



非イオン性界面活性剤のコシュランド試薬誘導体化  
反応とその吸光光度定量への応用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 宮崎大学教育文化学部 公開日: 2008-03-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 境, 幸夫, 杉, 敏彦, Sugi, Toshihiko メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10458/1387">http://hdl.handle.net/10458/1387</a>

## 非イオン性界面活性剤のコシュランド試薬誘導体化 反応とその吸光光度定量への応用

境 幸夫 杉 敏彦<sup>1</sup>

Derivative Reactions of Nonionic Surfactants with Koshland Reagent and  
its Application to the Photometric Determination of Nonionic Surfactants

Yukio SAKAI and Toshihiko SUGI

### 要旨

タンパク質中のトリプトファン残基の定量に利用されてきた2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロミド(コシュランド試薬)を、非イオン性界面活性剤のオキシエチレン鎖末端の水酸基に結合させる誘導体化反応の基礎的条件について検討を行った。反応時間は40℃で、2時間を要する。生成した誘導体は、315nmに吸収極大を示す。誘導体化後、水酸化カリウム水溶液と振り混ぜると、カリウムイオンがオキシエチレン鎖及び鎖に結合したp-ニトロフェノラートアニオンと錯体を生成してクロロホルムに抽出される。この現象を利用して界面活性剤の吸光光度定量が可能である。この時、測定波長は420nmの可視光線域であるため、紫外線領域の吸光度を測定する方法に比べて妨害も少ない。

p-Nitrophenol group can be introduced to the terminal of oxyethylene chain of nonionic surfactant in the benzene medium by the reaction with 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide (known as Koshland-I reagent) for 2 hr at 40°C in the presence of sodium hydride and potassium iodide. The resultant compound shows the absorption maximum at 315nm. The compound can complex with potassium cation through oxygen atoms of oxyethylene chain and of p-nitrophenolate anion. The complex can be extracted from alkaline solution into chloroform. The absorption maximum of the extracted complex shows at 420nm, which makes it possible to determine nonionic surfactant having poly(oxyethylene) chain selectively. Spectrophotometric determination of nonionic surfactant was studied.

<sup>1</sup> 本学大学院教育学研究科教科教育学専攻理科教育専修(平成7年度修了)

## 1 緒言

非イオン性界面活性剤は、水溶液中でイオンに解離しないもので水酸基やオキシエチレン鎖などの親水基をアルキル基やアルキルフェニル基などの疎水基に付加したものである。水溶液中でイオンとならないため、カルシウムイオンやマグネシウムイオン濃度の大きな硬水を用いても、洗浄力はその影響を受け難く、またミセル限界濃度がイオン性の界面活性剤に比べて低いため、洗剤はもちろん、化粧品、シャンプー、農薬の乳化剤として広範囲に用いられている<sup>1</sup>。全世界で用いられる界面活性剤の3割は、非イオン性界面活性剤で占められ、その割合は年々増加傾向にあるとも言われている。毒性は他の界面活性剤に比べて低いと言われる<sup>2</sup>が、鯉などの淡水魚に対してはへい死の原因物質になるとの指摘もある<sup>3</sup>。また、ノニルフェニル基を疎水基とする界面活性剤が、環境水に排出された後、生分解により生成するノニルフェノールが、内分泌攪乱作用を有することが明らかにされた<sup>4</sup>。今後環境水中の非イオン性界面活性剤分析の必要性はますます高くなってくるものと思われる。

これまでの分析法としては、青色のチオシアン酸コバルト錯体がオキシエチレン型非イオン性界面活性剤共存下でベンゼンに抽出される現象を利用する吸光度定量、ヨウ化ビスマス酸カリウムと塩化バリウムを用いて界面活性剤を一度沈殿させ、その後ビスマスを滴定法や電気化学的方法で定量して間接的に界面活性剤を定量する方法が用いられている<sup>5,6</sup>。これらの方法は、陰イオンの妨害を受けやすい、オキシエチレン鎖の短い活性剤の定量が難しいなどの短所を持つ。ここでは、塩基の共存下で親水基のオキシエチレン鎖末端の水酸基に、p-ニトロフェノール基を導入できる知見を得たため、この誘導体化反応を利用して非イオン性界面活性剤を定量するための基礎的諸条件について検討したので、結果を報告する。

