

芳香族化合物の呈色反応

フェノール類の塩化鉄(Ⅲ)反応・ニンヒドリン反応を題材として

上宮太子高等学校 講師 卜部 吉庸

I. フェノール類の塩化鉄(Ⅲ)反応

1. はじめに

フェノール類は塩化鉄(Ⅲ)水溶液により、青～赤紫色の呈色反応を示す。この反応はフェノール類の検出に利用される。

文献には、ピクリン酸や *m*-, *p*-ヒドロキシ安息香酸は、塩化鉄(Ⅲ)との呈色反応が陰性である¹⁾との記述がある。そこで、種々のフェノール類と塩化鉄(Ⅲ)水溶液との呈色反応の有無を調べ、その理由を明らかにしたい。

2. フェノール類の呈色反応

フェノール類の 0.05 mol/L 水溶液 5mL に、0.05 mol/L FeCl₃ 水溶液を 0.1mL 加えて振り混ぜ、呈色を観察した。また、各呈色液に 6mol/L 酢酸 2mL を加え、呈色の変化する様子も調べた。実験はすべて気温 30℃ で行った。その結果を右の表 1 に示す。

フェノールの FeCl₃ 水溶液による呈色反応(以後 FeCl₃ 反応とよぶ)は、Fe³⁺ にフェノキシドイオン C₆H₅O⁻ が配位結合してできた鉄(Ⅲ)錯体に起因する²⁾。吸光度の測定より、Fe³⁺:フェノール = 1:3(物質質量比)のとき、呈色が最も強いので、Fe³⁺ と 3 個の C₆H₅O⁻(残る 3 個は H₂O または OH⁻ とと思われる)の六配位の鉄(Ⅲ)錯体が提唱されている³⁾。また、フェノール類の FeCl₃ 反応は、酢酸などにより妨害されるとの報告がある⁴⁾。これは、酸性が強くなると、下式の平衡が左に偏り、配位子となる C₆H₅O⁻ が減少し、鉄(Ⅲ)錯体が形成されにくくなるためと考えられる。



一方、塩基性が強くなると、酸化水酸化鉄(Ⅲ) FeO(OH) * の赤褐色沈殿を生成する。したがって、フェノール類の FeCl₃ 反応は、中性に近い条件で行うのが適切である。

*これまで水酸化鉄(Ⅲ) Fe(OH)₃ と考えられていた物質は実在せず、[Fe(OH)₃(H₂O)₃] の OH と H₂O の間で脱水縮合を繰り返してできた [FeO(OH)]_n として実在する。

3. フェノールとサリチル酸の呈色反応の違い

フェノールと FeCl₃ との呈色液は薄い紫色で、酢酸を加えると消失した。一方、サリチル酸と FeCl₃ との呈色液は濃い赤紫色で、酢酸を加えても消失しなかった。以上より、フェノールの鉄(Ⅲ)錯体よりもサリチル酸の鉄(Ⅲ)錯体の方が、酸に対する安定度が大きいことがわかる。

フェノキシドイオン C₆H₅O⁻ は金属イオンの 1 か所に配位結合する単座配位子であるが、サリチル酸イオン *o*-C₆H₄(O⁻)(COO⁻) は金属イオンの 2 か所に配位結合する二座配位子である。なお、二座以上の多座配位子は、金属イオンをはさみ込むように配位結合して、環状構造をもつキレート錯体を形成する。一般に、キレート錯体は普通の錯体に比べて、その安定度定数が格段に大きくなる(キレート効果)。

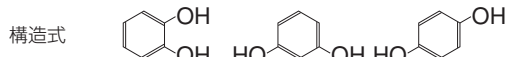
金属イオンに単座配位子が配位した場合、同数の単座配位子が置換されるだけで、系のエントロピーに変化はない。一方、金属イオンに 1 分子の二座配位子が配位した場合、2 分子の単座配位子が置換されるので、系のエントロピーが増加する。このエントロピー効果により、キレート錯体が形成しやすくなるのがキレート効果の主な原因と考えられる⁴⁾。

