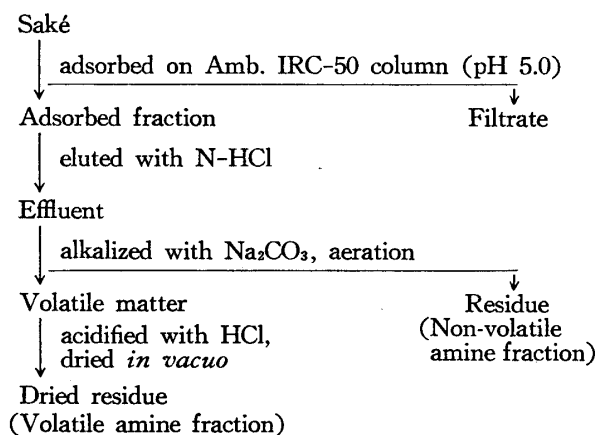
定することを試みた。

アミン類のガスクロマトグラフィーによる分離は非常に困難であることが、従来知られているが、James,^{2,3)} 吉川,⁴⁾ Sze,⁵⁾ Smith,⁶⁾ 雨宮,⁷⁾ 中尾⁸⁾ らの方法を検討して、tetraethylenepentamine, tetrahydroxyethylethylenediamine, Silicone DC-710 等を液相とした充填剤を用いて、ほぼ20種の標準低沸点アミン類を分離することができたので、この方法を清酒に適用し、清酒中より10種の揮発性アミン類を分離同定した。それらの結果をここに報告する。

実 験 方 法

1. 清酒中の揮発性アミン類の捕集

A. イオン交換樹脂による分離, 捕集 清酒アミンの分離方法を示すと Scheme 1 の通りである. すなわち Amberlite IRC-50 を内径 1 cm, 長さ 30 cm の吸着柱として, 2 N-NaOH 120 ml→蒸溜水 150 ml→N-acetate buffer (pH 5.0) 250 ml→蒸溜水 300 ml の順で, 流速 1~2 ml/min. で洗い活性化し, 清酒 300 ml を 1~2 ml/min. の速度で通して清酒中の有機塩基混合物を樹脂に吸着させる. これを蒸溜水 150 ml で洗い, つぎに N-HCl 120 ml を通して有機塩基混合物を溶出し, 蒸溜水 150 ml で洗い, この溶出液および洗液を合する. 合した溶出液および洗液を, 50 ml 程度に減圧濃縮し, 30% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ を添加してアルカリ性とし, 液温を $50 \pm 1^\circ\text{C}$ に保ち, 50 ml/min. の流速で 90 分間液内通気を行ない, その気流を 1/20 N-HCl 120 ml 中を通して, 揮発性アミン類を捕集した.



Scheme 1. The method for separation of amines in sake using an ion exchange column.

B. 減圧蒸溜による分離, 捕集 クライゼンフラスコに清酒 300 ml を入れ, 30% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶液を加えてアルカリ性にし, 液温を $40 \sim 50^\circ\text{C}$ に保ち, $40 \sim 70 \text{ mmHg}$ で 30 分間減圧蒸溜する. 溜出液を 1/20 N-HCl 120 ml で捕集した.

2. ガスクロマトグラフへの供試 A, B の方法で得られた揮発性有機塩基区分を含む 1/20 N-HCl をそれぞれ減圧乾固し, 乾固物をエタノールで溶解, 濾過して不溶物を除き, 再び減圧乾固して, 白色のアミン塩酸塩を得た. 得られたアミン塩酸塩の適当量を $3 \times 30 \text{ mm}$ の小試験管に移してシリコンゴム栓で密封し, マイクロシリンジを用いて $10 \sim 20 \mu\text{l}$ の 10 N-NaOH を注入して, アミン類を遊離させた. このさい, 氷冷してアミン類の揮発を防いだ. 遊離アミンを含む 10 N-NaOH 液 $2 \sim 6 \mu\text{l}$ をガスクロマトグラフ

に供試した.

3. 装置 および充填剤 島津 ガスクロマトグラフ GC-1C 型を用いた. 検出器は水素炎イオン化型と熱伝導度型の両者を用いた. カラムはアミン類と反応しないステンレス製を用いた. 固定相液体は Silicone DC-710 を主として tetraethylenepentamine (TEP), tetrahydroxyethylethylenediamine (THEED) の両者を混合したものを補助的に用いた. この両者の場合とも担体はアルカリ処理した Chromosorb W である. また, これら 2 種類の充填剤ではメチルアミンとジメチルアミンの分離ができなかったため, その分離を目的として Porapak-Q を担体として TEP を固定相とする充填剤を用いた.

