

報 文

Crude Rum の香気成分について

出 来 三 男 , 加 藤 時 信

アルコール原料として輸入された Crude rum とジャマイカラムの香気成分を薄層クロマトグラフィー、NMR 及びガスクロマトグラフ直結質量分析計により比較検討した。ヘッドスペース成分から揮発性カルボニル化合物として、イソブチルアルデヒド、プロピルアルデヒド及びアセトアルデヒドを 2・4 - DNPH として分離確認した。アルデヒドの主成分はアセトアルデヒドであり、Crude rum とジャマイカラムとの間には相違はみられなかった。クロロホルム抽出物からガスクロマトグラフィーにより約 45 種類のピークを検出した。これらのピークで主な成分はアセトン、3 - メチル - 1 - ブタノール、イソブチルアルコール、2 - フェニルエチルアルコール及び C₆ から C₁₆ までの脂肪酸エチルエステルであり、2 - フェニルエチルアルコールはこれまでラム酒から検出されていない化合物である。クロロホルム抽出成分も両者の間に顕著な相違は認められなかった。

1 . 緒 言

食品加工のうえから強化食品や保存食品については、数多くの研究がみられるが、食品製造上重要な役割をもつ香気については、それが微量成分であるためこれまであまり検討されていなかった。ところが、最近の微量分析法の開発はこの領域の研究を促進し、とくにガスクロマトグラフィーの利用は穀類、油脂、乳製品及び肉類などの微量香気成分について多くの知見を与えてくれた。なかでも、醸造食品については古くから品質鑑定の基準の一つとして官能検査による香りが重要な位置を占めているが、ガスクロマトグラフィーの利用により、それらの微量揮発成分が多数同定され、醸造食品と香気成分との関連性が検討されている。

著者らは輸入食品の加熱、調製などの加工処理の程度や混合食品の素材を鑑定する目的から食品に特有なフレーバー組成についてガスクロマトグラフィー及び質量分析計を用いて検討し、これまで食品添加香料¹⁾、麦芽の香気成分²⁾について報告してきた。ここでは、輸入 Crude rum の香気成分をジャマイカラムのそれと比較検討した。

一般にラム酒は他の蒸留酒にみられない極めて特有用な風味を有する酒であり、その芳香は原料として用いる糖みつや醗酵工程に依存しているといわれている。この独特な芳香は各種の微量揮発成分の相乗作用によるものと考えが、すでに Maarse³⁾ をはじめとして Nykanen ら⁴⁾ がガスクロマトグラフィーによりジャマイ

カラムから多数の揮発成分を検出している。

著者らは Crude rum の香気成分を 2 つの画分に分別した。すなわち、ヘッドスペース成分に含まれるカルボニル化合物は 2・4 - ジニトロフェニールヒドラゾンとして捕集し、この画分の検索は薄層クロマトグラフィーで分離後、赤外線吸収スペクトル、NMR スペクトル及び質量分析計により同定し、一方、ラム酒のなかに含まれる芳香成分はクロロホルムで抽出し、ガスクロマトグラフ直結質量分析計により分離同定した。

2 . 実験方法

2・1 試 料

実験に使用した試料は、オーストラリア産 Crude rum、ジャマイカラム(レッド)、糖みつを原料として醗酵により製造した原料用アルコール(95%v/v)及びエチレンから合成した原料用アルコール(95%v/v)の 4 種類である。

2・2 香気成分の捕集

2・2・1 ヘッドスペースのカルボニル成分の捕集

試料 100ml を三口フラスコにとり、これを 60 に保持しながら N₂ ガスを通気(200ml/min)し、流出する揮発性物質を 2・4 - ジニトロフェニールヒドラジン塩酸溶液(2・4 - ジニトロフェニールヒドラジン 0.4g を 2 規定塩酸 100ml に溶解する 50ml 中に吸収させ、カルボニル成分をヒドラゾンとして捕集する。ヒドラゾンの黄色～橙黄色沈澱は 2 規定塩酸水溶液で洗浄後水

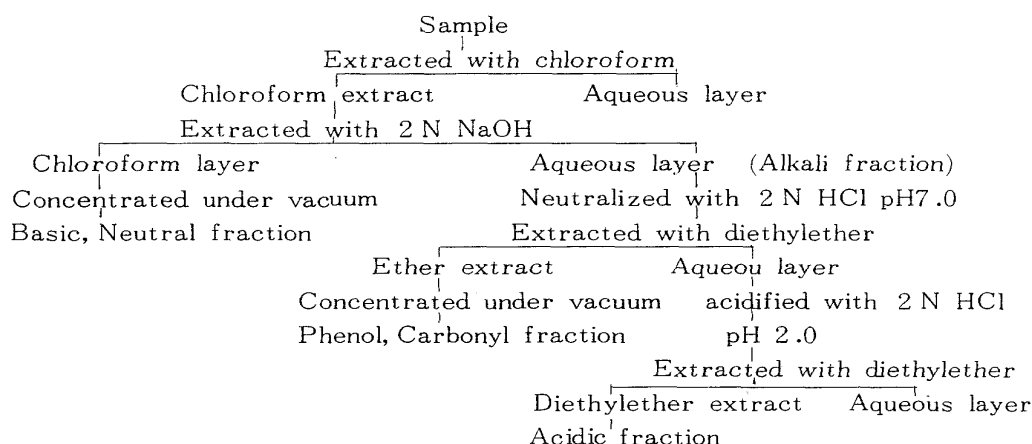


Fig.1 Extraction and fractionation of flavour component of rum

で洗浄して真空乾燥する。

2・2・2 クロロホルムによる香気成分の抽出

試料 100ml を分液ろ斗にとり再蒸留したクロロホルム 100ml を加え 10 分間激しく振とうして抽出する。クロロホルム抽出液に 2 規定苛性ソーダ水溶液 20ml を加えて振とうし、酸性物質、フェノール系物質をアルカリ溶液に転溶させる。クロロホルム層は無水芒硝で脱水後低温で減圧濃縮し、これを塩基性及び中性区分とした。アルカリ抽出液は 2 規定塩酸水溶液で pH7 とし、分液ろ斗に移し入れ、エチルエーテル 50ml を加えて激しく振とう抽出する。分液後エーテル抽出液は無水芒硝で脱水し、低温で濃縮しこれをフェノール及びカルボニル区分とした。水層は 2 規定塩酸水溶液を加えて pH2 とし、分液ろ斗に移し入れエチルエーテル 50ml と振とう抽出する。このエーテル抽出液は脱水後濃縮しこれを酸性区分とした。

