

ブロモクレゾールパープルと第四級アンモニウムイオン の変色反応を利用するエタノールの吸光光度定量

山本 幸市^{®*}, 本水 昌二^{**}

(1991年3月1日受理)

酸性染料ブロモクレゾールパープルは pH 8 付近の水溶液中, 長鎖アルキル基を持つ第四級アンモニウムイオンと反応し, 青色から淡黄色へと変化する。しかし, あらかじめアルコールが存在すると変色反応は阻害される。このことをエタノールの定量に利用した。検量線はバッチ法では直線とはならないが, FIA 法では 60% (v/v) まで直線性を示した。FIA 法においてエタノール 4, 20% (v/v) の 5 回の繰り返し実験の相対標準偏差はそれぞれ 1.5%, 0.2% であり, 毎時約 35 サンプルの測定が可能であった。本法は酒類 (しょうちゅう) 中のエタノールの迅速・簡便な定量法として用いることができる。

1 緒 言

第四級アンモニウムイオン (Q^+) は, 金属錯体陰イオンとのイオン会合体の溶媒抽出又は可溶化による微量金属の吸光光度定量法において, 感度並びに選択性の向上などのために幅広く用いられている¹⁾。小原らは金属イオンと有機配位子との錯形成反応における Q^+ の効果を, 酸性色素分子の Q^+ ミセルへの吸着に基づき説明している²⁾。著者らは, 酸性色素分子と臨界ミセル濃度以下の Q^+ との相互作用について検討し, ブロモクレゾールパープル (BCP) の pH 8 付近の溶液に長鎖アルキル基を有する Q^+ 溶液を添加すると青色から淡黄色へと色調が変化することを見いだした。その結果, この変色反応を抑制する陰イオン界面活性剤の定量が可能であった³⁾。

本報では, セチルトリメチルアンモニウムイオンによる BCP の変色反応に及ぼすエタノールの抑制効果を利用して, 酒類 (しょうちゅう) 中のエタノールの迅速かつ簡便な FIA 法を開発した。

2 実 験

2.1 装 置

分光光度計: 吸光度及び吸収スペクトルの測定には日

本分光工業製 UVIDEC-430A 型分光光度計を用い, セルはすべて光路長 1 cm のものを用いた。

振り混ぜ器: イワキ製 V-SX 型 KM シェーカーを用いた。

FIA 装置: Fig. 1 にフローダイアグラムを示す。流路は樹脂製コネクター類と内径 0.5 mm の PTFE チューブを用いて構成した。ポンプはサヌキ工業製ダブルプランジャー型マイクロポンプ (DMX-2300-T) を用い

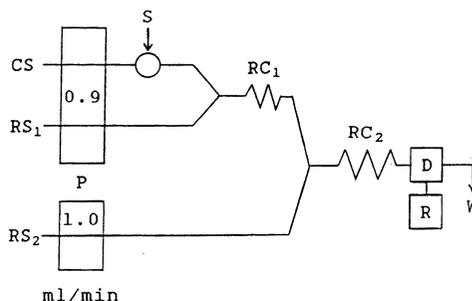


Fig. 1 Schematic diagram of flow system for ethanol determination

CS: carrier solution (H_2O); RS: reagent solution {1: 2.5×10^{-5} M BCP, 0.03 M phosphate buffer (pH 8.1); 2: 2×10^{-3} M CTMA-Cl}; P: pump; S: sample injector (sampling loop 250 μ l); RC: reaction coil {1: 0.5 mm i.d. \times 0.5 m; 2: 0.5 mm i.d. \times 3 m}; D: detector (591 nm); R: recorder; W: waste

* 米子工業高等専門学校工業化学科: 683 鳥取県米子市彦名町 4448

** 岡山大学理学部化学科: 700 岡山県岡山市津島中 3-1-1

た。検出器は 8 μ l のフローセルを持つ相馬光学製可視分光検出器 S-3250 型を用い、記録計 (横河電機 LR4200) にて吸光度変化を測定した。

2・2 試薬

BCP 溶液: BCP (和光純薬工業製, 試薬特級) の 0.0135 g を 0.01 M 水酸化ナトリウム溶液 5 ml に溶かし、水で 200 ml として 1.25×10^{-4} M 溶液を調製した。他の濃度の溶液についてこれを希釈して調製した。

