要 約

第一報に引続き、清酒と合成清酒との差異を明らかにするために、蛋白質及びアミノ酸の呈色反応を検討した。本実験の条件で陽性であつた反応は、Biuret, Ninhydrin, Millon, Xanthoprotein, 昇汞, Adamkiewitz, 坂口の 7 反応であつて、この中顯著で比較的再現性、安定性の充分な反応は、Millon, Xanthoprotein の両反応であつた。

文 献

(1) 山田正一; 醸協誌 48, 367, (1953)

参考文献

生物化学; 鈴木, 小幡 朝倉書店 アミノ酸及蛋白質; 赤堀 共立出版株式会社 蛋白質化学 I, II; 赤堀, 水島 同上

(東京国税局鑑定官室)

醸 造 用 水 の 研 究

(第 1 報) 醸造用水分析法に関する研究 (その 2) 硬度の測定について

伊 藤 恭 五 郎, 佐 藤 淳

(昭和 29 年 8 月 27 日受理)

Studies on Brewing Water.

(Report 1) Studies on the Analytical Method of Brewing Water.

(Part 2) Determination of Hardness by a Photoelectric Colorimeter.

By

K. Ito and Z. Sato

(Received August. 27, 1954)

Summary

We examined colorimetric methods for the determination of calcium and magnesium in brewing water. The following results were found by the modification of these methods.

(1) In the Yanagisawa's method the measured value of magnesium was lower than the theoretical value, but for calcium there was little error and the result was approximately accurate.

(2) By the titan yellow method magnesium could be determined in considerable accuracy without any change of color with time and without influence of interfering ions when added with stabilizing agents (starch and sucrose).

(3) The determination of calcium by the phosphate method showed some change of transmittance percentage with time, but accurate results were obtained without large change of color and without influence of interfering action when determined in 5 minutes.

Among the three methods the titan yellow and phosphate methods were recognized to be applicable for the determination of hardness in brewing water rapidly and accurately by using a photoelectric colorimeter.

緒 言

醸造用水の硬度測定法には現在迄多くの研究発表がなされているが、それ等の主なるものについて一瞥するに次の様な色々な長短が見出される。先ず Clark 氏に依る石鹼法は操作が比較的簡便なところから従来最も広く採用されてきたのであるが、該法は既に 2~3 の人^{(1)~(3)}に依つて指摘された通り測定に非常は熟練を要すること、personal error の生じ易いことなどの欠点があり、T. Wohlfel に依れば之は水の硬度を

示すものでなく水の石鹼液消費量及び起泡能を示すに過ぎないと極言している。

小原、和田氏⁽⁴⁾は Blacher 液を使用し容量的に硬度を測定しているが、これは硬度の高い水では乳濁を生じ、end point が明確でなく又他の salts の共存する場合誤差が大となる傾向があると述べている。

近年 Schwarzenbach⁽⁵⁾は iminotricarbonic acid, ethylenediaminetetra acetic acid 等の aminotricarbonic acid が多少の差はあるが、alkali earth metal と非常に電離度の低い complex salt を生成することに着目し Ca, Mg 及びその他の 2 価の ion の定量に応用し、水の硬度測定にも用いている。この方法は end point 確認のため Eriochrome black T なる azo 色素を使用しているが、その変色の比較的明瞭なことと操作の簡便なため今や石鹼法は代つて広く用いられようとしている。

Ca 及び Mg を colorimetric に測定する方法も種々見受けられ、Ca を oxalate として更に alizarin の Ca-salt とし、これを分解して遊離となつた alizarin を比色する法⁽⁶⁾、又 Ca を phosphate として沈澱させ、これを磷モリブデン酸塩に変えて還元し生じた molybden blue を比色する法⁽⁶⁾、Mg は磷酸アンモニウムマグネシウムの沈澱を作り磷酸を定量して間接的に求める法⁽⁶⁾、更にモリブデン酸アンモン、ハイドロキノン及び Bell-Doisy の溶液を加え比色する方法等がある。

光電比色計を用いて行う方法として、G. M. Wyatt⁽⁷⁾は Eriochrome black T を用い、Stevens⁽⁸⁾、Haurry⁽⁹⁾等は同じく titanyellow で鈹石、血液、その他 fluids 中の Mg を定量している。Ca については F. Burriel-Martí⁽¹⁰⁾が ferri-salicylate complex を oxalate で脱色させ、Mg と共存する Ca を定量し、Frank⁽¹¹⁾は血清中 Ca を ethylenediaminetetra acetic acid, ammonium purpurate で測定している。

