

Title	青いフラスコの実験におけるメチレンブルーの脱色と分解
Sub Title	Bleaching and degradation of methylene blue in blue bottle experiment
Author	向井, 知大(Mukai, Tomohiro) 大場, 茂(Oba, Shigeru)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2010
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 (The Hiyoshi review of the natural science). No.48 (2010. 9) ,p.11- 30
JaLC DOI	
Abstract	慶應義塾大学日吉キャンパスにおける文系学生を対象とした化学実験のテーマの1つとして、メチレンブルーの酸化と還元に関する実験を平成16年度から行っている。これはアルカリ条件下でグルコースを還元剤として使用し、脱色に要する時間（脱色時間）について振動回数と温度による影響を調べる実験である。この実験中に青い色素が次第に紫そして黄色に変化するという問題があった。そこで、どのような分解反応が起こっているのか文献を調べたところ、ジメチルアミノ基からメチル基が順次脱離し、そしてメチレンバイオレット（紫色）になり、さらに脱メチル化されることがわかった。メチレンブルーだけのアルカリ水溶液は青から紫、そして最終的には無色になる。黄色になる原因はメチレンブルーの分解生成物であるアミンとグルコースとの褐変化反応（メーラード反応）にあった。これらの反応は昇温により加速する。
Notes	研究ノート
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20100930-0011

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

青いフラスコの実験におけるメチレンブルーの脱色と分解

向井知大・大場 茂

Bleaching and Degradation of Methylene Blue in Blue Bottle Experiment

Tomohiro MUKAI and Shigeru OHBA

概要

慶應義塾大学日吉キャンパスにおける文系学生を対象とした化学実験のテーマの1つとして、メチレンブルーの酸化と還元に関する実験を平成16年度から行っている。これはアルカリ条件下でグルコースを還元剤として使用し、脱色に要する時間（脱色時間）について振動回数と温度による影響を調べる実験である。この実験中に青い色素が次第に紫そして黄色に変化するという問題があった。そこで、どのような分解反応が起こっているのか文献を調べたところ、ジメチルアミノ基からメチル基が順次脱離し、そしてメチレンバイオレット（紫色）になり、さらに脱メチル化されることがわかった。メチレンブルーだけのアルカリ水溶液は青から紫、そして最終的には無色になる。黄色になる原因はメチレンブルーの分解生成物であるアミンとグルコースとの褐変化反応（メーラード反応）にあった。これらの反応は昇温により加速する。

1. はじめに

「青いフラスコの実験」（英語では blue bottle experiment）は、1963年に Campbell によって広く紹介されたもので、くり返し反応の一種である。¹⁾ 溶液の青い色が消えたり戻ったりをくり返すため、化学マジックの演示例として、あるいは反応機構を考えさせる実験テーマとして使われている。また、メチレンブルーは殺菌性があり、化学療法の扉を開いた色素でもあった。²⁾ このフラスコを使った実験操作は非常に簡単であり、ポピュラーな実験となっている。しかし、その裏に隠れている色素の酸化還元および分解反応は、そんなに単純ではない。特に

慶應義塾大学化学教室（〒223-8521 横浜市港北区日吉4-1-1）：Department of Chemistry, Keio University, Hiyoshi 4-1-1, Kohoku-ku, Yokohama 223-8521, Japan. [Received Jan. 13, 2010]

フラスコ内の溶液が加熱あるいは時間経過に伴い変色してしまうが、それがどのような変化なのか、詳しく解説した資料がなかった。そこでメチレンブルーの分解反応等について文献を調べ、また実際に実験を行い、疑問点を明らかにすることにした。

2. 青いフラスコの反応の原理

2-1. 実験操作

実験テーマ「メチレンブルーの酸化と還元」で行っている実験内容は以下の通りである。100 ml ビーカーに30 ml の水を入れ、2 g のグルコースを少しずつ入れて溶かす。それを100 ml 丸底フラスコに入れ、3M NaOH 4 ml を加え、続いて0.05%メチレンブルー水溶液を1 ml 加えて、フラスコに栓をする。まず、試薬を混ぜるためにフラスコを激しく振ってから、溶液の青色が消えるまで放置する。このフラスコをまた激しく振ると、無色だった溶液が深い青色になるが、しばらく放置すると再び無色になる。色が消えるのに要する時間は、振る操作を何回したか（振動回数）に依存する。振動回数を10, 20, 30回と変えて脱色時間をそれぞれ3回ずつ測定する。ただし、各実験の前に、フラスコの栓をあけて、確実に十分な量の酸素が存在するようにしなければならない。脱色時間は温度にも依存する。そこで、温度を室温から10°Cずつ段階的に上げたときの脱色時間を測定する。ただし温度は50°Cを越えない範囲にする。なお、昇温実験の際には、ウォーターバススターラーを用い、フラスコを振動させるとき以外は湯浴に入れて、目的の温度に保つ。

