

Gas Liquid Chromatography による魚肉腐敗 生産物中のアミン類の分離

佐藤美和・伊藤啓二・松本文夫
(広島大学水畜産学部水産学科)

Separation of Lower Aliphatic Amines Present in the Spoilt Fish Meat by Gas Liquid Chromatography.

Yoshikazu SATO, Keiji ITO & Fumio MATSUMOTO

*Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University, Fukuyama*

(Text-fig. 1-5; Tables. 1-2)

緒 言

魚肉あるいは魚肉加工品はその腐敗生産物中にアミン類を生成し、食中毒の一因となることが知られている。これらのアミン類の確認、定量を行なうことができれば魚肉の腐敗進行状態を推測し得、その取扱いを合理的に行い得るものと考え、しかしながら現在アミン類の定量は一般には揮撥性アミンとして一括測定するか、もしくはその分離定量は甚だ複雑な方法によらなければならない。よってその手段として Gas-Liquid Chromatography (G. L. C.) が採用できれば、短時間に比較的簡便に測定出来るのではないかと考え、先づ低沸点アミン類の分離について検討してみた。

現在までに G. L. C. による脂肪族アミン類分離の報告は、JAMES, A. T. ら^{1), 2)} によって G. L. C. の開発が行なわれた当初に、固定相液体として Paraffin wax, Lubrol MO を用いて脂肪族アミンの分離が試みられて以来 AMELL, A. R. ら³⁾, SMITH, E. D. ら⁴⁾, その他多くの報告^{5), 6), 7), 8)} が見られるが、第一級、第二級、第三級アミンでは活性水素の数が異なるため、水素結合を形成し得るような固定相液体を用い親和性の著しい差を利用して比較的容易に分離出来るものとされる。しかし種々のアミン混合物をテーリングを起こさず、定量的に分離することは困難であるという。

最近、SZE, Y. L. ら⁹⁾ は固定相液体として tetrahydroxyethylethylenediamine および tetraethylenepentamine を用い低級脂肪族アミンについて比較的効果のある分離を行なっているが、著者らは現在市販されている充填剤を用いて、魚肉腐敗生産物中に存在しやすいと考えられるアンモニア、メチルアミン類、エチルアミン類をほぼ完全に分離することができたのでここに報告する。対象としたアミン類は B. p. 100°C 以下の低沸点のメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、n-プロピルアミン、イソプロピルアミン、n-ブチルアミン、イソブチルアミンおよびアンモニアであって、先づこれらを比較的明確に分離する充填剤を探がし、次いでそのカラム温度およびキャリアーガス流速の適度を求め、終りにその条件でフィッシュソルブル中のアミンの測定を試みた。