4. 成分の同定 標準物質の保持時間をあらかじめ求め, 試料のピークと保持時間の一致する標準物質を試料中に加えて, ピークの変化の状態を見る添加法によって同定した. それぞれのアミンについてこれを 2 種類のカラムで行なった.

実験結果および考察

1. 充填剤の検討と決定 Table 1 の 6 種類の充填剤について標準アミン類のクロマトグラムを作成した. その保持時間を Table 2 に, 操作条件を Table 3 に示す.

Table 1. Column Packing.

No.	Column Packing
1	5% KOH-5% THEED ^{a)} -15% TEP ^{b)} on Chromosorb W
2	5% THEED-15% TEP on Chromosorb W
3	5% KOH-15% Diglycerol-5% TEP on Chromosorb W
4	15% Diglycerol-5% TEP on Chromosorb W
5	5% KOH-10% Carbowax 400 on Chromosorb W
6	5% KOH-10% Silicone DC-710 on Chromosorb W

%: wt% on Chromosorb W 60~80 mesh.

^{a)} THEED, tetrahydroxyethylethylenediamine.

^{b)} TEP, tetraethylenepentamine.

Table 3 の Condition I, II, III, IV, V, VI における標準アミン類のクロマトグラムの *n*- および *iso*-alkyl amine の炭素数と保持容量の関係を Figs. 1, 2, 3, 4, 5, 6 に示した.

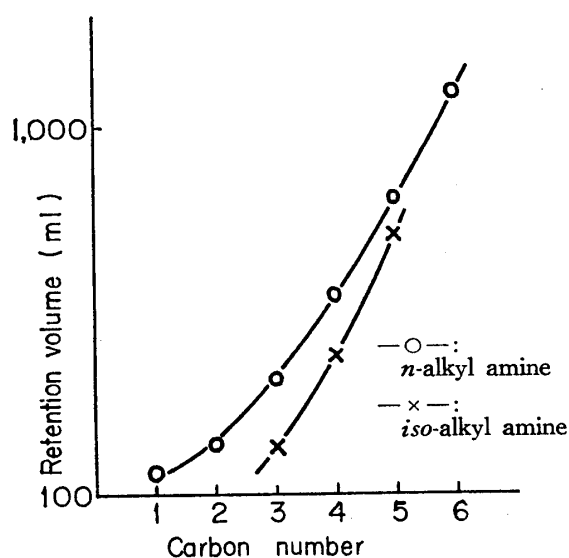
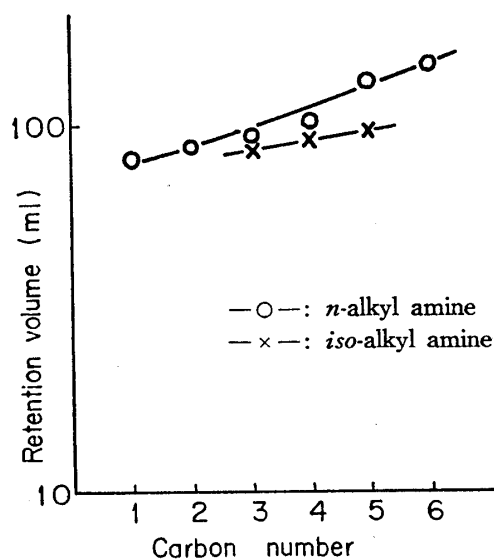
Table 2. Retention time of amines.

