水中の微量アルキルベンゼンスルホン酸塩 (ABS) の定量 (第 2 報)¹⁾

高速液体クロマトグラフィーによるメチレンブルー 活性物質中の ABS の定量

高野 敏・高崎智恵子・国弘和雄・山中 実

花王石鹸株式会社家庭品研究所 (東京都墨田区文花 2-1-3)

Determination of Trace Amounts of Alkyl Benzenesulfonates (ABS) in Water. II.

Determination of ABS in Methylene Blue Active Substances by High Performance Liquid Chromatography

Satoshi TAKANO, Chieko TAKASAKI, Kazuo KUNIHIRO and Makoto YAMANAKA

Household Products Research Laboratories KAO SOAP Co., Ltd.

(1-3, 2-Chome, Bunka, Sumida-ku, Tokyo)

A simple and selective method for the determination of trace amounts of ABS has been developed. It was previously reported¹⁾ that the complexes of Methylene Blue (MB) with methylene blue active substances (MBAS) dissociated into MB and MBAS on silicagel thin-layer chromatography. Based on this phenomenon, ABS contained in MB-MBAS complex could be determined by high performance liquid chromatography (HPLC) under the same conditions as previously reported¹⁾. The methylene blue active substances in samples were extracted with chloroform in a similar way to MB spectrophotometric method, then concentrated, dissolved in methanol and determined by HPLC. Good recovery and reproducibility were obtained on the determination of ABS in river and waste water. Further, the measured values of ABS agreed well with those obtained by the previously reported method¹⁾. Therefore, this simple method is applicable to the determination of trace amounts of ABS in river and waste water.

1 緒 言

微量のアルキルベンゼンスルホン酸塩 (ABS) の定量には、メチレンブルー比色法^{2)~4)} が一般に用いられているが、メチレンブルー活性物質 (MBAS) が ABS 以外にも存在するため同時に定量され、ABS に対する選択性に難点があった。著者らは、Amberlite XAD-2 を用いたカラムクロマトグラフィーで前処理した後、高速液体クロマトグラフィーで定量する事により、水中の ABS が選択的に定量できる事を既に報告した¹⁾。同時に、シリカゲル薄層クロマトグラフィーで MB-MBAS 錯体を分析し、MB と ABS (もしくは MBAS) が、シリカゲル上で展開中に解離する事を示した。

一方、ABS の定量を行った高速液体クロマトグラフィーにおいては、固定相としてシリカゲルを用いているので、上述の TLC と同様に分離カラム中で MB と ABS (もしくは MBAS) の解離が起こるものと考えられた。既に、Sallee ら⁵⁾ は 1-メチルヘプチルアミンとの錯体を、安部ら⁶⁾ は MB との錯体を、それぞれ赤外吸収を利用して定量しているが、検出感度が低い等の問題があった。しかし、定量手段として高速液体クロマトグラフィーを用いれば、これらの欠点を充分補えるものと考えられ、更に ABS 以外の MBAS に対する知見も得られるものと期待できる。

そこで、高速液体クロマトグラフィーにおける MB-ABS 錯体の挙動を検討した結果、既に報告した方法¹⁾ と同一の分析条件で ABS の定量が可能であり、その際 MB はカラムの上端に残って溶出されないことがわかった。更に、河川水等に含まれている MBAS を、MB と

1) 前報 (高野ほか, 油化学, **24**, 389 (1975)) を, 「水中の微量アルキルベンゼンスルホン酸塩の定量」第 1 報とする。

の錯体として抽出し、高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、既に報告した方法と良く一致し、再現性も良好な結果が得られ、河川水等に含まれる微量のABSを比較的簡便に定量できることがわかったので報告する。