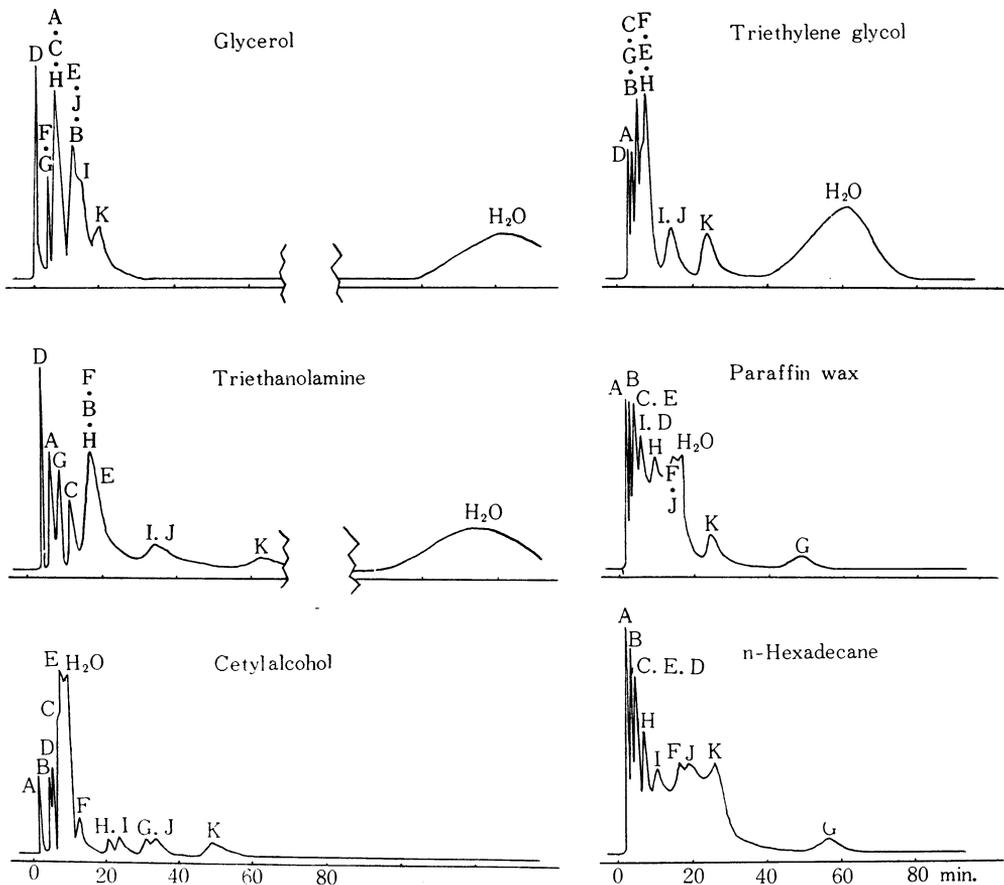
実 験 の 部

1. 装置および標品 装置：柳本製 GCG-2 型を使用、カラム直径 4 mm、キャリアーガスはヘリウム、測定条件は特記しない限り、検知器のブリッジ電流 150mA、記録計の感度は 16mV。

標品：市販一級品を試料としたが、アンモニアは28%水溶液、メチルアミン、ジメチルアミンは40%水溶液、エチルアミンは70%水溶液であった。

2. 固定相液体の探査 カラムの固定相液体として n-Hexadecane, Paraffin wax, Triethylen glycol, Cetylalcohol, Glycerol, Triethanolamine の6種を用い、固定相担体としては Triethanolamine には Shimalite Dを、他の固定相液体には Celite 545を、何れも 80~100mesh のものを使用した。又固定相担体に対する液体の割合は Triethanolamine のみ 25%、他のものは 30%のものを使用した。

カラム温度 80°C, カラムの長さ 2 m, キャリヤーガス流速を n-Hexadecane, Paraffin wax, Triethylen glycol では 10ml/min., Cetylalcohol, Glycerol, Triethanolamine では 20ml/min. として試料アミン類を分離した結果は Text-fig. 1. の通りである。またこれら 6種類の固定相液体に対する保持時間をカラム温度80°C, カラムの長さ 2 m, キャリヤーガス流速 20ml/min. で測定した結果は Table 1. のようになる。



Text-fig. 1. Separation of ammonia and ten lower aliphatic amines.

- | | |
|--------------------|---------------------|
| A : ammonia | G : triethylamine |
| B : methylamine | H : iso-propylamine |
| C : dimethylamine | I : n-propylamine |
| D : trimethylamine | J : iso-buthylamine |
| E : ethylamine | K : n-buthylamine |
| F : diethylamine | |

Table 1. Retention times of ammonia and lower aliphatic amines.

	minutes.					
	n-Hexa- decane	Triethylen- glycol	Paraffinwax	Cetylalcohol	Glycerol	Triethanol- amine
ammonia	1.1	2.5	1.0	1.9	9.3	4.6
methylamine	1.6	4.6	1.4	4.5	17.0	12.6
dimethylamine	2.2	4.0	1.8	6.6	9.3	9.0
trimethylamine	3.0	2.1	2.4	5.3	2.5	3.0
ethylamine	2.3	5.5	1.9	8.5	15.2	14.0
diethylamine	10.4	5.7	7.2	12.5	8.6	12.0
triethylamine	33.0	3.8	28.0	29.3	8.0	6.0
iso-propylamine	3.9	5.5	4.5	18.6	9.5	12.6
n-propylamine	5.7	10.0	2.3	23.5	18.5	20.8
iso-butylamine	11.0	11.5	9.2	33.3	15.2	23.4
n-butylamine	16.2	19.8	14.6	47.3	24.0	40.4

この図、表に明らかなように n-Hexadecane, Paraffin wax, Triethylen glycol, Cetylalcohol のような極性が無いか、もしくは比較的弱い固定相液体では、アミン類の全てのピークが意外に早く現はれ、又水の流出速度も早いのでそのピークと重なることが多い。Glycerol, Triethanolamine のような極性の強いものでは、水のピークはおくれて現われ、アミン類に重なることはない。