Amine \ Condition*	I	II	III	IV	V	VI
Ammonia	1.6	1.6	1.9	3.15	1.9	2.0
Trimethylamine	1.6	1.4	1.4	1.9	1.85	2.3
Dimethylamine	1.9	1.4	2.1	3.3	2.8	2.4
Methylamine	1.9	1.4	2.1	3.3	2.8	2.4
Triethylamine	2.3	1.55	1.45	2.1	2.3	2.9
Diethylamine	2.5	1.6	1.8	3.3	2.5	3.9
Ethylamine	2.3	1.45	2.45	4.5	3.6	2.9
<i>iso</i> -Propylamine	2.3	1.45	1.8	4.1	2.65	2.9
<i>tert</i> -Butylamine	2.3	1.45	1.65	3.3	2.25	2.9
<i>iso</i> -Butylamine	4.05	1.55	2.5	5.6	5.7	4.6
<i>iso</i> -Amylamine	8.55	1.6	3.6	9.5	11.2	8.65
<i>n</i> -Propylamine	3.48	1.55	2.9	5.6	5.1	3.65
<i>n</i> -Butylamine	5.9	1.7	3.6	8.1	8.0	5.8
<i>sec</i> -Butylamine	3.4	1.5	2.1	4.95	3.45	4.3
<i>n</i> -Amylamine	11.0	2.15	4.05	11.6	11.7	11.8
<i>n</i> -Hexylamine	20.4	2.4	5.1	16.85	19.7	25.05

* Shown in Table 3.

Table 3. Conditions for the gas chromatographic separation of amines.

Condition	I	II	III	IV	V	VI
Column packing No.	1	2	3	4	5	6
Column dimension	3mm×4.5m	3mm×4.5m	3mm×4.5m	3mm×4.5m	3mm×4.5m	3mm×4.5m
Column temperature	63°C	61°C	99°C	75°C	95°C	65°C
Detector temperature	98°C	148°C	148°C	119°C	148°C	108°C
Injection temperature	150°C	248°C	250°C	240°C	249°C	248°C
Carrier gas flow rate	60 ml/min	60 ml/min	60 ml/min	60 ml/min	60 ml/min	60 ml/min
Carrier gas	He	He	He	He	He	He
Detector	T.C.D.	T.C.D.	T.C.D.	T.C.D.	T.C.D.	T.C.D.

Fig. 1. Gas chromatographic data for *n*- and *iso*-alkyl amines. (Condition I)Fig. 2. Gas chromatographic data for *n*- and *iso*-alkyl amines. (Condition II)

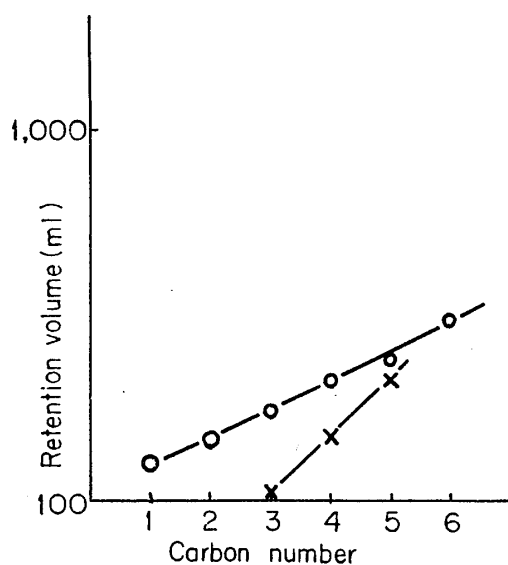


Fig. 3. Gas chromatographic data for *n*- and *iso*-alkyl amines.

(Condition III) —○—: *n*-alkyl amine
—×—: *iso*-alkyl amine

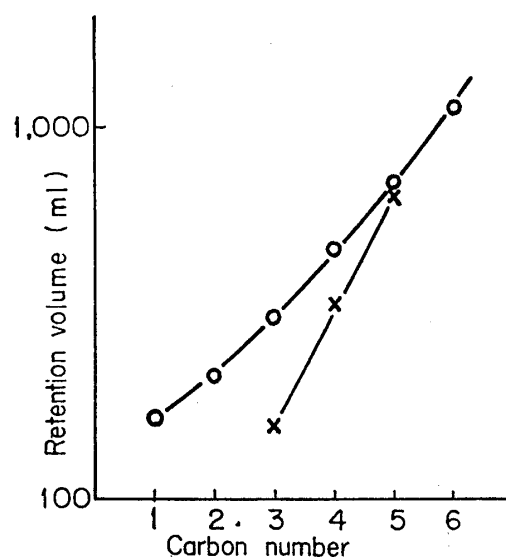


Fig. 5. Gas chromatographic data for *n*- and *iso*-alkyl amines.

