水-アルコール混合溶媒中におけるテトラブロモフェノールフタレインエチルエステルの発色に基づくエタノールの吸光光度定量

細井 康宏，本水 昌二®*

(1988 年 2 月 6 日受理)

トリフェニルメタン系酸性色素のテトラブロモフェノールフタレインエチルエステル (TBPE) は水溶液中，弱酸性条件下で酸型 TBPE·H の黄色沈殿を生じる．しかし非イオン性界面活性剤 Triton X-100 の共存により，TBPE·H は可溶化する．そこへアルコールを加えると，解離型の $TBPE^-$ の生成による青色 ($\lambda_{max}=590$ nm) を発する．この発色反応を酒類中のエタノールの定量に利用した．検量線は直線とはならないが，定量可能範囲は最終濃度で 1～10% (v/v) であった．実際試料 (清酒，ウイスキー，しょうちゅう) では，活性炭により前処理をした後定量に用いた．本発色系は FIA にも応用され，その場合前処理は必要なく，毎時 45 サンプルの測定が可能であった．

1 緒　言

酸性色素のテトラブロモフェノールフタレインエチルエステル (TBPE と略記) は，酸塩基指示薬 (酸解離定数 $pK_a=4.2$) の一つであるが，タンパク質の鋭敏な検出試薬としても用いられている．最近では，酒井らにより第四級アンモニウムイオン，アミン，アルカロイド及び金属キレート陽イオンの抽出-吸光光度定量用試薬として多用されている[1)~4)]．TBPE の酸型 (TBPE·H と略記) は黄色固体であるが，クロロホルム，1,2-ジクロロエタンなどの有機溶媒にもよく溶解し，黄色を発する．この黄色の溶液にアルコールを加えると解離型の青色を発するが，これはアルコールの溶媒和により TBPE·H の解離が促進されるものと解釈される[5)]．

一方，TBPE·H は水にはほとんど溶解しないが，非イオン性界面活性剤の Triton X-100 (TX-100 と略記) を少量 (0.01%) 加えると可溶化し，黄色となる．これにアルコールを加えると青色に変色することを見いだした．

酒類中のエタノールの定量法として国税庁が指定している方法は，(1) 蒸留の留液の比重測定，及び (2) 二クロム酸カリウムを用いる酸化法，(3) GC などがある[6)]．最近，高橋らは導電率測定に基づく酒類中エタノールの定量を行い，良好な結果を得ている[7)]．本報では，水溶液中での TBPE·H の変色に基づく酒類中のエタノールの簡便な吸光光度定量法について報告する．更に FIA 法にも適用し，迅速分析法とすることができたので併せ報告する．

* 岡山大学理学部：700　岡山県岡山市津島中 3-1-1

2 実　験

2·1 装　置

分光光度計：吸収スペクトルの測定には島津ダブルビーム自記分光光度計 UV-300 を，吸光度の測定には 139 型日立分光光度計を用い，セルはすべて光路長 1 cm のものを用いた．

振り混ぜ器：大洋 Recipro Shaker SR-1 を用いた．

遠心分離器：島津遠心分離器 CPN-500 を用いた．

FIA 装置：Fig. 1 にフローダイヤグラムを示す．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 (DM2M-1026 型) を用い，送液は 0.8 ml/min で行った．検出器は 8 μl 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 (東亜電波工業，FBR-251A) にて吸光度変化を記録した．

2·2 試　薬

TBPE 溶液：TBPE のカリウム塩 (TBPE·K と略記，和光純薬工業) の 0.070 g をエタノール (99.5%，和光純薬工業) に溶解して，100 ml とした (1.0×10^{-3} M)．

