[農化 第 39 卷, 第 9 号, p. 347~351, 1965]

タバコの揮発性塩基に関する研究 (第1報)

乾燥葉および生体植物の低沸点アミンについて

安松 範郎, 赤池 重男 (日本専売公社秦野たばこ試験場)

昭和 40 年 5 月 12 日 受理

Studies on the Volatile Bases in Tobacco Part I. Volatile Amines in Cured Leaves and Tobacco Plant

By Norio YASUMATSU and Shigeo AKAIKE

Hatano Tobacco Experimental Station, Japan Monopoly Corporation

Volatile amines in cured leaves and tobacco plant were investigated by gas chromatography. Fifteen amines were detected in cured leaves and among them twelve amines were identified. Amine content was influenced by the type of cured leaves (flue cured and air cured) and by the amount of nitrogen supplied, but N-methylpyrrolidine was the main constituent of volatile amines in cured leaves. In tobacco plant, most of the amines observed in cured leaves were detected, but relatively large amount of isobutylamine, isoamylamine in the leaves and methylamine in the root were observed compared with cured leaves.

(Received May 12, 1965)

緒 言

葉たばこの揮発性成分は、製品たばこの香喫味に関係を有する重要な成分であり、それらのうち塩基成分についてはアルカロイド以外あまり研究されていない。従来、揮発性塩基は葉たばこの品質上好ましくない成分として考えられており、その量的比較の際は一定条件で得られる揮発性塩基類の全量として測定表示する方法がとられている⁽¹⁾。しかし、これら塩基類の種類および量的関係についてはこれまで全く知られていなかったが、最近たばこの煙中における低沸点アミンの存在が明らかとなった⁽²⁾。これらのアミンはいずれも特異臭を有するものであり、葉たばこについても香喫味に関係する成分と考えられたので、著者らは施肥、乾燥法を異にした乾燥葉たばこおよび生体植物を供試し、ガスクロマトグラフィーにより低沸点アミンについて検討をおこなったので、その結果を報告する。

実 験 方 法

供試たばこ材料：標準窒素量として1アール当り1kgおよびその倍量を施与して生産した鉄管乾燥葉たばこ(品種：ブライトエロー)ならびに空気乾燥葉として松川葉および白だるま葉、または生体試料として水耕栽培し

たブライトエローの発蕾期における全葉と根を供試した。

揮発性塩基成分の調製：葉たばこ公定分析法⁽¹⁾にしたがって得られる揮発性塩基のフラクションには、多量のアルカロイドやアンモニアが含まれるため、微量に存在する低沸点アミンの検出や定量が困難となるので、その妨害を除くため下記の方法にしたがって調製した。乾燥葉たばこ粉末 100 g, あるいは生体試料約 500 g の磨砕物に 0.5% 酢酸水溶液 1 l を加えて 5 分間煮沸し、沝液洗液を合せて減圧下で約 150 ml に濃縮する。濃縮液を 500 ml の丸底フラスコに移し、20 g の酸化マグネシウムを加えて湯浴上で 80° に加温しながら 8 時間通気して揮発性塩基を 1 N 塩酸水溶液中に捕集する。つぎにこの塩酸液を濃縮乾固し、残渣を無水エタノールで抽出したのちエタノール溶液を蒸発乾固する。えられた残渣を既知濃度の内部標準物質を含む水溶液 1 ml に溶解し、ガスクロマトグラフィー用の試料とした。

ガスクロマトグラフィー条件：装置は島津製 GC-1 B 型、水素炎イオン化検出器 HFD-1 型を使用した。各種条件について検討の結果、運転条件としては下記 3 通りの方法を採用した。

(1) PEG 6000 25%, NaOH 3%/シマライト B (30

～60 メッシュ), ステンレスカラム内径 4 mm, 長さ 4.5 m, カラム温度 65°, キャリヤーガス N_2 , 入口流速 40 ml/分, 入口圧 1 kg/cm².

(2) スクアラン 20%, グリセリン 2%, NaOH 3%/シマライト B, ステンレスカラム内径 4 mm, 長さ 3.75 m, カラム温度 65°, キャリヤーガス N_2 , 入口流速 40 ml/分, 入口圧 1.5 kg/cm².

