

## 脂肪酸によるステインスオールのメタクロマジー

坪内正弘  
(化学)

### Metachromasy of Stains-all with Fatty Acids

Masahiro TSUBOUCHI

*Chemistry*

**Abstract.** A color reagent for fatty acids and soaps is proposed. Stains-all was found to form an ion association compound with the fatty acids or anionic surfactants in an aqueous phase to show a color change. This phenomenon finds an application in the visual screening of them without extraction procedure. An aqueous solution of Stains-all is red. The dye solution soon turns to a yellow color in the presence of anionic surfactants or fatty acids. Fatty acids require an alkali medium for this change in color. The optimum concentration of ammonia was between  $10^{-4}$ M and  $10^{-2}$ M. The color change from red to yellow in an acetate buffer solution (pH 4.7) takes place only in the presence of surfactants such as laurylsulfate and laurylbenzenesulfonate. The wavelength of maximum absorbance for their yellow compounds and the limiting concentration for visual detection are as follows: caprate, 456 nm,  $2 \times 10^{-4}$ M; laurate, 456 nm,  $2 \times 10^{-5}$ M; myristate, palmitate, oleate, and stearate, 448 nm,  $1 \times 10^{-5}$ M; laurylsulfate, 450 nm,  $1 \times 10^{-5}$ M; laurylbenzenesulfonate, 436 nm,  $1 \times 10^{-5}$ M respectively. Continuous variation plot has a maximum absorbance at 0.33 mole fraction of myristate, indicating a 1 to 2 myristate-dye ratio.

大学初級の学生にとって、定性分析は化学の最も基本的な分野とされている。定性分析を行なう場合、検出反応が特異的であればある程、操作が簡略化できるしまた誤りも少ない。そして各物質やイオンのおおのにおに特異的に反応する感度のよい定性反応がそろっていれば、前処理として行なう分離操作は不必要であり、試料中の成分を直接調べることができるので便利であるが、今なおこのような完全に特異的な検出反応はほとんどみつかっていない。現在使われている多くの呈色反応や沈殿反応は、たいがい多種類のイオンや物質に共通のものであるから、どうしても分離操作の後で分析することになる。無機イオンにくらべて、水溶液中の有機物に対する定性反応は、この傾向はさらに強く反応の種類も少ない。水溶性有機物のうち、日常的

に接する機会の多い界面活性剤は主として合成界面活性剤と石けんであり、陰イオン系合成界面活性剤には、メチレンブルーによる有機溶媒抽出法が一般に使われている<sup>1,2)</sup>。もちろんこのメチレンブルー抽出法も陰イオン界面活性剤に特異的であるのではなく、過塩素酸イオン、ヨウ化物イオン、チオシアン酸イオン、水銀(II)やコバルト(II)の錯陰イオンのような無機イオンとも反応する。一方石けんは脂肪酸塩であり、大学一年生の化学実験に導入できる呈色反応はほとんど無い。試験管だけである程度識別できる呈色反応として、ステインスオールによるメタクロマジー反応を調べ、脂肪酸塩との反応の様子を検討した。

### ステインスオールのメタクロマジー反応

メタクロマジー現象は、分子量の大きい陽イオンと陰イオンとの間にみられることが多い。たとえば、ポリビニル硫酸エステルカリウム塩と陽イオン性コロイド電解質との間で行なわれるコロイド滴定の当量点の判定には、トルイジンブルーのポリビニル硫酸エステルによるメタクロマジー現象が利用されている。タン白誤差を利用した色素によるタン白の検出も、一つのメタクロマジー現象であろう。メタクロマジー現象は、比較的低い濃度で反応が起るが、種類のいかんにかかわらず多くの電解質の存在によって左右されることが多い。このことは、メタクロマジー現象が、基本的には水溶液中での吸着現象にもとづいていることによるものと考えられる。メタクロマジーによる呈色反応は、極めて短時間で起るが、その結合力は、イオンの荷電による静電引力とファンデルワールスの引力による分散力によるものであろう。静電引力は、解離基の強弱とイオンの価数に左右されるので、解離定数が大きくてよく解離しているものほどよく結合する。一方ファンデルワールスの引力については、水溶液中での分子量が大きいものほど分子間の引力も強くなると推定される。このことから、脂肪酸塩はタン白質などに比べると分子量はずっと少なく、脂肪酸の酸解離定数もそんなに大きくない。したがって、脂肪酸によるメタクロマジー現象は考えにくいのが一般的であるが、ステインスオールは、水溶液中で微量の脂肪酸によってメタクロマジー現象を示すことがわかった。