最近柳沢氏⁽¹²⁾は血清中の Ca, Mg を Chlorophenolazodioxynaphthalin disulfonic acid の Na-salt を用いて定量を行い、更にこれを敷衍して硬度を測定し、それについての詳細な発表も行つている。

吾々はこれ等の中実際応用して適当と考えられる数種の方法につき再検討を行つたところ、或程度の改変により簡易、迅速且正確に定量することが可能になつたので茲にその実験結果について報告する。

尙本実験に使用した光電比色計は Erma 式 II 型である。

実験の部

A. 柳沢氏法の検討⁽¹²⁾

柳沢氏は血清及び水の Ca, Mg の定量法を発表しているが、これが操作は比較的簡単であり醸造用水の硬度測定にもその精度が充分であれば実用に供の得ると考えたのでこの方法について検討を試みた。

(1) 検量線について

検量線を同氏法に従つて求めた処、Ca の検量線は 10 γ まで直線となり Beer の法則に従うが、Mg の場合は 4 γ まで直線となつて以後は漸次透過率は減少して来る。即ちこのことは Mg の測定に際してはその含有量の適用範囲が著しく狭くなる事を意味している。それ故、0.5 cc の試水中 4 γ 以上の Mg を含有する場合には当然低い結果が得られる訳であり、試水を更に少く採る事が必要である。即ち Mg 含量が 4 γ 以上の場合には 0.5 cc より少い採取量によりその含量を決定しにしなければならない。それは 0.5 cc で行つた

Mg の値が実際にはそれより高い値になり得るという事も考えられるからである。又その検量線は透過率 30~50 % の間の变化であり勾配が少く、それがため透過率 1 % の誤差が 0.5 cc 中の Ca 及び Mg 量では 0.5~1 γ で従つて透過率の僅少の差が実験値には大きな誤差を生ずる結果となる。

以上の事を図上で示せば次の通りである。

(2) 試料について

既知試料を同氏法に依つて行つた Ca 値は大体理論値に近い結果になつたが、Mg は著しく低い値となつた。この原因については詳細分明しないが、多分阻害 ion の影響に依るか或は試料の採取量の僅少なための誤差か、操作上に何等かの欠点があるのか何れかと考えられる。この点に関して加納氏⁽¹³⁾も Mg に於て著しく低い値を得るのは妨害 ion に起因しているのではないかと述べている。又柳沢氏が阻害 ion として挙げているものは、Mn, Fe²⁺, Fe³⁺, Co, Ni 等であるが、これら ion の中 Mn, Fe²⁺, Fe³⁺ は用水中に含有されている場合が多いのでそれに原因する誤差も考慮に入れておくべきであらう。

次に硬度 5 度のものについて行つた結果を示すと次表の通りである。

Table 1 Analytical Results of known Samples

method	Kind of Hardness	CaCO ₃ +MgSO ₄	CaSO ₄ +MgSO ₄
Schwarzenbach's method ^{A)}	Ca Hardness	2.505	2.544
	Mg "	2.521	2.459
	Total "	5.026	5.003
Blacher's method ^{B)}	Ca "	2.771	2.501
	Mg "	2.458	2.618
	Total "	5.229	5.119
Yanagisawa's method ^{C)}	Ca "	2.448	2.522
	Mg "	—	—
	Total "	—	—

A) Schwarzenbach 法; 先ず全硬度を求め次に Ca を oxalate として ppt. せしめその濾液につき Mg 硬度を求め、全硬度より Mg 硬度を減じ間接的に Ca 硬度を求めた。

B) Blacher 法; 全硬度より KMnO₄ による titration により求めた Ca 硬度を減じ Mg 硬度とした。

C) Yanagisawa 法; 採取試料は 0.3 cc である。

B. Titan yellow 法に依る Mg の比色定量⁽¹⁴⁾

Titan yellow を用いて Mg を比色定量する方法は従来鉱石、血清の定量に一般に応用されているが、吾々は該法を水中の Mg 定量に応用しようと試み、次の如き実験を行つた。

