でそのまま泳動値を判定した。

汚紙クロマトグラフィー 実験条件は Table II および第4報^{*1}を参照。試料は前項の Table II のものと同じ。スポットは有色なので、そのまま Rf 値を算出した。

鉄錯塩とヒドロキシルアミンによるフェノール類の呈色反応溶液の吸収スペクトル フェノール類の水溶液(フェノール類の 1 m mol に N NaOH 1~2 cc を加え溶解させたのち、水を加え 100 cc とし(10 mM 溶液)、5 mM 溶液はこれを希釈し使用した) 0.5 cc に同濃度の NH₂OH·HCl 溶液 3.5 cc (PAF, PAQF を使用するときは 3 cc), NP 溶液 1.5 cc (PAF, PAQF を使用するときはその 2 cc) および水 20 cc を加えて振りまぜ、0.5N NaOH 1 cc および水を加えて 50 cc とし振りまぜたのち、30° で反応させる。同一条件で処理した同濃度の鉄錯塩-NH₂OH-NaOH 溶液をブランクとして 75~90 min における吸収を測定して、この測定値より、さらに同濃度のフェノール(類)-NaOH 溶液の吸収を差し引いたものを真の測定値として吸収スペクトルをえがいた。Table III で concentration (mM soln) が 1/20 となつていゝるフェノール類は 5 mM 溶液、1/10 となつていゝるフェノール類は 10 mM 溶液を使用した。鉄錯塩と NH₂OH はこの混合率のときフェノール類の呈色が最強となる。また、鉄錯塩としては NP が一番反応し易いので多くのフェノール類の反応にはこれを使用した (Table III)。

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

京都大学薬学部

UDC 547'172'267-386:543.41[547.562]

107. 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6報*)

フェノール類の呈色反応機構 その3 *p*-Aminophenol 類を配位子とした

ペンタシアノ鉄錯塩およびインドフェノール型色素生成について

Seiichi Ohkuma: Color Reaction of Organic Compounds with Pentacyano-iron

Complex Salts. VI. The Mechanism of Color Reaction of Phenols. (3).

The Formation of Pentacyano-iron Complex Salts Containing

p-Aminophenols as Ligand, and Indophenol Pigments.

(Faculty of Pharmacy, University of Kyoto^{*2})

Mechanism of color reaction of phenols by the reaction of pentacyano-iron complex like sodium nitroprusside and pentacyanoammineferroate, and hydroxylamine was examined by paper chromatography, paper electrophoresis, and absorption spectra. It was revealed that the chief product of this reaction is blue or green pentacyano-*p*-aminophenolferroates. In the case of phenols with electron-releasing group, a part of the *p*-aminophenols formed by the reaction and unchanged phenols undergo autoxidative condensation to produce the indophenol-type dye as a by-product.

(Received August 25, 1959)

さきに著者はニトロプルシッドナトリウム(NP)、ペンタシアノアクオフェロエート(PAQF)、ペンタシアノアンミンフェロエート(PAF)などのペンタシアノ鉄錯塩(鉄錯塩)とヒドロキシルアミンによるフェノール類の呈色反応を汚紙クロマトグラフィー、汚紙電気泳動および吸収スペクトルにより検討し、生成色素の一つは有色鉄錯塩であり、他の一つは有機アニオノイド色素であることを明らかにし、この反応は *p*-位が未置換のフェノール類によつて起こることを示した^{*1}。その後、さらに検討をかさねた結果、これらの色素の一つは *p*-アミノフェノール類を配位子とした鉄錯塩であり、他の一つはインドフェノール型色素であることを明らかにすることができたので以下これについて報告する。

