UDC 547.562/.565-172.267-986:545.844.42+545.3[537.363]

317. 大熊誠一：ペンタシアノ鉄錯塩による有機化合物の呈色反応に関する研究(第4報¹⁾) フェノール類の呈色反応機構 その1 呈色色素の

沝紙クロマトグラフィーおよび沝紙電気泳動

Seiichi Ohkuma : Color Reaction of Organic Compounds with Pentacyano-iron Complex Salts. IV. The Mechanism of Color Reaction of Phenols. (1).Paper Chromatography and Paper Electrophoresis of
the Pigments formed in Color Reaction.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyoto*)

The blue or green pigment produced by the color reaction of phenols between pentacyano-iron complex salts, such as sodium nitroprusside, pentacyanoammineferroate, and pentacyanoaquoferroate, and hydroxylamine, was examined by paper chromatography and paper electrophoresis. The phenols possessing electron-releasing group produce two kinds of anionoid pigment. From their behavior to alkalis, Rf value, and migration value, one of the pigments was assumed to be an organic pigment and the other, a complex anion. Phenols possessing electron-attracting group produce only one kind of comparatively labile complex anion. It was concluded that the identification of the pigment produced and original phenols can be made by utilization of paper chromatography and paper electrophoresis.

(Received May 9, 1959)

フェノール類はニトロプルシッドナトリウム (NP), ペンタシアノアンミンフェロエート (PAF), ペンタシアノアクオフェロエート (PAqF) などのペンタシアノ鉄錯塩とヒドロキシルアミンにより水酸化ナトリウム・アルカリ性で反応し、緑色または青色を呈する²⁾。この反応はフェノール類の検出^{2,3)}、レゾルシノールと NP を用いるオキシムの検出⁴⁾ に利用されている。この呈色反応はペンタシアノ鉄錯塩、またはヒドロキシルアミン単独では起らないからペンタシアノ鉄錯塩とヒドロキシルアミンの協働作用による呈色反応であることは明らかである。したがって、これらの鉄錯塩とヒドロキシルアミンがフェノール類に対し、如何なる反応を起こし呈色するかということは有機分析化学および錯塩化学的に興味ある現象である。そこで著者はこの呈色反応機構の追求と同時にフェノール類の確認を行なうため、反応生成色素の沝紙クロマトグラフィーと沝紙電気泳動法を試みたところ、大部分、反応生成物は1種類ではなく2種類の異なった青色アニオノイド色素であり、かつ、これら色素の Rf 値および泳動値によつて各フェノール類の分離確認の行なえることが明らかとなつた。

呈色色素の沝紙クロマトグラフィー フェノール類にペンタシアノ鉄錯塩とヒドロキシルアミンを作用させて得られた呈色溶液 (試料, Table I) をアンモニア水-重炭酸ナトリウム-メタノール, アンモニア水-重炭酸ナトリウム-アセトン, アンモニア水-硫酸アンモニウム-メタノール, アンモニア水-硫酸アンモニウム-アセトン等の4種の展開溶剤で沝紙クロマトグラフィーを行なつた (Table I).

phenol : メタノール系溶剤で分離された青色スポットは細長く風乾により、その上部がピンク色に変化する。このピンク色の部分はアンモニアにより再び青色に戻るが、風乾により再びピンク色になる。この場合、炭酸ナトリウム・アルカリ性になると青色になり、風乾しても安定な青色を保つ。アセトン系溶剤によるときは2箇の安定な青色スポットが分離される。したがって、メタノール系溶剤とアセトン系溶剤の分離状況から判断して、この呈色反応では2種類の色素が生成していることは明らかである。

cresol 類 : *o*-, *m*-体ともに2種類のスポットが分離されているが、Rf 値の大きい上段のスポットは風乾によ

* Yoshida-konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto.

1) 第3報 : 本誌 79, 1590(1959).

2) 大熊 : 本誌 72, 872(1952).

3) 船久保 : “有機化合物確認法” 上巻第2版, 770(1953) 養賢堂; 木下, 森山 : 本誌 76, 709(1956).

4) 長沢, 大熊 : 本誌 74, 410(1954).

