可視内部反射分光法による水、メタノール、及び 水-メタノール混合溶媒とガラス界面領域でのメ チレンブルーの状態分析

樋上 照男[®], 横山 友^{*}, 尾関 徹^{**}

(1993 年 12 月 6 日受理)

メチレンブルー (MB) の水溶液及びメタノール溶液の可視内部反射及び透過スペクトルを測定した。メタノール溶液では両スペクトルはほぼ一致し、MB が溶液中でもガラス (内部反射素子)-溶液界面領域でも同様に単量体で存在することが確かめられた。一方、水溶液では両スペクトルは大きく異なり、MB が界面領域では希薄な溶液中とは異なる化学種として存在することが示唆された。異なる混合比の水-メタノール混合溶媒を用いて測定した MB の内部反射スペクトルを因子分析した結果、三つの成分スペクトルが得られ、それらはメタノール中の単量体、ガラスに吸着した単量体、及び水溶液中の二量体によるものと帰属された。

1 緒 言

メチレンブルー (テトラメチルチオニン, MB) は水溶液中において自己会合あるいは固-液界面において界面会合を起こす塩基性色素で、生体染色などに広く利用されている。MB が会合によりスペクトル変化 (メタクロマジー) を起こすために、古くからその原因となる化学種の同定や溶存状態が分光学的な方法を用いて研究されてきた¹⁾²⁾。一方、内部反射分光法は、光が屈折率の高い相から低い相に臨界面以上の入射角で入射するとき生じる減衰波 (エバネッセント波) の試料による吸収を測定する分光法であり、減衰波が二つの相の境界から屈折率の低い相に波長程度の距離だけしか侵入しないために観測領域が界面領域に限られることや装置的に *in situ* 観察が容易であることから、表面や固-液界面などの分光学的な状態分析に利用されている^{3)~6)}。又、因子分析法は測定された一連の多成分系試料のスペクトルから各成分の純粋なスペクトルを抽出するデータ処理法であり、未知の化学種の存在検出に利用されている^{7)~9)}。本研究では、界面領域の状態を表す内部反射

スペクトルと溶液中の状態を表す透過スペクトルとを比較し、ガラス-水あるいはメタノール界面領域の MB の状態を考察するとともに、一連の異なった水-メタノール混合比の MB 溶液の内部反射スペクトルを因子分析法によって解析することにより、界面領域での MB の化学種と溶存状態についての検討を行った。

2 実 験

2・1 内部反射スペクトルの測定

内部反射スペクトルは市販の自記録式分光光度計 (島津製作所, UV200S) の試料室に Fig. 1 に示す内部反射セルを取り付けて測定した。内部反射セルの有効光路長は、 0.1 mol dm^{-3} 過マンガン酸カリウムの 0.1 mol dm^{-3} 硫酸溶液を用いて、波長 525 nm で $4.52 \times 10^3 \text{ nm}$ と決定した。又、He-Ne レーザーを用いて測定した内部反射素子 ($30 \text{ mm} \times 75 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ のガラス板) 内での反射回数は 8 回であった。実際の正確な反射回数は不明であるが、便宜的にこの反射回数を用いて計算すると、反射 1 回当たりの有効光路長は 565 nm となる。ここで求めた有効光路長は内部反射セルを透過セルと見たときの光路長で、通常、有効厚と呼ばれている。有効厚は内部反射素子表面から溶液中への距離ではあるが、実際に減衰波が溶液中に侵入する深さではない。 565 nm の有効厚に対応する侵入深さを見積もると 96.7

* 大阪大学理学部化学科: 560 大阪府豊中市待兼山町 1-1

** 兵庫教育大学自然系化学: 673-14 兵庫県加東郡社町下久米 942-1

Fig. 1 Cell for internal-reflection spectroscopy

nm となった。すなわち、測定される内部反射スペクトルは、ガラス表面から約 100 nm の厚さの溶液層に存在する吸光種のスペクトルであると言える。侵入深さは、減衰波の強度が内部反射素子表面の値の $1/e$ の値に減衰するまでの距離である。従って、厳密には、内部反射スペクトルは表面から 100 nm 以上の溶液の寄与も含む。又、通常の透過スペクトル測定では一定の光路長で測定を行うが、内部反射分光法では、光路長（有効厚）が、入射角、ガラスと溶液の屈折率、吸収係数及び波長の関数であるため、光路長は波長の走査とともに変化する。波長走査による屈折率及び吸収係数の変化に伴う光路長の変化は、ここで用いた波長領域では無視できる程度である。しかし、有効厚は波長に正比例するため、内部反射スペクトルは透過スペクトルに比べて長波長側で見掛け上吸収が強く現れる。本研究では、MB の化学種の存在量よりはむしろ帰属を主な目的とした。すなわち、吸収極大の位置や形などを重視したため、これに対する補正は行わなかった。