脂肪族アミン類の定量の難点とされているテーリングは n-Hexadecane, Paraffin wax, Cetylalcohol, Glycerol にその傾向が強くみられる。

上記カラム充填剤中、可能性の大きいと考えられる Cetylalcohol, Glycerol, Triethanolamine について Table 2. の 10 通りの組合せを作り比較検討した。

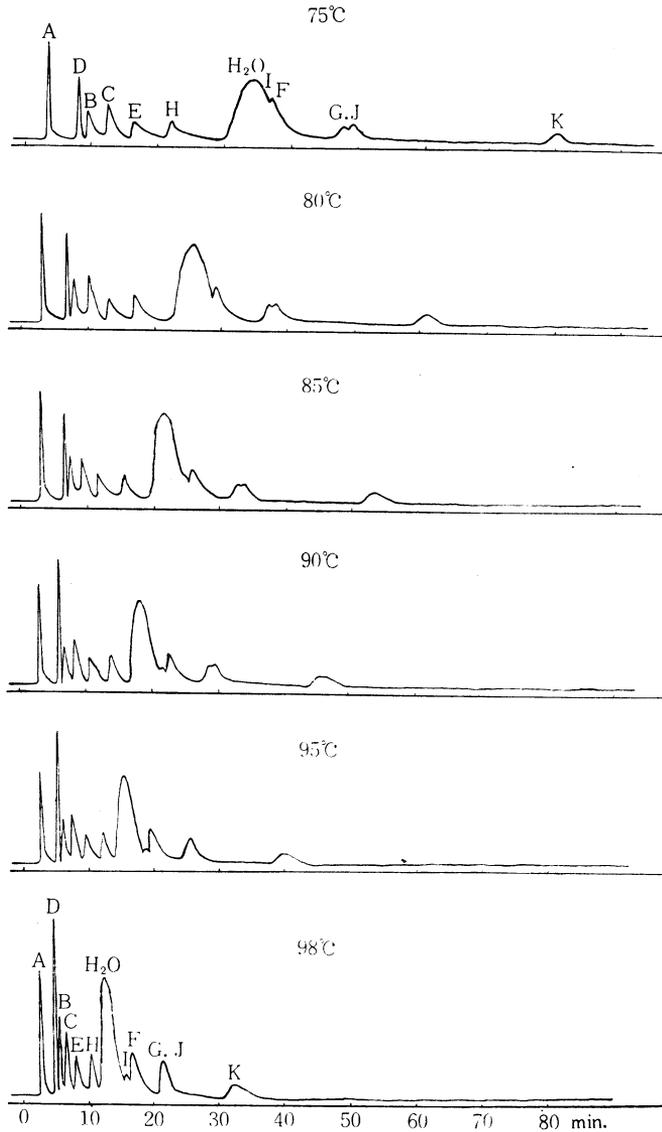
Table 2. Combination of the liquid phase of column.

Column	Liquid phase and length	
1	Glycerol 1m	Cetylalcohol 2m
2	Glycerol 2m	Cetylalcohol 2m
3	Glycerol 2m	Cetylalcohol 1m
4	Glycerol 3m	Cetylalcohol 2m
5	Glycerol 2m	Triethanolamine 2m
6	Triethanolamine 2m	Cetylalcohol 1m
7	Triethanolamine 2m	Cetylalcohol 2m
8	Triethanolamine 1m	Cetylalcohol 2m
9	Triethanolamine 1m	Cetylalcohol 3m
10	Triethanolamine 1m	Cetylalcohol 4m

これらのうち、(4), (10) が比較的良好に分離できることを認めたが、中でも (10) の Triethanolamine 1m に Cetylalcohol 4m を直列につないだものが最も効果的でアンモニアと低級脂肪族アミン類を一応分離することができた。よって、次にこの組合せによるカラムについてカラム温度およびキャリアーガス流速の適度を定める。

3. カラム温度、およびキャリアーガス流速の決定 キャリアーガス流速 30ml/min. カラム温度 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 98°C に設定して分離能を比較した。この場合固定相液体

