CHCl_3 を留去し残分を真空乾燥後無水 tetrahydrofuran 5 ml. に溶解, その 1 ml. を常法によって trimethylsilylether 化. GLC を行なって各検量線より cinobufagin の含量を求めた.

本研究にあたり, 有益な御助言をいただいた富山大学薬学部 飯田武夫教授, 御援助いただいた株式会社 広貫堂 塩井社長, 高桑工場長の各位に深謝します. また本研究に用いた bufotalin, cinobufotalin は K. Meyer 教授, campesterol, β -sitosterol は九大薬学部 西岡助教より御恵与いただいたものであわせて感謝いたします.

なお本研究費の一部は昭和 37 年度文部省科学研究費によったので付記し, 謝意を表します.

富山大学薬学部

〔薬 学 雑 誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
84 (12) 1171 ~ 1175 (1964)

UDC 543.422.5[547.56]

182. 梅田益雄：フェノール類の呈色反応 (第8報^{*1}) 1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウムによるフェノール類の呈色反応およびそのレゾルシンの比色定量法への応用

Masuo Umeda : Color Reaction of Phenols. VIII. Color Reaction of Phenols with Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate and its Application to Colorimetric Determination of Resorcinol.

(Shinagawa Factory, Sankyo Co., Ltd.^{*2})

A color reaction of phenol derivatives by sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate was investigated. Among about 40 kinds of phenols, those substituted by a positive group at a *o*-position gave much better coloration, while no color or at least only faint color was observed in case of *m*- or *p*-substituted one by the same group. Phenols substituted by a negative group gave negative results without exception. As to polyphenols resorcinol alone gave good color and others generally showed brown coloration perhaps due to air oxidation. Similar results were obtained, even when sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate was replaced by 1,2-naphthoquinone. Then this color reaction was applied for the colorimetric determination of resorcinol successfully. Limit of measurement, 20~180 $\mu\text{g./ml.}$, and $\hat{r}=0.84\%$ ($n=6$). One ml. sample solution (water solution containing 20~180 $\mu\text{g./ml.}$, of resorcinol) was taken exactly in 10 ml. measuring flask, 1 ml. of 0.2% sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate solution and 2.5 ml. of pyridine were added and shaken well. After kept standing for 5 min. at 15° 1 ml. of 0.45*N* sodium hydroxide solution was added, shaken well and kept standing at the same temperature for 15 min. Then water was added to make 10 ml. exactly and the absorbance at 680 $\text{m}\mu$ was measured. As a reference solution for the measurement 1 ml. of water was treated in the same manner.

(Received July 17, 1964)

1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウムは従来アミン類,¹⁻⁷⁾あるいは活性メチレン化合物⁸⁻¹¹⁾の呈色試薬として用いられてきた.

*1 第7報：本誌, 84, 846 (1964).

*2 Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo.

- 1) M. X. Sullivan, *et al.* : J. Am. Chem. Soc., 58, 47 (1936).
- 2) E. I. Short : Lancet., 1954, 656; *Idem* : Anal. Abstr., 1, 1349 (1954).
- 3) W. Dihlmann : Biochem. Z., 325, 295 (1954); *Idem* : Anal. Abstr., 1, 2123 (1954).
- 4) W. Troll : J. Biol. Chem., 202, 479 (1953).
- 5) D. H. Rosenblatt, *et al.* : Anal. Chem., 27, 1290 (1955).
- 6) H. Boser : Hoppe-Syl. Z., 298, 145 (1954).
- 7) E. G. Schmidt : J. Biol. Chem., 122, 757 (1938).
- 8) F. Sachs, *et al.* : Ber., 38, 3685 (1905).
- 9) F. Feigl, *et al.* : Anal. Chem., 29, 1522 (1957).
- 10) L. R. Jones, *et al.* : *Ibid.*, 28, 1493 (1956).
- 11) F. Turba, *et al.* : Angew. Chem., 61, 74 (1949).