*1 第5報：本誌 80, 487(1960)。

1) 大熊：本誌 79, 1596(1959)。

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

フェノールに NP とヒドロキシルアミンを水酸化ナトリウムアルカリ性で作用させると緑色をへて青色となる。この呈色溶液の一部をブタノールで抽出すると青色色素の一部はブタノール層に移行するが、水層はいぜんとして濃厚な青色を呈する。これらのブタノール抽出液、水層および反応溶液を滌紙クロマトグラフィーにかけ Table I の結果を得た。これらの展開状況から判断するとブタノール可溶の青色色素と水溶性の青色色素とは性質が全く異なる化合物であることは明らかである。したがって、以上の抽出展開状況、呈色反応条件などを考えると、前者は有機化合物であり、後者は極めて無機性の強い化合物、すなわち、有色鉄錯塩と推定することができ、第 4 報¹⁾の実験結果とよく一致する。

Table I. Paper Chromatography and Rf Values of the Pigments formed in Color Reaction of Phenol with Sodium Nitroprusside and Hydroxylamine in Sodium Hydroxide Alkaline Solution (one-dimensional ascending method)

No.	Sample	Solvent		NaHCO ₃ (1%)		CH ₃ COCH ₃ 90 cc.		CH ₃ COCH ₃ 90 cc.		NaHCO ₃ 2 g.	
		Temp. (°C)	Time (hrs.)	H ₂ O	10 cc.	NH ₄ OH (28%)	10 cc.	NH ₄ OH (28%)	40 cc.	CH ₃ COCH ₃	60 cc.
		18°	5	18°	5	18°	5	18°	5		
1	pigment of BuOH layer	1-B	0.34	1-B	0.99	1-B	0.85	1-B	0.86		
2	pigment of H ₂ O layer	intense-B	0.99	intense-B	0	intense-B	0	intense-B	0.64		
3	pigment of reaction mixture	1-B	0.34	1-B	0.99	1-B	0.85	1-B	0.87		
		intense-B	0.99	intense-B	0	intense-B	0	intense-B	0.65		

B : blue, Br : brown, G : green, O : orange, Y : yellow, dk : dark, ft : faint, l : light

さらに、Berg と Becker²⁾ は 8-hydroxyquinoline (I) がヒドロキシルアミンと反応し緑色を呈することを見出し、その呈色色素はインドフェノール型色素の 1-(8-hydroxy-5-quinolyl)quinoline-5,8-quinone 5-imine (II) であることを証明した (Chart 1)。

しかし、この反応が一般のフェノール類に起こるか否かについては検討していないので、著者は若干のフェノール、ナフトール類にヒドロキシルアミンを作用させたところ、 α -ナフトールと 8-hydroxyquinoline のみ緑色を呈し、フェノール類はすべて陰性であることが見出された。したがって、この Berg-Becker 反応はナフトイド活性の化合物のみに起こる反応と考えられる。しかるに鉄錯塩とヒドロキシルアミンによる呈色反応はフェノール、ナフトール類に共通な反応であるから、一応、Berg-Becker 反応とは全く関係ないようにみえる。しかしヒドロキシルアミンが鉄錯塩の配位子として一たん導入され pentacyanohydroxylaminoferroate を形成し、活性化されればナフトール類のみならずフェノール類にも作用してアミノ化を行なう可能性が考えられる。さらに、このようなアミノ化が起こりアミノフェノール類、アミノナフトール類が生成すると、これらの芳香族アミン類が鉄錯塩と配位子置換反応³⁾を起こし、有色鉄錯塩を形成し、さらに、アミン類の一部が未変化のフェノール、ナフトール類と反応しインドフェノール型色素⁴⁾を形成する結果、二つの有色物質の得られることが考えられる。たまたま、*p*-アミノフェノール類を配位子とする鉄錯塩は 690~710 m μ に λ_{max} を示し、フェノール、ナフトール類の呈色溶液の λ_{max} も同様、690~710 m μ で^{*1}よく一致し、この推定を支持する。そこで、これらの予想を確かめるためつぎの実験を行なった。

2) R. Berg, E. Becker : Ber. **73**, 172(1940). 3) 大熊 : 本誌 **79**, 1590(1959).

4) G. Heller : Ann. **392**, 16(1912); D.C. Lawford, D.G. Harvey : Analyst **78**, 63(1953).