2-2. メチレンブルーの役割

フラスコ内の溶液の着色および脱色がくりかえし起こるが、この反応系の概要を図1に示した。³⁾ 端的にいうと、反応全体は空気中の酸素によるグルコースの酸化反応であり、メチレンブルーがその反応の触媒となっている。アルカリ条件下においてグルコース GH からプロトン H^+ がはずれてグリコシドイオン G^- が生じ、これが還元剤として働くため、メチレンブルー（青色）が還元されてロイコメチレンブルー（無色）となる（図2）。フラスコを振ると、空気中の酸素が溶液中に溶け込み、それがロイコメチレンブルーを酸化してメチレンブルーに戻す。脱色の操作をくりかえすと、グルコースはグルコン酸イオン GO^- になっていくが、メチレンブルーは酸素によって再生されるので、色素の量が減るわけではない。そういう意味で、メチレンブルーは触媒の役割を果たしているといえる。なお、図2だけを見て、単純な可逆反応であると誤解してはならない。図1に示したように、メチレンブルーの還元と、ロイコメチレンブルーの酸化は、反応の相手が違うのである。詳しい反応機構については後に述べる。

2-3. グルコースの還元性

グルコースは水溶液中で開環反応が起こり、その開環体はアルデヒドである。このため還元性を示しそうであるが、中性水溶液中ではメチレンブルーを還元しない。アルカリ条件下にお

