報 文

テトラキス(4-クロロフェニル)ホウ酸カリウムを含む液膜イオン
選択性電極を用いる清酒中のエタノール濃度の測定

服部 敏明^{®*}, 入 倉 鋼^{*}, 加藤 正直^{*}

Measurement of the ethanol concentration in a sake using liquid membrane
ion-selective electrode containing potassium tetrakis (4-chlorophenyl)

Toshiaki HATTORI, Hagane IRIKURA and Masanao KATO^{*}

^{*}Research Center for Chemometrics, Toyohashi University of Technology, 1-1, Hibarigaoka, Tempaku-tyo, Toyoha-shi, Aichi 441-8580

(Received 11 July 2001, Accepted 24 August 2001)

An ion sensor with plasticized poly (vinyl chloride) membrane containing potassium tetrakis (4-chlorophenyl) borate was developed for measuring of concentration of ethanol in sake as a non-distilled liquor including high concentration of ion matrixes. The effect of ions that were included in the sake on the potential response was investigated. The co-existence of cations, such as organic amines, strongly interfered with the potential response, though anions didnot. The addition of KCl was effective in reducing the interference of cations. However, the reductive effect was insufficient for measuring of ethanol concentration in sake. Therefore sake was treated with a mixed cation and anion exchange resin before the measurement. The ion sensor measurement established with the ion-exchange pretreatment provided a quantitative result, such that the measured concentration agrees with the concentration obtained by gas chromatography within 1%.

Keywords : flow-through ion sensor; ethanol; amphiphilic ion; sake; ion-exchange.

1 緒 言

日本酒として知られている清酒は、主に米、米こうじ及び水を原料として発酵・汙過させたもので、14~16%のエタノールを含む醸造酒として知られている。清酒は、ウイスキーやしょうちゅうのような蒸留酒と異なり、様々な成分を豊富に含んでいる¹⁾²⁾。清酒中成分は、水、エタノール、1~5%のグルコース以外に、高級アルコール、糖類、有機酸、アミノ酸、アミン、無機イオン、エステル、フェノール性化合物、含硫黄化合物、インドール系化合物、ビタミン類等がある¹⁾。

清酒中のエタノール濃度の測定は、蒸留後の留液に対する比重測定やガスクロマトグラフィー (GC) が用いられ

る³⁾。特に、GCは、エタノール濃度以外のアルコール濃度も測定できる方法で有用である。しかし、GCは装置の手軽さという点で難があるため、酵素を利用したバイオセンサー法⁴⁾⁵⁾、色素との発色作用による吸光光度法⁶⁾⁷⁾、可塑化ポリ塩化ビニル (PVC) 液膜型イオンセンサー法⁸⁾⁹⁾、光屈折フローインジェクション法¹⁰⁾、などが試みられている。

エタノールに応答する可塑化 PVC 膜イオンセンサー法としては、脂溶性のアルキル第四級アンモニウム塩化物を含むものが、都甲ら⁸⁾⁹⁾によって報告されている。その応答機構は、電位決定イオンである塩化物イオンの活量係数がエタノール濃度で変化することだと考えられている¹⁰⁾。著者らは、種々な両親媒性イオンを内部液に含む可塑化 PVC 膜フロー型イオンセンサー (AmISE) の、エタノール濃度に対する電位応答挙動を調べた¹²⁾。Tôei の両親媒

^{*} 豊橋技術科学大学分析計測センター: 441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1

性イオンの分類¹³⁾に従えば、アルキル鎖型よりむしろ平面型色素の両親媒性イオンセンサーが、エタノールに対して大きな電位応答を示すこと、また両親媒性陽イオンを用いた AmISE は、エタノール濃度に対して負の電位勾配を持ち、両親媒性陰イオンを用いた AmISE は、エタノール濃度に対して正の電位勾配を持つことを報告した。

エチルバイオレットを用いた AmISE を、蒸留酒中のエタノール測定に適用すると、GC による結果と非常によく一致した結果が得られ、実用的に測定可能であることが分かった¹²⁾。しかし、清酒やワインのような非蒸留酒のエタノール濃度測定において、AmISE による測定値はラベル値よりもはるかに高い値を示し、非蒸留酒の濃度測定は困難であった。高値を起す原因は、共存イオンが AmISE の電位応答に関与するためと考えられる。