さて、前報^{*1}でこの呈色反応はフェノール類の水酸基の *p*-位に何等かの変化が生じ、これが反応に直接関係することを推定した。したがって、この呈色反応で *p*-アミノフェノール類の生成が予想される。そこでフェノール類-NP-ヒドロキシルアミン、フェノール類-PAF-ヒドロキシルアミンに対し、*p*-アミノフェノール類-PAF、*p*-アミノフェノール類-フェノール類を対照とし、*p*-紙クロマトグラフィーおよび*p*-紙電気泳動を行ない、Table IIの結果を得た。

Table II. Paper Chromatography and Paper Electrophoresis of the Pigments formed in some Color Reactions

Paper chromatography: one dimensional ascending method

Paper electrophoresis: horizontal open strip method

MD: migrated distance as anionoid

No.	Sample	Method	Paper chromatography						Paper electrophoresis					
		Condition	NaHCO ₃ 1.5 g. NH ₄ OH (28%) CH ₃ OH 70 cc. 16° 6 hrs.	NaHCO ₃ 2 g. NH ₄ OH (28%) CH ₃ COCH ₃ 60 cc. 17° 6 hrs.	(NH ₄) ₂ SO ₄ 5 g. NH ₄ OH (28%) CH ₃ COCH ₃ 60 cc. 16° 6 hrs.	NaHCO ₃ 1% 15 V/cm. 1.84→ 3.52 mA/cm. 60 min.	Na ₂ CO ₃ (0.1N) 15 V/cm. 1.76→ 3.68 mA/cm. 60 min.	Na ₂ HPO ₄ -NaOH (pH 11.0) 15 V/cm. 1.60→ 3.20 mA/cm. 60 min.						
		Spot	Color	Rf	Color	Rf	Color	Rf	Color	MD(cm.)	Color	MD(cm.)	Color	MD(cm.)
1	P NH ₂ OH NP NaOH	B	0.68	B	0.86	B	0.92	B	10.3	B	10.9	B	10.1	
				B	0.67	B	0.63	1-B	4.3	1-B	3.8	B	3.4	
2	P NH ₂ OH PAF NaOH	B	0.68	B	0.88	B	0.93	B	10.2	B	11.0	B	10.2	
				B	0.65	B	0.65	1-B	4.2	1-B	3.9	B	3.6	
3	PAP PAF NaOH	B	0.68	B	0.69	B	0.64	B	10.3	B	10.8	B	10.3	
4	PAP P NaOH	B	0.70	B	0.88	B	0.91	B	4.3	B	4.0	B	3.5	
5	Indophenol NaOH	B	0.69	B	0.87	B	0.92	B	4.2	B	3.9	B	3.5	
6	OAP NH ₂ OH NP NaOH	ft-B	0.65	G	0.68	1-BrGY	0.71	1-dk-G	9.5	1-B	9.6	1-G	8.8	
		B	0.52	ft-GY	0.64	1-G	0.64	1-dk-O	0.9	1-dk-GY	3.0	1-BrY	3.6	
				1-BrGY	0.38	1-BrGY	0.38			1-BrY	1.1			
7	OAP NH ₂ OH PAF NaOH	1-B	0.65	1-G	0.68	1-B	0.64	ft-GB	9.6	1-B	9.3	G	9.0	
		B	0.51	1-G	0.64	1-B	0.64	1-dk-OY	0.9					
8	DAP PAF NaOH	1-B B	0.60 0.49	1-G ft-GY	0.69 0.42	ft-B 1-BrGY	0.67 0.36	GB	9.6	1-B	9.3	G	8.8	
9	DAP OAP NaOH	1-GY	0.60	1-Br 1-BrGY 1-GY	0.80 0.66 0.50	1-BrGY	0.69	dk-OY	1.2	1-BrGY	3.1	1-Br 1-BrGY	5.3 2.6	
10	SA NH ₂ OH NP NaOH	1-B	0.36	1-B	0.35	ft-B	0.61	B	10.8	B	12.3	B	11.8	
				1-B	0.24	1-B	0.39							
11	SA NH ₂ OH PAF NaOH	1-B	0.35	1-B	0.36	ft-B	0.60	B	10.7	B	12.1	B	11.8	
				1-B	0.21	1-B	0.34							
12	ASA PAF NaOH	ft-B ft-B	0.57 0.37	1-B 1-B	0.44 0.23	1-B ft-B	0.37 0.14	B	10.7	B	12.2	B	11.6	
13	ASA SA NaOH	—	—	—	—	—	—	1-dk-O	5.6	1-dk-O	5.8	1-dk-O	6.4	