香気成分捕集の概略を Fig.1 に示した。

2・3 薄層クロマトグラフィーによる分析

110 で 2 時間活性化したシリカゲル薄層板を用い、展開溶剤として n-ヘキサン：クロロホルム(1:1)、又はリグロイン：ベンゼン：酢酸エチル(6:6:1)を用い上昇法により展開した。2・4-ジニトロフェニルヒドラゾン(2・4-DNPH)は黄色を呈しているのでスポットの確認は容易であるが、0.5 規定アルコール性カリ溶液を噴霧すると、アルデヒド類の 2・4-DNPH は赤褐色に、ジケトン類の 2・4-DNPH は青紫色を呈する。

2・4 ガスクロマトグラフィーの条件

装置：柳本 GCG5DH、水素炎検知器。

カラム充填剤：PEG20M(5%)、セライト 545(80~100 メッシュ)、カラム長 2m、カラム温度 70~240 °C、6 /min.昇温、キャリアーガス：He15ml/min.注入口温度 270 °C、カラム充填剤として SE33(5%)及び APG-L も使用したがこの実験においては PEG20M が最もよい分離能を示した。

2・5 質量分析計の測定条件

イオン加速電圧 m/e600, 1.8KeV, イオン化電圧 70eV, 電子電流 60 μA. 装置は日立 K-53 型ガスクロマトグラフと直結した日立 RMU-6E 型質量分析計である。固体試料は全ガラス直接導入装置により行ない、試料室の温度は 200 °C とした。

2・6 核磁気共鳴スペクトルの測定条件

装置：日立 R-20

測定条件：60MHZ, Sweep Width 600 HZ

Sweep time 250 sec., Time Constant 0.1sec.,

Solvent: CDCl₃, TMS を内部標準とした。

3. 結果と考察

3・1 ヘッドスペースのカルボニル成分

ヘッドスペースからカルボニル成分を 2・4-DNPH として捕集した後の香気はラム酒特有のフレーバーはかなり弱くなることからヘッドスペースのカルボ

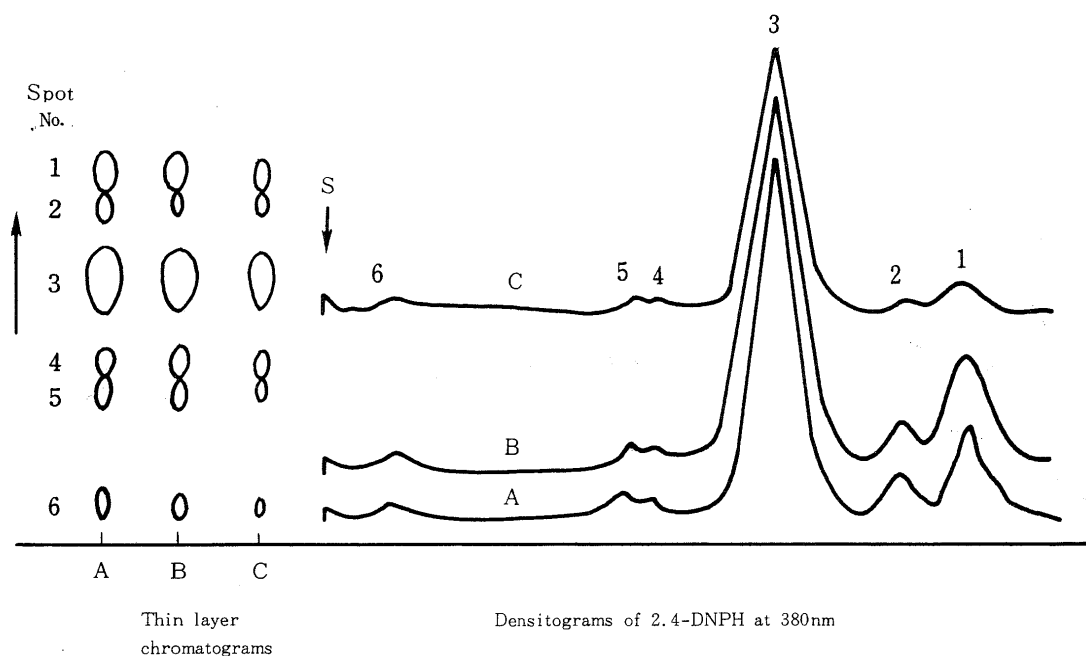


Fig.2 Thin layer chromatograms of 2·4 - DNPH in head space vapour

A : Crude rum, B : Jamaica red rum, C : Alcohol (95%v/v) made from molasses by fermentation.

Developpe : n-Hexane-chloroform (1 : 1v/v), duplicate.

ニル化合物はラムフレバーの主要な成分を形成していることが判る。

Crude rum からの 2·4 - DNPH をクロロホルムに溶解後 TLC で分離したクロマトグラムは Fig.2 に示したように約 6 個のスポットを示す。これらの各スポットのうち、スポット No.3 が主成分をなしており、デンストメーターで記録した濃度曲線から相対面積強度を求めるとスポット No.3 は 75%、スポット No.1 が 20%を占めている。クロマトグラムにアルコール性カリを噴霧するとスポット No.1, 2, 3 は赤褐色に変色するがスポット No.4, 5, 6 は淡紫青色を呈する。

他方、ジャマイカラムのヘッドスペースからの 2·4 - DNPH は Fig.2 の薄層クロマトグラフに示したように、Crude rum のそれと全く類似しており、分離スポットの相対面積強度比もよく一致している。