表 1 フェノール類の塩化鉄(Ⅲ)による呈色反応

| 化合物 | フェノール | サリチル酸 |
|--------------|-------|-------|
| 呈色 | 紫色 | 赤紫色 |
| 6mol/L 酢酸滴下後 | 無色 | 赤紫色 |

| 化合物 | <i>o</i> -クレゾール | <i>m</i> -クレゾール | <i>p</i> -クレゾール |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 呈色 | 緑褐色* | 青紫色 | 青色 |
| 6mol/L 酢酸滴下後 | 淡褐色 | 無色 | 無色 |

| 化合物 | カテコール | レスルシノール | ヒドロキノン |
|--------------|-------|---------|--------|
| 呈色 | 青緑色 | 青色 | 呈色なし |
| 6mol/L 酢酸滴下後 | 青緑色 | 無色 | 呈色なし |



*やや濁りがみられ、しだいに沈殿に変化しつつあった。

フェノールの配位子 $C_6H_5O^-$ は、強酸性では C_6H_5OH に戻り、その鉄(III)錯体が解離して、紫色が消失したと考えられる。一方、サリチル酸の配位子 $o-C_6H_4(O^-)(COO^-)$ は、その鉄(III)錯体の安定度定数が大きいので、強酸性でも解離せず、赤紫色の呈色が持続したと考えられる。

4. クレゾールの塩化鉄(III)反応

実際に、3種のクレゾールに $FeCl_3$ 反応を行うと、*p*-クレゾールは青色、*m*-クレゾールは青紫色を示したが、*o*-クレゾールは青紫色を示さず、青緑色から直ちに暗緑色に、やがて緑褐色の沈殿に変化した。この沈殿の正体は、フェノール類の酸化生成物ではないかと予想し、温度を変えて同じ実験を行ったところ、下の表2のような結果となった。

o-クレゾールの場合、 $-OH$ 基とメチル基は、ともにベンゼン環に電子を送り込む性質(電子供与性)をもつ。さらに、*o* 位にある CH_3 基の $C-H$ 結合と OH 基の O 原子の $2p$ 軌道の一部が重なり、電子の相互移動(超共役)を生じるために、*o*-クレゾールは *p*-, *m*-

表2 温度による *o*-クレゾールの呈色の変化

| 温度(℃) | 10℃ | 20℃ | 30℃ |
|--------------------|-----|-----|-----|
| <i>o</i> -クレゾールの呈色 | 青色 | 青緑色 | 暗緑色 |

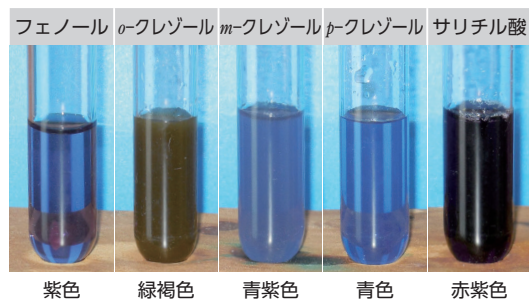


図1 1価フェノール類の塩化鉄(III)水溶液との呈色反応

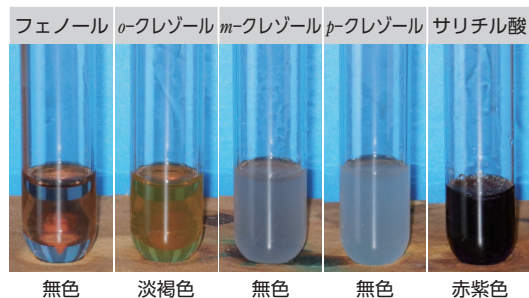


図2 各呈色液に酢酸を加えたときの变化

クレゾールよりもさらに酸化されやすくなっている可能性がある。したがって、*o*-クレゾールの $FeCl_3$ 反応を演示するときは、冷却して行う必要がある。

o-, *m*-, *p*-クレゾールと塩化鉄(III)との呈色液に酢酸を加えると、いずれも呈色が消失した。したがって、これらの鉄(III)錯体はフェノールと同様に、普通の錯体と考えられる。そして、*o*-クレゾールでは褐色の濁りがみられることから、酸化物の生成が予想される。一方、*m*-, *p*-クレゾールでは、どちらも白濁がみられたが、これは酸化生成物ではなく、強酸の放出した H^+ によって、水に溶けにくい *m*-, *p*-クレゾール分子が遊離したことを示している。