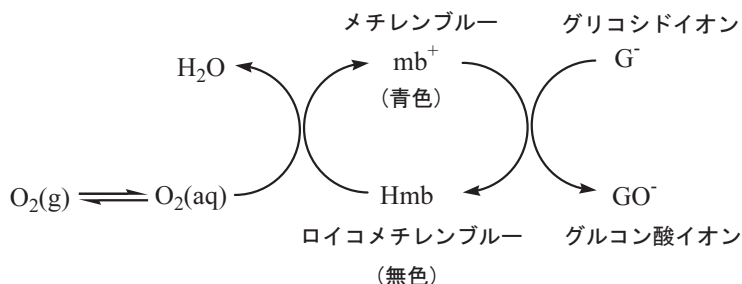


図1. 反応系の概要。³⁾ O₂(g) は空気中の酸素, O₂(aq) は溶液中に溶けている酸素を意味する。

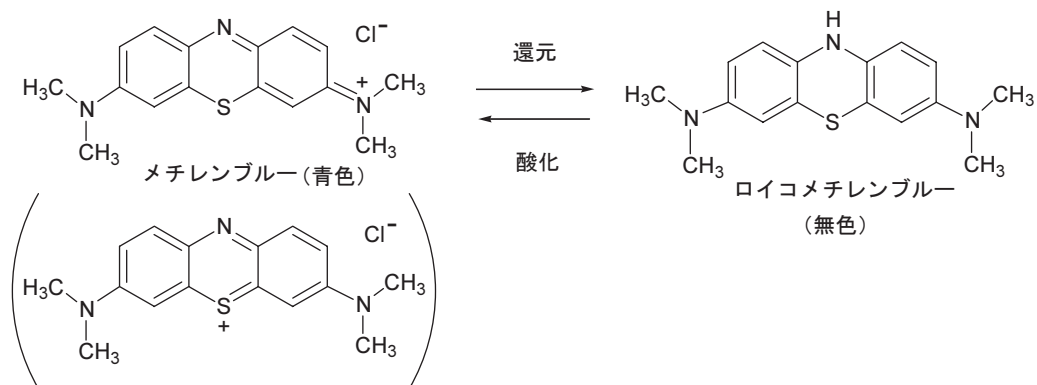


図2. メチレンブルーの分子構造とその反応に伴う変化。メチレンブルーの構造については、共鳴構造式が他にいくつか書けるが、そのうちの1つをカッコの中に示している。

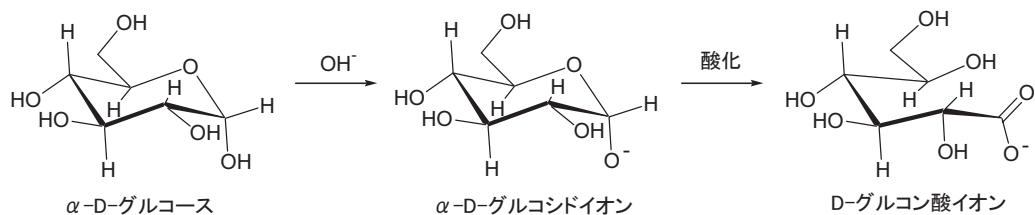


図3. グルコースの酸化反応。グルコースはアルカリ条件下でグルコシドイオンとなり、これが還元剤として働く。

くと、還元剤として働くが、それはグルコース GH からプロトン H⁺がはずれて、グルコシドイオン G⁻が生じるからである (図3)。⁴⁾ グルコシドイオンはロイコメチレンブルーを還元し、そして自分は酸化されてグルコン酸イオンとなる。

糖の種類をグルコースからガラクトースやマンノースなど他の還元性単糖類に変えたときに、メチレンブルーを触媒とした糖の酸化反応の活性化エネルギーがどのように変わるかが、調べられている。⁵⁾ それによると、水溶液中で α -ピラノース型よりも β -ピラノース型の存在比が高い糖ほど、活性化エネルギーが低い傾向にある (図4)。つまり、同一の糖でも β 型 (ア

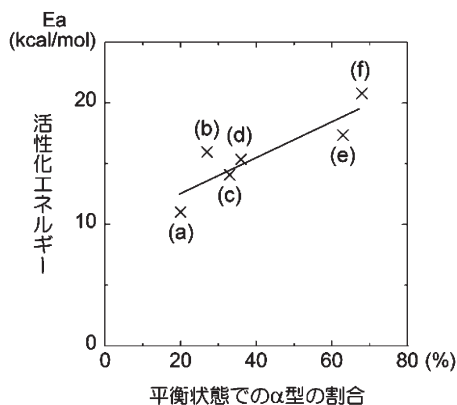


図4. 糖の水溶液中の平衡状態における α -ピラノース型の存在割合と、そのメチレンブルー水溶液中における酸化反応の活性化エネルギー E_a との関係。⁵⁾ (a) リボース, (b) ガラクトース, (c) キシロース, (d) グルコース, (e) アラビノース, (f) マンノース

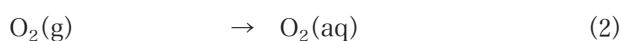
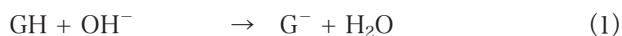
ノメリック炭素に結合しているOHがエカトリアル)の方が、 α 型(OHがアクシャル)よりも酸化されやすいことを意味する(α 型と β 型の化学平衡については、付録を参照)。

2-4. 溶存酸素

フラスコを振ることにより、空気中の酸素 $O_2(g)$ が溶液中に溶け、この溶存酸素 $O_2(aq)$ がロイコメチレンブルーを酸化する(図1)。フラスコの振動回数を増やすほど、脱色時間が長くなる傾向にあるが、それはこの溶存酸素の濃度がより高くなるからである。フラスコを振動させてから静置するとしばらくは、溶液の青い色は減衰せずに一定を保つ。それは、溶液中の溶存酸素がまだ残っていて、メチレンブルーが順次再生されているからである。溶存酸素がなくなると、急に色の減衰が始まる。このことは、電気化学的手法で確認されている。⁴⁾なお、フラスコの振動回数を増やすと、脱色時間が長くなるのは、それだけ青い物質の量が増えるからだだと誤解しやすいが、そうではない。メチレンブルーの量は限られているため、いくら振動回数を増やしても、青色がそれ以上濃くならないのである。⁶⁾振動回数が多い程、溶存酸素の濃度が増すと推定される。

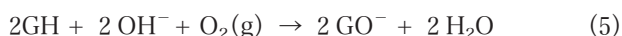
2-5. 反応機構および反応速度

図1に示した物質の変化は、次のような化学反応式で表わされる。^{1,4)}



ここで、GH, G^- , GO^- はそれぞれグルコース、グルコシドイオン、およびグルコン酸イオン

を表わし、 mb^+ はメチレンブルー、Hmbはロイコメチレンブルーである。式(1)と(4)を2倍して、(2)と(3)をも辺々加えると、メチレンブルーに関する項は消えて、次のようになる。



つまり、反応全体としては、アルカリ水溶液中でのグルコースの、酸素による酸化反応となっている。そして、メチレンブルーはその反応の触媒となっているのである。溶液中の溶存酸素濃度は、電気化学的な測定で調べることができる。また、メチレンブルーの濃度は可視吸収スペクトルから求めることができる。反応速度の研究により、次のようなことがわかっている。⁴⁾