薄層クロマトグラフィーで分離した各スポットを掻き取り、クロロホルムで抽出分取したものについて、紫外、赤外吸収スペクトル及び核磁気共鳴スペクトル

を測定した。Fig.3 にクロロホルム溶液中及び 0.5 規定苛性ソーダ溶液中における可視、紫外吸収スペクトルを示した。

スポット No.1 及び No.3 は 358nm に、スポット No.2 は 361nm にクロロホルム溶液中で max を示し、スポット No.5 は max 365nm スポット No.6 の max は 385nm である。アルカリ処理により各スポットとも深色移動を起すが、スポット No.5, No.6 は他のスポットと異なりかなり長波長側へシフトし、これらの挙動はジケトン類のそれに近似している。

スポット No.1, No.2 及び No.3 の赤外吸収スペクトルを Fig.4 に示した。

2·4 - DNPH はすべて 1613 cm^{-1} と 1600 cm^{-1} にフェニールグループによるダブルットが現われ、さらに 833 cm^{-1} にフェニール基の 1, 2, 4 置換による吸収が共通して現われている。スポット No.1 は 2990 cm^{-1} の CH_3 の CH 伸縮振動による吸収強度が比較的強く現われており、 920 cm^{-1} がダブルットを示す以外は 1100 cm^{-1} から 700 cm^{-1}

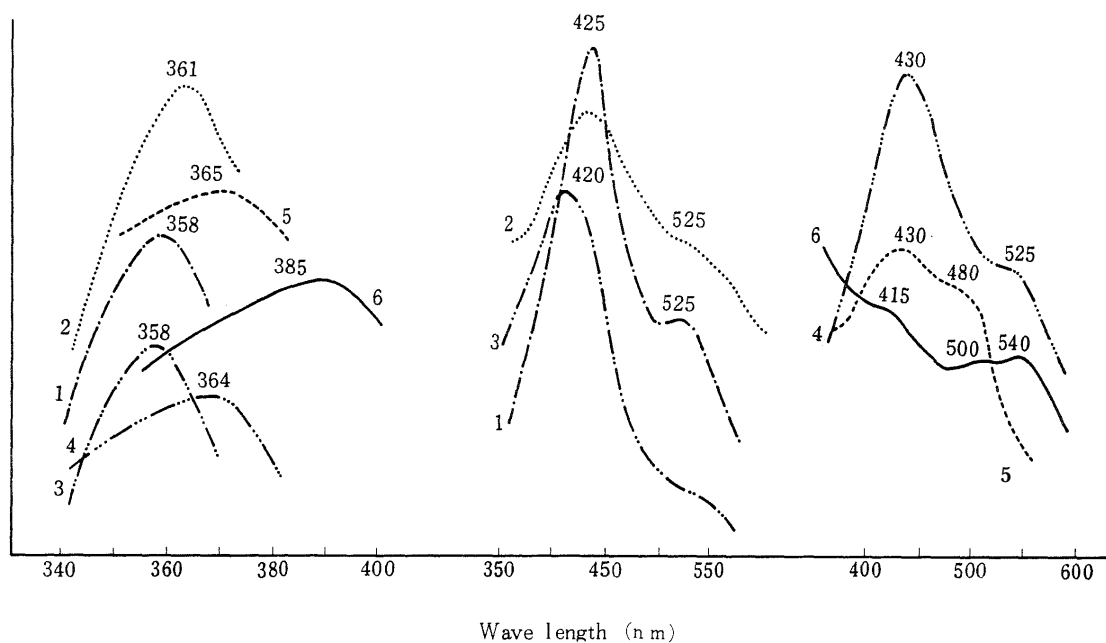


Fig.3 UV spectra of 2·4 - DNPH in head space vapour
Numbers are spot number same as cited in Fig. 2, (A) : In chloroform, (B) : In 0.5 N NaOH.

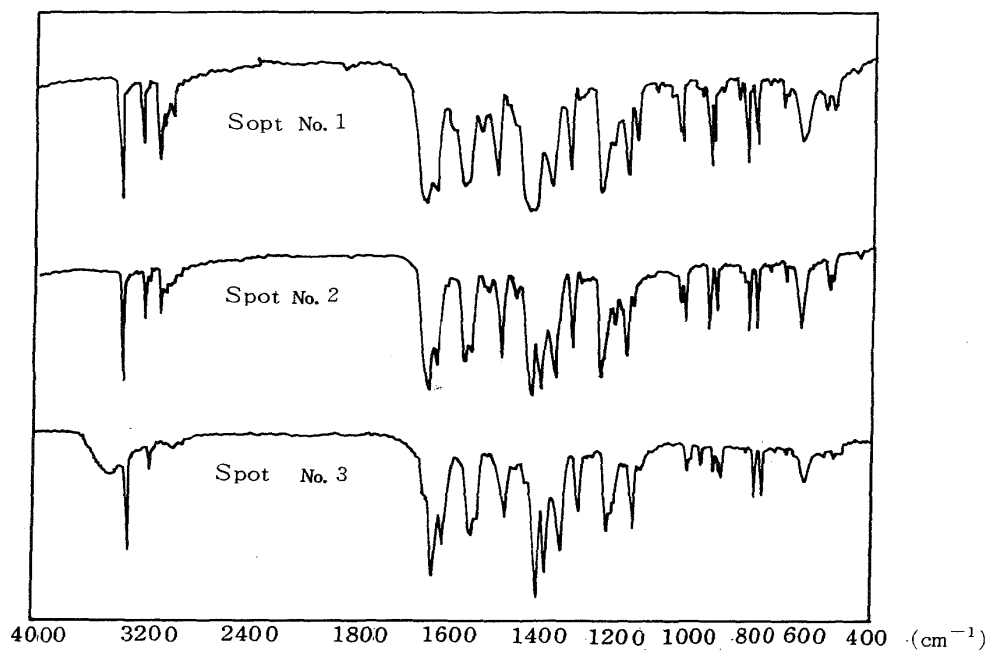


Fig.4 IR spectra of 2·4-DNPH isolated from thin layer chromatogram
Spot number in figure are same as cited in Fig.2.

