

Phenol 類及び數種關係化合物の Vanillin 試薬 に因る呈色反應に就て

講師 農學士 西 田 孝 太 郎

I 緒 言

既に古く Reichl 氏 (1890)⁽¹⁾ は Vanillin が Tryptophan と反應して鋭敏に呈色することを述べて居るのであるが近年に至つて Kraus 氏 (1925)⁽²⁾ は Vanillin 鹽酸溶液を用ふる Tryptophan の定量法を提案した Rosenthaler (1905)⁽³⁾ 及び Kutscherow (1905)⁽⁴⁾ 兩氏は各々獨立に Vanillin と鹽酸又は 硫酸の作用により Ketone 或は種々の揮發性精油が呈色することを報告して居る高橋偵造氏 (明治 38 及び 44)⁽⁵⁾ は嘗て Komorowski 氏が研究したやうな Benzaldehyde, Salicylaldehyde 及び其他の環狀 Aldehyde 特に Vanillin と硫酸とを用ひて Fusel 油の呈色反應を研究して其檢出法並に定量法を案出し 尙 Vanillin が種々の Alcohol, Ether, Ester 等と作用して呈色することに就て精査した 小篠武雄氏 (明治 44)⁽⁶⁾ は高橋氏の研究を参照し Vanillin を用ひて Fusel 油の定性及び定量法を研究した 佐田樂造氏 (大正元)⁽⁷⁾ も Fusel 油の定量法を研究し Vanillin を用ふる高橋氏の方法を改良して居る 黒野勘六氏等 (大正 13)⁽⁸⁾ は多數の Alcohol, Aldehyde, Ester, 有機酸等と Vanillin 試薬の呈色反應を検し Laevulin 酸が鋭敏に特殊の青綠色を呈することを發見してこれを Keton 酸特に Laevulin 酸の新呈色反應となしその定量方法を案出して居る 東恒人氏 (昭和 3)⁽⁹⁾ は種々の Alcohol, Aldehyde, Ester, Ketone, Keton 酸等の Vanillin 試薬に因る呈色状態を比較研究し 又該試薬を用ひて 清酒溜液中より呈色沈澱する物質を分離し 其原物質は $C_5H_{10}O$ 又は $C_5H_{12}O$ なる組成を有すべきことを述べて居る 更に同氏 (昭和 5)⁽¹⁰⁾ は燒酎 清酒其他に存在し Vanillin 試薬により綠色反應を呈する 微量物質を探究し それが Methyl ethyl ketone なるべきことを推定した 最近私 (昭和 6)⁽¹¹⁾ も Vanillin は蛋白の呈色試薬として極めて鋭敏であることを述べて置いた

以上は Vanillin の主として非芳香族化合物に對する呈色試薬としての從來の研究を述べたのであるが Vanillin 試薬は又 Phenol 類とも呈色反應を與へることが知られて居る 即ち Fleig 氏 (1908)⁽¹²⁾ は Phenol 類及び其他の環狀 異種環狀並に非環狀化合物に亘り 30 種の物質に就て 14 種の芳香族 Aldehyde を試薬として夫々の呈色反應を研究して居るが夫等 Aldehyde 中に Vanillin をも使用して居るのである 又近頃 Ware 氏 (1929)⁽¹³⁾ は Phenol 類の檢出及び

識別に Aldehyde 類及び Dihydroxyacetone の使用を題し Vanillin 反應によつて石炭酸中に Cresol の存在を検出し得ること及び *o*-Cresol と *m*-Cresol とを識別し得ることを述べて居るのである。前記従來の研究結果を通覽するに Vanillin 試薬は多種多様の物質を作用して様々の呈色を示すものであるが、概して云へば赤色又は赤色に近い色相を呈するものと、青—綠色の色相を呈するものとに分別し得るやうに思へるのである。而して Phenol 類は概して前者に屬する。

私は Vanillin 硫酸溶液による Phenol 類、Phenol 酸類及び夫等と關聯せる二三物質の呈色反應に關する實驗を行つたのであるが、その豫備實驗に於て同一物質にてもその濃度、試料と試薬との割合、反應時間等によつて甚だしく呈色を左右することを認め、仍て一定濃度の一定容の試料について、試薬の量その他の條件を定めて實驗を繰り返した結果、注目すべき事實として Phenol 類と Phenol 酸類とは著しく異つた行爲を示すこと、及び Tyramine, Tyrosine の如き化合物も亦此呈色反應を與ふることを見出し得て尙多少の考察をも試みたるを以て以下その梗概を報告することにした。