- (1) 空気から溶液への酸素移動速度は、かき混ぜる速さ（スターラーを使った場合の回転速度）に依存する。
- (2) 酸素によってグルコースが直接酸化される反応も起こるが、メチレンブルーが介在した反応と比べて、その速度は1/10である。
- (3) 溶液をかき混ぜないと、溶液中の酸素濃度 $[O_2]$ は直線的に減少する。その減少速度は水酸化ナトリウムの濃度 $[NaOH]$ の1.2乗に比例し、グルコースの濃度には依存しない。溶液中の $[O_2]$ が非常に低くなってから、メチレンブルー（青色）の濃度が減少し始める。
- (4) 酸素が存在しない状態でのメチレンブルーとグルコシドイオンとの反応速度は、グルコースの濃度が高いときにはグルコースの濃度に依存しない。しかし、グルコースの濃度が低いときは、反応速度はグルコースとNaOHの濃度に比例する。よって、次のように錯合体を形成して反応が進むものと推定される。



3. メチレンブルーの還元と分解反応

3-1. 色素の種類と還元されやすさの違い

メチレンブルーのようなフェノチアジン骨格を有する色素をチアジン染料とよぶ。グルコースを還元剤として脱色のくり返し反応を起こさせる色素として、チアジン染料以外にもオキサジン染料、アジン染料が使える。⁵⁾ 色素によって色は違うのはもちろんだが、脱色反応の速さも違ってくる。チアジン染料について、反応の相対速度の順番が報告されているので、それを図5に示す。メチレンブルーはちょうど真中の順位であり、メチレンブルーの1,9-位にメチル基を導入したものは2番目の速さとなっている。一方、メチレンブルーのジメチルアミノ基からメチルが1つ脱離したアズールBは1番速いが、メチルが2つ脱離したアズールAは今度は一番反応が遅く、メチルが全部脱離したチオニンには前に戻って3番目の速さとなっている。

る。詳しくは後に述べるが、アルカリ条件下では脱メチル化が容易に起こることを考えると、この報告結果はおおまかな目安としてみるべきであろう。それにしても、メチレンブルーと同じような分子骨格をもっているのに関わらず、置換基の影響により反応速度に緩急の差がでてくることは間違いない。

3-2. 対流によるパターン形成

青いフラスコの実験に用いるのと同じ反応系の溶液*¹を、シャーレに深さ 2 mm あるいはそれ以上入れると、はじめの数分間は青いままだが、そのうちカビが生えたようなまだら模様が見れる。この液を振り混ぜると、均一な青色になるが、それを放置すると数分後にはまた模様ができて、これを何度もくり返すことができる。⁷⁾ このまだら模様は、グルコースの酸化によって生じたグルコン酸イオンが液面近くで濃くなり、それが対流することが原因である。⁸⁾ なお、反応溶液にフェノールフタレインを数滴たらしめておくと、模様が観察しやすくなる。⁷⁾

3-3. 分子構造

メチレンブルーの水溶液は、可視部に 610 と 665 nm の 2 つの吸収極大をもつ (図 6)。このうち吸光度の小さい 610 nm の方は、二量体形成による吸収である。⁹⁾ メチレンブルーを含む化合物の結晶構造がこれまで何件か報告されているが、比較的最近、硝酸塩 2 水和物の構造解析が絶対温度 120 K においてなされている。¹⁰⁾ その結晶中の分子の π - π スタッキングの様子を図 7 に示した。2 つの分子は対称心 (つまり点対称) で関係付けられており、平面状の分子骨格が互いに完全に平行で、面間距離は 3.704(2) Å となっている。溶液中の二量体もこのように、 π 共役系が重なったような配置をしていると推定される。

X 線構造解析されたデータについて、分子内の結合距離に着目すると、中央の環内の 2 つの N-C 結合距離はほぼ等しく、2 つの C-S 結合距離も等しい。報告されている原子の熱振動だ円体の形も正常であり、構造がみだれている兆候はみられない。メチレンブルー陽イオンの幾何構造が完全に左右対称であり、フェノチアジン骨格の両端のベンゼン環はどちらもキノイド形の特徴を有している。したがって、2 つのジメチルアミノ基に正の電荷が同等に分布しているような共鳴状態であると考えられる。図 2 にカッコつきで入れたような、イオウに正電荷が局在する電子構造の寄与はかなり低いと推定される。