2 実 験

2.1 装置及び試薬

アルカリ性ホウ酸ナトリウム溶液：M/20 ホウ酸ナトリウム溶液と、N/10-水酸化ナトリウム溶液を等量混和して調製した。

メチレンブルー溶液：メチレンブルー 0.25 g を純水 1 l に溶解して調製した。

他は、前報¹⁾に準ずる。

2.2 メチレンブルー比色法による MBAS の抽出及び定量

MBAS の定量は、JIS K3363 (1968) に従って行ったが以下にその操作を示す。

300 ml の分液漏斗 (A) に純水 50 ml、アルカリ性ホウ酸ナトリウム溶液 10 ml 及びメチレンブルー溶液 5 ml を加え、分液漏斗 (B) には純水 100 ml、アルカリ性ホウ酸ナトリウム溶液 10 ml 及びメチレンブルー溶液 5 ml を加えた。それぞれにクロロホルム 10 ml を加え、30 sec 振とう器で振とう (約 2 回/sec) した後分液した。ついで、2~3 ml のクロロホルムを加え、ゆるやかに振り混ぜ水層を洗う。これらの操作をもう一度繰り返した後、分液漏斗 (B) に 3 ml の 1.0 N-硫酸溶液を加えた。

MBAS として 10~150 µg を含むように試料液を採取して分液漏斗 (A) に加え、更に 15 ml のクロロホルムを加えて 1 min 振とうした。2 min 静置後、クロロホルム層を分液漏斗 (B) に移した。

分液漏斗 (B) を同様に処理して 2 min 静置した後、クロロホルムで潤した脱脂綿を詰めた漏斗を通して、クロロホルム層を 50 ml のメスフラスコに移した。クロロホルム 15 ml を分液漏斗 (A) に加え、再び同様な抽出分液操作を繰り返した。

クロロホルム層を 50 ml に定容し、10 mm のガラスセルに移して、ブランク液を対照として波長 650 nm における吸光度を測定した。吸光度が 0.1 以下の場合には、50 mm のガラスセルを用いた。あらかじめ標準 ABS を用いて作成した検量線から MBAS 量を求めた。

2.3 高速液体クロマトグラフィーによる ABS の定量

2.2 項の操作によって得られた MBAS 溶液から、クロロホルムを留去した後、メタノールを用いて残分を溶

解し、共せん付き試験管に移してメタノールを完全に除去した。メタノール 1 ml を精確に加えて内容物を溶解し、高速液体クロマトグラフィーにより分析して、あらかじめ作成した検量線から ABS 含量を求めた。なお、試料分析と並行してブランク試験を行う。

分析条件は既に報告したように¹⁾、固定相としてシリカゲルを、移動相として *n*-ヘキサン-エタノール (8/2)、及びそれに硫酸を 0.01% 添加した 2 種類の溶離液を用いて段階溶出を行った。

3 結果及び考察

3.1 高速液体クロマトグラフィーにおける MB-ABS 錯体の挙動

2.2 項に従って抽出した MB-ABS 錯体を、既に報告した分析条件¹⁾で高速液体クロマトグラフに注入し、その挙動を検討した。その結果、シリカゲル薄層クロマトグラフィーにおける挙動¹⁾から予想されたように、MB-ABS 錯体を注入した場合でも、ABS だけを注入した場合と同一の保持時間で ABS が溶出され、MB はカラムの上端に保持されたままであった。また、MB-ABS 錯体を繰り返し注入した際の測定精度は、ABS を注入した際のそれと差はなく、標準偏差 0.4% と良好な結果を与えた。更に、MB-ABS 錯体の注入量を増した場合加成性のあることが認められ、カラム内で MB と ABS が完全に解離しているものと考えられた。

一方、カラム上端に保持された MB は、測定を繰り返すとわずかずつ移動する事が認められた。しかし、通常の測定条件では、連続 12 hr 程度測定しても、MB はカラムの 2/3 程度の位置にあり、この程度の連続使用は可能であった。また、カラム内に保持された MB は、メタノールに硫酸を 0.1% 程度添加した溶離液で容易に溶出され、そのまま通常の測定を繰り返すことができる。

3.2 回収率及び測定精度

3.1 項の結果から、高速液体クロマトグラフィーを用いて ABS の分析が可能であることが知られたが、更に水溶液中から 2.2 項に従って ABS を抽出し、高速液体クロマトグラフィーで分析して、回収率及び再現性を検討した。

その結果は Table-1 に示すように、ABS の回収率は 97~98% といくらか低めの値を与えたが、再現性は満足すべきものであった。しかし、低濃度になるとやや再現性が低下する傾向が認められるので、十分な精度を得るためには、ABS として 10 µg 前後を必要とするものと考えられる。

3.3 妨害物質の影響

Table-1 Recovery and reproducibility of ABS.