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-

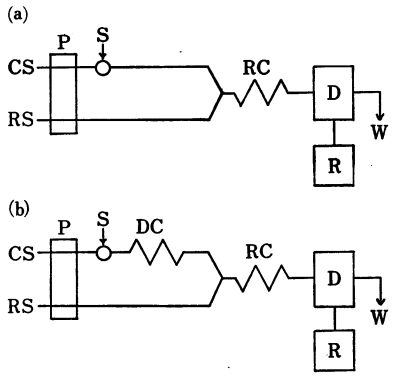

Fig. 1 Schematic diagram of flow system

CS : carrier solution (water); RS : reagent solution {2.0×10^{-5} M TBPE, 0.02% Triton X-100, 0.08 M acetate buffer (pH 4.4)}; P : double plunger pump (0.8 ml/min); S : sample injection (100 μl); DC : dilution coil (0.5 mm×3 m); RC : reaction coil (0.5 mm×1 m); D : detector (Soma S-3250, 590 nm); R : recorder, W : waste

プロパノールをそのまま用いた.

TX-100 溶液：TX-100 (和光純薬工業) を 50 ml 採り，これに熱水を加えて溶解した後，放冷し，500 ml にしたものを 10 v/v% 溶液とし，これを適宜希釈して用いた.

活性炭：Darco G-60 (和光純薬工業) をそのまま用いた.

その他の試薬はすべて市販品特級を用いた.

2・3 実験操作

2・3・1 標準操作 25 ml のメスフラスコに 1.0×10^{-3} M の TBPE・K エタノール溶液 0.25 ml を採り，TX-100 の 0.05% 溶液 5 ml，エタノールを含む試料溶液 5 ml, pH 4.4 の酢酸緩衝溶液 (1 M) 1 ml を加えた後，蒸留水を標線まで加えてよく混合し，波長 590 nm の吸光度を測定する.

2・3・2 酒類試料の前処理 遠沈管に Darco G-60 を約 25 mg 採り，試料を 10 ml 加えて 15 分間振り混ぜ，その後 3000 rpm で 5 分間遠心分離した後，上澄み液を試料溶液として用いる.

2・3・3 FIA によるエタノールの定量法 Fig. 1 に示す FIA 装置により，酒類中のエタノールを定量した. (a) では 2・3・2 により前処理した試料を，(b) では前処理をしていない試料 100 μl を六方注入バルブによりキャリヤー流れへ注入した. 同様に (a) では 2・3・2 により前処理した，(b) では前処理をしていないアルコール濃度既知の標準溶液を注入し，得られたピーク高さを用いて検量線を作成した.

3 結果及び考察

3・1 吸収スペクトル

2・3・1 の標準操作により得られた，0～10% のアルコールを含む溶液の吸収スペクトルを Fig. 2 に示す. 本法の場合，TX-100 はエタノールの低濃度領域での TBPE・H の沈殿を防ぐために必要なものであり，エタノールが高濃度 (約 6% 以上) 存在するときは，特に必要とされない. Fig. 2 の吸収曲線は，エタノールが 6% 未満のものでは等吸収点 (480 nm) を通り，6% 以上の場合に，長波長側の等吸収点 (498 nm) を通っている. すなわち，アルコールが増すにつれて TBPE の可溶化は TX-100 系から水-エタノール系に移行し，エタノールが 6% 以上では TX-100 は重要な役割をしていないものと考えられる.

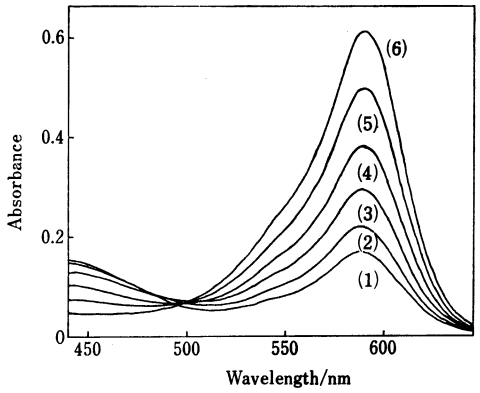

Fig. 2 Absorption spectra

Ethanol (%) : (1) 0, (2) 2, (3) 4, (4) 6, (5) 8, (6) 10; TBPE : 1.0×10^{-5} M; Triton X-100 : 0.01%; pH : 4.4