(Condition V) —○—: *n*-alkyl amine
—×—: *iso*-alkyl amine

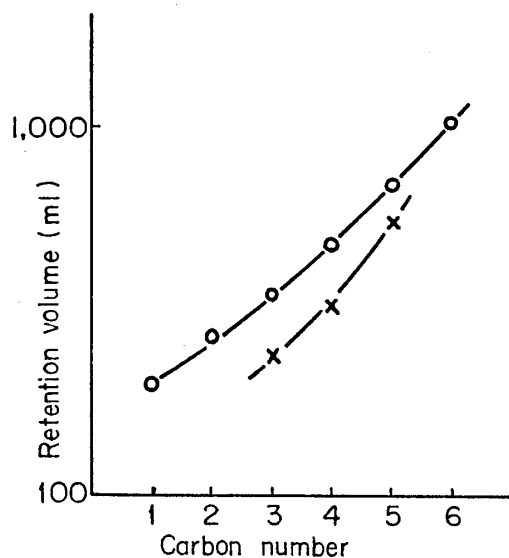


Fig. 4. Gas chromatographic data for *n*- and *iso*-alkyl amines.

(Condition IV) —○—: *n*-alkyl amine
—×—: *iso*-alkyl amine

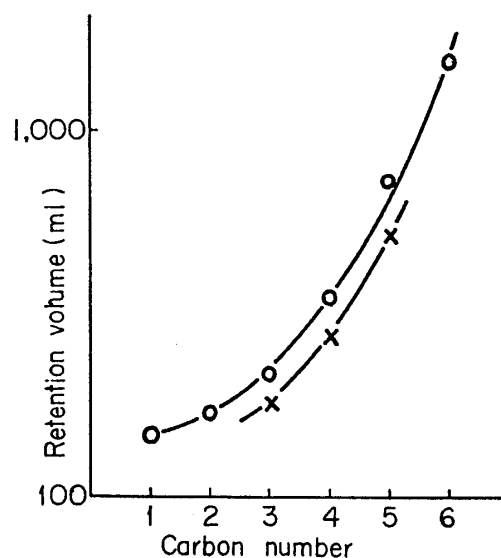


Fig. 6. Gas chromatographic data for *n*- and *iso*-alkyl amines.

(Condition VI) —○—: *n*-alkyl amine
—×—: *iso*-alkyl amine

これらの結果について検討すると、Fig. 2 および 3 では、炭素数の増大による保持容量の増大の量が少なく、充填剤 2 と 3 は分離が良好ではない。また、充填剤 3 を用いた場合、カラム温度が低いと、やや高い沸点のアミン類において、著しいテーリングが見られた。Figs. 1, 4, 5, 6 では炭素数の増加とともに保持容量の顕著な増大が見られ、充填剤 1, 4, 5, 6 は分離が良好であると思われる。そこでこの 4 種類の充填剤に

ついてさらに検討したところ、充填剤 1 は低沸点の揮発性アミン類についてピークの重なりが見られたが、やや沸点の高いアミン類の分離は良好であった。充填剤 4 は充填剤 1 とほぼ同様な分離状態を示すが、カラム温度が低い場合の保持時間が比較的長かった。

充填剤 5 を用いて得られるピークはテーリングが強く見られた。充填剤 6 を用いたクロマトグラムは、保持時間の幅が広く分離は良好であり、それぞれのピー

幅は狭く鋭敏なピークが得られる。しかし、この充填剤は他の5種類に比べて寿命が短く、また、検出器を汚染しやすいという欠点がある。

以上の結果から、清酒中の揮発性アミン類の分離には、充填剤1 (5% KOH-5% THEED-15% TEP on Chromosorb W) および 充填剤6 (5% KOH-10% Silicone DC-710) の2種類を用いることにした。

2. 操作条件 Table 4 に示す操作条件を採択した。充填剤の決定のさいにはカラム長さを4.5mとし、カラム温度を40℃から100℃までの範囲で変化させて保持時間の増減、ピークの形状を観察した。カラム長さが4.5mの場合には、温度を下げてもクロマトグラムのピークが重なりあって完全に分離したピークを得ることは困難であった。また、温度を下げることで、試料に対する感度の低下が見られた。

Table 4. Conditions for the gas chromatographic separation of amines.

