衛生化学
THE JOURNAL OF
HYGIENIC CHEMISTRY
20 (2) 81-85 (1974)

界面活性剤と色素の相互作用 (第3報¹⁾)
アクリジンオレンジを用いたアルキルベンゼンスルホン酸
ナトリウムの定量法について

横山 剛, 得津勝治
和歌山県衛生研究所²⁾

Interaction between Surfactant and Dye. III. ¹⁾
Determination of Sodium Alkylbenzene Sulfonate by the
Use of Acridine Orange

TSUYOSHI YOKOYAMA and SHOJI TOKUTSU
Wakayama Prefectural Institute of Public Health²⁾

(Received November 22, 1973)

A fluorometric method for the determination of sodium alkylbenzene sulfonate was investigated. The proposed method utilized the quenching effect of fluorescence of acridine orange forming a complex by reaction with the surfactant. After mixing a sample and the dye solution with stirring and allowing to stand under a definite condition, the intensity of fluorescence obtained by irradiation with a exciting light at 490 nm was measured at 525 nm by spectrofluorometer. Since the proposed method was confirmed to be better than the official method using Methylene Blue because of its simple procedure, high sensitivity, and small standard deviation, it would be available as a routing method for the determination of sodium alkylbenzene sulfonate.

ま え が き

前にメチレンブルー (MB) とラウリル硫酸ナトリウム (NaLS) との相互作用について報告したが,⁸⁾ 今回 MB と同様に塩基性色素であるアクリジンオレンジ (AO) を用いて吸収スペクトル, 蛍光スペクトルを調べ界面活性剤との相互作用について検討し, 蛍光強度のクエンチングによるアルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (ABS)

の定量について検討した. ABS などのアニオン性界面活性剤の定量法としては, ラジオトレーサー法による定量法,⁴⁻⁶⁾ NaLS を酸加水分解した後, ガスクロマトグラフにより定量する方法⁷⁾ もあるが, 実用的には, より簡便な方法として比色法⁸⁻¹²⁾ が検討提案されている. なかでも MB を用いる方法が一般に使用されている.¹³⁻¹⁵⁾ しかし MB 比色法は実用上精度の面あるいは液相分離の

- 1) 第2報: 横山 剛, 薬剤学, **29**, 233 (1969).
- 2) Location: 271-2 Minato-higashinotsubo, Wakayama (和歌山市湊東ノ坪271-2).
- 3) 横山 剛, 薬剤学, **28**, 145 (1968).
- 4) 篠田耕三, 食衛誌, **3**, 387 (1962).
- 5) 川城 巖, 食衛誌, **3**, 392 (1962).
- 6) 佐々木恒孝, 油化学, **12**, 228 (1963).
- 7) 檜府直大, 食衛誌, **6**, 420 (1965).
- 8) J. H. Jones, *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, **28**, 398 (1945).
- 9) G. R. Wallin, *Anal. Chem.*, **22**, 616 (1950).
- 10) E. Gould, *Anal. Chem.*, **34**, 567 (1962).
- 11) 青木 大, 薬誌, **79**, 529 (1959).
- 12) 宇野豊三, 薬誌, **82**, 1017 (1962).
- 13) J. H. Jones, *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, **28**, 398 (1945).
- 14) J. Longwells, W. D. Maniece, *Analyst*, **80**, 167 (1955).
- 15) D. C. Abbott, *Analyst*, **87**, 286 (1962).

面などで必ずしも十分とはいえない点もある。

著者らは精度の向上、実用上のより簡便化を目的として AO による蛍光分析法を検討し、ほぼ満足すべき結果を得たので報告する。

実験方法

1. 装置 蛍光光度計：日立 204 型自記蛍光分光光度計

攪拌装置：サーモミキサー-105型

2. 試薬 緩衝液 (pH 7)：0.75M リン酸水素 2 ナトリウム 溶液と 0.75M リン酸水素 1 カリウム 溶液により pH 7 に調整する。

AO 溶液：メルク社製 AO 5.5×10^{-5} M 溶液を pH 7 の緩衝液で調整する。

ABS 溶液：花王石鹼株式会社より 分析用試薬 として 提供 を 得 た ドデシルベンゼンスルホン酸 ナトリウム (DBS) 5×10^{-2} — $1.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 水溶液。