3・2 吸光度に及ぼす TX-100 濃度及びアルコールの影響

TBPE-TX-100 系における TX-100 の濃度による試薬から試験の吸光度 (測定波長 603 nm) に及ぼす影響を Fig. 3 に示す. Fig. 3 から分かるように，TX-100 が非常に低濃度の場合，TBPE は TBPE・H として十分に可溶化せず黄色の沈殿となっているため，濁りによる吸収が見られる. TX-100 の増大と共に沈殿は可溶化するため，濁度はわずかずつ減少し，TX-100 が 0.01% 付近で濁度は極小となる. 更に TX-100 を増すと吸光度は徐々に増加し，臨界ミセル濃度 (CMC) 0.015% 以上になると，解離型の $TBPE^-$ の生成によると思わ

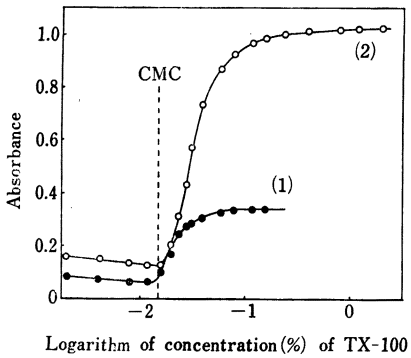

Fig. 3 Effect of Triton X-100 concentration on the absorbance

[TBPE]/10^{-5} M : (1) 1.0, (2) 3.0; pH : 4.0 (acetate buffer, 0.1 M)

れる 600 nm 付近の吸収が増加するが，十分高濃度になると吸光度はほぼ一定となる．CMC 以後の吸光度の増加は，ミセル中に取り込まれた TBPE·H が，一部解離型の $TBPE^-$ になるためと思われる．この現象は，クロロホルム-アルコール混合溶媒中で，TBPE·H が解離型になり 600 nm 付近に吸収を示す現象とよく似ている．今回は TBPE·H が沈殿せず，又，試薬から試験値が小さい 0.01% の TX-100 濃度を用いることにした．

Fig. 4 に TBPE·H の変色に及ぼす各種アルコールの影響を示す．Fig. 4 は検量線の一種であるが，いずれも直線とはならない．590 nm における吸光度の増加

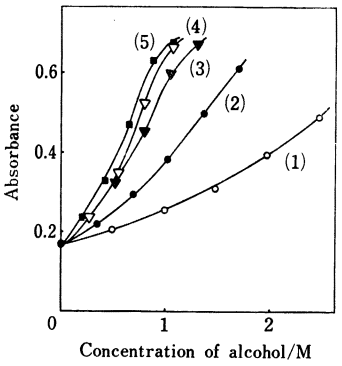

Fig. 4 Effect of alcohol concentration on the absorbance

Alcohol : (1) methanol, (2) ethanol, (3) 2-propanol, (4) 1-propanol, (5) 2-methyl-2-propanol; TBPE : 1.0×10^{-5} M; Triton X-100 : 0.01%; pH : 4.4

に及ぼす影響はメタノール<エタノール<プロパノール<ブタノールの順に大きくなる．これはアルコールのアルキル鎖の疎水性の増加の順と一致している．又，アルコール濃度が 6% 以上になると TBPE·H は沈殿とはならず，又，590 nm の吸光度も TX-100 が存在する場合とほぼ同じである．

3·3 pH の影響

エタノールの検量線に及ぼす pH (3.6～4.6) の影響を Fig. 5 に示す．低い pH では低濃度のエタノールの定量が困難となり，又高い pH では試薬から試験値が高くなる．そこで今回は 1～10% 程度のエタノールの定量に対するものとして，pH は 4.4 を用いることとした．

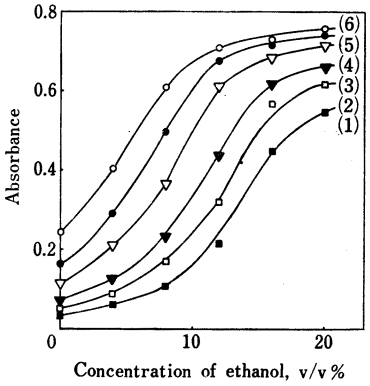

Fig. 5 Effect of pH on the calibration curves of ethanol

pH : (1) 3.6, (2) 3.8, (3) 4.0, (4) 4.2, (5) 4.4, (6) 4.6; TBPE : 1.0×10^{-5} M; Triton X-100 : 0.01%; Buffer : 0.04 M