ステインスオールは、1-エチル-2-[3-(1-エチルナフト[1,2-d]チアゾリン-2-イリデン)-2-メチルプロペニル]ナフト[1,2-d]チアゾリン-2-イリデン)-2-メチルプロペニル]ナフト[1,2-d]チアゾリンの臭化物塩である。分子量は559.60であり、カルボシアニン色素の一種である。水溶液中での極大吸収波長は575nmであるが、実際に実験に使うときにはアルコールに溶かすのがとけやすく便利である。1%エタノール水溶液中では510~512nmに極大吸収波長が移動する。ところが、リン酸塩緩衝溶液を加えると、pH 3~11において極大吸収波長が640~645nmに移動する。見た目には青色である。ステインスオールの水溶液およびリン酸塩緩衝溶液中におけるモル吸光係数はおよそ7万であった。吸収強度は、微酸性の方が強く、pH12では半分に減少する。このときの緩衝溶液はリン酸塩としての最終濃度は0.02Mであるが、緩衝溶液の添加量が多くなると、やや吸光度が減少する傾向

があった。また、ステインスオールをエタノールに溶かして用いたのであるが、最終的にこのアルコールの濃度が増えると、吸光度はやや減少する傾向があった。このことから、アルコールや緩衝溶液の量は少ない方が、呈色強度が強いことがわかる。このようなステインスオールの水溶液に、脂肪酸塩を少量添加すると、色調は青～赤色から黄色に変る。この変色は瞬間的であるが、長時間放置すると退色しはじめる。脂肪酸塩の種類によっても、呈色強度がわずかに異なるが、ステアリン酸塩 ( $C_{17}H_{35}COONa$ )、オレイン酸塩 ( $C_{17}H_{33}COONa$ )、パルミチン酸塩 ( $C_{15}H_{31}COONa$ )、ミリスチン酸塩 ( $C_{13}H_{27}COONa$ )、ラウリン酸塩 ( $C_{11}H_{23}COONa$ )、などは非常に識別しやすい変色をともなうメタクロマジー現象があらわれた。ところが、炭素数が10以下の脂肪酸塩、たとえばカプリン酸塩とかプロピオン酸塩では、赤から黄色への変色が弱い。この脂肪酸塩によるステインスオールのメタクロマジーに与える影響は、一般に無機塩でも有機物でも、濃度が高くなると変色強度を弱くする。0.001M程度でも黄色への移行を弱めるものは、ホウ酸、ヨウ化カリウム、硫酸ナトリウム、尿素、ポリビニルスルホン酸カリウム、などがあげられる。また0.01M程度共存してもほとんど影響しないものには、酢酸ナトリウムやホウ砂であるが、その他、塩化ナトリウム、臭化カリウム、グアニジン、硝酸カリウムなどは、およそその中間程度の影響を与える。非イオン界面活性剤やポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールは、0.01%程度共存しても呈色強度を弱くする。しかし、通常の大学一般教育課程での定性分析実験に、これらの特別な有機物を共存させることはほとんどないので、ステインスオールのメタクロマジー現象を、石けんなどの脂肪酸塩の定性反応に導入できると予想される。

### 合成界面活性剤による呈色反応

ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムやラウリル硫酸ナトリウムのような合成界面活性剤は、水溶液中で陰イオンに解離し、ステインスオールの赤紫色を黄色に変色させる。このメタクロマジーは、酸性水溶液中でも微アルカリ性水溶液中においても観察される。微酸性水溶液中において、ステインスオールにメタクロマジー変色を起させるものには、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムとラウリル硫酸ナトリウムなどがある。脂肪酸塩はアルカリ水溶液中においてのみステインスオールを変色させる。したがって、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムやラウリルスルホン酸ナトリウムの定性反応に利用するには、0.02Mの酢酸緩衝溶液を添加して、pHを4～5に調整するとよい。合成陰イオン性界面活性剤は、酢酸酸性水溶液中においてステインスオールと反応して、この赤紫色を黄色に変色させるのであるが、見た目には同じ黄色でも、条件によって少しずつ極大吸収波長が異なる。ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムの場合には、濃度が高くなると10nm程度短波長側に極大吸収が表れる。たとえば、ステインスオールが  $4 \times 10^{-5}M$ 、酢酸塩緩衝溶液の酢酸塩としての濃度が0.02M、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムが  $4 \times 10^{-6}M$  のときの極大吸収波長は430nmにあるが、ラウリルベン