の吸収スペクトルはイソブチルアルデヒドの吸収スペクトルによく類似している。また, Ross⁵⁾によると 920 cm^{-1} の吸収帯のダブルットは 2・4 - DNPH の結晶形に依存しているといわれており, 再結晶操作によって左右されるものと考ええる。

一方, スポット No.1 のマススペクトルをみると, Fig.5 に示したように m/e 252 に C_4 アルデヒドの 2・4 - DNPH にもとづく分子イオンピークを示しており, ニトロ化合物に特徴的な $\text{M} - \text{NO}$, $\text{M} - \text{NO}_2$ のフラグメントイオンピークが認められる。 m/e 238 の弱いピークの帰属ははっきりしないが, $\text{M} - 14$ に相当するものであり, ニトロ化合物の開裂様式から考えてこのピークは混在する炭素

数の 1 個少ない化合物の分子イオンピークによるものと考えるのが妥当である。これらの結果はスポット No.1 がブチルアルデヒドであることを示唆するものであるが, さらに Fig.6 に示した NMR スペクトルからわかるように, 1.2ppm にメチン基に隣接するメチルプロトン, 2.6ppm 付近にメチル基に隣接するメチンプロトンの多重線が現われており, 7.5ppm にはメチン基と窒素原子に隣接するプロトンシグナルがあらわれており, これらのプロトン強度比は 6 : 1 : 1 となることから, スポット No.1 はイソブチルアルデヒドの 2・4DNPH であると確認した。

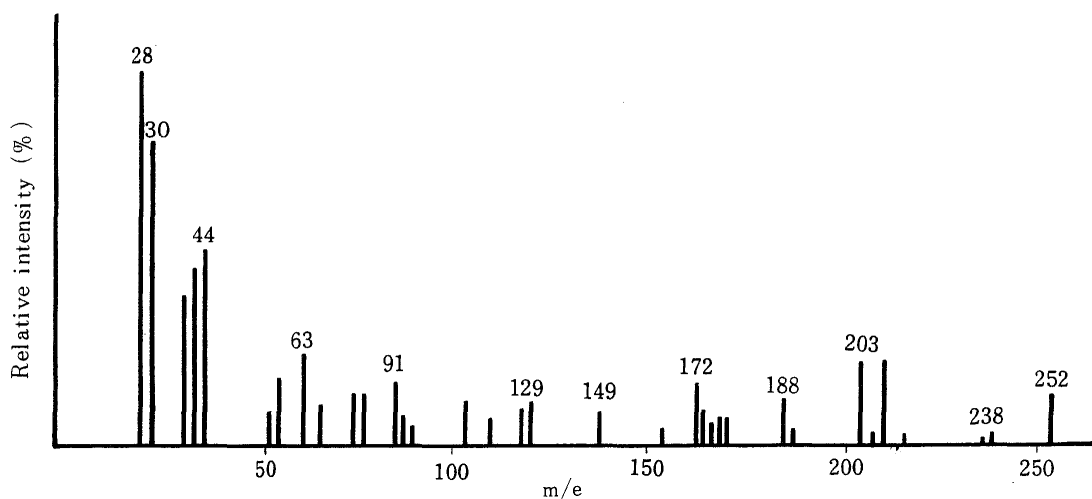


Fig.5 Mass spectrum of spot No.1 cited in Fig.2

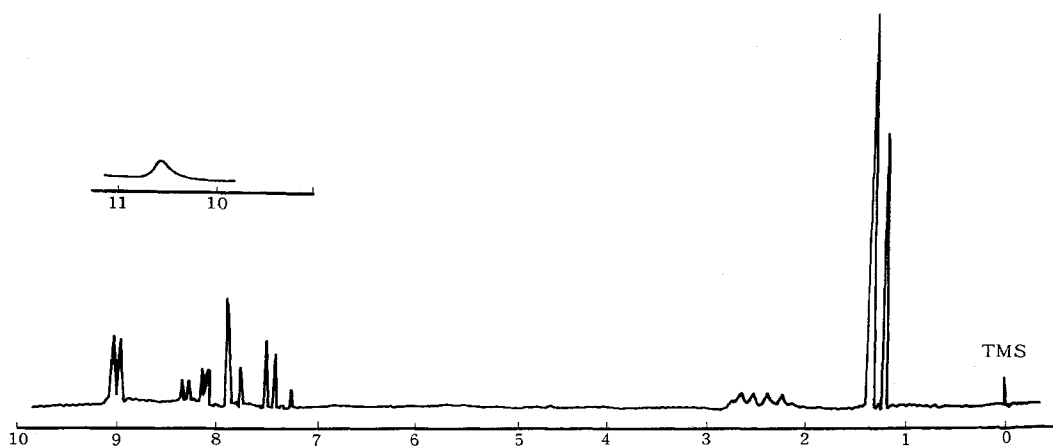


Fig.6 NMR spectrum of 2・4 - DNPH of spot No.1 cited in Fig.2

スポット No.2 は mp.153 であり,クロロホルム溶液中での max は 361nm である。TLC の Rf 値及び赤外吸収スペクトルはプロピルアデヒドの 2・4 - DNPH のそれとほぼ一致している (Fig.4)。

スポット No.3 は mp146 であり,クロロホルム溶液中で 358nm に max を示し,アルカリ処理による吸収極大の移動はアセトアルデヒドの 2・4 - DNPH に類似している。赤外吸収スペクトルは Fig.4 に示したよに 2・4 - DNPH の特性吸収帯のほか 850 cm^{-1} にアセトアルデヒドの形の結晶構造に基因する吸収帯⁵⁾が現われており, $1100\text{ cm}^{-1} \sim 700\text{ cm}^{-1}$ 領域のスペクトルはアセトアルデヒドの 2・4 - DNPH のそれによ

致している。また, Fig.7 のマスペクトルから判るように, $m/e224$ に強い分子イオンピークを示しており,スポット No.1 のマスペクトルと同様なニトロ化合物に特徴的な脱 NO 及び脱 NO_2 のフラグメントイオンを認める。 $m/e224(\text{M})^+$ からスポット No.3 はアセトアルデヒドの 2・4 - DNPH であると考えられるが,さらに Fig.8 に示した NMR スペクトルからもこのことを確認できる。すなわち, 2.2ppm の二重線はメチンに隣接するプロトンであり, このプロトンは 7.6ppm の四重線を示すプロトンとカップリングしており, プロトン強度比 3 : 1 から 2.2ppm のプロトンは窒素原子に近いメチルプロトンに, 7.6ppm はメチル基に接するメチンプロ