第四級アンモニウムイオン (Q^+) 溶液: セチルトリメチルアンモニウムクロライド (CTMA-Cl, 東京化成工業製, 純度 95% 以上), ステアリルトリメチルアンモニウムクロライド (STMA-Cl, 東京化成工業製, 純度 97% 以上), ゼフィラミン (Zeph-Cl, 同仁化学製, 純度 98% 以上), セチルジメチルベンジルアンモニウムクロライド (CDMBA-Cl, 東京化成工業製, 純度 95% 以上) を精製することなしに使用した。 10^{-3} M 水溶液を調製し、適宜希釈して使用した。

アルコール: 和光純薬工業製特級メタノール, エタノール, 1-プロパノール, 2-プロパノール及び 2-メチル-2-プロパノールをそのまま用いた。

活性炭: Darco G-60 (和光純薬工業製) をそのまま用いた。

その他の試薬はすべて市販品特級をそのまま用いた。

2・3 実験操作

2・3・1 標準操作 共栓付き試験管に 1.25×10^{-4} M の BCP 溶液を適量採り、pH 8.1 のリン酸緩衝溶液 (0.1 M) 1 ml, アルコールを含む試料水溶液を加え混合後、 Q^+ 溶液で 10 ml とする。その後 200 rpm で 15 分間振り混ぜ、蒸留水を対照として波長 591 nm の吸光度を測定する。

2・3・2 FIA によるエタノールの定量法 Fig. 1 に示す FIA 装置を用い、試料溶液を注入バルブによりキャリヤー流れに注入する。ピーク高さを測定し、あらかじめ作成しておいた検量線からエタノール含量を求める。

3 結果及び考察

3・1 吸収スペクトル

2・3・1 の標準操作法により得られたエタノールを含む溶液の吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。解離型の BCP^{2-} は 588 nm に吸収極大を示す。更に $Zeph^+$ が存在すると相互に作用して 588 nm の吸収は大きく低下し、591 nm に吸収極大を示す。又 BCP^{2-} 及び $Zeph^+$

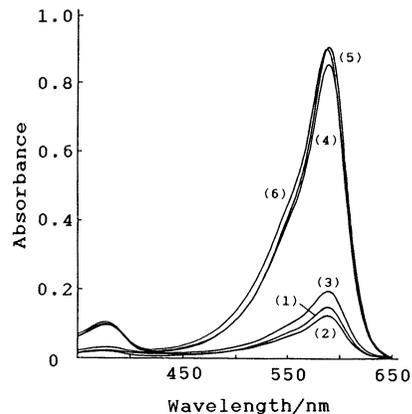


Fig. 2 Absorption spectra

BCP: 1.25×10^{-5} M. Zeph-Cl(M): (1)~(5), 1.25×10^{-5} ; (6), 0. Ethanol (v/v %): (1) and (6), 0; (2), 4; (3), 8; (4), 12; (5), 16. pH: 8.0

を含む溶液にアルコールを添加しても極大吸収波長は変わらず、アルコール含量の増加と共に 591 nm の吸収は急激に増加する。これはエタノール濃度の増加とともに BCP^{2-} 及び $Zeph^+$ にエタノールが溶媒和しやすくなり、 BCP^{2-} の $Zeph^+$ とのイオン会合反応が抑制されるものと思われる。

3・2 BCP 溶液の調製法及びアルコール濃度の影響

BCP 溶液は I 法 (2・2 による) と II 法 (所定量の BCP をエタノール 10 ml に溶解し、水で 200 ml として 1.25×10^{-4} M 溶液とする) による調製した。BCP 溶液調製後の経過日数及びエタノール濃度の 591 nm の吸光度に及ぼす影響を Fig. 3 及び 4 に示す。I 法においてはエタノール濃度 20% (v/v) を除いて経過日数による吸光度の変動は少なく、16% (v/v) までのエタノール濃度範囲で吸光度は小さい。II 法ではエタノール濃度 0 において経過日数による吸光度のばらつきが見られる。又、4~12% (v/v) のエタノール濃度範囲で 1 日目までは吸光度は小さく、2 日目以降は吸光度が大きい。BCP を少量の希水酸化ナトリウム溶液に溶解して調製した場合染料分子の会合は起こらないが、BCP を少量のエタノールに溶解して調製した場合染料分子は時間の経過と共に会合し、このことが BCP^{2-} の $Zeph^+$ とのイオン会合反応を抑制しているものと思われる。BCP 溶液の安定性及び BCP と長鎖第四級アンモニウムイオンとの相互作用による変色効果を考慮して BCP は I 法により調製した。