5. 2価フェノール類の呈色反応

カテコール $o-C_6H_4(OH)_2$ の場合、青緑色を示し、酢酸を加えても消失しないので、安定な鉄(III)キレート錯体を生成していると考えられる。

ヒドロキノン $p-C_6H_4(OH)_2$ の場合、一瞬は青色に呈色したが、すぐに消失した。これは、ヒドロキノンは還元性が強く、 Fe^{3+} をすべて Fe^{2+} に変えてしまうため、呈色しなくなったためと考えられる。

レスルシノール $m-C_6H_4(OH)_2$ の場合、青色を示し、酢酸を加えると消失したので、通常の鉄(III)錯体を生成していると考えられる。

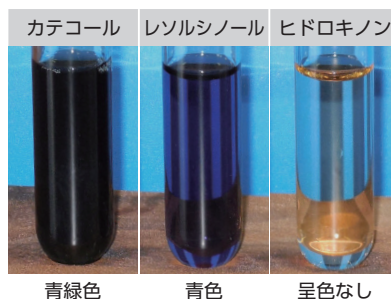


図3 2価フェノール類の塩化鉄(III)水溶液との呈色反応

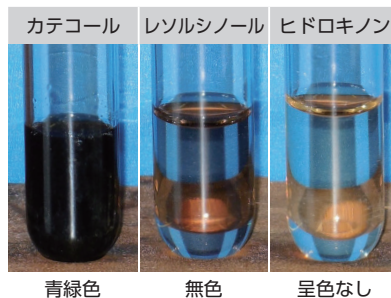


図4 各呈色液に酢酸を加えたときの变化

6. フェノール類の塩化鉄(Ⅲ)反応の色調

下表3にフェノール類の塩化鉄(Ⅲ)による呈色, 最大吸収波長, $-OH$ 基以外の置換基による $-OH$ 基への性質を示した。

表3 フェノール類の呈色, 最大吸収波長, $-OH$ 基に対する別の置換基の性質

| 化合物 | $FeCl_3$ による呈色 | 最大吸収波長 (nm) ⁵⁾ | OH 基に対する別の置換基の性質 |
|--------------------|----------------|---------------------------|--------------------|
| フェノール | 紫色 | 550 | |
| サリチル酸 | 赤紫色 | 525 | $-COOH$ 基 電子吸引性 |
| <i>m</i> -クレゾール | 青紫色 | 565 | $-CH_3$ 基 電子供与性 |
| <i>p</i> -クレゾール | 青色 | 580 | $-CH_3$ 基 電子供与性 |
| レソルシノール | 青色 | 580 | $-OH$ 基 電子供与性 |
| <i>p</i> -ニトロフェノール | 赤紫色 | 525 | $-NO_2$ 基 電子供与性 |
| <i>p</i> -クロロフェノール | 紫色 | 560 | $-Cl$ 基 電子供与性 |

※ Cl 原子は, *o*, *p* 配向性ではあるが, ベンゼン環への電子供与性は小さい。

フェノールの鉄(Ⅲ)錯体は, 550nm の黄緑色光を最も強く吸収して, その補色の紫色を呈する。

p-クレゾールのように, フェノールに別の電子供与性基が結合すると, 最大吸収波長が長波長側にずれ, 赤色光を多く吸収するため, 青色を呈する。

一方, サリチル酸のように, フェノールに別の電子吸引性基が結合すると, 最大吸収波長が短波長側にずれ, 青色光を多く吸収するため, 赤紫色を呈する。

もう少し詳しく調べると, 別の電子供与性基がフェノールの $-OH$ 基に対して, *o*, *p* 位に結合した場合, 紫色から青色への変化がみられるが, *m* 位に結合した場合, 紫色からの色調の変化は少ない。また, 別の電子吸引性基がベンゼン環の $-OH$ 基に対して, *o*, *p* 位に結合した場合, 紫色から赤紫色への変化がみられるが, *m* 位に結合した場合, 紫色からの色調の変化は少ないという傾向が見られた。