Taken (μg)	Found (μg)	Taken (μg)	Found (μg)
125.5	118.0	8.55	
	120.0		8.45
	129.5		9.20
	118.0		8.45
	126.0		8.20
	122.0		8.95
	120.0		7.45
	119.0		8.20
	123.5		
	117.0		
$\bar{x}$ (μg)	121.3	$\bar{x}$ (μg)	8.41
$\sigma/\bar{x}$ (%)	3.3	$\sigma/\bar{x}$ (%)	6.7
Recovery (%)	96.7	Recovery (%)	98.4

Table-2 Effect of interfering compounds on Methylene Blue spectrophotometric method and the proposed method.

Substance	Added (μg)	ABS (μg)		
		Taken	Method 1	Method 2
Sodium thiocyanate	110	82.5	88.0	80.5
Sodium chloride	400,000	82.5	85.8	80.8
Phenol	98	82.5	87.8	82.5
Sodium benzoate	92	82.5	87.9	78.3
Sodium dodecyl sulfate	117	82.5	214.9	78.0
Sodium <i>p</i> -toluene sulfonate	113	82.5	86.3	79.0

Method 1: Methylene Blue spectrophotometric method

Method 2: proposed method

本法は、メチレンブルー比色法を前処理手段として用いているので、メチレンブルー比色法に対して妨害を示すと考えられる数種の化合物を ABS に添加し、その影響を検討した。結果を、**Table-2** に示す。

このように、**Table-2** に示した化合物は、大なり小なり MBAS 値に影響を及ぼすが、この MBAS を高速液体クロマトグラフィーで分析した結果をみると、いずれも ABS 単独系における測定誤差範囲内の値を示している。更に、ABS の平均回収率も 96.8% と、ABS 単独系と変化はみられず、これらの物質の影響を完全に除ける事がわかる。一方、MB-ABS 錯体の生成もしくは、そのクロロホルム層への移行を阻害するような物質（タンパク質等）が共存した場合、回収率の低下が懸念されるが、**3.5** 項に示すように、河川水のような系では問題ないものと考えられる。

従って、高速液体クロマトグラフィーの ABS に対する選択性を考慮に入れば¹⁾、本法に対して妨害を示す物質は、ABS とかなり構造の類似したものであると考えられる。

3.4 ABS 以外の MBAS の挙動

Fig.-1 (a) に、河川水を分析した際の高速液体クロマトグラムを示したが、ABS のピーク以外に保持時間で 2~5 min のところにピークが認められる。一方、ABS だけを同様に処理して分析した (b) のクロマトグラムにも、やはり 2~5 min の位置にピークが認められ、クロロホルムもしくは、他の試薬中に含まれる微量の不純物に由来するものと考えられる。従って、河川水中に含まれるクロロホルム可溶性物質の影響をも考え併せれば、このピークがすべて ABS 以外の MBAS に由来するものではない事は明らかである。しかし、少なくとも紫外領域に吸収を持つ ABS 以外の MBAS は、このピークの一部を占めているものと考えられ、ABS に比較して極性が小さい物質である事を示唆している。それに対して、無機性の MBAS は、MB と錯体を形成した状態でカラムの上端に保持されているものと考えられるが、他の紫外領域に吸収を持たない MBAS の挙動は不明である。

いずれにしても、**Fig.-1** (a) から明らかなように、ABS と他のきょう雑物質は完全に分離されており、妨害のない状態で ABS の定量が可能な事を示している。

(a) river water, (b) ABS, Mobile phase: (1) *n*-hexane-ethanol (8:2), (2) 0.01% sulfuric acid in *n*-hexane-ethanol (8:2), stepwise elution (1) → (2), Column conditions: dimensions 500 mm × 3 mm i.d., silicagel, 40°C, Pressure: 17 kg/cm², Flow: 1.1 ml/min, Detector: 225 nm.

Fig.-1 Liquid chromatograms of river water and ABS by the proposed method.