(3) PEG 600 20%, NaOH 3%/シマライト B (4 mm×2.25 m) とスクアラン 20%, グリセリン 2%, NaOH 3%/シマライト B (4 mm×1.5 m) の連結カラム, カラム温度 65°, キャリヤーガス N_2 , 入口流速 40 ml/分, 入口圧 1.5 kg/cm².

試料の導入: 調査対象とするアミン類は, いずれも常温で気体あるいは低沸点の液体であり, 定量操作の点で取扱いにくい。ため A. T. James らがおこなった方法⁽⁸⁾にヒントを得て下記の方法を案出した。ガスクロマトグラフィー装置の試料室に第 1 図に示したごとく, 先端を絞ったステンレスパイプ (外径 5.5 mm, 長さ 60 mm) の中に, Merck 社製の元素分析用ソーダライム粒をつめたものを挿入し, 試料室の温度を 80～100° に保ちながら, アミン類の塩酸塩水溶液 50 μ l をマイクロシリンジでソーダライム中に注入してガス化した成分をカラムに導入する。

塩基成分の
同定: たば
こ中に含まれ
る低沸点アミ
ンは微量のも
のが多く, 各
成分を分離し
て同定するこ
とが困難であ
るので, 市販
試薬あるいは
合成物の塩酸
塩で求めたガ
スクロマトグ
ラフィーの相
対保持容量と
の関係で同定
した。標準試
料から求めた

第 1 図 試料導入系

① キャリヤーガス入口, ② ゴム栓, ③ ヒーター,
④ キャリヤーガス出口(カラムへ), ⑤ ステンレス
パイプ, ⑥ ソーダライム粒, ⑦ グラスウール

第 1 表 低沸点アミン類の相対保持容量
(ブチルアミン=1.00)

化合物	カラム スクア ラン	PEG 600 ^{b)} + スクアラン	PEG ^{a)} 6000
ア ン モ ニ ア	0.03	0.10	0.08
メ チ ル ア ミ ン	0.06	0.18	0.14
ジメチルアミン	0.14	0.15	0.14
エ チ ル ア ミ ン	0.14	0.22	0.22
トリメチルアミン	0.15	0.07	0.06
イソプロピルアミン	0.23	0.26	0.25
ter-ブチルアミン	0.33	0.29	0.24
プロピルアミン	0.37	0.43	0.46
ジェチルアミン	0.56	0.35	0.22
sec-ブチルアミン	0.63	0.68	0.52
イソブチルアミン	0.72	0.64	0.63
ブチルアミン	1	1	1
ジイソプロピルアミン	1.26	0.50	0.39
Nメチルピロリジン	1.36	0.83	—
Nメチルピロリジン	1.44	0.68	0.63
ピロリジン	1.47	1.95	1.77
トリエチルアミン	1.65	0.55	0.40
イソアミルアミン	1.98	1.53	1.69
アミルアミン	2.91	2.03	2.17
ピベリジン	3.03	2.59	—
ジプロピルアミン	3.08	1.28	1.06
ジイソブチルアミン	8.05	2.44	1.69
トリプロピルアミン	—	—	1.74

a), b), c): カラム, 温度, 流速条件は本文参照。

相対保持容量を第 1 表に示したが, スクアランカラムでは成分の沸点と相対保持容量との間に直線関係が認められるので, スクアランカラムのガスクロマトグラムから成分を推定し, 他の 2 つのカラムで該当するピークが得られたものを同定成分とした。また葉たばこ中に多量の存在が認められた Nメチルピロリジンとイソアミルアミンについては, ガスクロマトグラフィーで分取したのち, 塩酸塩の IR スペクトルから同定した。

成分の定量: 各試料のガスクロマトグラムから成分量を求めたが, 1 種類のカラムで全成分を定量することは困難であるため, 各成分について適当なカラムの選択をおこなった。内部標準としてブチルアミンの一定量を試料に加え, ガスクロマトグラムから重量法で求めたピーク面積と, 各成分の標準試料について求めたブチルアミンに対する相対感度とから成分量を算出した。未同定成分については相対感度が求められないので, ブチルアミン相当量として算出した。本実験条件では, 内部標準に対する成分量比と面積比との間に直線関係が成立するものと見なし, 各成分ごとの検量線は作製しなかったが,

第2図 黄色種葉タバコ本葉 (N 1 kg/a 区) アミンのガスクロマトグラム

カラム PEG 600 (4 mm×2.25 m)+スクアラン (4 mm×1.5 m), カラム温度 65°, ガス流速 40 ml/min.