7. 塩化鉄(Ⅲ)による呈色反応に陰性なフェノール類

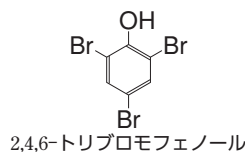
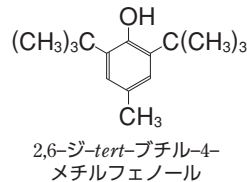
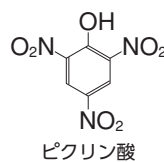
p-ヒドロキシ安息香酸($K_a = 10^{-4.5}$ mol/L), *m*-ヒドロキシ安息香酸($K_a = 10^{-4.1}$ mol/L)は $FeCl_3$

水溶液では呈色しない¹⁾。これは, 分子内の $-COOH$ の電離で生じた H^+ により, フェノール性 $-OH$ 基の電離が抑えられたためと考えられる。

ピクリン酸($K_a = 5 \times 10^{-1}$ mol/L)の酸性はさらに強く, $-NO_2$ 基の電子吸引性により, $-OH$ 基の O 原子の電子密度が低下し, 鉄(Ⅲ)錯体が形成できなかったと考えられる。

フェノール性 $-OH$ 基の両側に大きな置換基が結合した 2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-メチルフェノールでは, $FeCl_3$ 反応が陰性であるとの報告がある⁹⁾。これは置換基による立体障害により, 鉄(Ⅲ)錯体が形成されにくくなったためと考えられる。

これらのことにより, ピクリン酸の $FeCl_3$ 反応が陰性であるのは, 強酸性だけでなく, $-OH$ 基の両側に $-NO_2$ 基が結合したことによる立体障害の影響も考えられる。同様に, 2,4,6-トリプロモフェノールの $FeCl_3$ 反応が陰性であるのも, ピクリン酸とほぼ同様の理由によると思われる。



II. ニンヒドリン反応

1. はじめに

アミノ酸にニンヒドリン溶液を加えて温めると、紫色に呈色する。この反応はニンヒドリン反応とよばれ、 α -アミノ基の検出に利用される。また、アミノ酸の濃度が大きいほど濃く発色するので、アミノ酸の定量にも利用される。この反応は非常に鋭敏で、 α -アミノ酸だけでなく、タンパク質や各種のペプチド類も検出できる。

2. ニンヒドリン反応の反応機構

α -アミノ酸に対するニンヒドリン反応の一般的な反応機構は次のようである⁷⁾。

①ニンヒドリン(トリケトン型)の2位のC=O基に対してアミノ酸の α -NH₂基が求核攻撃し、脱水縮合の後、C=NR結合をもつ中間体(イミン)が生成する。脱炭酸(-CO₂)に続き、イミンの加水分解^{*}により、アミノ酸はアルデヒドに酸化される。一方、ニンヒドリンはニンヒドリンの還元型(第1級アミン)に還元される(図5)。