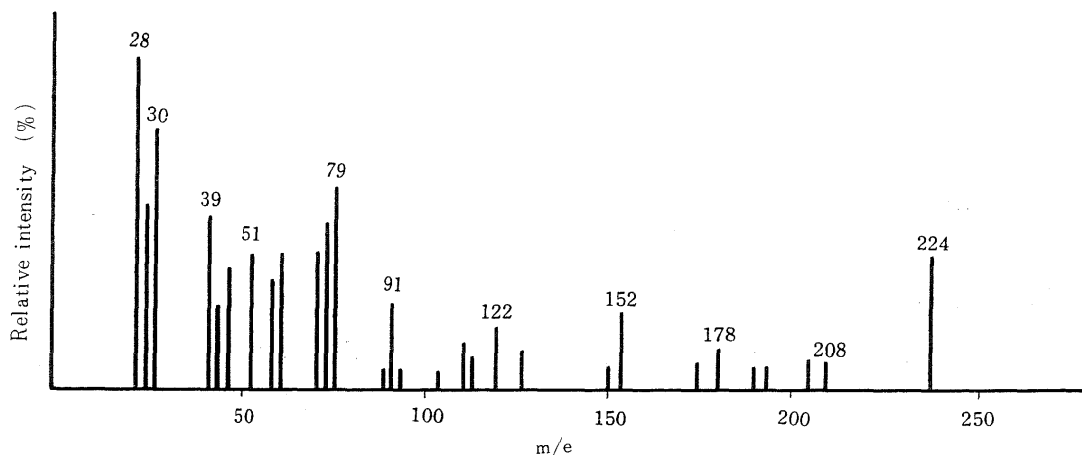


Fig.7 Mass spectrum of spot No.2 cited in Fig.2

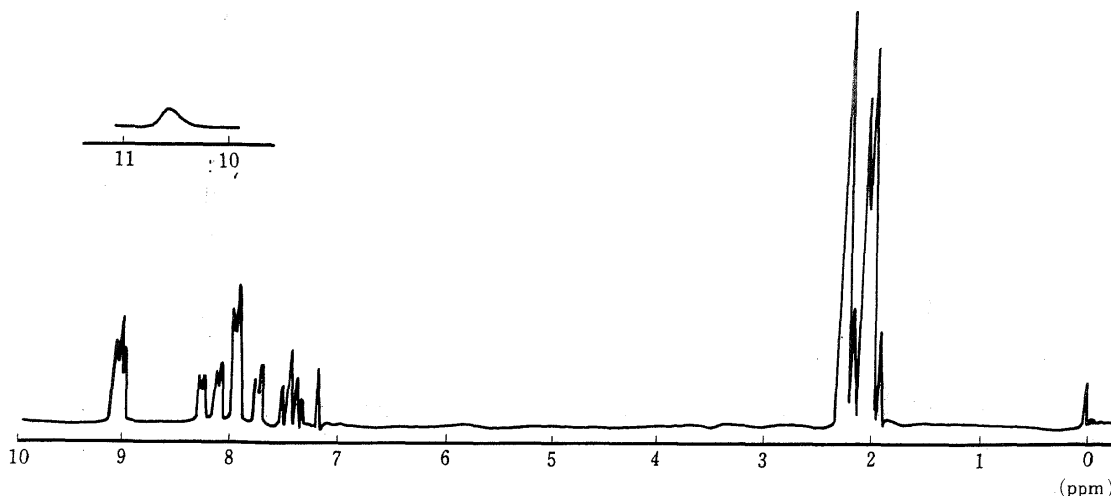


Fig.8 NMR spectrum of 2・4 - DNPH of spot No.2 cited in Fig.2

トンに帰属すると、この NMR スペクトルはアセトアルデヒドの 2・4-DNPH のそれと矛盾しない。

スポット No.4 ,No.5 及び No.6 は微量成分であり同定困難であるが、スポット No.6 はクロロホルム溶液中で 385nm に max を示し、アルカリ処理により 540nm に深色移動することからジケトン類と考えられる。

エチレンから合成された原料アルコールのヘッドスペースからはカルボニル成分は全く検出されなかったが、糖みつを原料として製造した原料アルコールからは微量であるが Crude rum と同様なカルボニル成分を検出した。このようなヘッドスペースのカルボニル成分の挙動は醗酵法により得られる蒸留酒に共通であり、このことは蒸留酒と他のアルコールとを判別する手がかりを与えるものと考えられる。

3・2 クロロホルム抽出物のガスクロマトグラフ直結質量分析計による検討

アルコールを多量に含有する試料からアルコール以外の揮発成分を抽出するには n - ヘキサンやクロロホルムなどの非水系溶媒が用いられている。また、溶解性を高めるために n - ヘキサン - ベンゼン ,n - ヘキサン - エチルエーテルなどの混合溶剤を用いる場合もあるが、エチルエーテルを含む混合溶剤では多量のアルコールが抽出液に混入してくるため、アルコール以外の微量成分をガスクロマトグラフィーで分離するのに不都合であった。