3. 試験法 試料および ABS 溶液それぞれ 20ml を褐色共栓試験管にとり、それぞれの試験管に AO 溶液 2 ml 加え 10° で 90 秒間攪拌し、同温度で 45 分間静置する。水 20ml を使用して同様の操作をし、空試験溶液とする。励起波長 490nm, 蛍光波長 525nm で空試験溶液の蛍光強度を 100% として試料および ABS 溶液の蛍光強度 F および F_{st} を測定する。

ABS 濃度に対して $100 - F_{st}$ をプロットして検量線を作成し、試料について $100 - F$ を求めて検量線より濃度を求める。

結果および考察

1. ラウリル硫酸ナトリウム水溶液中における AO の可視吸収スペクトル並びに蛍光スペクトル

AO は MB と同様に分子会合性の色素で、その水溶液は高濃度では Beer の法則にしたがわない。

AO の可視吸収スペクトルは濃度の増加とともに短波長側にピークが移動する。低濃度では短波長側にわずかに肩のある吸収スペクトル (α 吸収： $\lambda_{max}=490\text{nm}$) を示し、濃くなるにつれて、この主吸収帯が減少し、短波長側の吸収が増大する (β 吸収： $\lambda_{max}=480\text{nm}$)。これは色素固有の会合性によるものと考えられる。

Fig. 1 に示すように AO は NaLS の濃度が 3×10^{-3} M までは α 吸収帯および肩の β 吸収帯が漸次減少し新たに 470nm に λ_{max} を持つ吸収帯 (γ 吸収) が出現する。

γ 吸収帯は NaLS の濃度が 3×10^{-3} M で最大に達し、さらに NaLS の濃度を増加させると γ 吸収帯の減少とともに再び α 吸収帯が増加することが認められた。この現象は MB の場合と全く同様で可視吸収スペクトルにおける短波長側への移動は界面活性剤と色素の複合体を生

Fig. 1. Changes in the Absorption Spectra of 1.2×10^{-5} M Aqueous Solution of Acridine Orange in the Presence of Na Lauryl Sulfonate (NaLS)

1. NaLS (none)	2. NaLS (10^{-3} M)
3. NaLS (3×10^{-3} M)	4. NaLS (6×10^{-3} M)
5. NaLS (10^{-2} M)	

Fig. 2. Effect of Na Lauryl Sulfonate (NaLS) on the Fluorescence of Acridine Orange (1.2×10^{-5} M) Solution

The value of the fluorescence intensity before addition of NaLS was taken arbitrarily equal to 100. Exciter wave length 490nm.

ずるためであり、さらに高濃度の活性剤添加による α 吸収の増加は、その複合体が可溶化ないしは再分散されたためと考えられる。

AO の蛍光スペクトルは、モノマーに対して緑色の蛍光 ($\lambda_{max}=525\text{nm}$)、ダイマーに対しては赤色の蛍光 ($\lambda_{max}=660\text{nm}$) であった。赤色蛍光は緑色蛍光よりかなり弱い強度であった。

Fig. 2 に示すように AO は NaLS 濃度が 3×10^{-3} M までは蛍光強度が漸次減少し、さらに NaLS の濃度を増加

させると蛍光強度は再び増大した。これは可視吸収スペクトルと同様の傾向を示した。

NaLS 濃度 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下の比較的低濃度における AO のクエンチングを利用して ABS の定量について検討した。

2. AO の励起波長および蛍光波長

AO の最高励起波長は 490nm, 最高蛍光波長は 525 nm であった。この両波長で以下の実験を実施した。

3. pH の影響

AO の蛍光強度は $0-1 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度範囲で直線的に増加し, $3 \times 10^{-5} \text{M}$ で最高強度を示し, それ以上の濃度では減少の傾向を示した。

pH については pH 5-9 の間で蛍光強度は pH の増加とともに低下した。しかし AO が $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 以下ではほとんど影響は認められなかった。条件を一定にするため pH 7 の緩衝液を用いることにした。

4. AO-DBS 複合体の蛍光強度の経時変化について

pH 7 の緩衝液で調整した $1.5 \times 10^{-5} \text{M}$ の AO 溶液および $5 \times 10^{-6} \text{M}$ あるいは $1 \times 10^{-5} \text{M}$ の DBS 溶液各 10ml を混合攪拌し, この混合液を 10° で放置し蛍光強度の時間変化について, 検討した。