II 實 驗 方 法

試薬として使用した Vanillin 硫酸溶液は高橋氏の方法に倣ひ Vanillin 1g. を比重 1.84 の濃硫酸 200 c.c. に溶解して調製したのであるが、この溶液は黄色を呈する。而して試薬は常に新調したものを使用した。


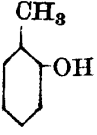
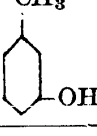
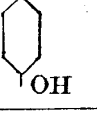
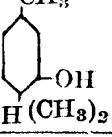
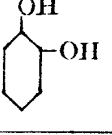
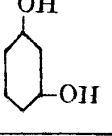
實驗方法は先づ各種供試物質の原液を作り順次稀釋して種々の濃度の溶液をなし、その 1 c.c. を試験管に採り 1 c.c. 又は 2 c.c. の試薬を Pipette を以て管壁に沿ひ徐々に注加したる後振盪するのである。而して實際振盪直後より暫時後に至るまでに現した色相、並にその呈色度を觀察したのであるが、呈色度の階級を表はすには顯著、鮮明、明瞭、輕微等の語を使用した。

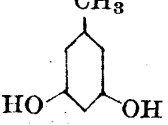

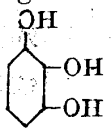
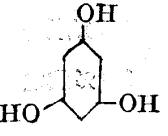
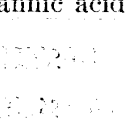
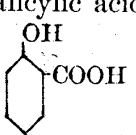
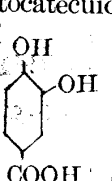
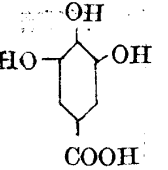
供試物質の溶媒としては水を用ひたのであるが、水に溶解し難い試料の場合には稀薄酒精又は稀硫酸を用ひた。即ち Thymol に對しては 20% Alcohol, Salicyl 酸には 50% Alcohol を用ひ、又 Tyrosine に對しては 5% 硫酸を用ひたのである。



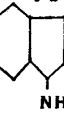
III 實 驗 結 果

前項の方法によつて Vanillin 硫酸溶液を試薬とし Phenol 類、Phenol 酸類、其他二三關聯物質に就てその呈色鋭敏度を觀察した結果を示せば次表の如くである。但し參考の爲め FeCl₃ 反應の鋭敏度も附記することにした。又 Tryptophan は Phenol 類と關聯した物質ではないが

Tyrosine が微弱ながら 陽性反應を呈するこゝを認めた爲め 互に蛋白の構成分子たるの故を以て兩者の鋭敏度を比較したに過ぎない

供試物質の名 稱及び構造式	Vanillin 反應の鋭敏度				FeCl ₃ -反應 の鋭敏度
	1.0 %	0.1 %	0.01 %	0.001 %	
Phenol 	顯著・橙色・ 一分位後混濁	鮮明・橙色・次第 ニ顯著トナリ少 シク混濁ス	輕微・一分位後 鮮明ナル淡赤色	數分後輕微・ 後明瞭トナル	1.0%顯著 0.1%輕微
o-Cresol 	鮮明・淡赤・ 直チニ混濁シ淡 朱色トナル ※ 顯著・濃赤色	鮮明・淡赤・ 直チニ橙黄色ト ナリ後混濁ス 顯著・赤色	明瞭・桃色・ 一分位後鮮明 顯著・橙赤色	一分位後極輕微・ 數分後明瞭・ 淡とき色 五分位後極輕微・ 淡橙黄色	1.0%顯著 0.1%陰性
m-Cresol 	顯著・淡赤・ 直チニ混濁シテ とき色一肉色ト ナル ※ 顯著・濃赤色	顯著・とき色 一分位後混濁 顯著・赤色	鮮明・とき色 顯著・橙赤色	一分位後輕微・ 二分位後明瞭・ 淡とき色 數分後輕微・ 淡橙黄色	1.0%顯著 0.1%陰性
p-Cresol 	極輕微・ 一分位後白濁 ※ 顯著・濃赤色・ 暫時後赤紫色	數分後極 輕微 顯著・赤色	— 一分位後輕微・ 數分後明瞭・ 淡赤色	— 殆ンド認め難シ	1.0%顯著 0.1%輕微
Thymol 	—	顯著・濃赤色 五分位後混濁	鮮明・淡赤色 數分後顯著ナル 赤色	一分位後明瞭・ とき色・ 數分後鮮明・	0.1%陰性
Catechol 	— ※	顯著・赤色	鮮明・淡赤色	極々輕微	0.1%顯著 0.01%輕微
Resorcinol 	—	顯著・赤色・ 數分後混濁	顯著・赤色	鮮明・淡赤色	0.1%明瞭