2.2 溶液の調製

MB は純正化学製特級試薬を精製せずそのまま用いた。MB 溶液は蒸留水とメタノールを用いて、所定の濃度になるように調製した。測定終了後の内部反射セルは内部反射素子に吸着した MB を完全に取り除くため、

メタノールで超音波洗浄した後、蒸留水でよく洗浄して次の測定に備えた。

3 結果と考察

3.1 MB 溶液の内部反射及び透過スペクトル

Fig. 2 に種々の濃度の MB メタノール溶液の内部反射スペクトル（実線）と透過スペクトル（破線）を示す。図中の M は mol dm^{-3} を示す。内部反射スペクトルの各波長の吸光度は MB 濃度に比例して増大した。ここには示さないが、透過スペクトルにおいても $2.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ の濃度範囲で同様のことが確かめられた。これらのことは、用いた濃度範囲において MB が同一の化学種で存在することを示す。又、Fig. 2 に見られるように、内部反射スペクトルと透過スペクトルはほぼ一致する。このスペクトルの一致と MB がエタノール中においては単量体として存在する²⁾ことを考慮すると、MB はメタノール中では溶液中においても、ガラスとの界面領域においても単量体として存在していると結論できる。Fig. 3 は種々の濃度の MB 水溶液の内部反射スペクトル（実線）と透過スペクトル（破線）を示す。示した透過スペクトルは、濃度が $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ のものである。緒言でも述べたように、MB は水溶液中で自己会合を起こすが、比較的低濃度では単量体と二量体だけが存在すると考えてよく、単量体換算濃度が $2.15 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 以下では $2\text{MB} \rightleftharpoons (\text{MB})_2$ の生成定数として $5.9 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ の値が報告されている²⁾。この値を用いて計算すると、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 水溶液での単量体の存在比（単量体濃度/単量体換算全濃度）は 90.4% となり、透過スペクトルは、ほぼ MB 単量体のスペクトルであると言える。一方、内部反射スペクトルは、メタノール溶液の場合とは対照的に、透過スペクトルとは異なった形を示した。例えば、透過スペクトルは 610 nm 付近にショルダーを持ち、665 nm に極大のある比較的鋭い吸収バンドを示すが、同濃度 ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) の MB 溶液に対する内部反射スペクトルは、反対に、660 nm 付近にショルダーを持ち、589 nm に極大のある幅広い吸収バンドを示す。このことは、MB が界面領域では溶液中と異なった溶存状態にあることを意味する。界面領域では界面会合のために単量体と二量体の存在比が変化するだけでなく、高次の会合体が生成することや吸着により新しい化学種が生成することが予想される¹⁾²⁾。更に、MB の濃度の増加に伴い、内部反射スペクトルの吸収バンドがより短波長側に移動することや吸光度の増大は濃度に比例しないこともこれらの予想を間接的に支持

Fig. 2 Internal-reflection spectra and transmission spectrum of MB methanol solutions

Solid curve: internal-reflection spectra; Dotted curve: transmission spectrum obtained with a 1 cm cell

Fig. 3 Internal-reflection spectra and transmission spectrum of MB aqueous solutions

Solid curve: internal-reflection spectra; Dotted curve: transmission spectrum obtained with a 1 cm cell

すると考えられる。

以上, MB メタノール溶液及び水溶液の内部反射スペクトルと透過スペクトルの比較により, メタノール溶液中では MB は溶液中と界面領域で同じ単量体として存在すること, 水溶液中では溶液中と界面領域では溶存状態が異なることが確かめられた。

Fig. 4 Internal-reflection spectra of MB solutions with water-methanol solvents

Concentration of MB: 5.0 mmol dm^{-3} ; a, 0 vol% (methanol); b, 10; c, 20; d, 30; e, 35; f, 40; g, 45; h, 50; i, 55; j, 60; k, 65; l, 70; n, 80; o, 90; p, 100