## 2 実験

### 2.1 試薬

用いた試薬を、以下に示す。各試薬は、試薬会社よりもっとも純粋な試薬を購入し、そのまま用いた。

2-Hydroxy-5-nitrobenzyl bromide(コシュランド試薬)：東京化成製

単分散型ポリオキシエチレンドデシルエーテル：和光純薬製。オキシエチレン単位数(n)が、2から8までの単一鎖長の薬品を購入した。本報では、用いたこの試薬を、オキシエチレン単位数を頭に付してnPEDと略記する。

水素化ナトリウム：東京化成製、市販品をヘキサンで3回洗浄して油分を取り除いた後に、減圧蒸留器を用いて完全にヘキサンを取り除いた。その後、乾燥した粉末状の試薬をサンプル管に移し、硫酸デシケート中に保存した。

ベンゼン：和光純薬製特級試薬

### 2.2 装置

実験に用いた装置は以下の通りである。

分光光度計：日立200-20型分光光度計

pHメーター：東亜電波製 HM6A型 デジタルpHメーター

振とう機：イワキV S型振とう機

遠心分離機：クボタ KN70型遠心分離機

恒温槽：EYELA Uni Cool UC-65型恒温槽

マグネチックスタラー：イウチMI型マルチスタラー

## 2. 3 方法

基本的な実験方法は、①一定量のnPEDを用いる誘導体化反応、②誘導体化された物質のクロロホルム抽出と吸光度の測定の2段階からなる。各段階の操作法について述べる。

### 2. 3. 1 誘導体化反応の基本操作

50 ml容積の遠心分離管に $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$  ( $\text{M} \equiv \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )のnPEDを含むベンゼン溶液を5 ml取り、 $8 \times 10^{-3} \text{ M}$ のコシュランド試薬を溶かしたベンゼン溶液を5 ml加える。その後水酸化ナトリウムを0.06 g添加し反応を開始させる。直ちにこの反応容器を40℃の恒温槽に入れ、マグネチックスタラーを用いて溶液を攪拌する。5分後に触媒として0.01 Mヨウ化カリウムエタノール溶液を25  $\mu\text{l}$ 添加する。反応開始後、一定時間ごとに反応液を0.5 ml採取し、ベンゼンを室温で蒸発させる。

### 2. 3. 2 抽出操作

先の蒸発残さに、クロロホルムを5.0 ml加える。これに2 M水酸化カリウム水溶液を5.0 ml加えて激しく攪拌する。静置して2相が分離した後、水相を取り除き、再び2 M水酸化カリウム水溶液を同量加えて抽出を行う。遠心分離機を用いて、水相とクロロホルム相を分離した後、10 mm石英セルを用いてクロロホルム相の410 nmにおける吸光度を測定する。

## 3. 結果と考察

本報の誘導体化反応は、塩基の共存下でアルコール（非イオン性界面活性剤）とハロゲン化アルキル（コシュランド試薬）からエーテルを合成するウィリアムソン合成法と呼ばれる方法の応用である。そこで誘導体化反応に対する①塩基の種類と濃度、②コシュランド試薬の濃度、③触媒の各項目について、最適条件を検討した。決定した最適条件下で種々濃度の2PEDから8PEDを用いて検量線を作成した。

### 3. 1 塩基の種類と濃度

ウィリアムソン合成で用いられる塩基としては、水酸化ナトリウム、トリエチルアミン、水酸化ナトリウムなどがある<sup>7</sup>。これらの塩基について、5PEDを用いて前実験を行ったところ、反応速度、再現性、取り扱い易さの点で水酸化ナトリウムが優れていた。図1に、水酸化ナトリウムの添加量の影響についての検討結果を示した。界面活性剤は、0.001 Mの5PEDベンゼン溶液を5 ml、0.004 Mのコシュランド試薬ベンゼン溶液を5 ml用いた。反応温度は30℃である。図より水酸化ナトリウム添加量を0.06 gから0.18 gまで変化させても、反応時間2時間以降で吸光度はほぼ最高一定となることが分かる。