ゼンスルホン酸ナトリウムの濃度を2倍にすると、その極大吸収波長は435nmに移動する。また、ステインスオールの濃度を半分にすると、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウムの濃度による極大吸収波長のシフトは少なくなり、ほとんど435nm付近に吸収ピークが現れる。ラウリルスルホン酸ナトリウムやエーロゾルOT（スルホコハコ酸ジ-2-エチルヘキシルナトリウム）についても、同様の傾向がみられる。これらの現象は、水溶液中におけるステインスオールは、ラウリルベンゼンスルホン酸陰イオン、ラウリル硫酸陰イオン、スルホコハコ酸ジ-2-エチルヘキシル陰イオンによってメタクロマジー現象を起こすが、その結合組成はほんの少しの条件の変動により種々変化するものと推定される。しかしいずれにせよ赤紫から黄色への変色は明らかに観察されるので定性反応への導入が可能である。大学初級学生への一般化学実験としての合成陰イオン系界面活性剤の定性分析には、次のように行うことができる。

陰イオン系合成界面活性剤（ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムあるいはスルホコハコ酸ジ-2-エチルヘキシルナトリウム）を含む試料5 mlに、pH 4.7の0.5M 酢酸塩緩衝溶液を5~10滴加えて微酸性に調整し、ステインスオールの0.02%エタノール溶液を3~5滴添加して混ぜる。陰イオン系合成界面活性剤が存在すると、直ちに色素の赤色は黄色に変る。この条件では、カプリン酸塩、ラウリン酸塩、ミリスチン酸塩、パルミチン酸塩、オレイン酸塩、ステリアン酸塩のような脂肪酸類や石けんは呈色しない。また、非イオン性界面活性剤やデンプンも呈色しない。

### 脂肪酸塩による呈色反応

石けん類はいくつかの脂肪酸のナトリウム塩からなっている。脂肪酸塩は一般に酸性水溶液中では解離せず、アルカリ水溶液中においてのみ解離する。したがって、脂肪酸塩によるステインスオールのメタクロマジー変化は、酸性水溶液中では起こらない。アルカリ水溶液中においても、多くの色素は脂肪酸塩によるメタクロマジー現象は観察されないが、ステインスオールは、赤色から黄色への変色が現れる。アルカリ性に調整するための緩衝溶液にはアンモニア系やホウ砂系を調べたが、単にアンモニア水を使うのが良かった。より識別しやすいメタクロマジー変化が起る。アンモニアアルカリ性水溶液中においては、脂肪酸塩によるステインスオールの変色による極大吸収波長のシフトは単純であり、脂肪酸の種類にかかわらずほぼ一定である。5×10<sup>-4</sup>Mのステインスオールのエタノール溶液を0.5mlとって、これを水でうすめて25mlにしたときの極大吸収波長は512nmにあり、そのモル吸光係数は約7万8千であった。ところが、5×10<sup>-4</sup>Mのステインスオールのエタノール溶液0.5mlに0.01Mのアンモニア水を2ml加え、同じく水でうすめて25mlにしたときには、極大吸収波長は変わらないが、モル吸光係数は6万2千に下降した。これらの溶液に脂肪酸塩を添加すると、ステインスオールの赤色がだんだんうすくなり、加えた脂肪酸塩の量に比例して黄色が強くなる。たとえば、5×10<sup>-4</sup>Mのステインスオールのエタノール溶液0.5mlに、0.01Mのアンモニア水を2ml加え、さらに2×