Orcinol CH ₃ 	—	顯著・赤色・ 數分後混濁シ血 赤色トナル	顯著・淡赤色・ 一二分後赤色	一分位後極輕微・ 五分位後鮮明ナル 淡赤色	0.1% 輕微
Quinol 	—	鮮明・淡赤色	一分位後明瞭・ 數分後鮮明	五分位後極輕微	1.0% 輕微 0.1% 陰性
Pyrogallol 	—	顯著・濃赤色	顯著・赤色	鮮明・淡赤色 數分後顯著	0.1% 顯著 0.01% 輕微
Phloroglucinol 	—	顯著・赤色・ 一二分後混濁	顯著・橙赤色	鮮明・ 淡橙黄色	0.1% 明瞭
Tannic acid 	—	鮮明・淡赤色・ 一分位後顯著	一分位後輕微・ 數分後明瞭	陰 性	0.1% 顯著 0.01% 鮮明
Salicylic acid 	陰 性	陰 性	陰 性	—	0.1% 顯著 0.01% 顯著
Protocatechuic acid 	陰 性	陰 性	陰 性	—	1.0% 顯著 0.1% 顯著 0.01% 鮮明
Gallic acid 	直後 陰性・ 五分内外ニシテ 稍明瞭	陰 性	陰 性	—	1.0% 顯著 0.1% 顯著 0.01% 極微

Tyramine (Hydrochloride)  <chem>CH2-CH2-NH2</chem>	※	陰 性	陰 性	—	—	1.0%顯著 0.1%陰性
		鮮明・淡赤色・ 二分位後顯著赤 色	數分後明瞭・ 次第＝鮮明・ 帶紫 淡赤色	—	—	
Tyrosine  <chem>CH2-CH(NH2)-COOH</chem>	※	陰 性	陰 性	—	—	1.0%陰性
		數分後明瞭 次第＝鮮明 帶紫淡赤色	五分位後輕微	—	—	
Tryptophan  <chem>CH2-CH(NH2)-COOH</chem> NH	※	—	顯著 濃帶赤紫色	顯著 帶紫赤色	五分位後 輕 微	—

備 考

- (1) ※印を附けた横欄は試料 1c.c. に對して試薬 2c.c. を 其他は何れも試料 1c.c. に對して試薬 1c.c. を注加したる場合の觀察結果である
- (2) Phenol 類中 Vanillin 試薬に最も鋭敏なるは Resorcinol にして 0.0001% の濃度に於ても直後輕微に呈色し一分位後明瞭に認むることが出來た 次は Thymol にして同上濃度にしては 5分内外後極輕微に呈色する程度で其他のものはこの濃度では何れも概ね陰性の結果を得た
- (3) 陽性反應を與ふるものは 長時間放置すればより濃色となる傾向がある 例へば Tyramine に於ては數時間後には 1%液は濃赤色となり又 0.1%液にありても顯著なる赤色となる

上表の如く Tyrosine も亦 Vanillin 試薬に對して呈色を與ふるものであつてその 1% 溶液に於ては暫時後鮮明に現色するのである 而して Tyrosine の呈色度は其 1% 溶液が Tryptophan の 0.005% 溶液に略匹敵するこゝを知り得たのであるが果して兩者が如何なる比に Colour Value を示すかを知らんが爲めに Duboscq 氏比色計を用ひてこれを測定した その方法は試験管 10 本に夫々 1% Tyrosine 液 1c.c. を採りそれに Vanillin 試薬 2c.c. 宛を加へて呈色せしめた 又 Tryptophan の 0.005% 溶液を Tyrosine の場合と全く同様に處理して呈色せしめたのである かくして 30 分間放置後夫々 10 本の試験管内の呈色液を合して兩者の Colour Value を比較して次の如き結果を得た

Duboscq 氏比色計の讀み

Tryptophan 溶液 (0.005%)	20.0 m.m.
Tyrosine 溶液 (1%)	21.3 m.m.