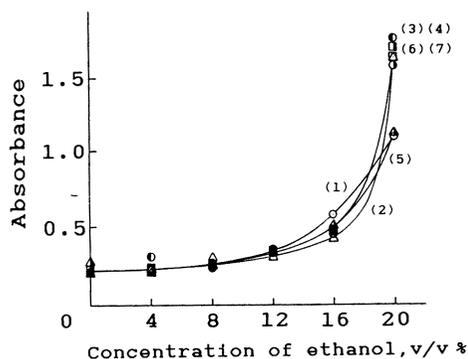


Fig. 3 Effect of elapsed time after preparation of BCP solution on absorbance

Time (d): (1)-(○), 0; (2)-(△), 1; (3)-(□), 2; (4)-(●), 3; (5)-(▲), 4; (6)-(■), 5; (7)-(●), 6. BCP (dissolved in dilute sodium hydroxide solution): 2.5×10^{-5} M; Zeph-Cl: 2.5×10^{-5} M. pH: 8.0. Reference: distilled water; $\lambda = 591$ nm

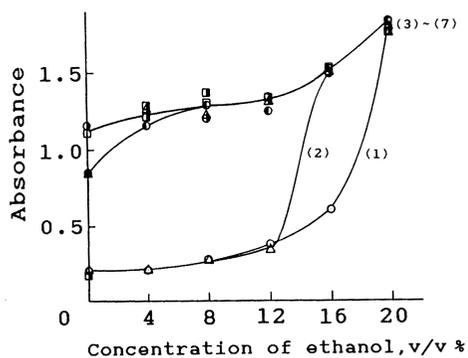


Fig. 4 Effect of elapsed time after preparation of BCP solution on absorbance

Time (d): (1)-(○), 0; (2)-(△), 1; (3)-(□), 2; (4)-(●), 3; (5)-(▲), 4; (6)-(■), 5; (7)-(●), 6. BCP (dissolved in ethanol): 2.5×10^{-5} M; Zeph-Cl: 2.5×10^{-5} M. pH: 8.0. Reference: distilled water; $\lambda = 591$ nm

3.3 アルコールの種類と濃度の影響

1.25×10^{-5} M BCP, 2.5×10^{-5} M Zeph⁺ と 2.5×10^{-5} M BCP, 2.5×10^{-5} M Zeph⁺ の二つの場合について、変色反応に及ぼす各種アルコールの影響を Fig. 5(a), 5(b) に示す。591 nm における吸光度の増加に及ぼす影響はメタノール < エタノール < 2-プロパノール < 2-メチル-2-プロパノール ≤ 1-プロパノールの順に大きくなる。

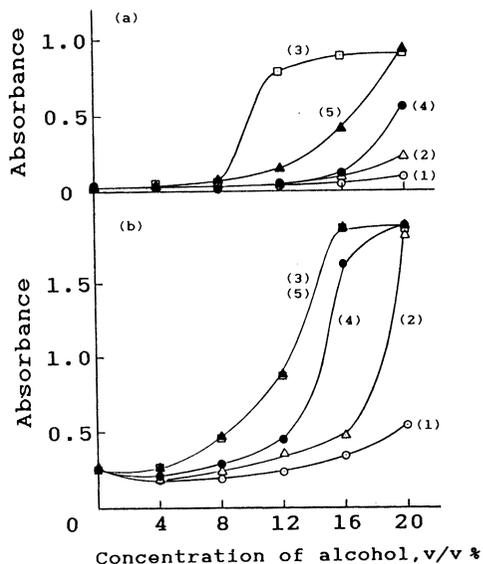


Fig. 5 Effect of alcohol concentration on absorbance

Alcohol: (1)-(○), methanol; (2)-(△), ethanol; (3)-(□), 1-propanol; (4)-(●), 2-propanol; (5)-(▲), 2-methyl-2-propanol. BCP: (a) 1.25×10^{-5} M, (b) 2.5×10^{-5} M; Zeph-Cl: 2.5×10^{-5} M. pH: 8.0. Reference: distilled water; $\lambda = 591$ nm

これはアルコールのアルキル鎖の長さすなわち疎水性の増加の順と一致している。又、BCP は高濃度のほうが吸光度の変化の割合は大きい。これは BCP^{2-} の Zeph⁺ とのイオン会合に基づく変色反応において過剰の Zeph⁺ が少ないため、アルコール溶媒和によるイオン会合の抑制効果が働くものと思われる。