いずれの場合も反応容器の底に水素化ナトリウムの粉末が溶け切らずに残っており、水素化ナトリウム試薬が共存する限り、添加量の影響は少ないものと考えられる。しかしながら、水素化ナトリウム粉末が多量である場合、コシュランド試薬が水素化ナトリウムに吸着されたり、反応後に水溶液を加える際に発火する危険性があるため、その添加量は少ないほうが良い。本法では添加量を0.06gとすることにした。これは、モル比でコシュランド試薬量の約130倍に相当する量である。

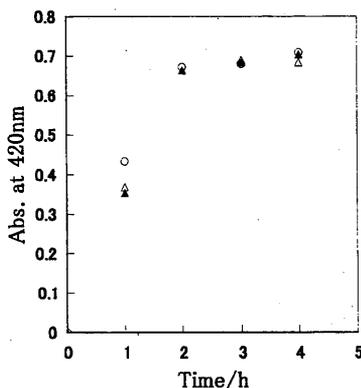


Fig.1 Effect of NaH on the reaction between 5PED and 2-(hydroxy)-5-nitrobenzyl bromide (Koshland)  
 $[5PED]=0.0005M$ ,  $[Koshland]=0.002M$ ,  
 NaH:△ 0.06g, ▲ 0.12g, ○ 0.018g

### 3. 2 コシュランド試薬の濃度

誘導体化反応に対するコシュランド試薬濃度の影響について検討した。用いた界面活性剤の種類と濃度、試薬の添加順序は3.1と同じであるが、反応温度は40℃である。また、水素化ナトリウムの添加量は、3.1の検討結果から0.06g一定にした。結果を図2にまとめて示した。添加するコシュランド試薬の濃度を0.002Mから0.008Mまで変化させたところ、奇妙なことに反応速度と反応率は、コシュランド試薬濃度が低いほど大きくなる結果が得られた。この結果に対する理由は、現段階で不明である。しかし、反応速度と反応率は界面活性剤濃度とコシュランド試薬の相対的濃度に依存することが考えられる。図3は、コシュランド試薬濃度を0.002M一定とした場合と0.004M一定とした場合の、5PEDに対する検量線を作成した結果を示したものである。2時間後の吸光度は、コシュランド試薬濃度が低い場合のほうが高い場合より大きい。図3から明らかなように5PED濃度が $10^{-3}M$ より大きくなるとその傾きは小さくなる。また反対に、コシュランド試薬濃度の高い場合の方が、直線性を示す5PED濃度範囲は広くなることが明らかである。定量分析に利用する誘導体化反応では、分析目的の物質と常に一定量反応する事が重要である。言い換えれば、コシュランド濃度は界面活性剤濃度に比べて大過剰に存在し、常に一定比率の界面活性剤と反応する条件が望ましい。したがって、コシュランド試薬濃度の検討結果からは、0.004M濃度が適当と判断される。しかしながら、反応速度や反応率は、相対的な試薬濃度のみならず、温度などの物理的要因や触媒などの化学的要因にも依存する。したがって、コシュランド試薬の最適濃度は次の触媒の検討結果を併せて考慮して決定することにした。

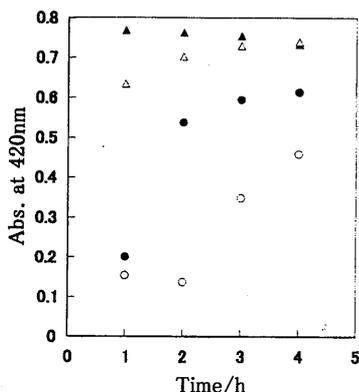


Fig. 2 Effect of concentration of 2-(hydroxy)-5-nitrobenzyl bromide (Koshland) on the reaction with 5PED  
 [5PED]=0.0005M, NaH=0.06g,  
 [Koshland]: ▲0.01M, △0.02M,  
 ●0.03M, ○0.04M