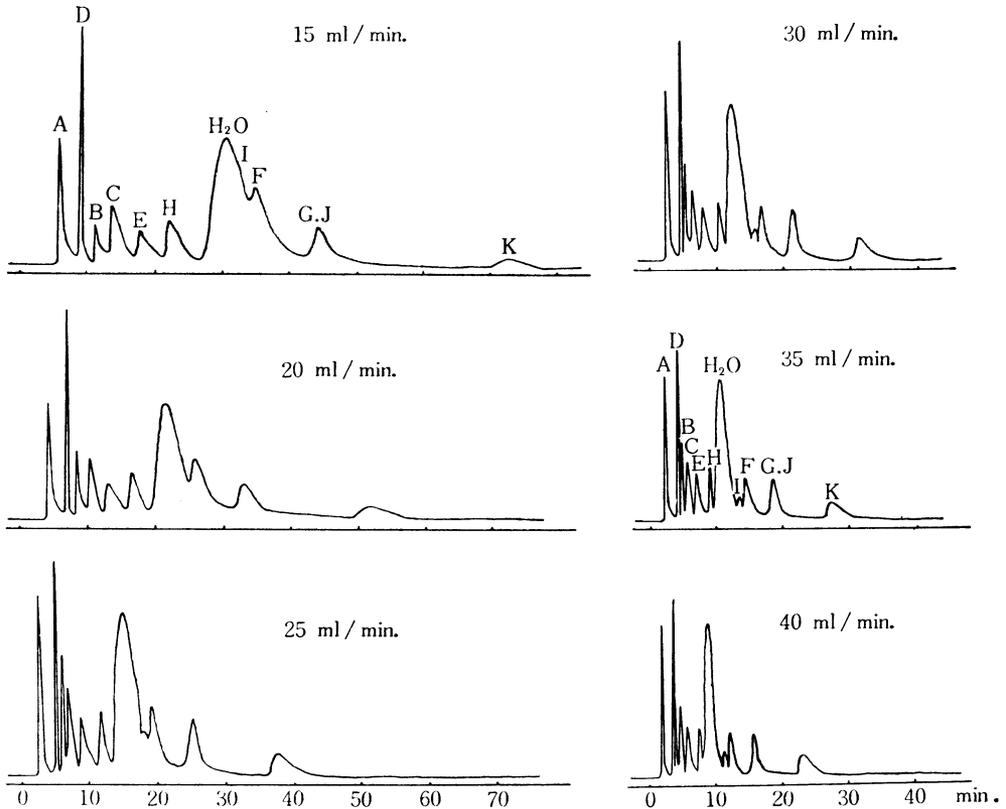
Triethanolamine の使用最高温度が 100°C であるため温度設定は 98°C までとした。その結果は Text-fig. 2. に示した。



Text-fig. 2. Effect of separation by the different column temperature.

カラム温度の低い条件の方が明確に分離できるように見えるが、テーリングの度合の大きいこと、ジエチルアミンと水、トリエチルアミンとイソブチルアミンの分離がはつきりしないから最もピークがシャープに現われ、しかも分離も比較的的良好であり、また 95°C 以上の温度条件になれば *n*-プロピルアミンの存在も確認できるのでカラム温度は 98°C を適当と考えた。

次にカラム温度 98°C 、キャリアーガス流速 $15\text{ml}/\text{min.}$, $20\text{ml}/\text{min.}$, $25\text{ml}/\text{min.}$, $30\text{ml}/\text{min.}$, $35\text{ml}/\text{min.}$, $40\text{ml}/\text{min.}$ に設定して分離能を比較した。その結果は Text-fig. 3. に示した。



Text-fig. 3. Effect of separation by the different flow rate of carrier gas.