1. 試 薬

- 0.01% methylred 溶液
- 0.1 N NaOH
- 5% sucrose 溶液
- 2% hydroxylamine hydrochlorid 溶液
- 1.5% starch 溶液

soluble starch 1.5 g を僅かの水に溶解しこれを沸騰水中に加え沸騰せしめ、室温放置後全量を 100 cc とす。該試薬は使用直前に調製する。

6. 0.075% titan yellow 溶液

titan yellow 75 mg を水に溶解し 100 cc とし濾過する。褐色瓶中に入れ冷暗所に保存する。

7. 1.5 N NaOH

2. 検量線

MgSO₄ · 7H₂O 1.0136 g を 1 l の水に溶解 chloroform 2~3 滴を加え保存する。この溶液 1 ml 中に Mg 100 γ を含有する。

上記標準液を 2 倍に稀釈し、その 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 cc 宛をメス試験管に採り、各々が 3 cc になる様に水を加える。後は定量の場合と全く同様に操作し、blank を 100% の目盛に合わせ、各々の透過率を求めた。これらは夫々 0, 25, 50, 75, 100 γ に相当する。

3. 定量方法

検水 3 cc を 10 cc 容メス試験管に採り、各々へ methylred 1 滴宛を加え注意しつつ 0.1 N NaOH を黄色となるまで加える。次いで 5% sucrose 溶液 1 cc, 2% hydroxylamine hydrochlorid 1 cc 宛及び starch 溶液 1.5 cc 宛を順次混和し、更に 0.075% titan yellow 液 1 cc 宛を加え最後に 1.5 N NaOH 2 cc 宛を加えて混和、直ちに各々が 10 cc となる様水を加え 20°C の水に浸け blank を 100% 透過率に合わせて検水の透過率を求める。フィルター 530 mμ, cuvette は 10 mm を使用する。

4. 検量線の経時的变化と温度の影響

Mg を Stevens 法により検討を行つたところその透過率の時間的变化は全試薬加注後非常に不安定であつた。即ちその変化は色調の濃淡の変化ではなく溶液中に微粒な沈澱が浮遊している状態であつて次第に液は濁濁を生じ透過率は減少するが 5 hr. 後には全く沈澱し透過率は再び増大する。それ故検量線として得られたものは再現性が乏しく測定の誤差も多く、時間的不安定性を除去する必要を認めた。

これらの結果より採取試料を更に少くし安定な色調を得、Ca の妨害を防ぐため sucrose 及び starch の水溶液を用い colloid の保護作用により安定をはかつたところ濁濁、沈澱を生ずる事なく時間的安定性も良好であつた。即ち blank 及び Mg 50 γ 含有のものについてその時間的变化を見ると次表の通りであつた。

Table 2. Change of Transmittance %

blank	time	transmittance %	Mg 50 γ	time	transmittance %
	0	4.00		0	30.4
	5	40.1		5	30.4
	10	40.5		10	31.2
	20	41.6		30	32.0
	40	43.0		60	32.8

この様に時間と共に透過率が上昇するが僅少な変化で5分以内に測定すれば殆んど誤差はないが温度に対しては著しい変化があり 35°C, 5 min. で透過率は 37.5% に減少するが室温に戻すと再び同様となる。又 Mg 50 γ 含有のものについても 50°C, 5 min. 放置後は透過率は 23.2% となり著しく減少したが、これを急速に冷却すると 29.2% となり更に 2 hrs. 後には 30.5% となつて元に復した。この様に温度変化は可逆的であり一定温に保てば誤差も少い。以上の事より試薬添加後 5 min. を基準として検量線を作成し、その温度は 20°C とした。

5. 阻害 ion の影響

次にこの測定法に影響を与えると思われる水中の Ca, Cl, P_2O_5 , Fe^{++} , Fe^{+++} 各 ion についてその阻害の有無を検した。即ちその方法として Mg 50 γ を含む水を blank としてこれに各種 ion の濃度の異なるものを加えて透過率を測定したところ Cl は 1 l 中 300 mg までは阻害作用を示す事はなく他の Fe^{++} , Fe^{+++} では 3 cc 中 1 γ まで、 P_2O_5 では 3 cc 中 20 γ 以内では影響は認められなかつた。又 Ca は 3 cc 中 0.3 mg までは影響はなかつたがそれ以上では沈澱を生じた。

以上の結果より Titan yellow 法は Ca ion の妨害を防ぐために sucrose 及び starch を用いると色調の変化もなく安定した検量線が保たれる。

6. 実験結果

醸造用水 6 点につき Schwarzenbach 法, Blacher 法, 重量法と Mg 硬度を比較した表を次に示すと

Table 3. Analytical Results of Mg Hardness

Sample No.	1	2	3	4	5	6
method						
Titan yellow method	1.5372	1.1526	0.9607	1.4373	0.8455	2.5749
Schwarzenbach's method	1.1385	0.9235	0.9235	1.0246	1.2523	2.2542
Gravimetric method	1.4401	1.1121	0.8572	1.3071	0.9629	2.5508
Blacher's method	1.4424	1.619	0.7372	1.1343	0.6376	2.3717