3·4 試料溶液の前処理

実際試料（清酒，ウイスキー，しょうちゅう）をそのまま測定に用いると，清酒では約 1 %小さい値となり，又ウイスキーは約 10% 小さい値となった．そこで活性炭前処理をした後測定に用いることにした．

3·4·1 活性炭の量　試料溶液（ウイスキー：表示エタノール濃度 40%）10 ml につきクロマト用活性炭，Darco G-60 を 0～40 mg 添加して検討した結果，25 mg 以上のもので，その吸光度は一定となった．そこで今回は 25 mg/10 ml を用いることにした．

3·4·2 振り混ぜ時間　試料溶液（ウイスキー）10 ml につき活性炭を 25 mg 添加し，振り混ぜ時間を 0～

30 分間まで検討した結果，15 分間以上でその吸光度は一定となった．そこで振り混ぜ時間は 15 分間と決めた．

3•4•3 遠心分離時間 活性炭を沈降させるために 3000 rpm で遠心分離したところ，約 5 分間でほぼ完全に遠心分離されることが分かった．

3•5 検量線

エタノールの最終濃度が 10% までの検量線を用いることとした．検量線の一例は Fig. 5 に示した．検量線は直線とはならないが，10% まで，すなわち 2·3·1 の標準操作法では試料溶液は 5 倍に希釈されているので実際試料としては 50% までのエタノールを定量することが可能である．なお，エタノール 1% 及び 10% を含む溶液の 5 回の繰り返し実験の相対標準偏差は 4.8% 及び 0.3% であった．

この検量線を用いて，実際試料（清酒，ウイスキー，しょうちゅう）中のエタノールの定量を行った結果を Table 1 に示す．回収率実験の結果も良好であり，他法（GC：気-液クロマトグラフィー）による定量結果も良く一致している．

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

Sample[a]	Present methods[b]			Other method[f]
	Batch-wise (recovery, %)[c]	FIA (1)[d]	FIA (2)[e]	
Sake				
A	14.5±0.5 (98.8)	15.7±0.1	15.9±0.0	
B	15.5±0.5 (98.8)	15.7±0.2		16.2
Shochu				
A	25.5±0.3 (98.8)	25.7±0.1	25.7±0.1	25.5
B	25.5±0.3 (98.8)	26.0±0.1	25.6±0.1	25.8
Whisky				
A	40.0±0.4(101.3)	39.4±0.2	40.2±0.1	40.5
B	40.0±0.1(100.0)	40.6±0.2	41.2±0.1	41.4
C	38.0±0.1(100.0)	38.4±0.1	38.4±0.1	37.8

a) Indicated value : sake=15～16%, shochu=25%, whisky A, B=40%, C=37%. b) The mean value of the three determinations and the difference between the mean value and each determination. c) Ethanol corresponding to 20% was added to the sample solution, and the recovery percentage was obtained. d) With pretreatment with activated carbon {flow system (a) in Fig. 1}. e) Without pretreatment with activated carbon {flow system (b) in Fig. 1}. f) Gas chromatographic method[6)8)].

3•6 FIA による酒類中のアルコールの定量

本法を FIA に応用したときのマニホールドを Fig. 1 に示す．(a) の系を用いて実際試料をそのまま注入すると，ウイスキーは数パーセントの負の誤差を与える．そこでこの系を用いる場合には，試料溶液を 2·3·2 により前処理をした後に，注入しなければならない．そのときの検量線用シグナルの一例を Fig. 6(a) に示す．しかし Fig. 1(b) に示した系を用いると，前処理なしで実際試料を定量することができた．これは注入バルブの後に付けた希釈コイルにより試料溶液が分散，希釈されるため，共存物質による妨害が抑制されるためと考えられる．この系に検量線用標準溶液と実際試料を注入したときのシグナルの一例を，Fig. 6(b) に示す．感度は若干悪くなるが，前処理なしで酒類中のエタノールを定量でき，非常に簡単，迅速な分析法となる．又 Fig. 6 のベースラインは少しドリフトしているが，これは TBPE·H のフローセルへの吸着のためと思われる．純アルコールを 2～3 回注入すれば，ベースラインはほぼ元に戻る．なお，試薬溶液はキャリヤーの蒸留水と合流して 2 倍に希釈されるため，すべて 2·3·1 のバッチ法の標準操作法で用いた最終濃度の 2 倍とした．得られた検量線はバッチ法のときと同様，直線とはならないが実際試料中のエタノールの定量は十分可能である．より低濃度の