Fig. 3 に示すように40分までは蛍光強度の増加が認められたが, 40分以後は2時間まで一定であった。放置時間は40分と定めた。

5. 反応温度について

pH 7, 放置時間40分の条件で温度と蛍光強度の関係を示す。温度を $10^\circ, 20^\circ, 30^\circ$ および 50° について検討した。

Fig. 4 に示すように AO のみおよび DBS 濃度 $2.5 \times 10^{-6} \text{M}$ では温度が高くなるにつれて若干蛍光強度が低くなり, $5 \times 10^{-6} \text{M}$ については蛍光強度が高くなったが, 50° では濃度による蛍光強度の差はほとんど認められなかった。したがって反応温度は濃度による蛍光強度の差がもっとも大きい 10° と定めた。

6. AO の最適濃度およびその定量範囲について

Fig. 5, Table I は pH 7.0 緩衝液で調整した AO ($1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$, $2 \times 10^{-6} \text{M}$) と, DBS [$5 \times 10^{-8} \text{M}$ ($0.174 \mu\text{g}$)— $1.2 \times 10^{-5} \text{M}$ ($41.75 \mu\text{g}$)] 各10ml の混合液について試験法により操作し蛍光強度を測定し DBS 濃度と蛍光強度 ($100-F$) の関係を示したものである。AO 濃度が低いほど感度は増大するが, その直線性と定量範囲を考慮すると, AO 濃度 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 添加の場合がもっとも一般的に用い得る濃度であると考えられる。その場合の DBS 定量範囲は $8.70 \times 10^{-2}-2.79 \mu\text{g/ml}$ であった。

微量の DBS の測定には, より希薄な AO 溶液を使用することにより可能であり, Table I に示すように

Fig. 3. Change of Fluorescence Intensity of Na Dodecylbenzene Sulfonate (DBS) -Acridine Orange (AO) Solution at 10°

—○— : AO alone
- - -○- : $2.5 \times 10^{-6} \text{M}$ DBS
—●— : $5.0 \times 10^{-6} \text{M}$ DBS

Fig. 4. Effect of Temperature on the Fluorescence Intensity of Na Dodecylbenzene Sulfonate (DBS)-Acridine Orange (AO) Mixture

—○— : AO alone
- - -○- : $2.5 \times 10^{-6} \text{M}$ DBS
—●— : $5.0 \times 10^{-6} \text{M}$ DBS

Fig. 5. Calibration Curve of Na Dodecylbenzene Sulfonate at Various Concentrations of Acridine Orange

—○— : $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$
- - -○- : $5.0 \times 10^{-6} \text{M}$
—▲— : $2.0 \times 10^{-6} \text{M}$

AO 添加濃度 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ では, DBS $3.48 \times 10^{-2} - 1.39 \mu\text{g/ml}$, AO $2 \times 10^{-6} \text{M}$ では $1.74 \times 10^{-2} - 6.96 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ の DBS が検出可能であった.

7. 本法とMB法の比較

本法と現在 ABS の定量法として一般的に採用されている MB 法¹⁶⁾ について定量限界, 標準偏差について比較した.

7-1. 定量限界について 本法とMB法の定量限界は Table II に示すように MB 法が $1.74 \mu\text{g}$ に対して, 本法はその約10倍の $0.17 \mu\text{g}$ の感度があった. したがって微量の ABS の定量には本法が適当であることがわかった.

7-2. 標準偏差について DBS $7 \mu\text{g}$, $3.5 \mu\text{g}$ 添加溶液について本法とMB法との定量結果および標準偏差を Table III に示した. 標準偏差は $7 \mu\text{g}$ 添加溶液では両者の差は認められなかったが, $3.5 \mu\text{g}$ 添加溶液では本法の方が勝っていた.

8. 非イオン界面活性剤の影響について

洗剤その他の市販品は, 陰イオン界面活性剤と非イオン界面活性剤の混合使用の場合が多い. 非イオン界面活性剤共存時の定量について, 本法とMB法の比較検討を行なった.