この測定數値から計算すれば Tryptophan は Tyrosine の 213 倍 $\left(\frac{21.3 \times 1}{0.005}\right)$ の Colour

Value を示すことになるのである

IV 實驗結果の考察

以上の實驗結果に基いて考察を試みた事項に就て述べれば次の如くである

(1) Phenol 類は Vanillin 硫酸溶液によつて極めて鋭敏に呈色反應を與ふるものである
勿論個々の物質によつて其程度を異にするのであるが多くの Phenol 類は 0.001%(1:100,000) 溶液 1c.c. を以てすれば試薬添加後 5 分間内外にして明かに呈色する 特に Resorcinol の如きは實に 0.0001% (1:1,000,000) 溶液 1c.c. を以てするも明瞭に呈色を認むることが出来るのである

Phenol 類に對する FeCl₃ 反應はこれを Vanillin 反應に較ぶれば極めて微弱であるが Phenol 酸類に對する FeCl₃ 反應は Phenol 類に對する FeCl₃ 反應より概して余程鋭敏である

(2) Phenol 類に對する Vanillin 反應は以上の如く鋭敏であるがこの反應の短所をすべき點は 試薬が多種多様の物質と反應して種々の呈色を示すことである 従て此反應のみにて未知物質の何物なるかを定め難きは勿論 試料が純品でなければ 假令微量の不純物にてもその影響を蒙ること著しく爲めに認定を誤る場合がある譯である

尙此反應は同一物質にても其濃度 試料と試薬との割合 反應時間などで著しく左右さるゝものである 例へば同濃度の試料を等しく 1c.c. づゝ採るも試薬を一般の場合の如く 1c.c. 注加する時は p-Cresol, Catechol, Tyramine, Tyrosine などは殆んど呈色を示さないが試薬 2c.c. を加ふれば前表に示す程度に呈色するのである 又前表中 o-Cresol や m-Cresol の反應に現れて居るやうに同一試料を同じく 1c.c. 採り それに試薬 1c.c. を加へたる時と 2c.c. を加へたる場合とを比較するにその色相に著しい差異を認むる場合がある 私は多數の實驗によつて 試料は常に 1c.c. と定め 試薬は場合により 1c.c. 又は 2c.c. とするのが適當であるを認めて居る

(3) Phenol 類は一般に Vanillin 試薬によつて鋭敏に呈色するが Phenol 酸類は全く呈色を示さないか呈色しても輕微で 而かも濃溶液の場合のみに限るのである 一般に Phenol 類に陽性の呈色試薬は Phenol 酸類に對しても陽性なのが普通であるが Vanillin 試薬は判然たる相違を示すが故に該試薬を以てすれば Phenol 類と Phenol 酸類とを明かに識別し得る譯である 今此等の關係を前表より摘約すれば次の如き對照となる

Phenol	C_6H_5OH	} 顯者に 呈色	Salicylic acid	$C_6H_4(OH)COOH$	} 反應は 陰性
Dihydric phenols	$C_6H_4(OH)_2$		Protocatechuic acid	$C_6H_3(OH)_2COOH$	
Trihydric phenols	$C_6H_3(OH)_3$		Gallic acid	$C_6H_2(OH)_3COOH$	
尙 Tyramine	[$C_6H_4(OH) \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2$]		と Tyrosine	[$C_6H_4(OH) \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2)COOH$]	

この呈色度を比較すれば前者が著しく大である

此等の事實よりすれば Phenol 類は Vanillin 試薬に作用して顯著なる呈色反應を示すものであるが Phenol に $-\text{COOH}$ 基を結合したる Phenol 酸にありては $-\text{COOH}$ 基の影響に因つて呈色反應は陰性なることを推知することが出来る 尙他の Phenol 化合物間に於ても同様の傾向があるやうに思へる 例へば Tyramine と Tyrosine との鋭敏度に著しい相違を認むるが如きそれである