著者らは再蒸留したクロロホルムを用いて分液漏斗中で振とう抽出する方法によって香気成分を捕集した。

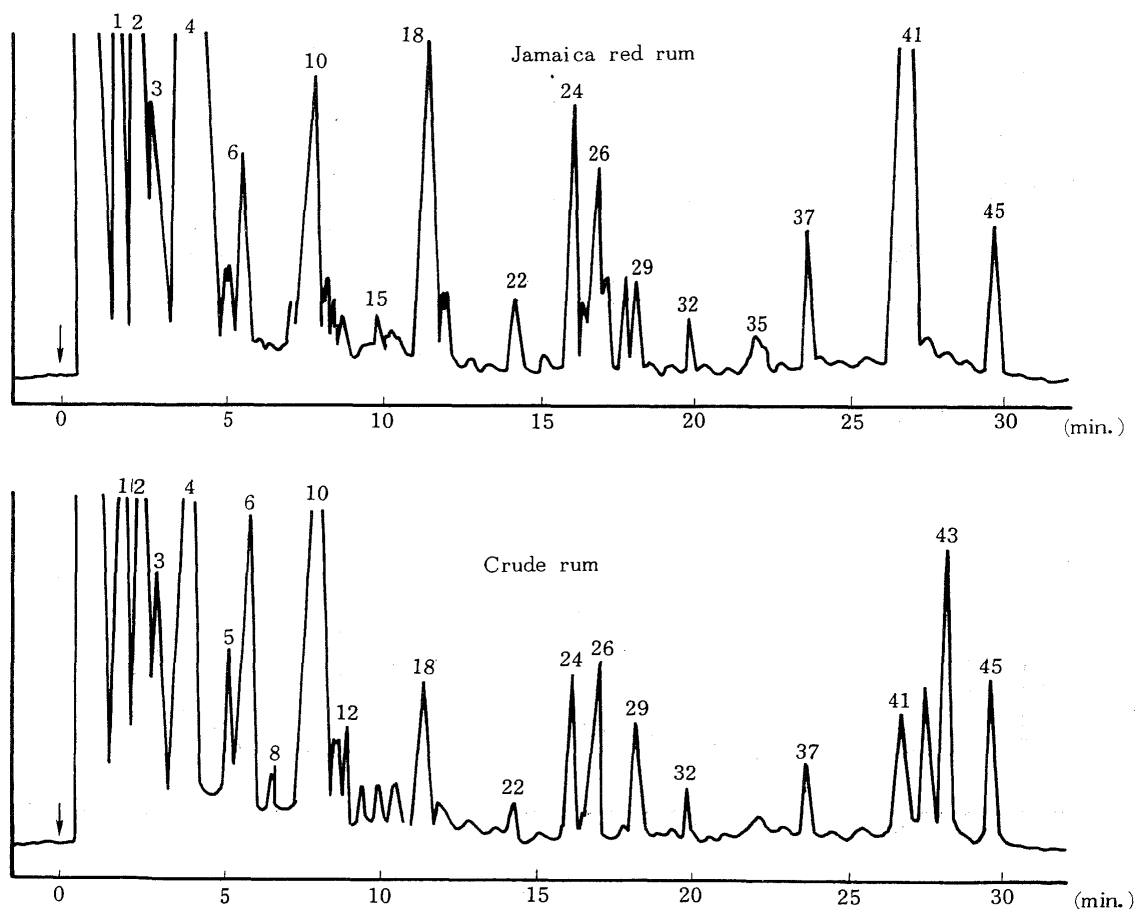


Fig.9 Gas chromatograms of chloroform extract of Crude rum and Jamaica red rum
Column : 1.5m of 5% of PEG 20M on celite 545 (80 to 100 mesh)
Column temperature : 70 to 240 , Programing : 6 /min.
Helium flow rate : 15ml/min., Detector : flame ionization detector

Crude rum のクロロホルム抽出物は Rum 特有の芳香をもっており、その芳香はジャマイカラムと官能的には区別できなかった。原料用アルコールからはクロロホルム抽出物は得られなかった。

Crude rum のクロロホルム抽出物のガスクロマトグラムは Fig.9 に示したとおりであり約 45 個のピークを検出した。このピークパターンはジャマイカラムのクロロホルム抽出物のガスクロマトグラムとほぼ類似しているが、各ピークの量的挙動は両者の間で相違している。

ことにジャマイカラムではピーク 4 が主成分となっているが、Crude rum ではピーク 10 が主成分であり、ピーク 4 の強度はこれに比較して弱い。これらの主なピークは Fig.10 に示したように主として中性及び塩基性区分に分別されている。

GC - Mass によりこれらの各ピークの同定を行なった。Fig.11 に示したようにピーク 1 は $m/e58$ が分子イオンピークとなっており、ベースピーク $m/e43$ はカルボニル化合物に特徴的な含酸素フラグメントイオンに帰属⁶⁾できることからピーク 1 の化合物をアセトン