14	α N NH ₂ OH NP NaOH	G	0.68	1-BrGY 0.86 1-B 0.69	1-G 0.59	1-B 8.9 1-O 5.4	1-B 9.1 1-dk-OY 5.0 O 3.0	1-B 8.5 1-dk-O 4.7 1-dk-Y 4.0 O 2.1
15	α N NH ₂ OH PAF NaOH	G	0.66	1-GY 0.87 1-B 0.66	1-G 0.61	1-B 8.9 1-O 5.4	1-B 9.2 Y 4.8 1-dk-O 3.4	1-B 8.4 1-dk-O 4.7 Y 3.9 O 2.2
16	AN PAF NaOH	B	0.70	ft-B 0.81 1-B 0.58	1-B 0.66	B 8.9 1-O 5.4	1-B 9.2 1-dk-O 5.2 1-dk-O 3.2	B 8.4 1-dk-O 4.6 1-O 2.2
17	AN α N NaOH	1-G	0.37	1-GY 0.86 1-GY 0.76 1-B 0.58	ft-G 0.60	1-dk-O 3.2	ft-BrY 5.1 ft-O 2.8	1-pink-O 4.7 1-Br 3.3 1-O 2.0

P : 1% phenol ethanolic soln. 3 drops

C : 1% *o*-cresol ethanolic soln.

OAP : 1% *o*-aminophenol·HCl soln. 3 drops

PAP : 1% *p*-aminophenol·HCl soln. 0.3 cc.

DAP : 1% 2,4-diaminophenol·HCl soln. 0.3 cc.

SA : 1% salicylic acid ethanolic soln. 3 drops

ASA : 1% 5-aminosalicylic acid·HCl soln. 0.3 cc.

α N : 1% α -naphthol ethanolic soln. 3 drops

AN : 1% 4-amino-1-naphthol·HCl soln. 0.3 cc.

NP : 1% Na₂(Fe(CN)₅NO) soln. 0.3 cc.

PAF : 1% Na₃(Fe(CN)₅NH₃) soln. 0.3 cc.

NH₂OH : 1% NH₂OH·HCl soln. 0.3 cc.

NaOH : 0.25N NaOH soln. 0.3 cc.

フェノール：フェノール-ヒドロキシルアミン-NP (PAF) の反応で生成する 2 個の青色スポットの一つは *p*-アミノフェノール-PAF, 他の一つは *p*-アミノフェノール-フェノール, すなわち, インドフェノールに一致する。

o-アミノフェノール：*o*-アミノフェノール-ヒドロキシルアミン-NP (PAF) の反応で生成する 2 個の青色～緑色のスポットの一つは 2,4-ジアミノフェノール-PAF, 他の一つは 2,4-ジアミノフェノール-*o*-アミノフェノールに一致する。

サリチル酸：サリチル酸-ヒドロキシルアミン-NP (PAF) の反応で生成する 2 個の青色スポットの一つは

Table III. Maximum Absorption of the Spot separated on Paper Electrophoresis

(paper electrophoresis : horizontal open strip method, 0.1N Na₂CO₃, 15 V/cm.,

1.76 → 3.68 mA/cm., 60 min. MD : migrated distance as anionoid)