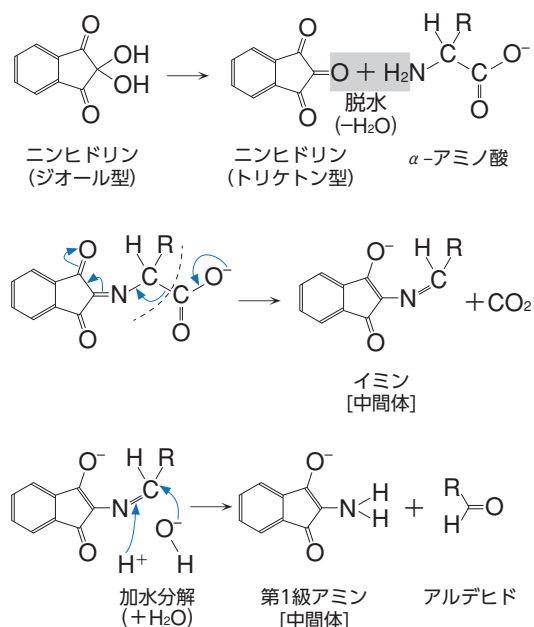


図5 ニンヒドリン反応の反応機構①

※イミン(カルボニル基とアミノ基が脱水縮合してできた化合物の総称)の加水分解については、文献7に記載がなかったので、筆者は次のように考えた。C=NR結合のCは δ^+ 、Nは δ^- に分極しており、それぞれにOH⁻、H⁺が付加して加水分解が始まり、続いて、-OHのH⁺が隣のN原子に転位後、電子の移動が起こると、C-NH結合が切断されて加水分解が終了し、アルデヒドと第1級アミンが生成する。

②ニンヒドリンの還元型は、別のニンヒドリンのトリケトン型と脱水縮合すると、長い共役二重結合をもつ紫色の色素(ルーヘマン紫)を生じる(図6)。

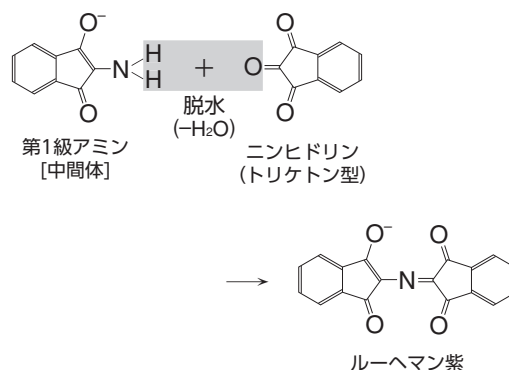


図6 ニンヒドリン反応の反応機構②

③環状構造のプロリンのように、イミノ基-NH-をもつ α -イミノ酸では、脱炭酸までで反応が終了し、別の黄色の色素(プロリン黄)が生成する⁸⁾(図7)。

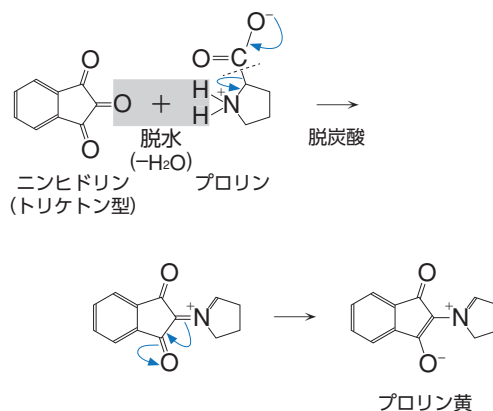


図7 α -イミノ酸のニンヒドリン反応の反応機構

3. ニンヒドリン反応の応用

犯罪捜査などにおいて、ガラスや金属に付着した指紋は、ニンヒドリン水溶液を吹きかけ、ドライヤーで加熱すると、指紋の部分に含まれるタンパク質やアミノ酸と反応して赤紫色に発色するので、容易に検出できる。

この他、 α -アミノ酸を適当な pH (4.2) でニンヒドリン反応させると、脱炭酸反応により CO_2 が発生する。これを一定濃度の $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 水溶液に吸収させて定量すれば、 α -アミノ酸を定量することもできる⁹⁾。即ち、1mol の酸性アミノ酸やシスチンからは 2mol の CO_2 が発生するが、残る α -アミノ酸 1mol からは 1mol の CO_2 が発生する(もちろん、プロリン 1mol から 1mol の CO_2 が発生する)。