Condition	I	II
Column packing	5% KOH-10% Silicone DC-710 on Chromosorb W	5% KOH-5% THEED-5% TEP on Chromosorb W
Column dimension	3 mm×9 m	3 mm×9 m
Detector	F.I.D.	F.I.D.
H ₂	60 ml/min	60 ml/min
Air pressure	1 kg/cm ²	1 kg/cm ²
Carrier gas	N ₂	N ₂
Flow rate	30 ml/min	30 ml/min
Temperature		
Column	80℃	80℃
Detector	230℃	230℃
Injection	140℃	140℃

これらのことから、標準アミン類および清酒試料のクロマトグラム作成のさいには、カラム長さを2倍の9mとした。この場合、カラム温度が50℃以下になると、試料がカラム内に吸着残留してピークを得ることができなかった。また120℃以上になると水による影響があらわれ、また、保持時間の短縮によりピークの間隔が狭くなって分離が悪くなった。

それらの条件を考慮して、比較的良好な分離および分析時間が得られるカラム温度として、80℃を採用した。カラム長さ9m、カラム温度80℃で得られるクロマトグラムは、カラム長さ4.5m、カラム温度50℃の場合とピークの重なり状態は大差ないが、分析時間はやや短い。また、やや沸点の高いアミン類につい

ては感度が良い。

アンモニアおよび水に対する感度の点と、清酒試料のアミン含有量が微量であることから、標準アミン類のクロマトグラム、および清酒試料のクロマトグラム作成のさいには、水素炎イオン化検出器を用いた。

3. 標準アミン類クロマトグラム 標準試料としては市販の一級アミン塩酸塩を用いた。単品のみをNaOH液で中和してガスクロマトグラフに供試した場合に、単一のピークが得られるまで再結晶をくりかえして精製した。遊離アミンは塩酸を加えて塩酸塩とし、同様に精製して用いた。

これらの標準アミン類の保持時間をTable 5に、クロマトグラムをFigs. 7, 8に示す。

Table 5. Retention time of the volatile amines.

Peak No.	Condition* Amine	I	II
1	Trimethylamine	4.14	6.84
2	Dimethylamine	4.27	6.29
3	Methylamine	4.27	6.29
4	Triethylamine	7.89	8.10
5	Diethylamine	5.77	8.69
6	Ethylamine	4.45	8.10
7	<i>iso</i> -Propylamine	4.74	8.10
8	<i>tert</i> -Butylamine	4.98	8.10
9	<i>iso</i> -Butylamine	6.88	14.25
10	<i>iso</i> -Amylamine	11.10	27.04
11	<i>n</i> -Propylamine	4.98	11.73
12	<i>n</i> -Butylamine	8.11	19.46
13	<i>sec</i> -Butylamine	6.42	12.28
14	<i>n</i> -Amylamine	13.55	33.85

* Shown in Table 4.

4. メチルアミンとジメチルアミンの分離 Figs. 7, 8で見られるように、この二種類のカラムでは、メチルアミンとジメチルアミンとを分離することはできなかった。そこで、中尾ら⁹⁾の方法により担体に Porapak-Qを用いた充填剤によるメチルアミンとジメチルアミンの分離を試みた。その結果をFig. 9に、操作条件をTable 6に示す。この充填剤では分子量の大きいアミン類の保持時間が非常に長く、Table 6の条件で12分以内にピークがあらわれたのは、メチルアミン、ジメチルアミン、エチルアミン、トリメチルアミンのみであった。これはメチルアミンとジメチルアミンとの分離の点では好都合であるが、清酒試料を供試した場合、分析に長時間を要した。そこで、試料を注入し必要なクロマトグラムを得た後、カラム温度を

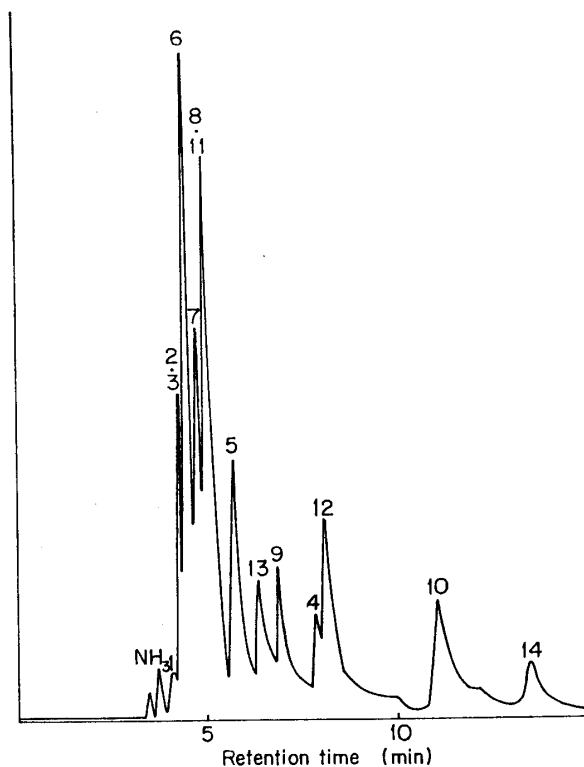


Fig. 7. Gas chromatogram of amines.
(Condition I)