3.5 実試料への応用

河川水 100 ml を採取し、**2.2**、**2.3** 項に従って測定した結果を **Table-3** に示したが、再現性は満足すべきものであった。この結果からみて実試料の測定にあたっては、測定誤差としておよそ ±5% 程度が見込まれる。また、**3.2** 項の検討により、再現性良く定量するためには ABS として 10 μg 前後を必要とするので、試料採取量を 100 ml とした場合、検出限界は 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後と

Table-3 Determination of ABS in river and waste water.

Sample	Methylene Blue spectrophotometric method ($\mu\text{g/ml}$)	Proposed method ($\mu\text{g/ml}$)
Tama river (Marukobashi)	1.43	1.11
		1.17
		1.06
		1.15
Sumida river (Shirahigebashi)	0.56	0.28
		0.27
		0.34
Edo river (Ichikawabashi)	0.27	0.27
		0.29
Waste water	0.28	0.18
		0.19
		0.18

考えられる。

河川水に ABS を添加して測定した結果を **Table-4** に示したが、添加した ABS の平均回収率は 96.7% と、ABS 単独系のそれと変化はなかった。従って、**3・3** 項に述べたように、河川水のような系を対象とする限り、MBAS の生成もしくは抽出を阻害するような物質の影響はほとんどないものと考えられる。

Table-4 Recovery of ABS added in river water.

Sample	Originally present ($\mu\text{g/ml}$)	Added ($\mu\text{g/ml}$)	Total ($\mu\text{g/ml}$)	Found ($\mu\text{g/ml}$)
Tama river (Marukobashi)	1.12 ± 0.06	0.41	1.53 ± 0.06	1.47
				1.42
				1.56

Table-5 Comparison of the results by three methods.

Sample	Methylene blue spectrophotometric method ($\mu\text{g/ml}$)	Previously reported method ¹⁾ ($\mu\text{g/ml}$)	Proposed method ($\mu\text{g/ml}$)
Tama river (Marukobashi)	1.43	0.97	1.12
Waste water	2.12	1.66	1.61
Waste water	0.28	0.15	0.18

次に、Amberlite XAD-2 で処理後、高速液体クロマトグラフィーで測定¹⁾した結果と、本法で測定した結果の比較を **Table-5** に示した。このように、両法の測定値はほぼ一致しており、本法が河川水等の簡便な微量 ABS 定量法として、充分応用可能なことを示している。

4 結 語

2・2 項に従って抽出した MB-MBAS 錯体を、直接、高速液体クロマトグラフィーで分析することにより、河川水等に含まれる微量の ABS を比較的簡便に定量できることを示した。また、河川水のような試料を対象とする場合には、MB 錯体抽出操作が高速液体クロマトグラフィーの前処理手段として、Amberlite XAD-2 と同程度に有効であることがわかった。しかし、MB 錯体を抽出する際に乳化するような試料では、本法が適用できないことはいうまでもない。そのような場合には、Amberlite XAD-2 を前処理手段として用いる必要がある。

一方、これらの乳化性物質は、Amberlite XAD-2 で処理すれば容易に除去できるので、Amberlite XAD-2 と MB 錯体抽出操作、更に酸分解処理を組み合わせる前処理手段とし、高速液体クロマトグラフィーで定量すれば、ABS だけをより一層選択的に定量することが可能であろう。

なお、MB 錯体を抽出する際使用する MB 比色法は、種々の方法が提唱されているので、どれを使用しても良いであろう。また、MB 以外の色素を用いている場合でも、シリカゲル上で MB と同様な挙動をするのであれば、同様に使用できるものと考えられる。

終わりに、本研究を行うに当たり適切な御助言をいただいた、花王石鹼株式会社家庭品研究所、常盤文克所長に厚く感謝いたします。

(昭和 50 年 6 月 30 受理)

文 献

- 1) 高野 敏, 八木典子, 国弘和雄, 油化学, **24**, 389 (1975)
- 2) J. Longwell, W.D. Maniece, *Analyst*, **80**, 167 (1955)
- 3) D.C. Abbott, *Analyst*, **87**, 286 (1962)
- 4) 大槻 晃, 平山光衛, 半谷高久, 内海諭, 日化, **85**, 335 (1964)
- 5) E.M. Sallee et al., *Anal. Chem.*, **28**, 1822 (1956)
- 6) 安部喜也, 半谷高久, 分析化学, **21**, 252 (1972)