4. 塩基性アミノ酸のニンヒドリン反応

[3 種類の塩基性アミノ酸の 0.05mol/L 水溶液 3mL に、0.1% ニンヒドリン水溶液 1mL を加え、4 分間湯浴で加熱した結果、ヒスチジンは赤紫色を示したが、リシンでは褐色を示し、アルギニンでは呈色は確認できなかった。ただし、リシンにビタミン C を加えてニンヒドリン反応を行うと、青紫色を示した。]という報告がある¹⁰⁾。リシンの場合、還元型のニンヒドリンが酸化され、ルーヘマン紫が生成しにくかった可能性があることを指摘している¹⁰⁾。

ニンヒドリンは、有機物中の α -アミノ基と定量的に反応するが、反応途中に生成する還元型のニンヒドリン(第 1 級アミン)は空気酸化されやすい。そのため、「ニンヒドリン反応をアミノ酸の定量に用いる場合は、反応液に塩化スズ(II) SnCl_2 やビタミン C などの還元剤を加えた緩衝液(pH = 5.1)で行うとよい。この方法で行うと、ヒスチジン、リシン、アルギニンいずれも呈色を示した。」という報告がある¹¹⁾。

「ニンヒドリン反応においては、リシンの側鎖の ε - NH_2 基は発色せず、アルギニンの側鎖のグアニジノ基も発色せず、どちらの α - NH_2 基も普通のアミノ酸と同程度に発色する。また、ニンヒドリン反応の最適 pH は約 5 である。」という報告がある¹²⁾。

ヒスチジンは側鎖にイミダゾール環(1,3 位に N 原子を含む 5 員環)構造をもち、次の酸解離定数 $K_1 \sim K_3$ をもつ。

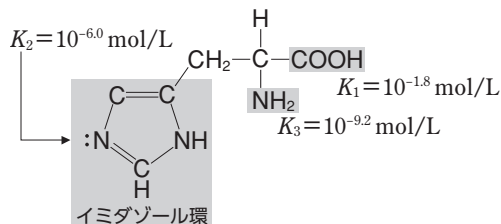


図 8 ヒスチジンの構造式とその酸解離定数

その等電点は $(6.0 + 9.2) \div 2 = 7.6$ の中性付近にある。

ヒスチジンだけがニンヒドリン反応で赤紫色を示したのは、その水溶液の pH がニンヒドリン反応の最適 pH に最も近かったことが原因の 1 つと考えられる。

一方、アルギニンは側鎖に強い塩基性のグアニジノ基をもち、次の酸解離定数 $K_1 \sim K_3$ をもつ。

その等電点は $(9.0 + 12.5) \div 2 = 10.8$ の塩基性側にある。

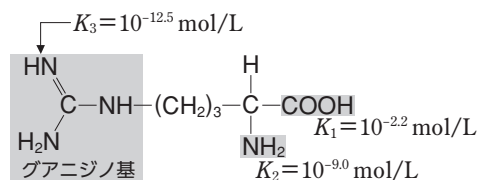


図 9 アルギニンの構造式とその酸解離定数

アルギニンがニンヒドリン反応で呈色しなかったのは、その水溶液の pH がニンヒドリン反応の最適 pH から大きく離れていたことが原因の 1 つと考えられる。

参考 アルギニンの役割について

染色体を構成するタンパク質のヒストンは、その約 20 ~ 32% をリシンとアルギニンが占め、他のタンパク質に比べて塩基性アミノ酸の含量が多い。ヒストンは塩基性アミノ酸の正電荷によって、負電荷をもつ DNA のリン酸基と安定した複合体をつくり、DNA を核内にコンパクトに収納する働きをもつ。また、動物の精子形成の際には、ヒストンの約 85% がプロタミンというタンパク質に変換される。プロタミンは約 80% を強い正電荷をもつアルギニンが占めており、負電荷をもつ DNA のリン酸基と強く結合することにより、精子の核ではさらにコンパクトに DNA が収納することが可能となっていると考えられる。

5. リシンのニンヒドリン反応が褐色を呈する原因

リシンは側鎖に塩基性の ϵ -NH₂ 基をもち、次の酸解離定数 $K_1 \sim K_3$ をもつ。その等電点は $(9.0 + 10.5) \div 2 = 9.8$ の塩基性側にある。