3・2 MB 水-メタノール溶液の内部反射スペクトルの因子分析

前節の結論をもとに, MB が水-メタノール混合溶媒とガラスの界面領域でどのような化学種として存在するのか, 又その化学種の存在比がどのように変化するのかを検討するため, 水-メタノールの混合比を変えた, 一連の MB 溶液に対する内部反射スペクトルを因子分析法により解析した。Fig. 4 に異なった水-メタノール混合比を持つ 5.0 mmol dm^{-3} MB 溶液の内部反射スペクトルを示す。Fig. 4 に示すように, メタノール 0~70 vol% (vol% は体積百分率を示す。)のスペクトル(下)の吸光度は, メタノール混合比の増加とともに, 630 nm より短波長側で減少していくが, 630~680 nm では反対に増加し, 680 nm より長波長側では減少する。一方, 70~100 vol% のスペクトル(上)では全波長領域でメタノール混合比の増加に伴って吸光度は減少した。これらのスペクトルを因子分析法により解析した。因子分析法では, 成分数(因子数)が多いほど実測スペクトルをよく再現するが, ここでは 3 成分で十分に実測スペクトルを再現することができた。Fig. 5 にこれらの 3 成分のスペクトルと相対濃度(以後, 単に濃度と略す)を示す。又, Fig. 6 は任意に選んだ 6 個の MB 溶液の実測スペクトル(実線)と Fig. 5 の 3 成分のスペクトルを用いて計算した再現スペクトル(破線)を表す。実測及び再現スペクトルはほとんど一致してお

Fig. 5 Spectra of three components and their relative concentrations obtained by factor analysis

Fig. 6 Observed and calculated spectra
Solid curve: observed; Dotted curve: calculated

り、成分数は3で十分であることが確かめられる。Fig. 5のスペクトルと濃度は、いわゆる pure wavelength 条件⁸⁾ (一つの純成分のみが有限の吸光度を持ち、他の成分は吸光度を持たないという波長が、それぞれの純成分について存在するという仮定)に従って、計算上得られたものであるため、例えば第二、第三成分のスペクトルに負の吸光度が現れることや3成分の濃度の和が必ず

Fig. 7 Optimized component spectra and their relative concentrations obtained by factor analysis

Solid curve: optimized component spectra; Dotted curve in (a): transmission spectra of $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ MB methanol solution; Dotted curve in (b): spectrum of a monomer in an aqueous solution; Dashed curve in (b): spectrum of a monomer bound to Na montmorillonite; Dotted curve in (c): spectrum of a dimer in an aqueous solution; Dashed curve in (c): spectrum of a n -mer bound to Na montmorillonite. Spectra of MB in an aqueous solution and bound to Na montmorillonite were obtained from Bergmann *et al.*²⁾.

しも1にならないなど、現実と矛盾する部分を含んでいる。

次に、これらの矛盾を解決し、現実にあったスペクトルを得るために、幾つかの条件を仮定した。1) 各々の成分のスペクトルはすべての波長領域で負の吸光度を持たない。2) 3成分の単量体換算濃度の和はほぼ一定となるようにする。これらの条件とともに現実的であり試料条件より明らかである。更に、MBの界面領域での溶存状態を考慮して次の3条件を加えた。3) メタノール100 vol%ではMBは単量体としてだけ存在する。4) メタノール0 vol%すなわち、水溶液中では界面領域にMBの単量体は存在しない。5) 各成分の濃度がメタノールの割合の増加・減少に伴い漸次的に変化する。3)は、前節で述べたように、メタノール溶液中では界面領域においてもMBは単量体として存在することから妥当な仮定と考えられる。4)については、二量体の生成定数が求められている上限濃度 ($2.15 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) での水溶液中の単量体の存在比は46.1%ではあるが、より高濃度の 5.0 mmol dm^{-3} では高次の会合体が生成し単量体の濃度は更に小さくなること、更に界面領域では高次の会合や吸着により、溶液中に比べてより単量体が存在しにくいことが予想されるため、この条件を取り入れた。5)は濃度が滑らかに変化することを仮