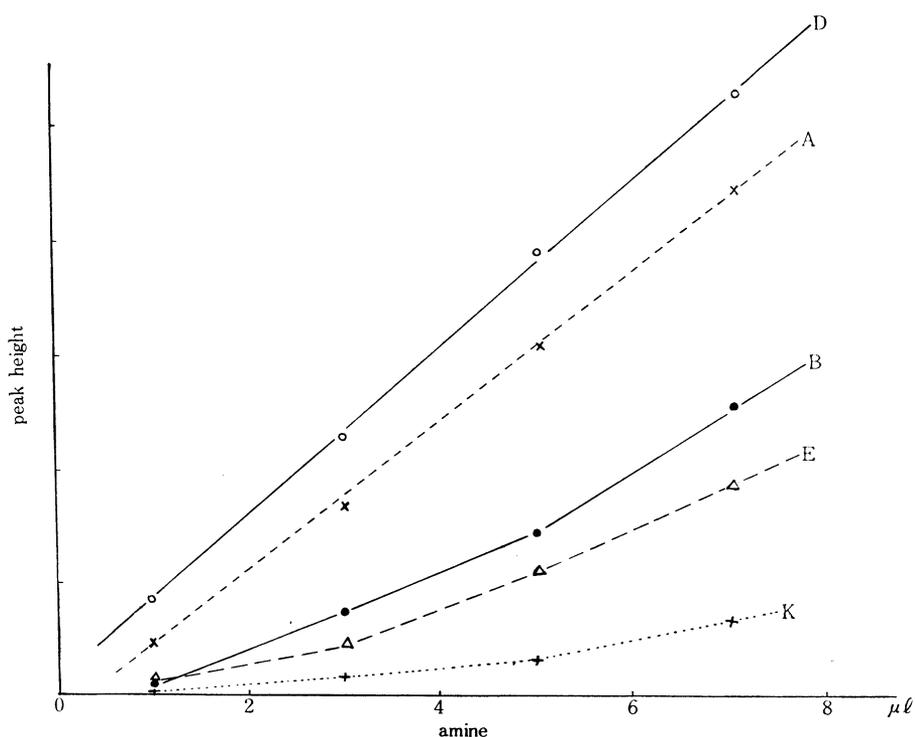
キャリアーガス流速 40 ml/min . になるとピークがシャープに現われ、また測定の迅速化という面からも好ましいように見えるが、メチルアミンとジメチルアミンとの分離が不完全である。 20 ml/min . 以下の流速ではジエチルアミンと水、トリエチルアミンとイソブチルアミンとの分離が明確でない。従って、 25 ml/min . ~ 35 ml/min . 流速が使用可能範囲と考えられるが、この後の実験には 30 ml/min . を採用した。

適度と考えられる条件、即ちカラム温度 98°C .、キャリアーガス流速 30 ml/min . においてどの程度定量的に現われるものかを見るため、アンモニア及びアミン量と波高の関係を検量線にえがいて Text-fig. 4. に示した。

図に明らかなように比較的ピークのシャープに現われ、テーリングの度合の少ないアンモニアとトリメチルアミンでは採取量と波高は一応比例の関係にあるとみられるが、テーリングの度合の大きいその他のアミンではやや曲線を示し正比例的な関係とみることはできない。従って、全般について波高をそのまま定量と結びつけることは無理であるが、それぞれのアミンとアンモニアを確認し、およその相対的な量を知ることはできるものと考え。

脂肪族アミン類の G. L. C. においてはテーリングの傾向が大であることが知られているが¹⁰⁾¹¹⁾、上述のように本実験でもこの傾向があらわれているものであって、今後定量法として G. L. C. を利用するためにはテーリングの解消が最も重要な問題である。

テーリング現象の起る原因の一つとして固定相担体の吸着性があげられ、これには物理的な担体の表面構造によるものと化学的な吸着性夾雑物、例えば結晶水やアルミナ質等によるものが考えられるが、



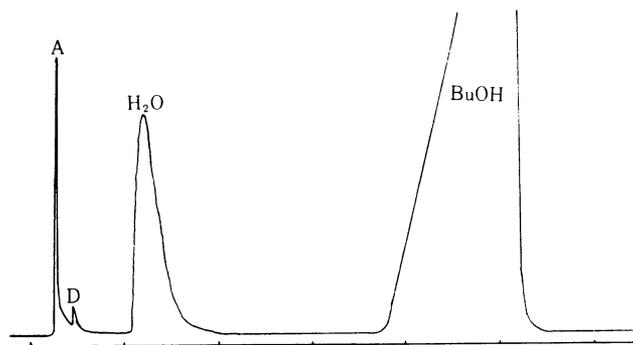
Text-fig. 4. Calibration curve for the estimation of ammonia and aliphatic amines.