Table I. Paper Chromatography and Rf of the Pigments formed in Color Reaction of Phenols with Pentacyano-iron Complex Salts and Hydroxylamine in Sodium Hydroxide Solution (One-dimensional ascending method)

No.	Phenol compd. (Color reaction)	Solvent							
		NH ₄ OH (28%) NaHCO ₃ MeOH	30 cc. 1.5 g. 70 cc.	NH ₄ OH (28%) NaHCO ₃ Me ₂ CO	40 cc. 2 g. 60 cc.	NH ₄ OH (28%) (NH ₄) ₂ SO ₄ MeOH	30 cc. 10 g. 70 cc.	NH ₄ OH (28%) (NH ₄) ₂ SO ₄ Me ₂ CO	40 cc. 5 g. 60 cc.
		18°	6 hrs.	17°	6 hrs.	16°	6 hrs.	16°	6 hrs.
1	phenol (GB→B)	B (pink)	0.69	1-B	0.87	B (pink)	0.71	B	0.90
		B	0.64	B	0.64	B	0.70	B	0.56
2	<i>o</i> -cresol (GB→B)	B (pink)	0.74	B	0.96	1-B	0.74	B	0.95
		B	0.63	B	0.66	B	0.66	B	0.57
3	<i>m</i> -cresol (GB→B)	1-dk-B(pink)	0.74	1-B	0.95	1-B	0.76	B	0.96
		B	0.64	B	0.66	B	0.68	B	0.59
4	thymol (G→GB)	1-B	0.78	1-B	0.84	1-B	0.83	B	0.60
		B	0.66	B	0.62	B	0.70		
5	pyrocatechol (G→black-G)	pink	0.31	pink	0.51	1-B	0.42	ft-B	0.40
6	resorcinol (G→black-G)	1-dk-B	0.40	B	0.33	1-dk-B	0.39	dk-B	0.23
		1-dk-B	0.10	1-B	0.13	1-dk-B	0.26	1-dk-B	0.12
								dk-B	0.03
7	hexylresorcinol (G→indigo-B)	indigo-B	0.65	1-B indigo-B	0.87 0.63	indigo-B	0.68	1-dk-B 1-dk-B B	0.94 0.84 0.50
8	hydroquinone (dk-G→Br)	—	—	—	—	—	—	—	—
9	<i>o</i> -aminophenol (BG→B)	1-dk-B 1-GY	0.64 0.46	1-B	0.66	1-B	0.42	1-B 1-B	0.46 0.34
10	<i>m</i> -aminophenol (BG→BrG)	1-dk-B	0.49	G 1-dk-G	0.65 0.55	ft-B	0.54	1-B ft-B	0.51 0.41
11	<i>o</i> -chlorophenol (G→B)	B	0.64	dk-B GB	0.97 0.62	1-indigo-B B	0.70 0.67	1-B indigo-B	0.96 0.57
12	<i>m</i> -chlorophenol (G→B)	B ft-B	0.63 0.33	B 1-B B	0.99 0.84 0.67	1-B B ft-B	0.70 0.64 0.40	1-B B	0.96 0.60
13	<i>p</i> -chlorophenol (dk-G→G)	1-B 1-indigo-B	0.64 0.55	1-B	0.62	1-B 1-B	0.66 0.47	1-B 1-dk-B	0.61 0.57
14	salicylic acid (G→Br)	1-GB	0.34	1-B	0.25	1-GB	0.62	1-B	0.14
15	<i>m</i> -hydroxybenzoic acid (dk-G→G)	GB	0.42	1-B	0.42	1-G	0.44	1-B	0.39
16	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (dk-OY→1-G)	ft-B (pink) 1-dk-B	0.64 0.32	1-B	0.63	ft-B ft-B	0.65 0.35	ft-B	0.54
17	salicylaldehyde (G→G)	1-B 1-B	0.55 0.50	GB	0.64	1-B ft-B	0.68 0.49	GB	0.59
18	<i>m</i> -hydroxybenzaldehyde (dk-GY)	ft-B	0.65	1-GY 1-GY	0.64 0.40	ft-GY ft-GY	0.50 0.39	1-G	0.53
19	<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde (dk-OY→1-G)	ft-B ft-GY	0.48 0.44	1-B	0.65	ft-B ft-B	0.66 0.50	ft-B	0.55
20	1-naphthol (B→dk-B)	G	0.67	1-GB	0.62	GB	0.65	1-B B	0.96 0.58
21	2-naphthol (BrG→BrY)	—	—	—	—	—	—	—	—
22	8-hydroxyquinoline (G→G)	1-B 1-GY	0.68 0.58	1-GB	0.60	1-G 1-G	0.64 0.53	1-B	0.59

dk: dark, ft: faintly, l: light, B: blue, Br: brown, G: green, O: orange,
V: violet, Y: yellow, —: decolor