定して取り上げたものである。以上の条件を仮定して最適化した成分スペクトルとその濃度を Fig. 7 に示す。ここで得られたスペクトルの強度（吸光度）は単量体に換算されたものであり、例えば、ある成分の化学種が二量体であればその吸光度は 2 倍となり、濃度は 1/2 倍となる。内部反射分光法では界面に生じるエバネッセント波の強度がガラス表面から溶液中に指数関数的に減衰するため、全体のスペクトルに対する表面近傍の成分のスペクトルの寄与は表面から離れたところの成分のスペクトルのそれより強調される。このことは、スペクトルの形状や水-メタノール混合比変化に伴う各成分の濃度変化にはあまり影響を与えないが、成分間の濃度の相対的な関係には大きく影響する。本研究では、光線の入射角など内部反射素子内での光線の挙動が不明であり、深さ方向に対する濃度分布が正確に見積もれなかったために、この影響を評価することは困難であった。そのため得られた成分の濃度は、成分間の相対的な関係において見掛け上のものである。

3.3 成分スペクトルの帰属

因子分析法によって得られた三つの成分スペクトルが MB のどのような化学種に対応するのかについて考察する。Fig. 7 に各成分の成分スペクトル（実線）とそれを帰属するときに参考としたスペクトルを合わせて表示した。第一成分のスペクトル（a）には MB メタノール溶液の透過スペクトル（破線）、第二成分のスペクトル（b）には Bergmann ら²⁾によって求められた水溶液中の単量体（破線）及びモンモリロナイトに吸着した単量体のスペクトル（鎖線）、第三成分（c）に対しても彼らによって求められた水溶液中の二量体のスペクトル（破線）及びモンモリロナイトに吸着した n 量体（鎖線）を表示した。第一成分のスペクトルはメタノール溶液の透過スペクトルとほぼ一致することから、第一成分に対する化学種はメタノール溶液中の MB と同じ単量体であると考えられる。更に、この化学種が水-メタノール混合溶媒中にも存在することを考慮すると、これはメタノールによって溶媒和された MB の単量体であると推定される。第二成分のスペクトルは 610 と 666 nm に二つの吸収極大を示す。又、水溶液中の単量体のスペクトルも同様に 610 nm 付近にショルダーを持ち 664 nm に極大のある吸収バンドを示すことから、第二成分の化学種は単量体に関連したものと推定される。しかし、この成分が、単量体が存在しないと考えられるガラス-水溶液界面領域にも存在することや短波長側（610 nm）の吸収バンドが水溶液中の単量体（Fig. 3 参照）のそれに

比べて相対的に強く現れるなどの特徴を持つ。これらのことから第二成分の化学種は特殊な環境にある単量体であると考えられる。一方、モンモリロナイトに吸着した単量体のスペクトル（鎖線）では、短波長側の吸収バンドは第二成分のものに比べてより短波長側に現れてはいるが、第二成分と同様、相対的に強く現れている。

Bergmann ら²⁾はモンモリロナイトに吸着した単量体のスペクトルの短波長側の吸収バンドには、吸着した二量体からの寄与が含まれていることを強調している。すなわち、モンモリロナイトの吸着単量体の短波長側の吸収バンドは本来より長波長側に現れ、第二成分の短波長側の吸収バンドに近づくことが期待される。又、第二成分の成分スペクトルは、640 nm 以上の長波長側で、彼らの求めた吸着単量体のスペクトルと完全に一致している。これらのことから第二成分の化学種はガラスに吸着した単量体と推定した。第三成分の成分スペクトルは水溶液中の二量体のスペクトル（破線）と同様に 600 nm 付近の強い吸収バンドと 690 nm 付近の弱い吸収バンドを示す。690 nm 付近の吸収バンドは二量体に特徴的でその構造に起因するものである²⁾。吸着二量体にも長波長側の吸収バンドが観測されているが、その極大波長は更に長波長側（762 nm）であること²⁾や、モンモリロナイトに吸着した n 量体のスペクトル（鎖線）には対応する吸収バンドが 700 nm 付近には見られないことから、第三成分は溶液中の二量体であると推定した。第三成分の 600 nm 付近の強い吸収バンドは Bergmann ら²⁾によって求められた水溶液中の二量体のそれに比べ幾分短波長側に現れ、600 nm より短波長でのスペクトルの一致はよくない。多量体の生成に伴うこの吸収バンドの短波長移動を考慮すると、第三成分のスペクトルには二量体だけでなくそれ以上の多量体の寄与が含まれる可能性は十分考えられる。水-メタノールの混合比の変化に伴う濃度変化より二量体が混合溶媒中においても存在することは明らかである。しかし、二量体がメタノール 100 vol% 中には存在しないことを考慮すると、混合溶媒中ではこれは水によって溶媒和されていると考えられる。以上、3 成分に対する化学種を考察した。前にも述べたように各成分の濃度関係は内部反射分光法の特性などから見掛け上のものとなるが、水-メタノールの混合比の変化に伴う溶液-ガラス界面で MB の化学種の変化を定性的に説明することができる。メタノール 0 vol% 付近のスペクトルは主にガラスに吸着した単量体と溶存した二量体で説明できる。メタノールの増加とともに二量体は減少し、溶存単量体が徐々に増加し始める。一方、吸着単量体は、ちょうど溶存単量体と二量体の濃度