本論文では、多種類のイオンを含む清酒中のエタノールの測定に、AmISE を適用するための条件が検討された。AmISE のエタノール感応性イオンとしては、陰イオンの影響を軽減することを想定して、陰イオン排除剤として知られるテトラキス(4-クロロフェニル)ホウ酸カリウム (TCPB)^{14)~16)}を両親媒性陰イオンの代わりに用いた。TCPB カリウム塩は水に溶けにくいので、内部液に含ませずに可塑化 PVC 膜にドープすることとした。清酒の共存イオンに対する TCPB-ISE の電位応答特性を明らかにし、KCl 塩の添加によるイオンのマスキング効果や、イオン交換樹脂によるイオンの除去を検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

エタノールは、和光純薬製高速液体クロマトグラフ用試薬特級 (99.5%) を用いた。TCPB と 2-ニトロフェニルオクチルエーテル (NPOE) は、同仁化学研究所製の試薬を、PVC は、和光純薬製の試薬をそのまま用いた。イオン交換樹脂は、モノベットイオン交換樹脂 MB-1 (オルガノ) を用いた。以下のアミノ酸、有機酸、アミン類は、市販品を用いた: L-アラニン、L-プロリン、L-ロイシン、L-アルギニン、L-フェニルアラニン、L-アスパラギン-水和物 (以上、和光純薬特級)、L-グリシン (関東化学特級)、L-グルタミン酸-ナトリウム (キシダ化学特級)、コハク酸モノナトリウム (東京化成)、乳酸ナトリウム (和光純薬)、DL-リンゴ酸二ナトリウム (和光純薬 1 級)、塩化コリン (和光純薬 1 級)、塩酸チラミン (和光純薬)、二塩酸カダベリン (和光純薬化学用)、塩酸イソブチルアンモニウム (和光純薬特級)、ヒスタミン (和光純薬特級)、塩酸エチルアミン (和光純薬)、DL-アミノエチルベンゼン (和光純薬 1 級)、硫酸アグマチン (東京化成)。D-グルコースや金属塩は、いずれも市販の試薬特級を用いた。

2.2 装 置

フロー型イオンセンサー: 既報¹⁶⁾に記載したフローセルを用い、電位差計は東亜電波 IM-40S イオン濃度計を用いた。イオンセンサーの構成は、Ag/AgCl/飽和 KCl 溶液/可塑化 PVC 膜/試料溶液/飽和 KCl 溶液/AgCl/Ag である。

可塑化 PVC 膜は、既報¹⁶⁾に記載した一般的なキャストリング法により調製された。可塑化 PVC 膜の組成は、73.5% NPOE, 23.5% PVC, 3% TCPB である。この可塑化 PVC 膜は、1 日 8 時間の測定において安定な電位応答を示したが、溶液中に保存するとエタノールに対する電位応答の低下が見られた。そのため、膜は測定日ごとに交換して用いた。

2.3 TCPB-ISE によるエタノール濃度測定

試料溶液 30 cm³ にアンバーライト MB-1 5 g を加えて、振り混ぜ器で 10 分間かくはん後、溶液 20 cm³ を採り、1 mol/dm⁻³ KCl 溶液 1 cm³ と 0.2 M 酢酸-酢酸カリウム緩衝溶液 (pH 4.7) 1 cm³ を加え、フロー測定用溶液とした。アンバーライト MB-1 は熱乾燥すると樹脂が粉碎されるので、乾燥せずにデシケーター中で水分濃度を一定にしたものを用いた。調製後の溶液をペリスタポンプにより毎分 1.5 cm³ の流量でフローセル¹⁶⁾に導入し、電位差を測定した。相対電位は 2 分以内に安定した。上記操作に従って作成された検量線を用いて清酒中のエタノール濃度を決定した。

2.4 ガスクロマトグラフとエタノール濃度測定

ガスクロマトグラフ: 内径 2.6 mm, 外径 5 mm, 長さ 5.4 m のガラスカラムと熱伝導度検出器 (TCD) を備えた GC-8A (島津製作所製) を用いた。キャリアーガスはヘリウムを、カラムパッキング試薬は PEG1000 (ジーエルサイエンス製) を用いた。