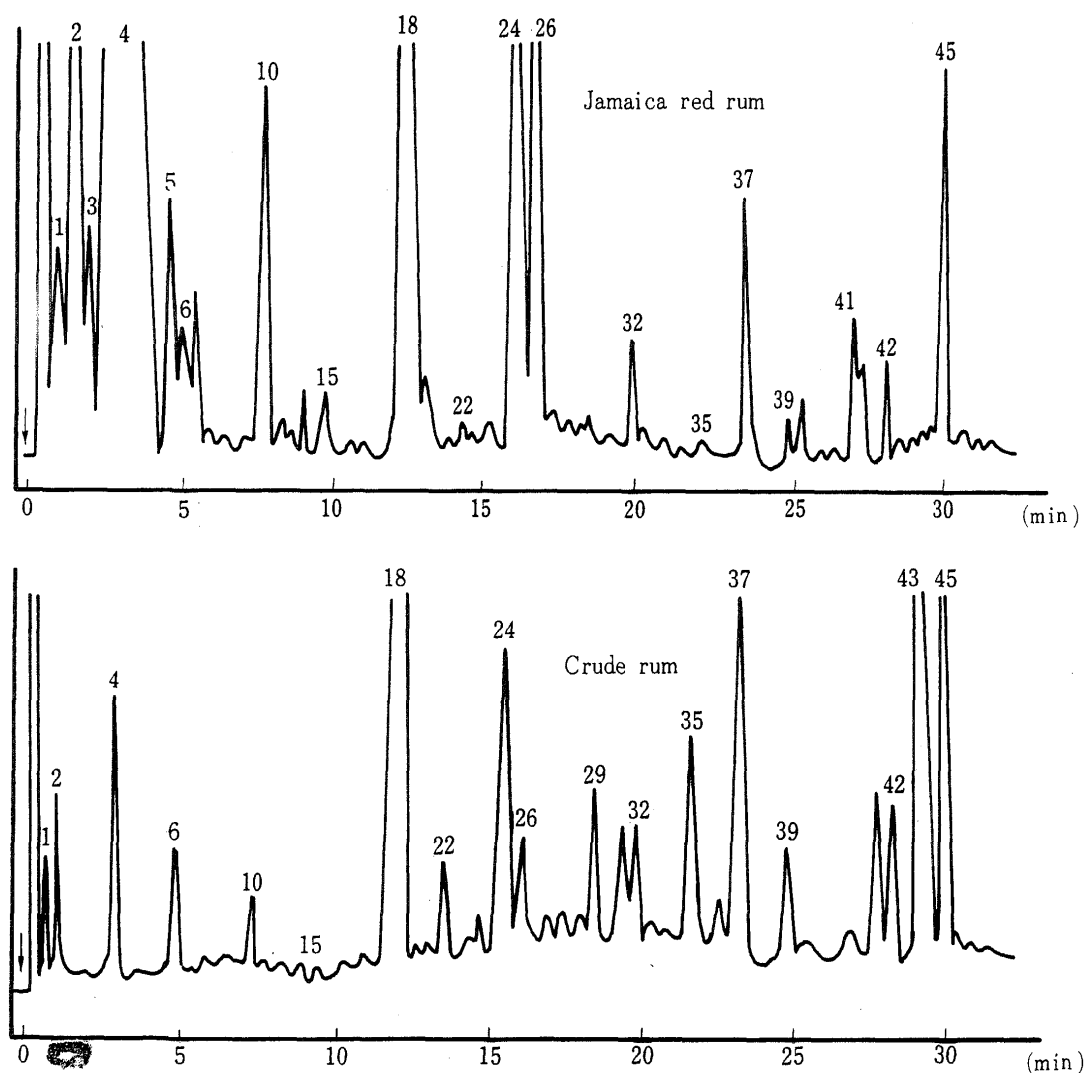


Fig.10 Gas chromatograms of neutral and basic fraction
Operating conditions are same as cited in Fig.9.

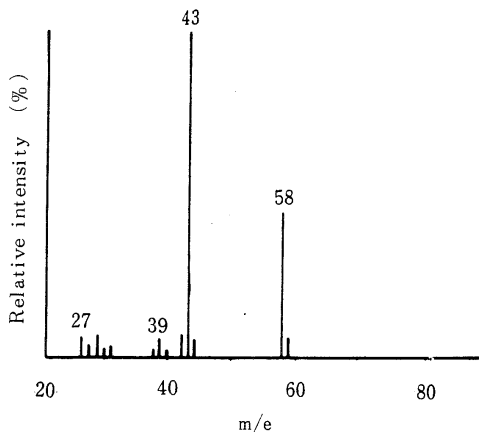


Fig.11 Mass spectrum of peak No.1
cited in Fig.9

と同定した。ピーク 2 は $m/e74$ の分子イオンピーク及び $m/e56(M - H_2O)$, $m/e57(M - OH)$ の脱水ピーク及び $m/e43$ (ベースピーク), $m/e31$ などのアルコールに特徴的なフラグメントイオンからこの化合物はイソブチルアルコールと確認した。そのマススペクトルは Fig.12 に示した。ピーク 4 は中性区分に主として分別されており, そのマススペクトルは Fig.13 に示したように $m/e70$ に強いフラグメントイオンピークを示し, $m/e55$ がベースピークとなっている。 $m/e88$ は分子イオンピークであるがその強度は極めて弱い。 $m/e31$, $m/e45$ などのピークはアルコール系化合物に特徴的なものであり, $M - H_2O(m/e70)$, $M - OH$ の各ピーク及び $m/e27, 41, 42, 43$ から, ピーク 4 は側鎖のある 3 - メチル - 1 - ブタノールと認めた。

フェノール画分の主な成分は Fig.14 に示したように, ピーク 24, 33, 42 であり, 主成分であるピーク 42 のマススペクトルは $m/e152$ に強い分子イオンピークを示し, $m/e151(M - 1)$ 及び $m/e41$ (ベースピーク) からパニリンと推定されるが確認できなかった。

Fig.10 に示したようにピーク 10, 18, 22, 24, 32, 37, 41, 45 は主として中性画分に分別されている。これらはマススペクトルから $C_9, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{14}, C_{16}$ の飽和脂肪酸エチルエステルであり, 主成分は C_8 の脂肪酸エチルエステルである。

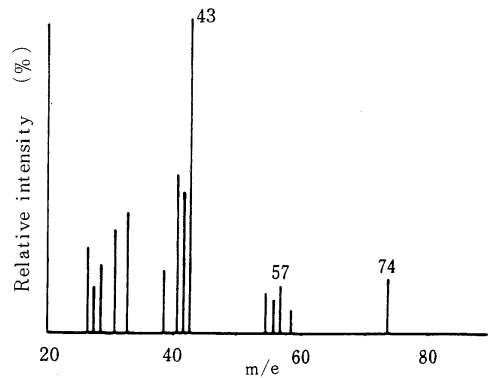


Fig.12 Mass spectrum of peak No.2
cited in Fig.9

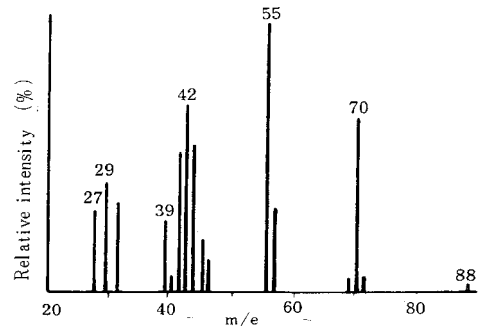


Fig.13 Mass spectrum of peak No.4
cited in Fig.9

各抽出区分のガスクロマトグラムは Crude rum とジャマイカラムではほぼ類似しているが, ピーク 4, 10, 18, 26, 37, 41, 43 の相対強度が異なっており, とくにピーク 43 は Crude rum では顕著である。