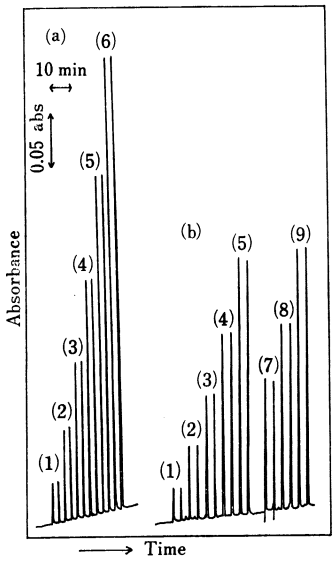

Fig. 6 Flow signals for ethanol

Ethanol (%) : (1) 5, (2) 10, (3) 15, (4) 20, (5) 25, (6) 30; Alcoholic liquor : (7) sake, (8) whisky (2-fold dilution), (9) shochu

アルコールの定量は検出器のダイナミックレンジを変えることにより可能となる．例えば吸光度 0.2 のフルスケールとするとエタノール 0～10% の検量線で，0.2% エタノールでもピーク高さ 2mm となる．FIA 法で求めた結果を Table 1 に示すが，前処理をしたもの，していないもの共に，バッチ法，GC との結果とよく一致している．

終わりに，本研究を進めるに当たって気-液クロマトグラフィーによる測定に御協力をいただいた林原(株)技術部第二研究室秋庭正典氏，浜田正一氏に深い感謝の意を表します．

文　献

1) S. Tsurubo, T. Sakai : *Analyst* (London), **109**, 1397 (1984).
2) T. Sakai, N. Ohno, M. Tanaka, T. Okada : *Analyst* (London), **109**, 1569 (1984).
3) T. Sakai, N. Ohno : *Talanta*, **33**, 415 (1986).
4) T. Sakai, N. Ohno : *Anal. Sci.*, **2**, 275 (1986).
5) 本水昌二，細井康宏：日本分析化学会第 36 年会講演要旨集，p. 659 (1987).
6) 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).
7) 高橋　昭，辻　　巌，田中　昇，丹野弘紀，鹿島篤子，三上尚子：分析化学，**36**，537 (1987).
8) 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 based on coloration of tetrabromophenolphthalein ethyl ester in water-alcohol mixed solvent.
Yasuhiro Hosoi and Shoji Motomizu (Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-naka, Okayama-shi Okayama 700)

In a weak acidic solution an acidic triphenylmethane dye, tetrabromophenolphtalein ethyl ester, exists in the protonated form, TBPE·H, which precipitated as a yellow solid. TBPE·H, however, dissolves in an acidic solution in the presence of a non-ionic surfactant, such as Triton X-100, and the TBPE·H solution turns blue (λ_{max}=590 nm) on adding alcohols, such as methanol, ethanol, propanol and butanol. This color change was used to determine the ethanol content in alcoholic liquors. The calibration curve was not a straight line. The determinable range was from 2 to 10%(v/v) (final concentration). Alcoholic liquors (sake, whisky, shochu) were used for the determination after pretreatment with activated carbon. This color change reaction was applied to FIA; it made it possible to analyse 45 samples per hour without pretreatment with activated carbon.

(Received February 6, 1988)

Keyword phrases

Spectrophotometric determination of ethanol; FIA; tetrabromophenolphthalein ethyl ester; non-ionic surfactant Triton X-100; alcoholic liquors.