アミン類の親水性であることから化学的原因が大きいと思われる。従って今後固定相担体のアルカリ処理だとか、キャリアーガス中に極性化合物を混ざる等の方法によりできるだけテーリングの解消をはかり定量的方法にまで進めるつもりである。

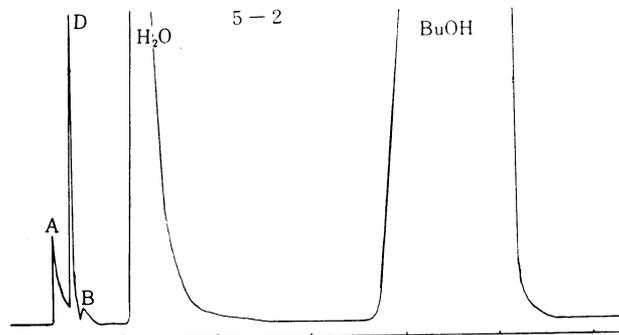
4. 魚肉腐敗生産物中のアンモニアおよび低級脂肪族アミン類の確認 試料として市販フィッシュソルブル（含水量40%）を用い、これを蒸留水で4倍に稀釈し38°Cで5日間腐敗させて使用した。これを水蒸気蒸溜し、溜液をN-塩酸に捕集した。捕集液は脂肪酸等により薄黄色、乳濁状態にあるのでエーテルで洗滌し、残液を減圧濃縮して結晶状粉末を得た。この粗結晶から揮発性塩基素通気定量法の装置を用い、ブタノールを受液として、受器を寒剤で-10°C以下に冷却しながらアンモニアと低級脂肪族アミン類を蒸溜捕集した。受液としてはエーテル、アセトン、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルアルコール、メチルアルコール等も試みたが、いずれもアミン類のピークに重なるため比較のおくれてピークの現われるブタノールを採用した。

ブタノール捕集液を前記クロマトグラムにかけた結果は Text-fig. 5-1. に示したが、アンモニアの位置に大きなピークが現われ、トリメチルアミンの位置にも小さいものがみられる。従って、前記条件の腐敗においては、その腐敗生成物の大部分をアンモニアがしめ他のアミン類があらわれ難かつたものと思われる。よって、粗結晶中から塩化アンモニウムのみを除去を試みた。即ち、アルコールに対する塩化アンモニウムとアミン塩酸塩の溶解度の相違を利用して98%エチルアルコールで分別し、可溶部を濃縮後再び前記の方法にしたがって捕集した。このものについて分離を試みた結果は Text-fig. 5-2. に示す通りであって、塩化アンモニウムを完全に除去できなかったためアンモニアのピークが残っているが、トリメチルアミンの存在が大きく現われ、他にメチルアミンが少量みられる。

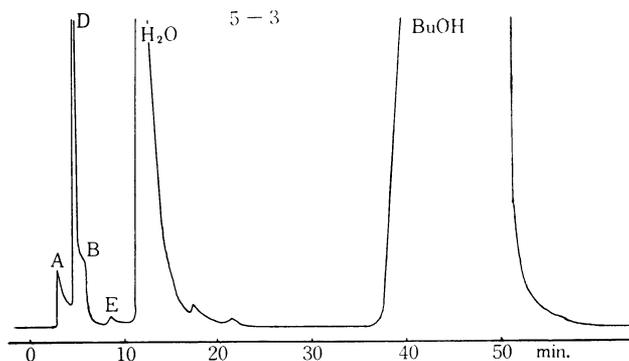
5-1



5-2



5-3



Text-fig. 5. Separation of ammonia and lower aliphatic amines.

5-1. None treatment.

5-2. Eliminate of ammonium chloride from above.

5-3. Eliminate of moisture from 5-2.

なお、Text-fig. 5-2. においても水のピークが大きな部分を占め、それに続いて現われるはずのジエチルアミン、トリエチルアミン又はイソブチルアミンの存在が不確かになっていると思われるので、次に無水硫酸ソーダを使用して水分の除去をはかった。このもののクロマトグラムでは Text-fig. 5-3. に示すようにトリメチルアミン、メチルアミンと共に少量のエチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン又はイソブチルアミンのピークが認められた。

そのように Triethanolamine 1*m*, Cetylalcohol 4*m* を直列したカラムを用い、上記のような操作を行

なう場合にはフィッシュソルブル腐敗生成物中からアンモニアと5種類のアミンの存在を確かめることができた。定量的にみるには未だアンモニア、アミン類の捕集方法に不十分な点があり、また含水量を減ずる工夫をも要するが、これらを解決できれば魚肉或いは魚肉加工品の腐敗生産物中のアミン類の簡便な分離定量法として、腐敗過程の研究、もしくは鮮度判定にも利用できるのではないかと考える。なお、広い範囲のそれらの目的を達するためには更に G. L. C. による高沸点アミン類の分離をも検討しなければならない。