りピンク色に変色し(メタノール系溶剤), アンモニア, 炭酸ナトリウム等のアルカリにより青色を呈し phenol の場合と全く同一の態度を示す. したがって phenol, cresols におけるピンク色のスポットは pH 指示薬のようなイオン構造をとる有機性色素と判断される. また, 溶剤の種類により上段のスポットは下段のスポットより, その Rf 値が影響され易いので上段と下段のスポットは化学構造の全く異なる色素と推定することができる. *o*-体と *m*-体の判別は不可能である.

thymol 類：2 種類のスポットが分離され，cresol 類の場合より，スポットの分離が良好である。

2 価フェノール類：*o*-体および *p*-体のスポットの呈色は極めて弱く，また相互の判別は困難である。*m*-体は 2 種以上のスポットが分離されている。*n*-hexylresorcinol の Rf 値は resorcinol の Rf 値より大きい。

m-体と，*o*-，*p*-体との判別確認は容易である。

aminophenol 類：*o*-，*m*-体ともに不安定な 1~2 種のスポットを生成し，その判別は可能である。

chlorophenol 類：*o*-，*m*-，*p*-体とも 2 種以上のスポットを生成し，各展開溶剤を適当に使い分けることにより，各異性体の判別が行なえる。

hydroxybenzoic acid 類：1 種のスポットを生成し，各異性体の判別は可能である。

hydroxybenzaldehyde 類：*m*-，*p*-体のスポットの判定はその色調が極めて淡いため困難であるが，*o*-体は Rf 値の異なる明瞭なスポット 1~2 種を分離するので，その判別確認は容易である。

naphthol 類：2-オキシン体はスポットを生成しないが，1-オキシン体はスポット 1 種を分離するので，その確認は容易である。

8-hydroxyquinoline：1~2 種のスポットが分離されている。

nitrophenol 類：呈色反応陰性であり，その反応溶液を濾紙クロマトグラフィーにかけたが，nitrophenol と試薬のスポットが認められるのみで，青色または緑色スポットは見出されなかつた。

Table II. Paper Electrophoresis of the Pigments formed in Color Reaction of Phenols with Pentacyano-iron Complex Salts and Hydroxylamine in Sodium Hydroxide Solution (Horizontal, open-strip method, MD: distance migrated as anionoid: cm.)

No.	Phenol compound (Color reaction)	Electrolyte		NaHCO ₃ (1%)		Na ₂ CO ₃ (N/10)		Na ₂ HPO ₄ -NaOH (pH 11.0)	
		Voltage		15 V/cm.		15 V/cm.		15 V/cm.	
		Electric current		1.60→3.44 mA/cm.		1.92→3.52 mA/cm.		1.68→3.36 mA/cm.	
		Time		60 min.		60 min.		60 min.	
	Spot	Color	MD	Color	MD	Color	MD	Color	MD
1	phenol (GB→B)	B	9.7	B	9.2	B	8.9		
		1-B	4.2	1-B	3.7	1-B	3.4		
2	<i>o</i> -cresol (GB→B)	B	8.4	B	8.1	B	8.9		
				ft-B	3.2				
3	<i>m</i> -cresol (GB→B)	B	9.3	B	9.4	B	10.2		
4	thymol (G→GB)	B	7.4	1-B	7.5	1-B	9.0		
5	pyrocatechol (G→black-G)	—		ft-B	8.2	ft-dk-G	8.5		
6	resorcinol (G→black-G)	indigo-B	8.9	indigo-B	10.5	dk-B	11.3		
7	hexylresorcinol (G→indigo-B)	1-indigo-B	7.3	indigo-B	8.6	ft-B	9.6		
8	hydroquinone (dk-G→Br)	—		—		—			
9	<i>o</i> -aminophenol (BG→B)	ft-B	9.3	1-dk-B	8.7	ft-dk-B	8.8		
10	<i>m</i> -aminophenol (BG→BrG)	1-indigo-B	8.9	1-dk-B	8.1	1-dk-B	9.5		
11	<i>o</i> -chlorophenol (G→B)	B	9.0	B	8.1	B	9.0		
12	<i>m</i> -chlorophenol (G→G)	1-B	8.1	1-B	9.5	1-B	10.0		
		ft-B	3.5	1-B	3.8	ft-B	3.6		
13	<i>p</i> -chlorophenol (dk-G→G)	ft-B	8.1	ft-B	7.9	—			
14	salicylic acid (G→GBr)	B	9.6	B	9.1	B	9.7		
15	<i>m</i> -hydroxybenzoic acid (dk-G→G)	1-B	9.7	1-B	9.1	B	10.8		
16	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (dk-OY→1-G)	—		—		—			
17	salicylaldehyde (G→G)	ft-B	9.1	1-B	9.9	ft-B	11.6		
		1-B	8.1	1-B	8.8	1-B	10.1		
18	<i>m</i> -hydroxybenzaldehyde(dk-GY→dk-GY)	ft-B	8.2	—		—			
19	<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde (dk-OY→1-G)	—		—		—			
20	1-naphthol (B→dk-B)	ft-B	9.0	1-B	8.3	ft-B	7.8		
21	2-naphthol (BrG→BrY)	—		—		—			
22	8-hydroxyquinoline (G→G)	B	8.3	1-G	8.3	1-B	9.6		