斜線をほどこしたピークは内部標準としての *n*-ブチルアミン.

第3図 黄色種葉タバコ本葉 (N 1 kg/a) アミンのガスクロマトグラム

カラム スクアラン (4 mm×3.75 m), カラム温度 65°, ガス流速 40 ml/min.

斜線をほどこしたピークは内部標準としての *n*-ブチルアミン.

第4図 タバコ生葉アミンのガスクロマトグラム

カラム スクアラン (4 mm×3.75 m), カラム温度 65°, ガス流速 40 ml/min.

斜線をほどこしたピークは内部標準としての *n*-ブチルアミン.

同一条件下で、イソブチルアミン標準試料についての検討結果では、両者の間に完全な直線関係が成立し、13回反復測定値の標準偏差は2.8%であった。なお試料によってはブチルアミンに相当するピークがごく僅かに認められるものもあったが、定量上支障を与えない程度であるので無視した。

結果および考察

タバコ試料中に存在するアミンの種類およびその含量各試料のガスクロマトグラムを第2図～第5図に、また定量結果を第2表に示した。低沸点アミンとして約15種類のピークが検出され、同定成分としてはメチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、イソプロピルアミン、プロピルアミン、ジエチルアミン、*sec*-ブチルアミン、イソブチルアミン、*N*-メチルピロリジン、トリエチルアミン、イソアミルアミン、アミルアミンが挙げ

られる。なおこれ以外にエチルアミンの存在が推定されたが、他成分ピークとの分離が不十分であったため確実にこれを同定することができなかった。

従来、葉タバコあるいはタバコ材料から調製した粗製ニコチン中に存在する低沸点アミンとして報告されたものにはトリメチルアミン^(4,8)、ピロリジン⁽⁶⁾、*N*-メチルピロリン⁽⁶⁾、*N*-メチルピロリジン⁽⁶⁾があり、一方タバコ生葉中存在が報告されているものにメチルアミン⁽⁷⁾、トリメチルアミン⁽⁸⁾、イソアミルアミン^(7,9)がある。したがって、本実験において確認したそれら以外のアミンは新しく同定されたものである。しかしながら、タバコから調製した粗製ニコチン中に存在が報告されているピロリジン、*N*-メチルピロリンについては、乾燥葉タバコあるいはタバコ植物中に存在することが確認できなかった。

また、従来タバコ試料の低沸点アミン類の定量に関する報告は全くみられないが、著者らは上記試料について各成分の量的関係を明らかにすることができた。乾燥葉タバコの低沸点アミンの主体をなすものは*N*-メチルピロリジンであり、生葉においてはイソアミルアミンである。いずれにしても、低沸点アミンはアルカロイドあるいはアンモニアの含量に比べ著しく少ない。乾燥葉タバコ中に比較的多く存在する*N*-

第5図 タバコ根アミンのガスクロマトグラム
 カラム スクアラン (4mm×3.75m), カラム温度 65°, ガス流速 40 ml/min.
 斜線をほこしたピークは内部標準としての *N*-ブチルアミン。

チルピロリジンの由来については十分明らかでないが、タバコの主アルカロイドであるニコチン中に *N*-メチルピロリジン環が存在することから、ニコチンの分解産物のように思われるが、ニコチンの微生物分解⁽¹⁰⁾あるいは熱分解⁽¹¹⁾に関する報告によると、ニコチンのピロリジン環は不安定で、開裂して分解することが知られている。また、タバコ生体試料中にも *N*-メチルピロリジンの存在が認められることは、E. Späth ら⁽⁵⁾が述べているように、植物体中でプロリンのメチル化、あるいは脱炭酸反応を通じて生合成され、タバコ本来の成分として乾燥葉に移行したものと推察される。なお、比較的高沸点部分に3種の未同定成分が存在し、スクアランカラムからの