カラム温度が 100℃ で熱平衡にした後、あらかじめ一定量のプロパノールを標準添加した試料 2 μl を注入し、エタノールとプロパノールを分離検出した。プロパノールに対するエタノールのピーク面積比を用いて検量線を作成し、エタノール濃度を決定した。

3 結果及び考察

3.1 KCl の影響

TCPB-ISE の電位決定イオンはカリウムイオンである。Fig. 1 に 10% から 20% のエタノールを含む塩化カリウム水溶液に対する相対電位差を示す。Fig. 1 で 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ mol/dm⁻³ 塩化カリウム水溶液における 1% のエタノール濃度変化に対する電位勾配は、それぞれ、2.1, 2.2, 2.3 mV である。一方、0, 10, 12, 14, 16, 20% のエタノール濃度における 10 倍の塩化カリウム濃度変化に対す

Fig. 1 Potential response of TCPB-ISE

○: 0.001 M KCl; △: 0.01 M KCl; □: 0.1 M KCl

る電位勾配は, 53.2 ± 1.2 mV であった。

水からエタノールへのカリウムイオンの移行活量係数は, $\log \gamma = 2.9$ である¹⁸⁾。エタノール濃度 0% から 100% の水溶液において, 移行活量係数が直線的に変化すると仮定すると, カリウムイオン濃度に対する TCPB-ISE の実測応答 53.2 mV を用いて, 1% のエタノールの濃度変化に対して 1.5 mV の電位勾配が算出される。しかし, この値は実測値である 2.2 mV よりはるかに小さい。両親媒性イオンの対イオンの移行活量係数変化から, 推定される電位勾配よりも実測勾配が大きくなることは AmISE での特徴であり, また AmISE に用いる両親媒性イオンの種類¹²⁾や, 膜溶媒¹⁰⁾によって電位勾配は変化することから, 膜電位発生は, 試料溶液中の電位決定イオンの活量変化による電位応答機構だけでは説明できないと考えられる。高分子電解質に応答する両親媒性イオンセンサーで示されたように, 電位決定イオンの膜内濃度変化にも着目した機構¹⁹⁾を考慮することが必要であると思われる。

3.2 アミン類の影響

一般的に両親媒性陰イオンを含む可塑化 PVC の ISE は, 様々な陽イオンにも応答し, 特に第四級アンモニウムイオンに対する選択係数は大きい。そこで, 有機性アミンは, 酸性や中性溶液中で TCPB-ISE によるエタノール測定に大きな妨害を起こすと思われる。Table 1 には, 清酒中に含まれる代表的なイオンを示す。酢酸-酢酸カリウム緩衝溶液での 14% のエタノール濃度測定における, 8 種類のアミンの影響を調べた。Fig. 2 (A) に見られるように, 10 ppm 程度なら相対電位差 (KCl と緩衝溶液以外を含まないエタノール 0% の試料を基準とした) はほとんど変化し

Table 1 Main component* of Ions in sake

Organic matter	Compounds	Content, ppm
Organic acid	succinic acid	600
	lactic acid	300
	malic acid	400
Amino acid	alanine	400
	arginine	500
	glutamine	500
	glycine	300
	choline	~ 300
Amine	cadaverine	~ 30
	ethanolamine	~ 10
	agmatine	~ 10
	calcium	~ 100
	magnesium	~ 40
Inorganic element	potassium	~ 120
	sodium	~ 240
	iron	~ 0.6
	phosphor	~ 200

* results from ref. 1).

ないが, 50 ppm の共存では電位がかなり大きく変化する。これらの溶液に KCl を添加すると, Fig. 2 (B) に見られるように, 相対電位差に及ぼすアミンの影響は緩和される。清酒中では, コリン以外のアミン類がいずれも 50 ppm 以下なので, エタノール濃度測定に対するコリン以外のアミン類の影響は少ない。しかし, コリンは 300 ppm 以上も存在する場合があるので, KCl を添加してもコリンの影響を除去することは困難であると思われる。

3.3 金属イオンの影響

Table 1 に示すように, 清酒中には Ca, Mg, K, Na が 200 ppm 程度まで, 更に, Fe も 1 ppm 程度まで含まれていると報告されている¹⁾。Mg や Na は, 200 ppm まで共存してもエタノールに対する TCPB-ISE の相対電位は全く変化しなかった。Fig. 3 に見られるように, Ca^{2+} や Fe^{2+} の共存は, エタノール濃度測定を大きく妨害する。しかし, 0.1 M の KCl を共存させれば, それらの金属イオンが 100 ppm まで共存しても, 相対電位差は 2 mV 以内の誤差内で測定可能である。