一方本試薬のフェノール類への応用についての報告はきわめて少なく、1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウム-水酸化ナトリウムによりレゾルシンが紫色を呈すること^{8,12)} また 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウム-アンモニアにより *p*-未置換フェノールが呈色すること¹³⁾ が報告されているに過ぎない。

今回著者は 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウム-水酸化ナトリウムによる方法をフェノール類について試み、若干の知見を得るとともに、本呈色反応によるレゾルシンの比色定量法を確立したので報告する。

1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウム-水酸化ナトリウムによるフェノール類の呈色反応を行なうに先き立ち、Feigl¹²⁾ が記載している方法を追試した結果、レゾルシンは良好に緑色を呈し、Sachs⁹⁾ および Feigl¹²⁾ の記載 (紫色) と異なる結果を得たが、呈色液の色調は試薬の純度に左右され、低純度の 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムを用いた場合に赤紫色を呈した。

またピリジンの存在下に 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムによる呈色反応を行なうと呈色が円滑に行なわれることを見出したので、この方法を用いてフェノール類の呈色反応を行なうこととした。

本法により各種フェノール類について呈色反応を行なった結果は Table I に示すとおりで、*o*-クレゾールおよび *o*-メトキシフェノールの例に見られるように *o*-陽性置換フェノールは良好に呈色するが、*m*- および *p*-置換フェノールは呈色し難いか、あるいは全く呈色せずまた陰性置換フェノールは呈色しない。一方ポリフェノール類についてはレゾルシンが良好に呈色する他は空気酸化を受けるためか褐色を呈するものが多い。

本呈色反応の機構については次報において述べる予定であるが、1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムの他に 1,2-ナフトキノを用いても、各種フェノール類についてはほぼ同様の結果が得られ、しかも、オルシンやフロログルシンなどは 1,2-ナフトキノの方が呈色しやすい傾向が見られた。この事実は 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムによる場合、レゾルシンを除いて *m*-置換フェノールが呈色し難いことと考え合わせ、本反応の反応機構に何らかの関係があるものと考えられる。

ついで本呈色反応によるレゾルシンの比色定量法について検討した。

TABLE I. Color Reaction of Phenols with Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate or 1,2-Naphthoquinone

Phenols	Reagent ^{a)}			
	1		2	
	Coloration ^{b)}	$\lambda_{\max}$ (m μ)	Coloration ^{b)}	$\lambda_{\max}$ (m μ)
Phenol	G. Bl	625	—	—
<i>o</i> -Cresol	Bl. G	680	G. Br	645
<i>m</i> -Cresol	faint Br	690	—	—
<i>p</i> -Cresol	faint G	670	—	—
3,4-Dimethylphenol	—	—	Br	—
3,5-Dimethylphenol	—	—	—	—
2,5-Dimethylphenol	faint Br	660	—	—
2,6-Dimethylphenol	G	720	—	—
2,4-Dimethylphenol	faint Br	445	G. Br	—
Thymol	—	—	—	—
<i>o</i> -Methoxyphenol	Bl	680	G	640
<i>m</i> -Methoxyphenol	Br	540	G. Br	—
<i>p</i> -Methoxyphenol	faint Br	670	—	—
<i>o</i> -Chlorphenol	faint Bl	620	G. Br	640
<i>m</i> -Chlorphenol	—	—	—	—
<i>p</i> -Chlorphenol	—	—	—	—
<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid	—	—	—	—
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	—	—	—	—

12) F. Feigl: "Spot Test in Organic Analysis," 6th Ed. p. 315 (1960), Elsevier Publishing Co.

13) A. Steigmann: J. Soc. Chem. Ind., 61, 180 (1942) (C. A. 37, 2305 (1943)).

<i>o</i> -Nitrophenol	—	—	—	—
<i>m</i> -Nitrophenol	—	—	—	—
<i>p</i> -Nitrophenol	—	—	—	—
<i>p</i> -Acetoamidophenol	—	—	—	—
<i>o</i> -Aminophenol	Br	—	R. Br	—
<i>m</i> -Aminophenol	R. O	485	Br	—
<i>p</i> -Aminophenol	V	565	V	565
Pyrocatechol	R~R. Br	—	Br	—
Hydroquinone	O~Br	—	—	—
Resorcinol	G	680	Bl. G	690
Phloroglucinol	faint Br	600	G	650
Pyrogallol	Br	—	Br	—
Orcinol	R. Br	490	G	690
α -Naphthol	faint G. Br	690	G. Br	—
β -Naphthol	—	—	—	—
2,7-Dihydroxynaphthalene	faint G. Br	640	G. Br	—
8-Hydroxyquinoline	—	—	—	—
<i>o</i> -Phenylphenol	faint G. Br	650	—	—
<i>p</i> -Phenylphenol	—	—	—	—
<i>p</i> -Benzylphenol	—	—	—	—
<i>p</i> -Chlor- <i>m</i> -cresol	—	—	—	—
2,5-Dihydroxybenzoic acid	R. Br	555	—	—
2,6-Dichlorophenol	—	—	—	—

a) 1) Sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate-pyridine-NaOH

2) 1,2-Naphthoquinone-NaOH

b) Bl: blue, Br: brown, G: green, O: orange, R: red, V: violet

Fig. 1. Absorption Spectra of Colored Solution obtained from Resorcinol with Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate·NaOH