$10^{-5}$ Mのミリスチン酸ナトリウム溶液の2 mlを加え、水でうすめて25mlにしたときには、512 nmにあったステインスオールの大吸収波長はそのまゝであるが吸収強度は約半分に減少し、そのかわりに448nmに新しい吸収ピークが現れる。ミリスチン酸塩の濃度が高くなると、448 nmの吸光度はさらに強くなり、それにつれて512nmにおける吸光度は減少する。このような現象は、他の脂肪酸塩すなわちパルミチン酸塩、オレイン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩にも観察された。448nmにおける吸光度と脂肪酸塩の濃度との関係については、ミリスチン酸塩、パルミチン酸塩、オレイン酸塩、ステアリン酸塩の場合には比例関係が得られたが、ラウリン酸塩については直線関係が成立しない。 $1 \times 10^{-3}$ Mのステインスオールのエタノール溶液を0.5mlとって、0.02Mのアンモニア水2 mlと各種の脂肪酸塩を加えて25mlにうすめた溶液の448nmにおける吸光度を測定すると、ミリスチン酸塩のモル吸光係数が最も高く約23万であった。つづいてパルミチン酸塩、オレイン酸塩、ステアリン酸塩の順で少しづつ低くなっている。カプリン酸やラウリン酸塩は、赤色から黄色への変色は起こるが、濃度と吸光度との間に比例関係が成立しない。プロピオン酸になると、ステインスオールのメタクロマジー現象は起こらない。このことから、脂肪酸イオンへのステインスオールの吸着には、脂肪酸塩のアルキル基の炭素数が10~12程度以上必要のように見受けられる。大学初級学生への一般化学実験として行なう定性分析にも、このステインスオールのメタクロマジー現象を導入して、脂肪酸塩を試料として使うことが可能である。石けんや脂肪酸塩を含む試料を5 mlとり、0.5Mのアンモニア水を1滴加え、さらに0.02%のステインスオールのエタノール溶液を3~5滴加えて混合する。脂肪酸塩が存在すると、赤色から黄色へのメタクロマジー変色が観察される。

#### 脂肪酸塩と陰イオン界面活性剤の目視検出限界

ステインスオールのメタクロマジー現象を、脂肪酸塩や陰イオン界面活性剤の定性分析法に応用するには、脂肪酸塩の場合にはアンモニアアルカリ性水溶液に調整し、陰イオン性合成界面活性剤の場合には酢酸酸性水溶液に調整することが必要である。試料5 mlに、0.5Mのアンモニア水1滴またはpH4.7の0.5Mの酢酸緩衝溶液5~10滴、0.02%のステインスオールのエタノール溶液3~5滴加えて、黄色への変色が目で見て識別できるのは、次の濃度がおよその限界である。カプリン酸塩は $2 \times 10^{-4}$ M、ラウリン酸塩は $2 \times 10^{-5}$ M、ミリスチン酸塩、パルミチン酸塩、オレイン酸塩およびステアリン酸塩は $1 \times 10^{-5}$ M、ラウリル硫酸塩およびラウリルベンゼンスルホン酸塩は $1 \times 10^{-5}$ Mである。石けんについては、その種類によって多少異なるが、5 ml中に0.05mgの石けんを含む水溶液を試料として使用したとき、ステインスオールのメタクロマジーによる黄色の大吸収波長はおよそ445~445nm付近にあらわれる。そのときの吸光度は約0.5前後であった。試薬ブランクの吸光度は0.05程度である。一般に市販されている液体洗剤では、430~440nm付近に大吸収が観察された。ステインスオールのメタクロマジーによる黄色の大吸収波長は、非イオン界面活性剤や多量のデンプン、廃液中の不明の成分に