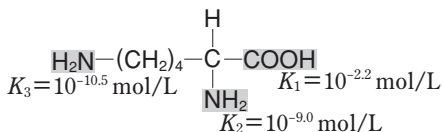
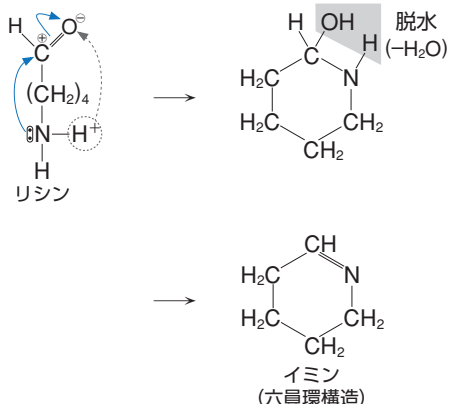


図10 リシンの構造式とその酸解離定数

リシンがニンヒドリン反応で褐色を示したのは、その水溶液の pH がニンヒドリン反応の最適 pH から離れていたことだけが原因とは考えにくい。

α -アミノ酸のニンヒドリン反応では、通常、アルデヒドが生成し、この還元性により、還元型ニンヒドリンの酸化が抑制され、ルーヘマン紫が生成しやすい条件にあったと考えられる。

一方、リシンの場合、ニンヒドリン反応で生じたアルデヒドのホルミル基と、自身の ϵ -位のアミノ基とが脱水縮合して六員環構造が形成され、ルーヘマン紫の生成能力が失われたと考えられるという報告がある¹³⁾。これは、ホルミル基にアミノ基が付加し、さらに脱水縮合すると、C=NR 結合をもつイミンに変化する*ため、還元型ニンヒドリンの酸化が進行して、ルーヘマン紫が生成しにくくなっていたと考えられる(図11)。



※この反応は、糖のホルミル基に対してヒドロキシ基が付加して、ヘミアセタール構造ができるのと同じ反応形式の反応である。実は、カルボニル基の C 原子に対する求核性は -OH よりも -NH₂ が大きいので、この反応は比較的容易に進行することが予想される。

リシンの水溶液に還元剤のビタミン C を加えてニンヒドリン反応を行うと青紫色を示したのは、還元剤によってニンヒドリンの還元型の酸化が抑制されたこと、および、ビタミン C (L-アスコルビン酸) 自身の酸性により、その水溶液の pH がニンヒドリン反応の最適 pH に近づいたことにより、ルーヘマン紫が生成しやすくなったためと考えられる。

参考文献

- 1) 梅沢 純夫 実験有機化学 丸善 p306 (1956)
- 2) 鈴木 弘 有機化学 実教出版 p154 (1977)
- 3) 木村 之信 雑誌「啓林」 No222 p10 (1986)
- 4) 日本化学会 続実験化学講座 5(上) 丸善 p446 ~ 452 (1965)
- 5) 長谷川 正, 臼井 豊和 日本化学会 化学と教育 39 巻 4 号 (1991) p456, 457 「塩化鉄(III)によるフェノール類の呈色反応」
- 6) 小竹 無二雄 大有機化学 9 巻 朝倉書店 p52 (1957)
- 7) 平松 茂樹 化学と教育 63 巻 3 号「アミノ酸・タンパク質の検出反応」 p136, 137 (2015)
- 8) 太田 貴文 化学と教育 47 巻 10 号 p688 (1999)
- 9) 内藤 多喜夫 関東化学 ケミカルタイムス 11 号 p180 (1953)
- 10) 金光大阪学園 探究 II 論文集 「アミノ酸のニンヒドリン反応における色調の相違」(2013)
- 11) 岩下 伸行 関税中央分析所報 第 45 号「ニンヒドリン比色法によるアミノ態窒素の定量について」 p50, 52 (2005)
- 12) 田村 英八郎 日本食品工業学会誌 12 巻 6 号 p249
- 13) 山岸 正治 JAPAN ANALYST Vol.4 「ニンヒドリン反応について」p586 (1955)