----- Blank solution

レゾルシンに 1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウムを加え、さらにピリジンの存在下に水酸化ナトリウムを加えるとき、緑色を呈し 680 mμ に吸収極大を示す (Fig. 1). 本波長における試薬ブランクは非常に小さい。したがって 680 mμ を測定波長として定量法の各条件すなわち、ピリジンの添加量および水酸化ナトリウムの濃度の吸光度におよぼす影響、反応温度および反応時間、1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウムの濃度の影響などについて検討を行なった。その結果、各試薬の濃度変化は顕著な影響を与えないが、反応温度および時間の影響は大きく、一般に低温になるほどデーターの再現性がよく、さらに吸光度も高くなる傾向があり、10~20° の間で良好な再現性が得られた。

以上の結論として、従来の方法に比較して感度は

多少劣るが、各種条件の多少の変動によっては影響されない操作の簡単な比色定量法を確立することができたといえよう。本法によるレゾルシンの測定範囲は 20~180 μg./ml., 測定精度は $\sigma=0.84\%$ ($n=6$) である。

実 験 の 部

試薬および試液 1) 各種フェノール類：既報のとおり。2) 0.2% 1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウム (試薬特級) 液：水溶液。3) 0.5% 1,2-ナフトキノン液：EtOH 液。4) ピリジン：試薬特級。5) 0.45 および *N* NaOH。6) EtOH：試薬特級。

測定機器 日立スペクトロホトメーター EPU-2A 型および日立自記式スペクトロホトメーター EPS-2U 型。

定性反応 各種フェノール類の 5~10 mg./ml. 含有の EtOH 液を調製し検液とした。

操作法 1: 検液 1 ml. を試験管にとり, 0.2% 1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウム液 1 ml., ピリジン 2 ml. および 0.45N NaOH 1 ml. を加えてよく振り混ぜ, 10~15° に 15 min. 放置する.

操作法 2: 検液 1 ml. を試験管にとり, 0.5% 1,2-ナフトキノン液 1 ml. および N NaOH 1 ml. を加え, よく振り混ぜ, 5~10 min. 放置する.

レゾルシンの比色定量法 検液 (レゾルシン 20~180 $\mu\text{g./ml.}$ 含有の水溶液) 1 ml. を 10 ml. メスフラスコ中に正確にとり, 0.2% 1,2-ナフトキノン-4-スルホン酸ナトリウム液 1 ml. およびピリジン 2.5 ml. を加えてよく振り混ぜ, 15° に 5 min. 放置した後, 0.45N NaOH 1 ml. を加えてよく振り混ぜ, 同温度に 15 min. 放置する. ついで水を加えて正確に 10 ml. とし, 680 $\text{m}\mu$ における吸光度を測定する. 別に検液の代わりに水 1 ml. を用い同様に処理した液を対照液とする.

Fig. 2. Calibration Curve of Resorcinol

標準曲線の作成 レゾルシン 20~200 $\mu\text{g./ml.}$ 含有の水溶液を調製し, その各 1 ml. ずつをとり, 定量法にしたがって操作し, 標準曲線を作成した. Fig. 2 に標準曲線を示す.

定量条件の検討 レゾルシン 100 $\mu\text{g./ml.}$ 含有の水溶液を調製し, 検液として以下の検討を行なった.

1) 呈色液の吸収曲線: 検液 1 ml. をとり定量法にしたがって操作し, 吸収スペクトルを測定した. Fig. 1 に吸収スペクトルを示すとおり, 680 $\text{m}\mu$ に吸収極大を示した. なお 680 $\text{m}\mu$ における試薬ブランクの吸光度は約 0.04 である.