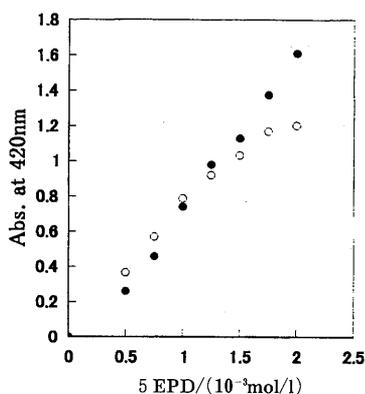


Fig. 3 Calibration curves for 5PED  
 NaH=0.06g,  
 [Koshland]: ○0.01M, ●0.02M

### 3. 3 触媒の検討

コシュランド試薬は蛋白質中のトリプトファン残基の高選択的な修飾(誘導体化)試薬として最初に用いられたが、その際メチオニンを共存させると反応速度が大きくなることが報告されている<sup>8</sup>。また、ウィリアムソン合成においても種々の触媒が知られている<sup>7</sup>。ここでは、コシュランド試薬の脱離元素である臭素を活性化させることが知られているヨウ化カリウムについて検討した。この試薬はベンゼンに溶け難いため、ここではヨウ化カリウムの1M濃度水溶液を約100倍量のエタノールで希釈して0.01M濃度とし、この溶液をマイクロピペットで25 $\mu$ l添加してその触媒作用について検討することとした。ヨウ化カリウムと共に混入する微量の水は水素化ナトリウムによって分解されるものと考えられるが、同時にコシュランド試薬も水と反応して速やかに分解してしまうことが報告されているため<sup>8</sup>、コシュランド試薬濃度を0.008Mに増量して検討した。

結果を図4にまとめたが、5PEDの反応溶液中の濃度を横軸に、反応時間2時間後の吸光度を縦軸に示してある。図4中には、ヨウ化カリウムを添加しない場合の結果も示してある。ヨウ化カリウムを添加することによって、15%から35%程度吸光度が増加した。増加率は高濃度の界面活性剤において顕著である。なお、界面活性剤を含まない系(ブランク)に対し、同じ操作を行ったが、吸光度は0.008であり、界面活性剤以外にはクロロホルムに抽出されるような化合物が生成しないことが確認できた。

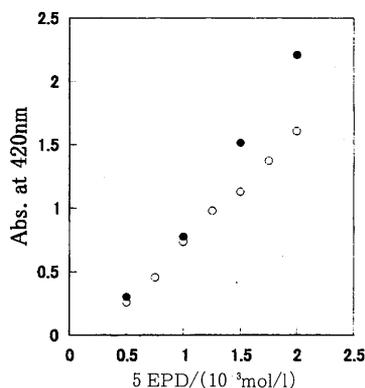


Fig. 4 Effect of KI on the reaction between 5PED and 2-(hydroxy)-5-nitrobenzyl bromide (Koshland).  
 [Koshland]=0.004M, NaH 0.06g,  
 KI: ○None  
 ●0.01M, 25  $\mu$ g added

### 3. 4 検量線

誘導体化反応の基本操作(2. 3. 1)により、2 PEDから8 PEDを用いて検量線を作成した。各PEDは、0.0002Mから0.002Mの濃度の溶液を用いた。各検量線はいずれも良好な直線性を示したが、その傾きからモル吸光係数を計算したところ、図5のような結果が得られた。図5で明らかなように、3 PEDと4 PEDの見かけのモル吸光係数間は、おおよそ10000と21600 mol・cm<sup>-1</sup>であり、大きなギャップが認められる。

オキシエチレン鎖の短いPEDでこのようにモル吸光係数が小さくなる原因としては、①短いオキシエチレン鎖を持つ界面活性剤においては誘導体化反応が進み難い、②誘導体化反応は進んでい

るが、抽出操作において短いオキシエチレン鎖の界面活性剤誘導体では水酸化カリウム溶液を用いた場合の抽出率が低いことの二つが考えられる。このうち②については、別に報告している通り<sup>9</sup>、6 PED誘導体によるカリウムイオンの抽出定数は $10^{-9.59}$ であるのに対し、3 PED誘導体では $10^{-11.49}$ と、2桁ほど小さい値である。しかし、2Mという濃い水酸化カリウム溶液を用いて抽出を行う限り、少なくとも90%以上の3 PED誘導体は、クロロホルム相に移行することを確認している。すなわち、2M水酸化カリウム溶液を使い、3 PED誘導体で抽出した時のモル吸光係数は約20000 mol・cm<sup>-1</sup>であり、4 PEDに近い値となった<sup>9</sup>。従って、3 PED誘導体の低いモル吸光係数は、①の低い誘導体化反応率に起因するものと考えられる。