DBS $7 \mu\text{g}$ 溶液に非イオン界面活性剤としてポリオキシエチレンソルピタンモノオレート (以下ポリオキシエチレンを POE とする), POE モノステアレート, POE セチルエーテル, POE ノニルフェニルエーテル各 $7 \mu\text{g}$,

TABLE I. Fluorescence Intensity of Acridine Orange (AO) in the Presence of Na Dodecylbenzene Sulfonate (DBS)

DBS concn. (M)	DBS $\mu\text{g/ml}$	AO concn. (M)		
		1×10^{-5}	5×10^{-6}	2×10^{-6}
5.0×10^{-8}	1.74×10^{-2}	0	0	0.5
1.0×10^{-7}	3.48×10^{-2}	0	0.5	1.6
2.5×10^{-7}	8.71×10^{-2}	1.4	2.0	2.6
5.0×10^{-7}	1.74×10^{-1}	2.7	3.5	5.2
1.0×10^{-6}	3.48×10^{-1}	6.0	6.5	9.3
1.5×10^{-6}	5.22×10^{-1}	8.8	11.0	12.3
2.0×10^{-6}	6.96×10^{-1}	11.0	14.0	17.5
4.0×10^{-6}	1.39	19.3	26.0	19.0
6.0×10^{-6}	2.09	33.0	27.5	
8.0×10^{-6}	2.79	42.3	27.5	
1.0×10^{-5}	3.48	42.3	28.0	
1.2×10^{-5}	4.18	42.0		

TABLE II. Minimum Detectable Concentration of Na Dodecylbenzene Sulfonate for Acridine Orange (AO) and Methylene Blue (MB) Methods

Method	AO concn. (M)	Minimum detectable concn. (μg)
AO	1.0×10^{-5}	0.87
	5.0×10^{-6}	0.35
	2.0×10^{-6}	0.17
MB		1.74

TABLE III. Recovery of Added Na Dodecylbenzene Sulfonate and Standard Deviation of Acridine Orange (AO) and Methylene Blue (MB) Methods

Added (μg)	AO method			MB method		
	Found (μg)	Mean (μg)	Standard deviation	Found (μg)	Mean (μg)	Standard deviation
3.5	2.94	3.22	0.26	3.33	3.93	0.82
	3.29			2.98		
	3.64			3.12		
	2.94			4.90		
	3.29			5.29		
				3.96		
7.0		6.89	0.48	3.96	6.79	0.44
	6.30			5.99		
	7.28			7.53		
	6.30			6.83		
	7.28			6.76		
	7.28			6.69		
				7.14		
				6.58		

16) “衛生試験法注解,” 第2版, 日本薬学会編, 金原, 東京, 1965, p. 711.

TABLE IV. Effect of Non-ionic Surfactant on Acridine Orange (AO) and Methylene Blue (MB) Methods

Non-ionic surfactant	Method	Concn. of non-ionic surfactant									
		7 μg					14 μg				
		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	AV.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	AV.
POE sorbitan	AO	99.2	98.2	100.2	98.3	99.0	101.3	100.2	99.7	99.2	100.1
Monoleate	MB	99.3	100.0	100.7	—	100.0	103.3	100.0	100.7	—	101.3
POE sorbitan	AO	100.2	100.0	100.5	100.5	100.3	100.6	99.0	99.0	100.5	99.8
Monostearate	MB	94.1	101.2	102.9	—	99.4	100.0	101.2	100.6	—	100.6
POE cetyl ether	AO	99.0	99.0	99.1	100.4	99.4	102.7	100.9	99.8	99.8	100.8
	MB	99.4	96.8	98.7	—	98.3	98.7	107.0	98.7	—	101.5
POE nonyl	AO	101.6	100.6	100.0	99.5	100.4	101.1	100.6	99.0	101.0	100.7
Phenyl ether	MB	98.0	100.0	99.3	—	99.1	102.0	100.0	102.0	—	101.3

POE: polyoxyethylene

14 μg を添加し、本法および MB 法によって DBS 7 μg のみの蛍光強度および吸光度を A , 添加溶液の蛍光強度および吸光度 B を測定し, B/A % の比較を Table IV に示した.

Table IV に示すように 両法とも非イオン界面活性剤による影響は認められなかった.

9. 試験法の検討

前項までの実験において AO 溶液 10ml, 試料 10ml について検討したが, この場合試料は 2 倍に希釈されるため, 濃度の高い AO (例えば $5.5 \times 10^{-5}\text{M}$) を 2ml 添加

し, 比較検討したが両者において検量線に差が認められなかったので AO 2ml 添加を標準試験法とした.

結 論

AO による ABS の定量は一般に使用されている MB 法に比べて操作が簡単であり, 定量限界, 標準偏差にも利点が認められ実用化できるものと考えられる.

謝辞 終わりに本研究にあたり, 御指導, 御鞭撻を賜った阪大薬学部 鎌田 皎教授, 矢田 登博士に謹謝する.