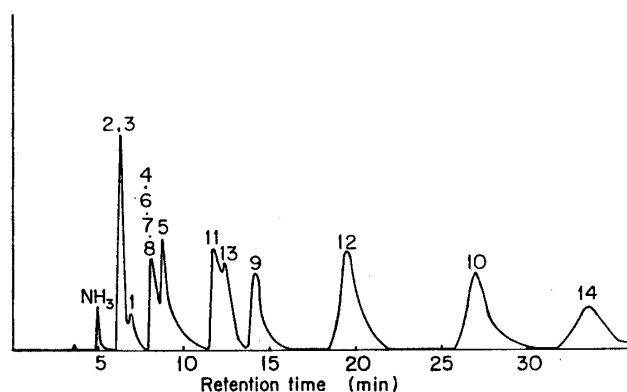


Fig. 8. Gas chromatogram of amines.
(Condition II)

125°C まで上げ、10 N-NaOH 液を数回注入して残留アミン類を追いつき、再びカラム温度を 80°C とし、つぎの試料を注入した。この結果、使用した三種類の市販清酒のいずれにもメチルアミンの存在が同定され、またジメチルアミンは二種類の清酒について存在が同定された。そのクロマトグラムの 1 例を Fig. 10 に示す。

5. 清酒中に含有される揮発性アミン類の分離、同定
試験酒は市販二級酒を使用した。三種類の清酒について、それぞれイオン交換法、減圧蒸溜法の二通りの

Table 6. Condition for gas chromatographic separation of methylamine from dimethylamine.

Column packing	10% (TEP-1% KOH) on Porapak-Q
Column dimension	3 mm × 2.25 m
Detector	F.I.D.
H ₂	60 ml/min
Air pressure	1 kg/cm ²
Carrier gas	N ₂
Flow rate	50 ml/min
Temperature	
Column	80°C
Detector	200°C
Injection	180°C

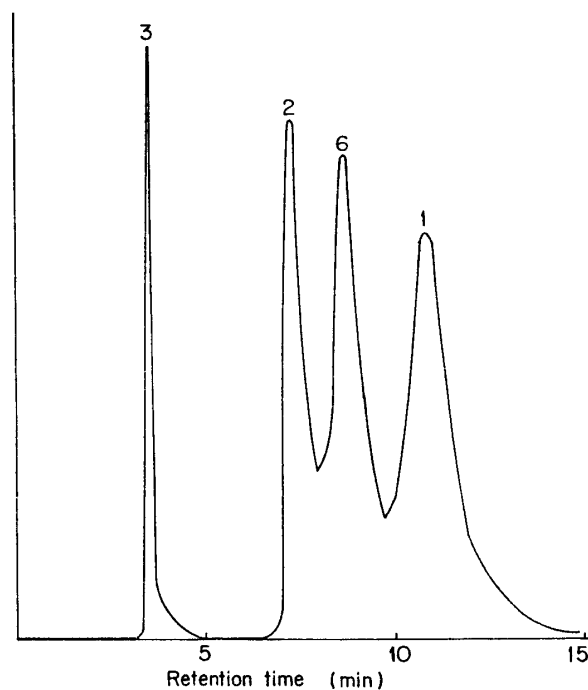


Fig. 9. Gas chromatogram of a mixture of methylamine (3), dimethylamine (2), ethylamine (6), and trimethylamine (1).
(10% (1% KOH-TEP)/Porapak-Q)

方法で捕集した試料をガスクロマトグラフに供試した。得られたクロマトグラムの例を Figs. 11, 12, 13 に示す。それぞれのピークについて二種類のカラムを用いて添加法で同定し、さらにメチルアミンとジメチルアミンについては、10% (1% KOH-TEP)/Porapak-Q を用いて、分離、同定した。その結果を Table 7 に示す。