3.4 Q^+ の種類の影響

$BCP^{2-}-Q^+$ 系の変色反応に及ぼす Q^+ の種類の影響を Fig. 6 に示す。エタノール濃度の増大に伴う 591 nm での吸光度の増加に及ぼす影響は $CDMBA^+ \leq Zeph^+ < STMA^+ < CTMA^+$ である。 Q^+ はそのアルキル鎖の長いものほどすなわち疎水性の大きいものほど BCP と強くイオン会合するため、変色反応におけるエタノールの影響を受けにくいことが分かる。

3.5 FIA によるエタノールの定量

Fig. 5(a), 5(b) 及び 6 は 2.3.1 のバッチ法 (物理及び化学平衡状態下での測定法) によるエタノールの定量のための検量線の一つであるがいずれも直線とはならな

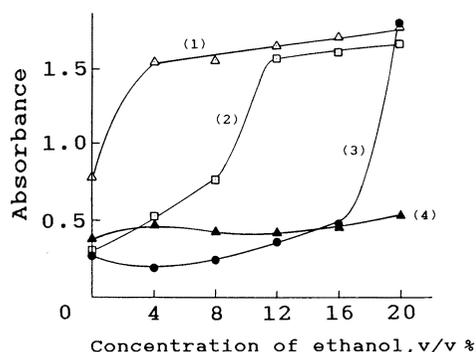


Fig. 6 Effect of quaternary ammonium surfactant on absorbance

Quaternary ammonium surfactant (2.5×10^{-5} M): (1)-(△), CTMA-Cl; (2)-(□), STMA-Cl; (3)-(●), Zeph-Cl; (4)-(▲), CDMBA-Cl. BCP: 2.5×10^{-5} M. pH: 8.0. Reference: distilled water; $\lambda = 591$ nm

い。従って、Fig. 1 に示す FIA 装置を用いて非平衡状態でのエタノールの定量を試みた。BCP 濃度、 Q^+ の種類 (CTMA⁺, STMA⁺, Zeph⁺, CDMBA⁺) 及び Q^+ 濃度の感度、ピーク高さの再現性及びベースラインの安定性に及ぼす影響を検討した結果、BCP 濃度: 2.5×10^{-5} M, Q^+ : CTMA⁺ 及び CTMA⁺ 濃度: 2×10^{-5} M が最適条件であった。次に反応コイル RC₁ の長さを 0.5~2.5 m, 反応コイル RC₂ の長さを 0.5~3.0 m の範囲で変えて検討した結果、ピーク高さはほとんど変わらなかった。ピーク高さの再現性の良い RC₁=0.5 m, RC₂=3.0 m を用いることにした。CS 及び RC₁ の流量を 0.4~1.05 ml/min, RS₂ の流量を 0.5~1.1 ml/min まで変えて検討したところ、流量が増大するとピーク高さは若干低下した。感度及び分析速度を考慮して CS と RS₁ は 0.9 ml/min, RS₂ は 1.0 ml/min の流量で送液した。又試料注入量を 50~300 μ l まで変えたところ、ピーク高さは注入量の増大とともに急激に上昇し、200 μ l 以上で一定のピーク高さを与えた。注入量の増大による分析速度の低下は小さい。感度、分析速度及び試料注入量の影響を考慮して、注入量 250 μ l を用いることにした。以上の検討結果より検量線を作成したところ、Fig. 7 に示すようにエタノール 60% (v/v) までの範囲で良好な直線性が得られた。なお、エタノール 4%, 20% を含む溶液の 5 回の繰り返し実験の相対標準偏差はそれぞれ 1.5%, 0.2% であった。この検量線を用いて実際試料 (しょうちゅう, ウイスキー, 清酒) 中の

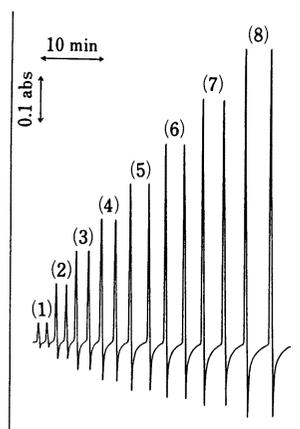


Fig. 7 Flow signals for ethanol

Ethanol (v/v %): (1), 4; (2), 12; (3), 20; (4), 28; (5), 36; (6), 44; (7), 52; (8), 60