オキシエチレン鎖を持たないドデカノールとコシュランド試薬の組み合わせでは、誘導体化反応は起きないこと、塩基性溶媒であるピリジン溶液中でも、PEDとコシュランド試薬は反応し難いことなどの結果は、低反応率原因説を支持するように思われる。言い換えれば誘導体化反応において、ある程度長いオキシエチレン鎖が必要であることを示している。その理由は不明であるが、アルカリ金属イオンとオキシエチレン鎖間の錯体生成が誘導体化反応において何らかの役割を演じていることを窺わせる。しかし、現段階においては推定の域を出ず、今後の検討課題である。

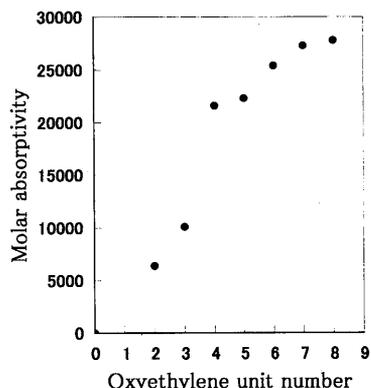


Fig.5 Dependence of molar absorptivity on the number of oxyethylene unit

## 4 結言

非イオン性界面活性剤の親水基末端に、p-ニトロフェノール基を結合させ、水酸化カリウム溶液と振り混ぜることによって、誘導体をクロロホルムに抽出し、可視光線領域の吸光度を測定して、非イオン性界面活性剤の定量を行う方法を開発した。本法の長所は、測定波長が420nmの可視光領域であるため、紫外部の吸収を利用する方法に比べ妨害が少ないことが挙げられる。また、イオン対抽出法による分析法では、陰イオン性の界面活性剤などの妨害が大きい、オキシエチレン鎖の短い界面活性剤の定量が困難であるなどの欠点がある<sup>5, 10</sup>。本法

では、誘導体化した界面活性剤がカリウムイオンと1:1の錯体を作って有機相に抽出できる現象を利用するため、陰イオンの影響は少ないと思われる。また、オキシエチレン鎖の短い界面活性剤の誘導体化は、低収率であるがこれまでの方法よりは取りこぼしが少ないと考えられる。しかしながら、反応時間の短縮、オキシエチレン鎖の短い界面活性剤の反応率とカリウムイオン抽出率の向上など改善すべき点が残されている。誘導体化後の抽出率に関しては、カリウムイオンに代えて第4級アンモニウム塩を使用することでの改善できる知見を得ている<sup>9</sup>。

#### 参考文献

1. 堀口 博: “新界面活性剤” p 587 (1981) (三共出版)
2. J.Sanchez Leal, M.T.Garcia, I.Ribosa and F.Comelles, “Environment Risk Assessment of Ethoxylated Non-Ionic Surfactants” in “Surfactants in Solution,” ed by A.K.Chattopadhyay and K.I.Mittal, in “Surfactant Science Series,” Marcel Dekker, Inc., New York, Vol 64, pp379-391(1996).
3. 小林勇: “恐るべき水汚染” p 73 (1989) (合同出版)
4. 高田秀重: 化学、53、No7、pp.37 (1998) (化学同人)
5. P.T.Crisp, “Trace Analysis of Nonionic Surfactants,” in “Nonionic Surfactants,” ed by J.Cross, in “Surfactants Science Series,” Marcel Dekker, Inc., New York, Vol 19, pp77-116(1987).
6. 界面活性剤分析研究会編 “界面活性剤分析法” p (1987) (東京 幸書房)
7. 日本化学会編 新実験化学講座 Vol .14 “有機化合物の合成と反応I” p568-572.
8. H.R.Horton and D.E.Koshland,Jr., J.A.C.S., 87,1126(1965).
9. Y.Sakai et al, Bull. Chem. Soc. Jpn., 投稿中
10. K.Toei, S.Motomizu and T.Umano, Talanta,29, 103(1982).

(1999年9月27日受理)