溶出順序にしたがいそれぞれ A, B, C とした。

黄色種葉たばこにおける窒素施肥量の影響

窒素を過剰に施して生産された葉たばこの品質は著しく低下することが知られており⁽¹²⁾、また、揮発性塩基含量の多い葉たばこは一般に好ましくないとされている。第2表の結果から明らかのように、窒素倍量施用区のアミン量は著しく増加し、この傾向はとくに高沸点部に顕著であった。

黄色種葉たばこの着葉位置による差異

着葉位置の低い中葉のアミン類は、上位のものに比べて量的に少ない傾向が認められるが、天葉は着位が最上であるにもかかわらず、本葉

よりかえって少なくなっている。着葉位置の相違は葉令あるいは成熟期間の長短に関係することから、上記のような結果になったものと思われる。

葉たばこの種類との関係

乾燥葉たばこの種類は、品種、栽培法あるいは乾燥熟成法などに関連を有するものであり、本実験で供試した材料は鉄管乾燥葉のプライトエローおよび空気乾燥葉の松川葉と白だるま葉である。品種、栽培などの条件を異にするけれども、第2表の結果から乾燥法によるアミン含量の差異について一応つぎのような傾向をうかがうことができよう。すなわち、鉄管乾燥葉たばこに比較して空気乾燥葉たばこはいずれもメチルアミン、ジメチルア

第2表 たばこ試料の低沸点アミン含量

塩基成分	試料 ピーク 番号	黄色種 (N 1kg/a 区)			黄色種 (N 2kg/a 区)			松川葉 白だるま		黄色種	
		天葉	本葉	中葉	天葉	本葉	中葉	本葉	本葉	生葉	生根
メチルアミン	1	0.33	0.30	0.14	0.50	0.86	0.42	0.76	1.35	0.63	2.08
ジメチルアミン	2	1.76	1.23	0.89	1.55	2.70	1.00	4.40	9.30	1.82	0.16
トリメチルアミン	3	1.01	1.00	0.69	1.13	1.95	1.20	2.20	6.00	0.61	1.16
イソプロピルアミン	4	0.05	0.07	0.12	0.24	0.39	0.07	0.04	0.17	0.26	0.25
プロピルアミン	5	0.10	0.09	0.10	0.42	0.47	0.06	0.08	0.09	0.18	0.18
ジェチルアミン	6	0.04	0.02	0.04	0.04	0.09	0.03	0.02	0.03	0.04	0.07
sec-ブチルアミン	7	0.20	0.27	0.17	0.24	0.42	0.09	0.32	0.27	0	0.12
イソブチルアミン	8	0.21	0.23	0.19	0.35	0.82	0.31	0.39	0.06	1.21	0.02
未同定成分 A*	9	1.35	1.60	0.68	1.42	1.91	1.35	0.35	1.17	0	0
Nメチルピロリジン	10	14.0	16.3	9.7	29.5	39.0	23.7	8.5	15.0	6.3	13.9
トリエチルアミン	11	0.02	0.02	0.02	0.05	0.10	0.04	0.02	0.16	0.08	0.16
イソアミルアミン	12	1.30	1.30	1.50	1.19	4.75	2.95	1.24	1.58	168	2.79
未同定成分 B*	13	0.07	0.72	2.20	3.50	6.00	2.10	0.32	0.39	—	0
アミルアミン	14	0.22	0.31	0.17	0.39	0.44	0.15	0	0.06	0	0
未同定成分 C*	15	1.68	2.67	0.97	1.80	12.90	6.10	1.06	6.50	1.31	3.55