3.4 有機酸, アミノ酸, 糖類の影響

Table 1 に示したように, 清酒中には有機酸としてコハク酸, 乳酸, リンゴ酸がおおよそ 500 ppm 程度まで含まれる。TCPB-ISE を用いて酢酸-酢酸カリウム緩衝溶液での 14% のエタノールを測定すると, それぞれの有機酸が 500 ppm まで共存しても, 相対電位差は ± 1 mV 以内でほとんど変化しなかった。しかし, それらの濃度が 1000 ppm になると, 相対電位差はコハク酸で 2 mV, 乳酸とリ

Fig. 2 Effect of amines on potential response of TCPB-ISE

(A): in 0.02 M $\text{CH}_3\text{COOK}-\text{CH}_3\text{COOH}$ buffer; (B): in (A) + 0.1 M KCl; ○: ethylamine; △: isobutylamine; □: agmatine; ▽: cadaverine; ◇: aminoethylbenzene; ⊙: choline; +: histamine; ×: tyramine

Fig. 3 Effect of metal ions on potential response of TCPB-ISE

○ and ●: Fe^{2+} ; □ and ■: Ca^{2+} . Open signs are in 0.02 M $\text{CH}_3\text{COOK}-\text{CH}_3\text{COOH}$ buffer. Closed signs are in 0.1 M KCl and 0.02 M $\text{CH}_3\text{COOK}-\text{CH}_3\text{COOH}$ buffer.

ンゴ酸で 3 mV 増加した。

アルギニン、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、グリシン、グルタミン酸については、1000 ppm 共存しても相対電位差は誤差 ± 1 mV 以内で変化しなかった。アスパラギン酸では、500 ppm まで相対電位差は誤差 ± 1 mV 以内であったが、1000 ppm では 2 mV 増加した。プロリンでは、100 ppm までは相対電位差が誤差 ± 1 mV 以内で

あったが、200 ppm で 2 mV、1000 ppm で 3 mV 増加した。

以上のように有機酸やアミノ酸の影響はそれほど大きくなく、いずれの場合も塩化カリウムを添加 (0.1 M KCl 中での測定) すると、相対電位差は誤差 ± 1 mV 以内になった。

清酒中には糖類として、1~5% のグルコースが含まれている¹⁾。TCPB-ISE で酢酸-酢酸カリウム緩衝溶液での 14% のエタノールを測定において、1~5% のグルコースを共存させても相対電位差は誤差 ± 1 mV 以内であった。

3.5 イオン交換樹脂による前処理

上記に示すように、KCl の添加によりある程度のイオンの効果を抑制できるが、エタノール濃度測定誤差を 1% 以内には不十分である。そこで、イオン交換樹脂による清酒の前処理を検討した。TCPB-ISE は陽イオンによる妨害が問題となるので陽イオン交換樹脂を用いたが、十分な結果が得られなかった。そこで、混合陽・陰イオン交換樹脂を用いて検討した。

清酒 30 cm^3 にアンバーライト MB-1 を 1~7 g 加えて、振り混ぜ器で 10 分間かくはん後、イオン交換後の清酒 20 cm^3 を採り、1 mol/ dm^3 KCl 溶液 1 cm^3 と 0.2 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 4.7) 1 cm^3 を加え、溶液濃度を測定した。その結果、5 g 以上の MB-1 を用いることでエタノール測定濃度は一定になった。そこで、清酒 30 cm^3 に対して 5 g のアンバーライト MB-1 を用いることにした。

Table 2 Measurement of ethanol in sakes

Sample No.	Labeled, v/v%	GC method, v/v%	ISE method, v/v%		
			0.02 M Acetate buffer solution	0.02 M Acetate buffer solution + 0.1 M KCl	0.02 M Acetate buffer solution + 0.1 M KCl & Ion exchanged
1	13~14	14.3	49.2	21.2	14.5
2	14~15	14.9	50.4	28.9	15.3
3	15~16	15.3			15.6
4	15~16	15.6	49.6	22.1	16.1
5	15~16	15.7			16.3