ピーク 26 は Fig.15 に示したように, $m/e122$ に分子イオンピークが認められ, $m/e91$ がベースピークとなっている。 $m/e91$ は芳香族アルキル化合物に特徴的なイオンピークであり,⁷⁾ 分子イオンが 開裂或いは Mc - Lafferty 転位を経て安定なトロピリウムイオンを生成したことを示している。 $m/e65$ はトロピリウムイオンから中性オレフィンが脱離したものであり, これらの結果はピーク 4 化合物を次の構造式()のものと考えれば説明できる。したがって, この化合物はマススペクトルの結果から 2 - フェニールエチルアルコールと確認した。

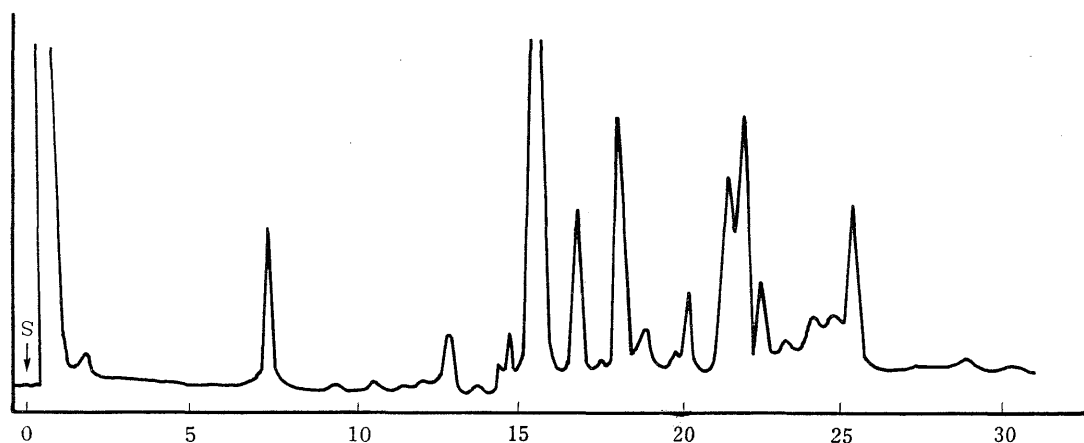


Fig.16 Gas chromatogram of acid fraction
Operating conditions are same as cited in Fig.9
Acid fraction is converted to methylesters with diazomethane

Table1. Aroma components in crude rum

Compound	Note	Compound	Note
isobutylaldehyde	spot 1	ethylcaprylate	peak 18
propylaldehyde	spot 2	ethylpelargonate	peak 22
acetaldehyde	spot 3	ethylcaprate	peak 24
acetone	peak 1	ethylundecylate	peak 32
isobutylalcohol	peak 2	ethylaurate	peak 37
3 - methyl - 1 - butanol	peak 4	ethylmyristate	peak 41
2 - phenylethylalcohol	peak 26	ethylparmitate	peak 45
ethyl caproate	peak 10	vaniline (?)	peak 42

この化合物の存在はこれまでラム酒では報告されていないものである。

他の微少ピークはこの方法では同定することはできなかった。また酸性画分についてはジアゾメタンでメチル化したのちガスクロマトグラフィーにより分離し約 24 個のピークを検出した、そのクロマトグラムを Fig.16 に示した、酸性成分については同定していないが今後検討したい。

Table 1 に Crude rum の芳香成分として分離確認した化合物を示してある。

4 . 総 括

Crude rum 及びジャマイカラムのヘッドスペース中のカルボニル成分を 2・4 - DNPH として捕集し、これを TLC により分離し、6 個のスポットを分取した。各スポットは UV, IR, Mass, NMR により、それぞれイソブチルアルデヒド、プロピルアルデヒド及びアセトアルデヒドであると確認した。ヘッドスペースのカルボニル成分は Crude rum とジャマイカラムでは全く一致しており、主成分はアセトアルデヒドであった。

エチレンから合成した原料用アルコールからはカルボニル成分は検出できなかったが、糖みつを原料として製造した原料用アルコールからは微量であるがラム酒と同様なカルボニル成分を検出した。

クロロホルムで抽出される香気成分の主なものはアセトン、イソブチルアルコール、3-メチル-1-ブタノール及び2-フェニルエチルアルコールであり、中性画分の主なものはC₆からC₁₆までの脂肪酸エチル

エステルである。Crude rum とジャマイカラムではピーク成分に本質的な相違はみられなかった。また2-フェニルエチルアルコールはこれまでラム酒の香気成分として報告されていない化合物である。

終りに本研究を行なうにあたり実験に種々協力願った佐藤宗衛技官に感謝する。

文 献

- 1) 大野幸雄, 出来三男: 本誌, No.9, 15 (1969) .
- 2) 出来三男, 大野幸雄: 本誌, No.10, 1 (1970) .
- 3) H. Maarse and M. C. ten Noever de Brauw: *J. Food Science*, **31**, 951 (1966) .
- 4) L. Nykänen, E. Puputti and H. Suo MaLacinen: *J. Food Science*, **33**, 88 (1968) .
- 5) J. H. Ross: *Anal. Chem.*, **25**, 1288 (1953)
- 6) A. C. Sharkey, J. L. Shultz and R. A. Friedel: *Anal. Chem.*, **28**, 934 (1956) .
- 7) R. A. Friedel, J. L. Shultz and A. C. Sharkey: *Anal. Chem.*, **28**, 926 (1956) .

On Aroma Components of Crude Rum

Mitsuo DEKI, Tokinobu KATO
Central Customs Laboratory
531, Iwase, Matsudo-shi Chiba-ken.

The volatile flavour components of crude rum imported from Australia and of Jamaica red rum have been analyzed by TLC, mass spectrometer combined with gas chromatography and NMR.

Carbonyl compounds in head space vapour were prepared as 2·4-dinitrophenylhydrazone. Aroma components in rum were extracted with chloroform in a separatory funnel. iso- Butylaldehyde, propylaldehyde and acetaldehyde were identified in head space vapour. A main component of carbonyl compound in it is acetaldehyde. Acetone, iso-butylalcohol, 3-methyl-1-butanol, 2-phenyl ethylalcohol and saturated fatty acid ethyl esters of C₆, C₈, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₄, C₁₆ were determined in chloroform extract of rum. 2-Phenylethylalcohol is a new compound which has not been found in rum.

Received Dec. 24, 1970