表中の数値は乾物 1g (生体試料については新鮮物 10g) 当りの μg 数。

* 未同定成分はブチルアミン相当量として算出した。

ミン, トリメチルアミンの含有割合が高くなっている。一般に空気乾燥葉たばこのアンモニア含量は鉄管乾燥葉たばこに比べて高いことが知られており, これは堆積醗酵中に蛋白質あるいはアミドなどの分解によって生ずるものと考えられている。また, ニコチンの微生物分解によってメチルアミンの生成することが知られており⁽¹⁰⁾, 過激な堆積醗酵中の変化をうける空気乾燥葉たばこにおいてアミンの低沸点部分が多いことは, アンモニアと同様におそらく乾燥以降の処理によって生成増加するものと推察される。

つぎに, 栽培法, 乾燥法の比較的類似している松川葉と白だるま葉の品種間の差異について考察すると, 白だるま葉のアミン量は前者に比べて多く, とりわけ高沸点部分にこの傾向がある。前述のごとく, 黄色種の品質低下をもたらす窒素過剰施与の影響により, アミン量とくに高沸点部分の増加が著しい。松川葉は空気乾燥葉たばこの香嗅味上いわゆるくせのない品種であり, これに反し, 白だるま葉は近年省力栽培の見地から育成されたもので, 香嗅味の点では必ずしも歓迎されていない事実を考え合えると, アミン類の量的変化と香嗅味との間には何らかの関連があるものと思われる。

タバコ植物のアミン

タバコ生体植物中にも 2, 3 の成分を除いて, 乾燥葉たばこにみいだされたと同様なアミン類が存在するが, 量的な割合は幾分異っている(第 2 表)。この実験に供試した材料は, 圃場で栽培したものとは条件が異なるけれども, 生体中において多くのアミンが検出されたことは興味深い。生葉ではイソアミルアミンが多量に含まれており, その他イソプロピルアミン, イソブチルアミンの存在割合も乾燥葉に比べて多くなっている。根においてはメチルアミンの含有割合が高く, イソアミルアミンは生葉ほど多くない。Nメチルピロリジンは生体中にも存在することが判明し, 葉部よりも根に多く含まれていた。

要 約

乾燥葉たばこ, ならびにタバコ植物中に存在する低沸点アミンをガスクロマトグラフィーにより検討した。葉たばこのアミンとして 15 成分を検出し, そのうち 12 成分を同定した。これらアミンの含量は葉たばこの種類(鉄管乾燥および空気乾燥葉たばこ), 窒素施用量によって変動するけれども, Nメチルピロリジンは低沸点アミン類中量的に主要なものである。タバコ植物にも乾燥葉で認められたと同様な多くのアミンの存在が確認できた。また生葉ではイソブチルアミン, イソアミルアミン, 根ではメチルアミンの存在割合が乾葉に比べて高かった。

終りに臨み, 本報告の発表を許可された当試験場石戸谷賢榎場長, 種々御指導を賜った山下貴部長, 実験の 1 部を担当された須山計子嬢に深甚の謝意を表します。

本研究の概要は昭和 40 年 4 月, 日本農芸化学会大会において発表した。

- (1) 日本専売公社 : 葉たばこ公定分析法 (1962)。
- (2) 伊沢正夫 : “たばこの煙に関する研究綜説”, 日本専売公社, p. 13 (1961)。
- (3) A. T. James, A. T. P. Martin : *Biochem. J.*, **52**, 238 (1952)。
- (4) E. Späth, E. Zajic : *Ber.*, **69**, 2448 (1936)。
- (5) E. Späth, S. Biniecki : *ibid.*, **72**, 1809 (1939)。
- (6) A. Pictet, G. Court : *ibid.*, **40**, 3771 (1907)。
- (7) Stein von E. Kamienski : *Planta*, **50**, 315 (1957)。
- (8) 長谷川浩, 岩田 精, 国井一己 : 秦野たばこ試験場報告第 30 号 (1931)。
- (9) M. Guggenheim : “Die Biogenen Amine”, Julius Springer, 1924, p. 38。
- (10) W. G. Frankenburg, A. M. Gottscho, A. A. Vaitekunas : *Tob. Sci.*, **2**, 9 (1958)。
- (11) 小橋友助, 渡辺美穂子, 山下雄右 : 本誌, **37**, 291 (1963)。
- (12) W. W. Garner : “The Production of Tobacco”, The Blakiston, Co. 1950, p. 101。