2) 反応温度および反応時間と吸光度との関係: 反応温度および反応時間を Table II のとおりに変化し, 他は定量法にしたがって操作するとき, 反応温度および反応時間と吸光度との関係は Table II のとおりとなり, 10~20° の反応温度, 10~25 min. の反応時間で一定の吸光度を与えた. またこの際のブランク値の

TABLE II. Effect of Reaction Time and of Temperature on Absorbance

Reaction temp. (°C)	Reaction time (min.)					
	5	10	15	20	25	30
5	0.484	0.512	0.529	0.526	0.521	0.529
10	0.509	0.523	0.530	0.530	0.527	0.521
15	0.522	0.523	0.522	0.523	0.525	0.521
20	0.521	0.524	0.527	0.521	0.527	0.512
25	0.515	0.514	0.516	0.511	0.515	0.499
30	0.484	0.489	0.484	0.484	0.482	0.478

変化はまったく認められなかった. したがって反応温度を 15°, 反応時間を 15 min. とした.

3) ピリジンの添加量および NaOH の濃度と吸光度との関係: ピリジンの添加量および NaOH の濃度を Table III のとおりに変化し, 他の条件は定量法にしたがって操作した場合のピリジンの添加量および NaOH の濃度と吸光度との関係は Table III のとおりとなり, 1.5~3.0 ml. のピリジンの添加量, 0.35~0.50N の NaOH

TABLE III. Effect of Pyridine Volume and of Concentration of NaOH on Absorbance

Concn. of NaOH (N)	Volume of pyridine (ml.)					
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0.25	0.432	0.484	0.504	0.505	0.499	0.489
0.30	0.436	0.508	0.515	0.513	0.503	0.500
0.35	0.440	0.503	0.520	0.526	0.530	0.527
0.40	0.442	0.506	0.522	0.526	0.524	0.528
0.45	0.441	0.519	0.521	0.525	0.530	0.529
0.50	0.444	0.501	0.520	0.530	0.530	0.530
0.55	0.444	0.500	0.513	0.526	0.528	0.530

の濃度で一定の吸光度を与えた。その際の試薬ブランクの吸光度はピリジンの添加量および NaOH の濃度に関係なくほぼ一定である。したがって、ピリジンの添加量を 2.5 ml., NaOH の濃度を 0.45N とした。

4) 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムの濃度および NaOH の濃度と吸光度との関係：1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムおよび NaOH の濃度を Table IV のとおりに変化し、他は定量法にしたがって操作するとき、1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムおよび NaOH の濃度と吸光度との関係は Table IV の

TABLE IV. Effect of Concentration of Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate and of Sodium Hydroxide Absorbance

Concn. of NaOH (N)	Concn. of sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (%)					
	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
0.35	0.473	0.524	0.527	0.522	0.525	0.511
0.40	0.475	0.528	0.528	0.529	0.520	0.516
0.45	0.465	0.529	0.527	0.526	0.528	0.516
0.50	0.458	0.527	0.530	0.527	0.530	0.525
0.55	0.440	0.530	0.527	0.527	0.526	0.517

とおりとなり、0.10~0.25% の 1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムの濃度および 0.35~0.55N の NaOH の濃度の間で一定の吸光度を与えた。この際の試薬ブランクの吸光度の変化は Table V に示すとおりで、1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムの濃度の増加とともにわずかに大きくなる傾向があるが、その変化は大きくない。したがって Table III の結果を参考とし、1,2-ナフトキノ-4-スルホン酸ナトリウムの濃度を 0.20%, NaOH の濃度を 0.45N とした。

TABLE V. Effect of Concentration of Sodium 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate and of Sodium Hydroxide on Absorbance of blank Solution

Concn. of NaOH (N)	Concn. of sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (%)					
	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
0.35	0.026	0.032	0.032	0.036	0.045	0.042
0.40	0.024	0.032	0.037	0.041	0.039	0.049
0.45	0.027	0.030	0.034	0.036	0.039	0.042
0.50	0.024	0.031	0.035	0.037	0.040	0.041
0.55	0.022	0.026	0.035	0.037	0.038	0.041

5) 呈色液の安定性：定量法にしたがって操作し、得られた呈色液の吸光度を時間を追って測定した結果は Table VI に示すとおりで、発色後少なくとも 15 min. は安定である。

TABLE VI. Stability of Color

Elapsed time (min.)	2	5	10	15	20	25	30
Absorbance	0.525	0.525	0.523	0.520	0.510	0.501	0.490

終わりに当たり終始御懇篤な御指導と原稿の御校閲をいただいた京都大学 宇野豊三教授に厚く御礼申し上げるとともに、発表を許可された中比良工場長、根来工場次長 ならびに研究の便宜を与えられた 桜井試験課長に謝意を表します。