(4) *o*-Cresol と *m*-Cresol との識別に就ては Ware 氏 (前出) も述べて居るのであるが Vanillin 反應を利用すれば色相の差異によつて容易にこれを區別することが出来る 即ち 0.1—1% 濃度の試料 1c.c. に試薬 1c.c. を注加して檢すれば兩化合物間に著しい色相の差異を認むることが出来るのである

(5) Gallic acid と Tannic acid とは前者が Ether に溶解すること及び Gelatin の溶液を沈澱しない點などで區別し得るのであるが各々 0.1% 濃度の試料に就て Vanillin 反應を試みても亦明かにこれを識別することを得るのである

(6) 生理上重要な Tyramine 及び Tyrosine が Vanillin 試薬によつて呈色反應を與ふる事實は注目に値する事柄である 尤も Tyrosine に對する Vanillin 反應の鋭敏度は極めて微弱であつて 例へば蛋白中の Tryptophan の檢出試薬として Vanillin を用ふる場合 等しく蛋白の構成分子として存在する Tyrosine の影響を考ふるに前の實驗に於ける Colour Value の比較より推してそれは negligible であること云つて差支へない程度である 但し Tyramine の Vanillin 反應は可なり鋭敏である

V 要 約

(1) Phenol 類 Phenol 酸類並に此等化合物と關聯せる二三物質即ち Phenol, *o*-, *m*-, 及び *p*-Cresols, Thymol, Catechol, Resorcinol, Orcinol, Quinol, Pyrogallol, Phloroglucinol, Tannic acid, Salicylic acid, Protocatechuic acid, Gallic acid, Tyramine 及び Tyrosine 等に對する Vanillin 試薬の呈色反應に就て研究し 同時に FeCl_3 反應を試み兩反應を比較對照して實驗結果の考察を試みた

(2) Phenol 類は Vanillin 試薬と作用して極めて鋭敏に赤色又は赤色に近い色相を呈するが Phenol 酸類の呈色反應は陰性であることを種々の濃度の試料について實驗した 而して FeCl_3 反應が Phenol 類 Phenol 酸類の何れにも陽性であることは勿論であるが Phenol 類に

對するその鋭敏度は Vanillin 反應に較べて著しく小さいこと及び Tyramine も FeCl₃ 液により陽性反應を示すが Tyrosine は陰性であること等を認めた

(3) Vanillin 試薬は Phenol 類と Phenol 酸類間 或種 Phenol 間 又は その關聯物質との識別に用ひ得ることを述べた

(4) 一般 Phenol 類に較ぶれば其鋭敏度は弱いが Tyramine も Vanillin 試薬によつて鮮かに呈色し 又更に輕微ながら Tyrosine も陽性に行爲することを知り得た 而して Tyrosine の Colour Value を Tryptophan のそれと比較した

終りに臨み此實驗を行ふに當り校長吉村清尚先生より有益なる助言を與へられたことを感謝する次第である

文 献

- (1) Abderhalden: Biochem. Handlex., IV Bd. (1911) S. 709
- (2) Kraus: Jour. Biol. Chem., 63 (1925) 157
- (3) Rosenthaler: z. analyt. Chem., 44 (1905) 292
- (4) Kutscherow: " " " 44 (1905) 622
- (5) 高橋偵造: 東京化學會誌 26 (明治38) 798 及び同誌 32 (明治44) 684
 " Bull. Coll. Agr. Tokyo. Imp. Univ. Japan., Vol. VI, No. 4, 437
 " Jour, Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo., Vol. V, No. 2 (1913) 167
- (6) 小篠武雄: 日本藥學會誌 351 (明治44) 277
- (7) 佐田樂造: 釀造試驗所報告 44 (大正元) 1
- (8) 黒野, 山田, 石田: 日本農藝化學會誌 1 (大正13—14) 405
- (9) 東恒人: 理化學研究所彙報 7 (昭和3) 506 及び 527
- (10) " : " 9 (昭和5) 42
- (11) 西田孝太郎: 我等の化學 4 (昭和6) 212
- (12) Fleig: Bulletin de la Soc. chim., [4] 3 (1908) 1038
 Chem. Zentralb., 80 (1909. I) 47 原文を見ずこの抄録を見た
- (13) Ware: Quart. J. Pharm. Pharmacol., 2 (1929) 249
 Chem. Abst., 24 (1930) 315 原文を見ずこの抄録を見た

(1931年9月稿)