3・6 TCPB-ISE による清酒中のエタノール濃度測定

本法で市販清酒のエタノール濃度を測定した。TCPB-ISE による測定結果として、緩衝溶液だけを用いた場合、KCl を添加した場合、更にイオン交換樹脂で処理後に KCl を添加して測定した場合、の 3 方法の結果を Table 2 に示す。緩衝溶液だけを用いた方法や更に KCl を添加した方法は、ラベル値や GC 値と比べてかなり高い値を示す。しかし、イオン交換樹脂を用いて前処理をすると、いずれの清酒でも GC 法とエタノール濃度誤差 1% 以内の差で測定することができた。

両親媒性陰イオンを含む可塑化 PVC イオンセンサーがエタノール濃度に電位応答することを利用して、多量のイオンが共存する清酒中のエタノール濃度測定を行った。イオン交換樹脂と電位決定イオンの添加の併用により、清酒中のエタノール濃度測定が可能になることが分かった。このように簡便なイオン濃度の制御により、多量のイオン性物質の中から非イオン性物質を測定できることが分かった。本研究はこれまで試みられることが少なかった非イオン性物質の濃度測定に対するイオンセンサーの用途を広げられる可能性を示した。

(1998 年 10 月, 日本分析化学
会第 47 年会において一部発表)

文 献

- 1) 日本醸造協会編: “新版醸造成分一覧”, (1977), (新日本印刷).
- 2) 吉澤 淑: “酒の科学”, (1995), (朝倉書店)
- 3) 日本分析化学会編: 改定四版 “分析化学便覧”, p. 452 (1991), (丸善).
- 4) 軽部征夫, 鈴木周一: 発酵と工業, **41**, 580 (1983).
- 5) 受田浩之, 中田勇二, 松本 清, 箴島 豊: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **39**, 723 (1990).
- 6) 細井康宏, 本水昌二: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **37**, 301 (1988).
- 7) 山本大二郎, 塚田正道, 佐藤大英: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **40**, 181 (1991).
- 8) Y. Arikawa, K. Toko, H. Ikezaki, Y. Shinha, T. Ito, I. Oguri, S. Baba: *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 371 (1996).
- 9) T. Tsukahara, K. Toko: *Food Sci. Technol. Res.*, **5**, 223 (1999).
- 10) 安藤 汀, 大久保正広, 加藤隆史, 岡田光史, 徳本淳一, 大蔵常利: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 961 (1995).
- 11) 塚谷忠之, 都甲 潔: 電気学会論文誌 E, **118**, 266 (1998).
- 12) T. Hattori, M. Kato: *Anal. Sci.*, **13**, 975 (1997).
- 13) K. Tôei: *Anal. Sci.*, **3**, 479 (1987).
- 14) von. D. E. D. Amman, A. F. Zhukov, F. Behm, E. Pretsch, W. Simon: *Helv. Chim. Acta*, **65**, 538 (1982).
- 15) K. Umezawa, X. M. Lin, S. Nishizawa, M. Sugawara, Y. Umezawa: *Anal. Chim. Acta*, **282**, 247 (1993).
- 16) A. Bratov, N. Abramova, J. Munoz, C. Dominguez, S. Alegret, J. Bartoli: *Anal. Chem.*, **67**, 3589 (1995).
- 17) T. Hattori, M. Kato: *Anal. Sci.*, **11**, 285 (1995).
- 18) 伊豆津公佑: “非水溶媒の電気化学”, p. 27 (1995), 培風館.
- 19) T. Hattori, M. Kato: *Anal. Sci.*, **15**, 359 (1999).

要 旨

テトラキス(4クロロフェニル)ホウ酸カリウムを含む可塑化 PVC 膜イオンセンサー (TCPB-ISE) を用いて、清酒中のエタノールを測定した。清酒中に多量に含まれるイオンに対する TCPB-ISE の応答挙動を調べた。この際、塩化カリウムの添加により、陽イオンの電位応答を抑制することができることが分かった。しかし、清酒中のエタノール測定において、その抑制効果は不十分であった。そこで、妨害イオン濃度を低下させるために、あらかじめ混合陽・陰イオン交換樹脂を用いて清酒を処理した。この処理方法を用いることで、TCPB-ISE によって得られる測定値は、GC による測定値と 1% 以内で一致した。