要 約

(1) アンモニアおよび低級脂肪族アミン類の G. L. C. による分離において、固定相液体 n-Hexadecane, Paraffin wax, Triethylen glycol, Cetylalcohol, Glycerol, Triethanolamine の6種類のうちでは、Cetylalcohol, Glycerol, Triethanolamine が比較的分離能のすぐれていることを知った。

(2) 固定相液体として Triethanolamine 1m, Cetylalcohol 4m を直列につないだものを使用してアンモニアと10種類の低級脂肪族アミンを分離し、その場合のカラム温度、キャリアーガス流速の適度はそれぞれ98°C, 30ml/min. と定めた。

(3) 上記のカラムを用いてフィッシュソルブルの腐敗生産物から、アンモニア、トリメチルアミン、メチルアミン、エチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン又はイソブチルアミンの6種類を確認し得た。量的な関係はアンモニアが大部分で次にトリメチルアミンが多く、微量のメチルアミンおよびエチルアミン、トリエチルアミン又はイソブチルアミンの痕跡が認められた。

なお本研究は文部省科学試験研究費補助金“フィッシュソルブルの製造に関する研究”の一部として実施したものであることを附記する。

文 献

1. JAMES, A. T. 1952. *Biochem. J.*, **52**: 242~247.
2. JAMES, A. T., MARTIN, A. J. P. & SMITH, G. H. 1952. *Biochem. J.*, **51**: 238~242.
3. AMELL, A. R., LAMPREY, P. S. & SCHICH, R. C. 1961. *Anal. Chem.*, **33**: 1805~1806.
4. SMITH, E. D. & RADFORD, R. D. 1961. *Anal. Chem.*, **33**: 1160~1162.
5. CINCOTTA, J. J. & FEINLAND, R. 1962. *Anal. Chem.*, **34**: 774~776.
6. MEADOWS, G. W. & KIRKLAND, J. J. 1961. *J. Phys. Chem.*, **65**: 2139~2143.
7. 雨宮良三, 1961. “ガスクロマトグラフィー” : 75~76.
8. 田辺弘也, 石居昭夫, 1961. “化学の領域増刊46号” : 165~167.
9. SZE, Y. L., BORKE, M. L. & OTTENSTION, D. M. 1963. *Anal. Chem.*, **35**: 240~242.
10. 高山雄三, 1958. *工化誌*, **64**: 803~806.
11. 高山雄三, 武内次夫, 1959. “入門ガスクロマトグラフィー” : 104~111.

SUMMARY

In this study, the authors attempted to separate the lower aliphatic amines and ammonia present in the spoiled fish meat by using of Gas-Liquid Chromatography (G. L. C.). However, the separation is difficult and unsuccessful unless the adopted partition liquid is suitable. So the liquid phase for available has been investigated, and determined the column temperature and the carrier gas flow rate. Then the separation of a standard mixture of aliphatic primary, secondary and tertiary

amines were achieved reasonably, and the detection of amines content in a spoiled fish-soluble were taken for a test of the method established above.

The results are as follows :

(1) As partition liquid for the separation of lower aliphatic amines, triethanolamine, cetylalcohol and glycerol were excellent than n-hexadecane, paraffin wax and triethylen glycol. (Text-fig. 1.)

(2) Especially the column connected with 1 *m* triethanolamine and 4 *m* cetylalcohol was more effective. In this case, the more suitable condition of procedure was the temperature of column 98°C and the flow rate of carrier gas 30 *ml/min*. (Text-fig. 2 & 3.)

(3) Although the separation of a standard mixture of aliphatic primary, secondary, tertiary amines and ammonia were achieved reasonably, it is imperfect to estimate them quantitatively because of the tailing of methylamine, dimethylamine and n-butylamine. (Text-fig. 4.)

(4) By the detection of amines present in a spoiled fish-soluble were obtained remarkable ammonia, considerable trimethylamine and a little methylamine, ethylamine, diethylamine and triethylamine or iso-butylamine. (Text-fig. 5-1~3.)