上表に示した如く本法の分析値は重量法のそれとほぼ一致し精度の面でも良好と考えられているので水中の Mg の定量に適當であると思われた。

C. Phosphate 法に依る Ca の比色定量⁽¹⁴⁾

本法は Ca を phosphate として沈澱させ、これを磷モリブデン酸塩に変え還元剤で還元し生じた molybden blue を比色し Ca を求める間接的な方法である。

1. 試薬

1. 5% trichloroacetic acid

2. 1% Na_3PO_4

3. アルコール洗液

95% ethylalcohol 58 cc と amylalcohol 10 cc を混じ水を加え全量 100 cc とし 5% NaOH 3 滴

1% phenolphthalein 2 滴を加える。

4. 6.25 N NaOH

5. 12.5% ammonium molybdate

6. aminonaphthol sulfonic acid 溶液

NaHSO_3 60 g, Na_2SO_3 1 g, 1, 2, 4 aminonaphthol sulfonic acid 1 g を mix し褐色瓶中に貯える。この 15 g を 100 cc の蒸留水に溶解し使用する。

2. 定量法

10 cc のメス試験管に検水 2 cc を採り 5 cc まで trichloroacetic acid を加え、次いで 0.3 cc の alkali, 5 min. 後 0.3 cc の Na_3PO_4 を加え混和し 1 hrs. 放置後 2000 r.p.m の centrifuge にかけ上澄液を捨てこれにアルコール洗液 2 cc を加え洗滌し再び centrifuge 3 min., 上澄液を捨て trichloroacetic acid を加え Ca の ppt. を溶解し ammonium molybdate 0.5 cc aminonaphtholsulfonic acid 0.5 cc を最後に加え 10 cc とし直ちに 660 m μ の filter, 10 mm の Cuvette を用い測定する。

3. 検量線

1 cc 中 Ca 1 mg を含む溶液を作りこの中 5 cc を採り 100 cc とし、その 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 cc を採り検量線を作成する事前同様である。

4. Beer の法則の適合範囲

Ca 量 50 γ , 100 γ , 150 γ , 200 γ , を含有する試料につきその透過率及び時間的变化を見ると次の如くであつた。

Table 4 Change of Transmittance %

time	0	10 min	30 min	60 min ^a
Ca content				
50 γ	63.5	63.5	64.5	67.0
100 γ	42.5	37.5	33.2	30.0
150 γ	32.5	18.0	11.5	7.0
200 γ	13.2	8.5	3.0	1.0

この透過率の変化を図で示すと 100 γ 迄は直線となるが以後は急激に減少する傾向となるので 100 γ までの検量線を成す事とした。

5. 検量線の経時的变化

blank 及び各標準液の透過率の時間的变化を見ると次表の通りであつた。

Table 5 Change of Transmittance % with Time

Ca Content	blank	25 γ	50 γ	75 γ	100 γ
time					
0 min	95.0	66.0	45.3	31.5	23.0
5	94.9	66.0	45.0	31.0	22.0
15	90.0	52.0	33.3	21.0	18.0
60	80.2	31.0	20.3	10.0	8.0

Standard Curve for Ca

この場合の透過率は蒸留水を 100 %目盛に合わせ各濃度の時間毎の変化を読んだので透過率は経時的に減少する傾向がある。又その変化も Mg 含量の増加と共に大となるが、5 min 以内であれば比較的その変化が少いので全試薬加注後直ちに測定するのが最も安全と考えられる。

6. 阻害 ion の影響

次に本法で Ca 以外の ion で当然影響があると考えられる P_2O_5 , Si, Mg 等は Ca のみが salt として沈澱し他の ion は上澄液として除去されるから、之等 ion の影響はないものと考えられる。

7. 実験結果

本法で定量した結果を各法と比較すると次の通りである。

Table 6 Analytical Results of Ca Hardness

Sample No.	1	2	3	4	5	6
method						
Phosphate method	2.3450	1.8200	1.3322	2.3000	2.3108	4.1620
Gravimetric method	2.3211	1.8429	1.3904	2.3968	2.5920	4.0606
Schwarzenbach's method	2.4384	1.5811	1.2523	2.1632	2.0032	4.1214
Blacher's method	2.0360	1.6312	1.2484	2.2244	2.5090	3.9458