以上のように electron-releasing group をもつフェノール類は多くの場合、2 種類、ときにはそれ以上のスポットを生成するが、この場合、下段(Rf 値小)のスポットは各フェノール類(electron-releasing group, electron-attracting group とともに)に類似の Rf 値を示すものが多いが、上段(Rf 値大)のスポットの Rf 値は互に異なっていることが多い。したがって、各フェノール類の判別確認には上段のスポットを利用するのが有効である。electron-attracting group をもつフェノール類は electron-releasing group をもつフェノール類のスポットより Rf 値が小さい。一般にアセトン溶剤はメタノール溶剤より分離能はよいが、スポットの呈色色調を弱め、ときにはスポットを消失させることがある。

呈色色素の汙紙電気泳動 つぎに呈色反応より得られた呈色溶液を 1%重炭酸ナトリウム溶液 0.1N 炭酸ナトリウム溶液、燐酸ナトリウム-水酸化ナトリウム溶液(pH 11.0)等3種のアルカリ溶液を電解液として用い汙紙電気泳動を行なった(Table II)。泳動により青色または緑色のスポットが1~2 種反応液より分離され、いずれも陽極に向って泳動したので生成色素はアニオノイドと判断される。

phenol 類：泳動値の著しく異なる安定な2種類の青色スポットが分離された。泳動値の大きいスポットは汙紙クロマトグラフィー(メタノール系溶剤)で分離されたスポット青色部分に、泳動値の小さいスポットは汙紙クロマトグラフィー(メタノール系溶剤)で分離されたピンク色部分に相当することが抽出、汙紙電気泳動実験により確かめられた。したがって呈色反応条件、汙紙クロマトグラフィーにおける場合のアルカリに対する態度、泳動値等より考え泳動値の大きいスポット*1は complex anion、小さい方は有機性アニオノイド型色素と推定される。

cresol 類：*m*-体は *o*-体より泳動値が大きい。

thymol 類：phenol, cresol 類より泳動値が小さいので、それらと判別できる。

2 価フェノール類：*o*-体と *p*-体のスポットは極めて色調が淡いため判定が困難であり、ときには全く見出されない。*n*-hexylresorcinol は resorcinol より泳動値が小さい。*m*-体は明瞭なスポット1種を分離する。

aminophenol 類：*o*-体および *m*-体は不安定なスポット1種を分離する。

chlorophenol 類：*o*-体および *m*-体は安定なスポットを分離し、かつ、泳動値が異なるので判別が行なえる。*p*-体のスポットは不安定である。

hydroxybenzoic acid 類：*o*-体および *m*-体は1種のスポットを分離するが、*p*-体はスポットを分離しない。

hydroxybenzaldehyde 類：*o*-体スポット2種を分離するが、その中の1種は色調が淡いため判定し難いことがある。*m*-体はまれに1種分離するが、*p*-体のスポットは全く見出されない。

naphthol 類：1-オキシ体のみスポット1種を分離し、2-オキシ体は分離しない。

8-hydroxyquinoline：スポット1種を分離する。

汙紙電気泳動による生成色素の分離は汙紙クロマトグラフィーに比較し、分離されるスポット数が少なく、その色調は一般に若干淡いのが欠点であるが、短時間内に主要成分を分離確認できるので極めて有効な分析法と考えられる。一般に置換基は泳動値に著しい変化を与えないが、アルキル基、特に分子量の大きいイソプロピル、ヘキシル基の場合は泳動値が可成り減少し、汙紙クロマトグラフィーの場合の Rf 値が増加するのは逆の結果となつている。また、一般に *p*-置換フェノール類は置換基の種類に関係なく、そのスポットは極めて淡く、また泳動中に消失し易い。electron-attracting group をもつフェノール類は呈色反応が弱いので、分離されるスポットの色調は淡く、分解消失し易い。