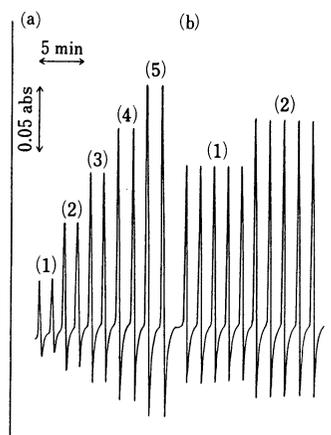


Fig. 8 Flow signals for ethanol (a) and flow signals obtained in the determination of ethanol in alcoholic liquor (b)

(a) ethanol(v/v %): (1), 4; (2), 8; (3), 12; (4), 16; (5), 20. (b) shochu(2-fold dilution): (1), sample A; (2), sample B

エタノールの定量を行った結果を Table 1 に示す。Fig. 1 に示す FIA システムにウイスキー試料をそのまま注入するとかなり大きな正の誤差を与える。そこでウイスキー試料は活性炭前処理 (最適な前処理法: 遠沈管に活性炭約 100 mg 採り, 試料 3 倍希釈溶液 10 ml を加えて 15 分間振り混ぜ, その後 3000~4000 rpm で 5 分間遠心分離する) をした後、測定した。ウイスキー, Sake B

Table 1 Determination of ethanol (v/v%) in alcoholic liquors

Sample		Indicated value	Present method ^{b)}	Other method ^{b)c)}
Shochu	A	25	25.6±0.2(5)	25.0±0.1(5)
	B	35	34.1±0.1(5)	35.4±0.2(5)
Whisky ^{a)}	A	40	42.7±0.2(3)	38.4±0.1(5)
	B	43	54.0±0.0(5)	41.7±0.1(5)
Sake	A	14~15	14.3±0.1(5)	14.4±0.2(5)
	B	15~16	11.4±0.1(5)	16.2±0.1(5)

a) with pretreatment with activated carbon. b) mean value. The figures in parentheses are the number of measurements. c) gas chromatographic method⁴⁾⁵⁾

を除いて他の測定法 (GC) による定量結果とよく一致している。ウイスキー、清酒は共存物質が測定を妨害するため活性炭以外の何らかの前処理が必要である。Fig. 8 に検量線用標準溶液としょうちゅう試料を注入したときのシグナルの一例を示す。本法はしょうちゅう中のエタノールの簡便・迅速 (毎時約 35 サンプル分析処理) な定量法として有用である。

文 献

- 1) 上野景平: 分析化学, **20**, 736 (1971).
- 2) 小原人司, 石橋信彦, 増崎俊明: 分析化学, **19**, 467 (1970).
- 3) 山本幸市, 池原宏治, 本水昌二: 分析化学, **39**, 393 (1990).
- 4) 注解編集委員会編: “第 3 回改正国税庁所定分析法注解”, (1981), (日本醸造協会).
- 5) 日本化学会編: “実験化学講座続 9, ガスクロマトグラフィー”, p. 294 (1965), (丸善).

☆

Spectrophotometric determination of ethanol in water based on color change of Bromocresol Purple with a quaternary ammonium ion. Koichi YAMAMOTO* and Shoji MOTOMIZU** (*Department of Industrial Chemistry, Yonago National College of Technology, 4448, Hikona-cho, Yonago-shi, Tottori 683; **Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-naka, Okayama-shi, Okayama 700)

In an aqueous solution buffered at pH 8, Bromocresol Purple reacts with a quaternary ammonium ion containing a long-chain alkyl group to change color from blue to light yellow. This color change, however, is inhibited in the presence of alcohols such as methanol, ethanol, propanol and butanol. This phenomenon was used to determine ethanol content in aqueous solutions. The calibration curve obtained by the batchwise manual method was not a straight line. In the FIA method, a linear relationship between the peak heights and the ethanol concentrations was obtained up to 60 v/v% of ethanol, and the relative standard deviations were 1.5 and 0.2% for the determinations ($n=5$) of 4 and 20 v/v% of ethanol, respectively. FIA made it possible to analyze about 35 samples per hour. This proposed method can be used as a rapid and simple method for the determination of ethanol content in alcoholic liquors.

(Received March 1, 1991)

Keyword phrases

spectrophotometric determination of ethanol; FIA; Bromocresol Purple; quaternary ammonium ion; alcoholic liquors.