の比率が入れ替わるメタノールの混合比で最大の濃度を持つ。これはメタノールの含まれる溶液中に溶存しにくくなった二量体がガラス表面に単量体として吸着することと、メタノールに富む溶液中で溶存しやすくなった単量体がガラス表面から溶け出すことの結果として生じると考えられる。最終的に、メタノール 100 vol% ではガラス表面から単量体が完全にメタノール溶液に溶け出し、溶存単量体だけとなる。

以上のように、水-メタノール混合溶媒-ガラス界面領域での MB の溶媒組成の変化に伴う動的な挙動が、可視内部反射分光法とそのスペクトルの因子分析法による解析から説明された。内部反射スペクトルの因子分析法による解析は、今後、固-液界面だけでなく液-液、気-液などの様々な界面の反応や現象の研究に有効であると考えられる。

文 献

- 1) E. Rabinowitch, L. F. Epstein: *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 69 (1941).
- 2) K. Bergmann, C. T. O'Konski: *J. Phys. Chem.*, **67**, 2169 (1963).
- 3) N. J. Harrick: "*Internal Reflection Spectroscopy*", (1967), (John Wiley & Sons, New York).
- 4) F. M. Mirabella Jr., N. J. Harrick: "*Internal Reflection Spectroscopy: Review and Supplement*", (1985), (Marcel Dekker, New York).
- 5) T. Hinoue, M. Kawabe, Y. Yokoyama: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 3811 (1987).
- 6) T. Hinoue, G. Imamura, Y. Yokoyama: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 3680 (1993).
- 7) 尾関 徹, 木原 寛, 藁目清一郎: 分析化学, **35**, 885 (1986).
- 8) T. Ozeki, H. Kihara, S. Hikime, S. Ikeda: *Anal. Sci.*, **3**, 285 (1987).
- 9) T. Ozeki, H. Kihara, S. Hikime: *Anal. Chem.*, **59**, 945 (1987).

Chemical species of Methylene Blue at interfacial regions between glass-water, methanol, and water-methanol mixed solvent; factor analysis of visible internal-reflection spectra. Teruo HINOUE, Yu YOKOYAMA* and Toru OZEKI** (*Osaka University, Machikaneyama-cho, Toyonaka-shi, Osaka 560; **Hyogo University of Teacher Education, 942-1, Shimokume, Yashiro-cho, Kato-gun, Hyogo 673-14)

Visible internal-reflection and transmission spectroscopy was employed for examining chemical species of Methylene Blue (MB) at the glass-solution interface, where the glass served as an internal-reflection element, and in the bulk of the solution. Both spectra of MB in methanol solution agreed with each other, suggesting that MB exists as a monomer in the interfacial region as well as in the solution. On the other hand, the internal-reflection spectrum was qualitatively different from the transmission spectrum in aqueous solution. This fact suggests that MB exists as different species in the interfacial region, such as a highly aggregated and an adsorbed species. Further, sixteen internal-reflection spectra of MB solutions differing in composition of water and methanol were examined by factor analysis. As the result, three component spectra were proposed and were assigned to a monomer in the methanol solution, a monomer adsorbed by glass, and a dimer in the aqueous solution.

(Received December 6, 1993)

Keyword phrases

Methylene Blue; solid-liquid interface; chemical species; internal-reflection spectroscopy; factor analysis.