これらの結果、三種類の市販酒には、常にメチルア

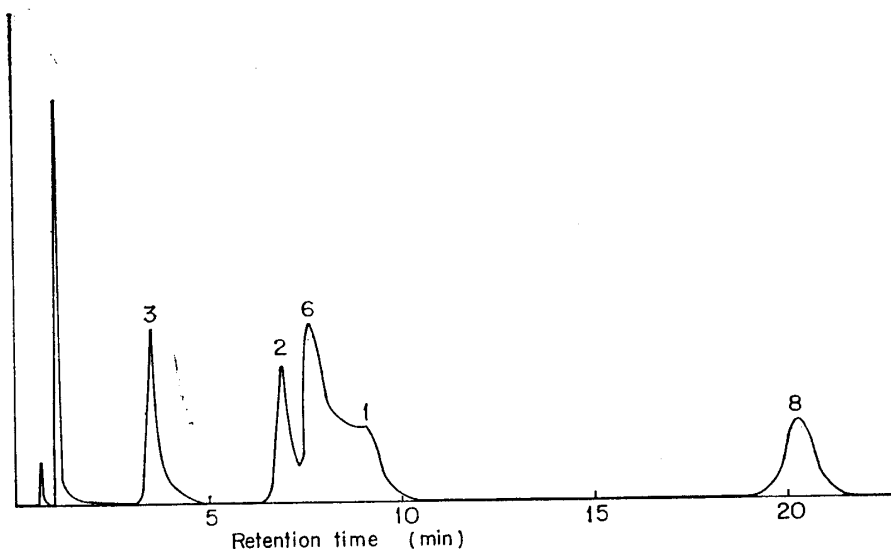


Fig. 10. Gas chromatogram of the methylamine and dimethylamine in sake B. (10% (1% KOH-TEP)/Porapak-Q)

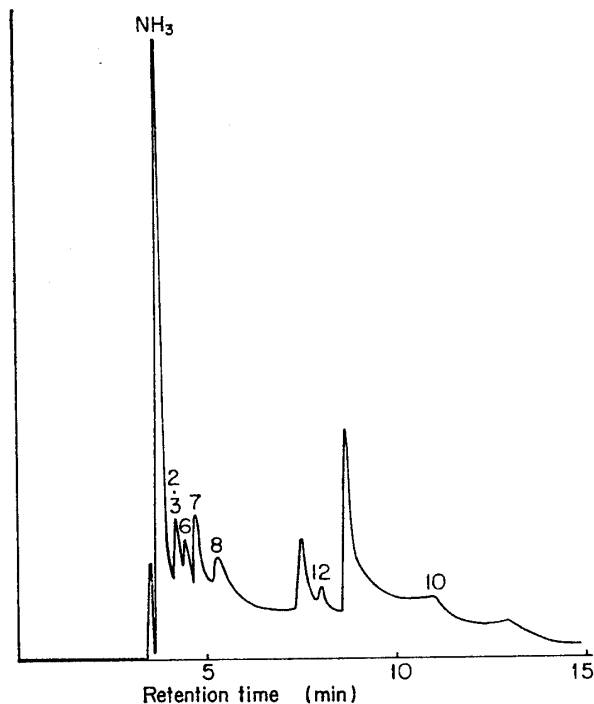


Fig. 11. Gas chromatogram of volatile amines in sake A. (Condition I)

ミン, エチルアミン, イソプロピルアミン, *tert*-ブチルアミン, イソアミルアミンが存在し, 一部の試料をのぞいてトリエチルアミン, *n*-ブチルアミンの存在も見られた。また, イオン交換法で捕集した3試料のうち, 2試料に, ジメチルアミンの存在が見られ, 他の1試料にトリメチルアミンと *sec*-ブチルアミンの存在が見られた。これらのアミンのうち, イソアミルアミンを