よって影響を受けてわずかにシフトするが、目で見えて観察するときにはほとんど識別できずに、いづれにせよ赤色から黄色への変色として見える。

### ステインスオールと脂肪酸塩の吸着物の組成

ステインスオールが脂肪酸陰イオンに吸着されて、赤色から黄色にかわるときの結合組成比について、ミリスチン酸塩について調べた。ステインスオールの濃度とミリスチン酸塩の濃度の合計を  $8 \times 10^{-6} \text{M}$  に保ちながら、ステインスオールとミリスチン酸塩の濃度比を順次かえて、448nm における吸光度を測定すると、ミリスチン酸のモル分率が0.33のところピークがあらわれる。また、ミリスチン酸塩の濃度を  $2.4 \times 10^{-6} \text{M}$  として一定に保ちながら、ステインスオールの濃度を変えて、448nm における吸光度を測定すると、ミリスチン酸塩の濃度に対してステインスオールの濃度が2倍くらいまでは、吸光度は直線的に高くなり、それ以上になるとほとんど一定の吸光度を示した。この連続変化法とモル比法の2つの結果とも、ミリスチン酸塩によるステインスオールのメタクロマジー変化が、ミリスチン酸イオン1分子に対して、ステインスオールが2分子の割合で結合していることを示している。同様の連続変化法とモル比法をラウリル硫酸塩についても適用して調べた。0.02M 酢酸塩緩衝溶液中において、ラウリル硫酸塩の濃度とステインスオールの濃度の合計を  $1.6 \times 10^{-6} \text{M}$  に保ちながら、ラウリル硫酸塩とステインスオールの濃度比を順次かえて、446nm, 452nm, 458nm における吸光度を測定すると、いづれの波長においても、ラウリル硫酸塩のモル分率が0.3付近にピークがあらわれる。また、ステインスオールの濃度を  $8 \times 10^{-6} \text{M}$  の一定に保ちながら、ラウリル硫酸塩の濃度を変えて、452nm, と505nm における吸光度を測定すると、ステインスオールの濃度に対してラウリル硫酸塩の濃度が半分くらいまでは、吸光度は直線的に高くなり、それ以上になると、ずっとゆるやかな傾きで吸光度が高くなっていくことがわかった。この連続変化法とモル比法の2つの結果から、ラウリル硫酸塩の場合にも、ミリスチン酸塩の時と同様に、ラウリル硫酸イオン1分子に対して、ステインスオールが2分子の割合で結合していると推定される。ところが、有機溶媒に抽出するときには、水溶液中での結合比とは異なる組成で抽出されることがわかった。pH 8 のリン酸塩緩衝溶液中において、ステインスオールの濃度とラウリル硫酸塩の濃度の合計を  $8 \times 10^{-6} \text{M}$  に保ちながら、ステインスオールとラウリル硫酸塩の濃度比を種々かえ、水溶液の体積を25ml に調整する。その水溶液に、キシレンとメチルイソブチルケトン(混合有機溶媒(混合比は1:1))10ml を加えて抽出し、抽出液の吸光度を測定する。抽出液の極大吸収波長は584nm に現れた。これは試薬ブランクも同じである。560nm, 584nm および600nm における吸光度は、いづれの波長においても、ラウリル硫酸塩に対するステインスオールのモル分率が0.5のときにピークを示した。さらに、25ml の水溶液中のステインスオールの濃度を  $4 \times 10^{-6} \text{M}$  の一定に保ちながら、ラウリル硫酸塩の濃度を順次かえて、連続変化法と同じように、キシレンとメチルイソブチルケトン(1:1)の混合有機溶媒で抽出して、その有機溶媒の吸光

度を、560nmと584nmにおいて測定した。いずれの波長においても、ステインスオールの濃度に対して、ラウリル硫酸ナトリウムの濃度が等しくなるまでは吸光度は直線的に高くなり、それ以上になると、吸光度はラウリル硫酸ナトリウムの濃度にかかわらず一定となった。これらの連続変化法とモル比法の結果から、抽出されるときには1:1のイオン対となって抽出されていると推定される。ステインスオールは1価の陽イオン系の色素であるから、水溶液中においては、脂肪酸陰イオンや合成陰イオン系洗剤とステインスオールが1:2の[アニオン・(ステインスオール)]<sup>+</sup>のような化学種として存在し、有機溶媒には(アニオン・ステインスオール)のような1:1のイオン対として抽出されるものと考えられる。なお、脂肪酸塩は、キシレン、トルエン、ベンゼン、メチルイソブチルケトン、1,2-ジクロロエタン、ニトロベンゼン、ニトロエタン、クロロホルム、クロロベンゼン、アミルアルコール、酢酸エチル、ヘキサン、四塩化炭素など、いずれの有機溶媒にも、黄色の付加物もイオン対も抽出されなかった。また、ステインスオールとラウリル硫酸ナトリウムによって生成した水溶性の黄色の化学種は、多量の電解質、たとえば硫酸ナトリウムを加えることによってゆっくりと沈殿することも観察される。このように、水溶液中での呈色種と、有機溶媒に抽出したときの呈色種の化学組成が異なるイオン会合現象の例としては、ピナシアノールとテトラフェニルホウ酸ナトリウムのイオン会合<sup>3)</sup>がある。石けんや脂肪酸塩は、一般にイオン会合現象を示しにくい有機物であるが、大学初級学生に対するイオン会合現象やメタクロマジー現象の説明や実験教材として、ステインスオールによる脂肪酸塩の定性分析は好適の課題であると思われる。

## 文 献

- 1) L.K.Wang, *J. Am. Water Works Assoc.*, **67**(1), 19-21 (1975).
- 2) L.K.Wang and P.J.Panzardi, *Anal. Chem.*, **47**, 1472-1475 (1975).
- 3) 坪内正弘, 酒井忠雄, *分析化学*, **24**(12), 754-758 (1975).

(1990年9月10日受理)