したがって、以上の汙紙クロマトグラフィーおよび汙紙電気泳動から次の事項が結論される。

1. electron-releasing group をもつフェノール類はこの呈色反応で2種類のアニオノイド色素を生成する。アルカリに対する態度、Rf 値および泳動値から、その一つは有機性色素であり、他の一つは青色錯アニオンと推定する。electron-attracting group をもつフェノール類は比較的安定な青色錯アニオン1種を生成する。

2. 汙紙クロマトグラフィーおよび汙紙電気泳動は生成色素と原フェノール類の判別確認に利用できる。

本研究に当り終始御懇篤なる御指導ならびに御校閱を賜わった宇野豊三教授、千葉大学宮木高明教授、御鞭撻を賜わった高木誠司先生に深謝する。

*1 PAF, PAqF およびフェロシアン等、2 価シアノ鉄錯塩の泳動値に類似している。

実 験 の 部

濾紙クロマトグラフィー

試料：Table I に示したフェノール類のごく少量（固体の場合は a pin head 程度の量，液体の場合は毛細管の半滴程度の量）に 1% NP（または 1% PAF）0.2 cc, 1% $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.2 cc および N NaOH 0.2 cc を加え，よく振りまぜる．直ちに，または暫時の後に呈色した溶液を試料とし濾紙の原点に直径 5~6 mm 程度になるように毛細管を使用してスポットし，風乾したのち展開させた．展開条件：一次元上昇法，東洋濾紙 No. 50 (2×40 cm) を使用し，一端より 6 cm の箇所を原点とした．

その他の展開条件は Table I および第 2 報³⁾ を参照．

濾紙電気泳動

試料：前項の実験の試料と同一のものを使用した．泳動条件：水平法，定電圧泳動，東洋濾紙 No. 51 (12.5×26 cm) 液面間距離 20 cm. その他の泳動条件は Table II および第 2 報³⁾ 参照．

抽出—濾紙電気泳動

NH_4OH - NaHCO_3 - MeOH 溶剤で展開分離されたスポットのピンク色部分と青色部分を別々に切り取り，細片としたのち，可及的少量の 0.05M Na_2CO_3 を加えて硝子棒で押しながら抽出する．いずれの抽出液も青色を呈する．これらの青色抽出液を小磁製皿に移し，水浴中（浴温 40° 程度），扇風機で吹きながら濃縮する．この濃縮青色溶液を試料として前項の濾紙電気泳動を行なうと，青色部分は呈色反応溶液を直接泳動させたとき得られる泳動値の大きい青色スポットに，また，ピンク色の部分は泳動値の小さい青色スポットに一致することが認められた．

京都大学医学部薬学科

5) 大熊：第 2 報，本誌：79, 1586(1959).

UDC 615.779.932-011

318. 人見 弘：アミンによるペニシリンの分解に関する研究（第 4 報）

ベンジルペニシリン・プロカイン塩の水溶液中における分解

Hiromu Hitomi: Studies on Decomposition of Penicillin with Amines. IV.*

Decomposition of Aqueous Solution of Benzylpenicillin Procaine Salt.

(Research Laboratories, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.**)

Decomposition of procaine benzylpenicillin by warming its aqueous solution to 37° results in six kinds of decomposition reactions: (1) Formation of benzylpenicilloic acid by hydrolysis, (2) formation of benzylpenilloic acid by decarboxylation of benzylpenicilloic acid, (3) initial formation of benzylpenicilloic acid and its hydrolysis to form N -formyl- d -penicillamine and phenaceturic acid, (4) formation of benzylpenillic acid by intramolecular rearrangement, (5) formation of d -penicillamine and benzylpenilloaldehyde by hydrolysis of benzylpenilloic acid, and (6) formation of the disulfide of d -penicillamine and N -formyl- d -penicillamine by their oxidation.

(Received July 11, 1959)

ペニシリンアレルギーないしはアナフィラキシーショックの原因が何処にあるかは現在明らかでないが，ペニシリン分解物中にペニシリンよりも容易に抗原性を獲得するものもあり得ることが知られ，また d -penicillamine による皮膚アレルギーも報告されている¹⁾．このような理由からまず試験管内におけるペニシリンの分解を知るため今回プロカインペニシリンの水溶液中における分解について検討したところ，次のように一次的，二次的および三次的の分解反応の行なわれていることがわかった．1) 加水分解による benzylpenicilloic acid (II) の生

* 第 1 報：本誌 73, 428(1953)；第 2 報：本誌 74, 185(1954)；第 3 報：本誌 74, 188(1954) とする．

** Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) H. N. Eisen, B. Levine: Nature 174, 701(1954).