No.	Sample	Spot		$\lambda_{\max}$ of spot (m μ)	No.	Sample	Spot		$\lambda_{\max}$ of spot (m μ)
		Color	MD (cm.)				Color	MD (cm.)	
1	P NH ₂ OH NP NaOH	B	3.7	630	8	DAP PAF NaOH	1-B→ 1-dk-GY	9.5	710*
2	P NH ₂ OH PAF NaOH	B	3.8	630	9	SA NH ₂ OH NP NaOH	B	12.3	710
3	PAP PAF NaOH	B	10.8	700	10	SA NH ₂ OH PAF NaOH	B	12.1	710
4	PAP P NaOH	B	3.8	630	11	ASA PAF NaOH	B	12.2	710
5	Indophenol NaOH	B	3.8	630	12	α N NH ₂ OH NP NaOH	1-B	9.1	690
6	OAP NH ₂ OH NP NaOH	1-B→ 1-dk-GY	9.6	730*	13	α N NH ₂ OH PAF NaOH	1-B	9.2	690
7	OAP NH ₂ OH PAF NaOH	1-B→ 1-dk-GY	9.4	720*	14	AN PAF NaOH	1-B	9.2	690

* unstable color

アミン量⁵⁾などの反応条件に影響されるので、インドフェノール生成は明らかに副反応であり、有色鉄錯塩生成が主反応と判断される。

したがって、鉄錯塩とヒドロキシルアミンによるフェノール類の呈色反応機構は次の如く推定される。鉄錯塩として NP を使用するときは、まず、ヒドロキシルアミンにより NP が PAqF に変化し、さらにこの PAqF が未反応のヒドロキシルアミンと配位子置換反応を行ない、pentacyanohydroxylaminoferroate (I) を形成し、ついで、フェノール類の水酸基の *p*-位をアミノ化し、*p*-アミノフェノール類 (II) を形成する。ここで生成した *p*-アミノフェノール類は PAqF または PAF と配位子置換反応を行ない、青色または緑色の pentacyano-*p*-aminophenol(s)ferroate (pentacyano-*p*-hydroxyanilino(s)ferroate) 類 (III) を生成する。electron-releasing group をもつフェノール類の場合は *p*-アミノフェノール類の一部と未変化のフェノール類が空気酸化縮合し、インドフェノール型色素 (IV) を副生し呈色反応を終結する。PAqF, PAF を使用するときは直接ヒドロキシルアミンが PAqF, PAF と反応し (I) を形成する他は、NP と全く同一反応経路をとる。これらの反応を図示すると Chart 2 のようになる。

実 験 の 部

呈色抽出実験 米粒大の PhOH に 1% NP, 1% $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, *N* NaOH の各 1 cc を加え反応させたのち、水を加えて 10 cc に希め、その 2 cc をとり、*n*-BuOH 2 cc を加えて烈しく振りまぜ抽出する。抽出は 3 回行ない抽出操作を完全とする。BuOH 抽出液、水層、呈色反応溶液は沓紙クロマトグラフィー用の試料として使用する。

Berg-Becker 反応 PhOH, *m*-クレゾール、チモール、サリチル酸、hexylresorcinol, α -ナフトール、 β -ナフトール、8-hydroxyquinoline 等の 1% EtOH 溶液 1 cc に 1% $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 1 cc および 2*N* Na_2CO_3 1 cc を加え振りまぜ 1 hr 放置する。 α -ナフトールおよび 8-hydroxyquinoline が緑色を呈する外は無色～淡褐黄色である。*N* NaOH を使用するときはすべて呈色しない。

沓紙クロマトグラフィー 展開条件は Table I, II および第 4 報¹⁾ のそれに準ずる。試料は呈色抽出実験の項の呈色液、Table II の sample 溶液 (表下に掲げる化合物を混合、反応呈色させたもの) を使用。

沓紙電気泳動 泳動条件は Table II～IV, および第 4 報¹⁾ のそれに準ずる。試料は Table II～IV の sample 溶液を使用した。

λ_{max} 測定 Table III の sample 溶液を沓紙電気泳動にかけ、分離されたスポットを切りとり (同一種のスポット 8 個を集める)、細片としたのち、これに 0.01*N* NaOH 12.5～25 cc を加え硝子棒がかきまぜながら抽出する。抽出液を乾燥沓紙で沓過し沓液の λ_{max} を測定する。ブランクは 0.01*N* NaOH。日立分光光度計 EPU-2 型。セルは 1 cm を使用。

本研究に当り終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲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。

京都大学薬学部

5) 大熊：本誌 79, 1586(1959)。