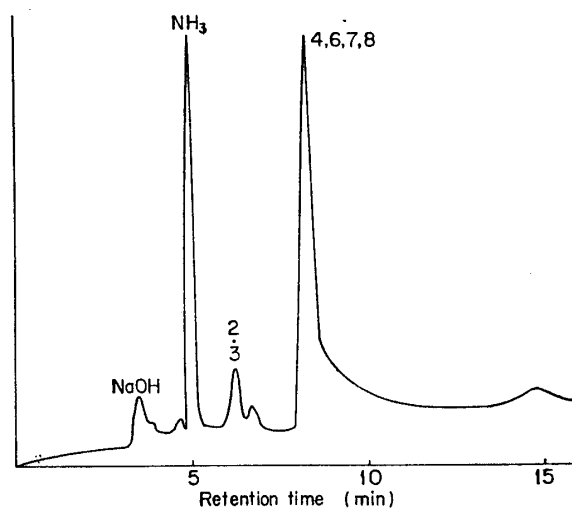


Fig. 12. Gas chromatogram of the volatile amines in sake A. (Condition II)

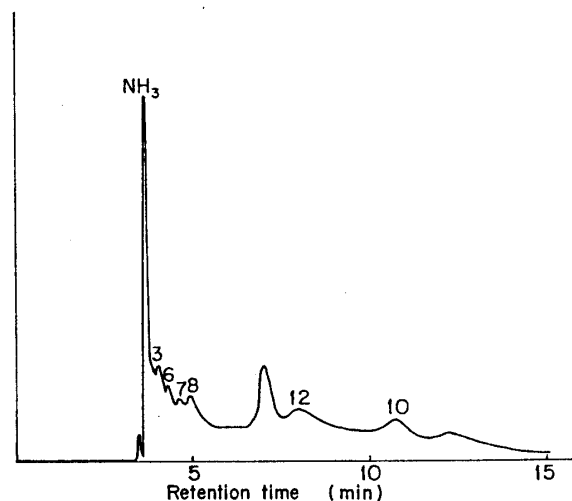


Fig. 13. Gas chromatogram of the volatile amines in sake C. (Condition I)

Table 7. The volatile amines in sake.

Sake Amine	A		B		C	
	Ion exchange	Vacuum distillation	Ion exchange	Vacuum distillation	Ion exchange	Vacuum distillation
Ammonia	○	○	○	○	○	○
Trimethylamine			○			
Dimethylamine	○		○			
Methylamine	○	○	○	○	○	○
Triethylamine		○	○		○	
Ethylamine	○	○	○	○	○	○
<i>iso</i> -Propylamine	○	○	○	○	○	○
<i>tert</i> -Butylamine	○	○	○	○	○	○
<i>iso</i> -Amylamine	○	○	○	○	○	○
<i>n</i> -Butylamine	○	○	○	○		○
<i>sec</i> -Butylamine			○			

のぞくものは清酒中に新しく検出されたアミン類である。

要 約

ガスクロマトグラフィーにより清酒中に存在する揮発性アミン類を分離、同定する意図のもとに、その操作条件および充填剤について検討し、5% KOH-10% Silicone DC-710/Chromosorb W, 5% KOH-5% TH EED-15% TEP/Chromosorb W および 10% (1% KOH-TEP)/Porapak-Q の三種類の充填剤を用いることにより、約20種類の揮発性アミン類の分離が可能なることを認めたので、本法を清酒に適用し、メチルアミン、エチルアミン、イソプロピルアミン、*tert*-ブチルアミン、イソアミルアミン、*n*-ブチルアミン、トリメチルアミン、ジメチルアミン、トリエチルアミン、*sec*-ブチルアミンを分離同定した。

終に臨み、本実験に御助力を頂いた本州化学北尾孝則氏、大日本塗料早川守男氏、本学来海寿己氏に深く感謝します。

文 献

- 1) 梅津：本誌, **39**, 233 (1961).
- 2) James, A. T., Martin, A. J. P., Smith, G. H.: *Biochem. J.*, **52**, 238 (1952).
- 3) James, A. T.: *Biochem. J.*, **52**, 242 (1952).
- 4) 吉川, 近藤, 山田, 寺本：本誌, **41**, 363 (1963).
- 5) Sze, Y. L., Bork, M. L.: *Anal. Chem.*, **35**, 240 (1963).
- 6) Smith, E. D., Radford, R. D.: *Anal. Chem.*, **33**, 1160 (1961).
- 7) 雨宮：ガスクロマトグラフィー, 75, 共立出版, 東京 (1958).
- 8) 中尾, 早川, 茂呂, 御法川：アンモニアおよびメチルアミン類のガスクロマトグラフィー, 日本化学会における講演 (1969).

(昭47.3.28 受付)