更に全硬度を比較すれば

Table 7 Analytical Results of Total Hardness

method Sample No.	Schwarzenbach's method	Blacher's method	Clark's method	Gravimetric method	Phosphate met- hod Titan ye- llow method
1	3.576	3.458	3.59	3.761	3.883
2	2.504	2.793	2.42	2.955	2.972
3	2.277	2.021	1.90	2.240	2.292
4	3.415	3.458	3.07	3.404	3.437
5	3.256	3.196	2.94	3.554	3.156
6	6.375	6.317	6.01	6.610	6.736

総 括

比色に依り Ca, Mg を定量する種々の方法について検討した。

(1) 柳沢法では Ca は誤差少く、理論値に近い値を得るが Mg は理論値より低い値となる。

(2) Titan yellow 法は安定剤(澱粉、蔗糖)の添加により時間的色調の変化が少く、又阻害 ion の影響をうける事も少く可成の精度で迅速に測定が可能である。

(3) Phosphate 法による Ca の測定は時間的変化があるが 5 min. 以内に測定すれば色調の変化が少く、阻害作用を受ける事もなく精度ある結果が得られる。

以上 3 法の中 Titan yellow 法, Phosphate 法が光電比色計に依る方法としては迅速で精度良く実際醸造用水の硬度得定には適当であると考え。

本研究は昭和 29 年 6 月 15 日の日本農芸化学会東北支部大会に於て講演した。

文 献

- (1) 斎藤, 板野: 日醸協, 1951, No 11 (2) 古池外 2 名: 日醸協, 1951, No12 (3) 上野: 化
 領, Vol 5 No 8 (4) 小原, 和田: 日醸協, Vol 31 No 11 (5) 坂口: 化領, Vol 5 No 10
 (6) 太秦康光, 分析化学 (7) G.M. Wyatt: Anal. Chem. Vol 25 No 3 498 (8) E. Stevens:
 Anal. Chem. Vol 24 No 1 196 (9) Hauny. VG: J. Lab. Clin. Med. Vol 23, 1938 1079 (10)
 F. Burriel-Marti: Anal. Chem. Vol 25 583 (11) Frank. Fales: J. B. C. Vol 204 577 (12) 柳
 沢文正: 日本医事新報別刷 1475, 都立衛生研究年報 III, 新潟医学会雑誌 66. 2, 3, 標準生化学実験法
 (13) 嘉納成三: 日醸友会大阪支部, 講演会速記録 第一報, p. 25 (14) 斎藤: 臨床化学検査

投 稿 規 約

- 原稿は醸造に関する限り次の欄に受ける。
A. 論 説 B 解 説 C. 随 筆 D. 講演記録 E. 報 文
- 原稿は他誌に未発表のものに限る。
- 原稿の取捨は編集部に一任のこと、原稿中の字句については加除修正を行うことがある。
- 報文は 4000 字(印刷面約 2 頁)以内とする。
- 記述は平がな、新かなづかいとし、欧語音訳は片かなを用い冗長を避け、簡単明瞭なること。
- 句読点, カッコには一劃間与え, 別行の冒頭は一字下げること。
- 図及びグラフは出来るだけ少数に纏め, 白紙又は青線方眼に丁寧に墨書すること, 青インキは写し取りが不可能である。
- 報文にはなるべく欧文の表題, 著者名, 結論を添えること。
- 引用文献は著者名, 雑誌名, 巻数, 頁数, 年号の順にすること。
- 報文中の引用文献番号はカッコをつけて肩に小さく書く, 文献は報文の最後に通し番号順に列記する。
- 校正希望ならば初校を著者校正とするがなるべく編集者に任されたい。
- 原稿の送付には送状をつけること。
 (イ) 発送年月日, (ロ) 氏名所属, (ハ) 連絡先, (ニ) 論文種別, (ホ) 標題, (ヘ) 原稿枚数,
 (ト) 写真及び図表数, (チ) 備考
- 投稿及び会誌編集に関する通信並びに原稿用紙(実費申受く)の請求は下記宛に願います。
 東京都北区滝野川二丁目六 日本醸造協会編集部 電話王子局(91) 2050 3390 番

研究報文を投稿される方へ

研究報文を投稿される方は報文の他に簡単に要旨を縦書で(400字詰原稿用紙一枚以内)に纏めて添付のこと、これは報文の末尾につく所謂要約とは別に、研究内容結果等を簡潔に分り易くまとめたものです。