3-4. 水溶液中のメチレンブルーの分解

前にも述べたようにメチレンブルーの水溶液は、可視部に 610 と 665 nm の 2 つの吸収極大をもつ (図 6)。このうち 665 nm の方は単量体による吸収であるが、それらの強度が時間とともに減少してピーク波長がシフトしていく様子 (図 8) などから、色素が分解して別の化合物になっていく過程が研究されている。それによると、この水溶液中の変化はメチレンブルーのジ

* 1 溶液の調製法は、グルコース 0.15 g を蒸留水 8 ml に溶かし、3M NaOH 1.5 ml と 0.05% メチレンブルー 0.5 ml を加えて混合する。

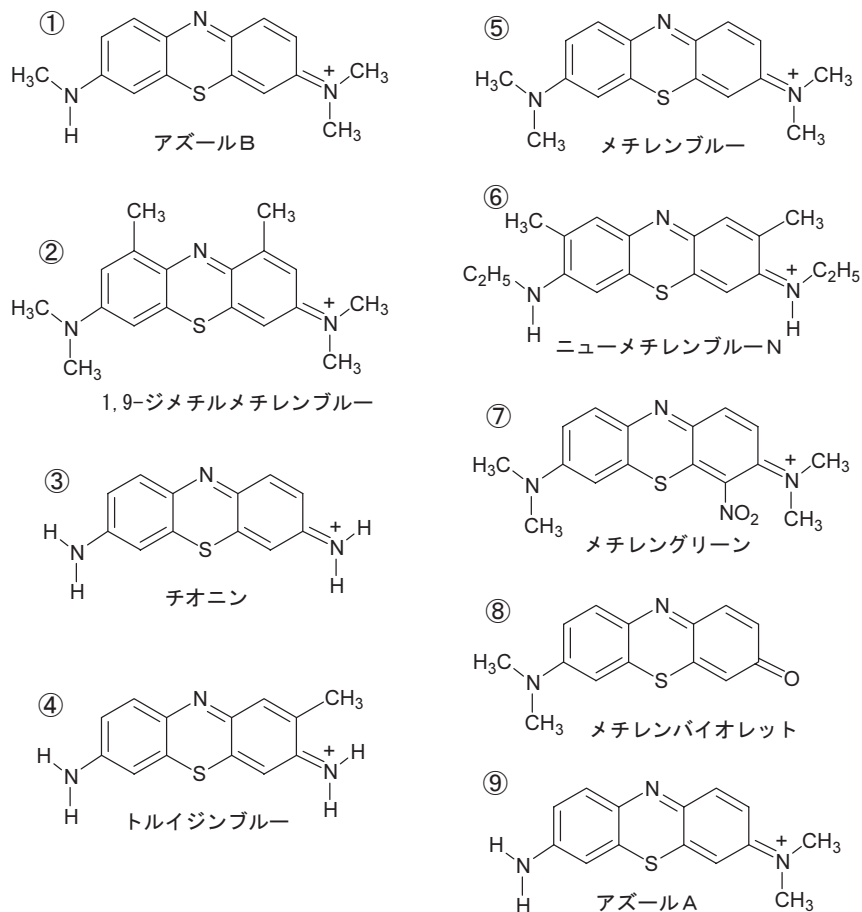


図5. チアジン染料の還元による脱色の相対反応速度。⁵⁾ 丸の中の数字は、速さの順番を示す。

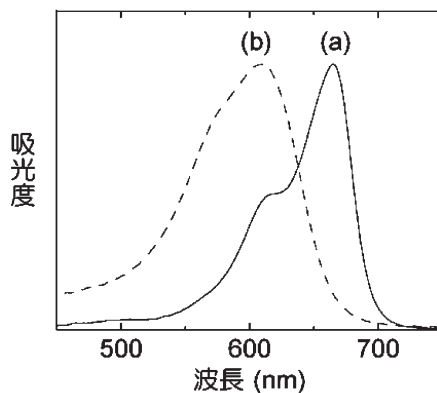


図6. 水溶液の吸収スペクトル, (a) メチレンブルー, (b) メチレンバイオレット。吸収極大の波長は (a) 616 nm と 665 nm, (b) 610 nm。

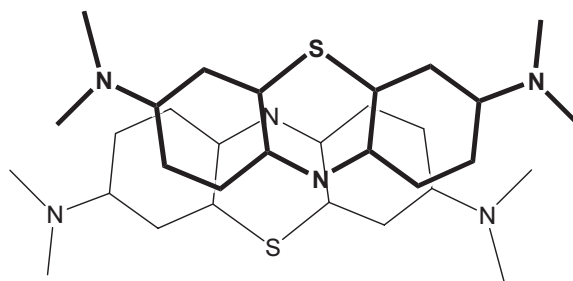


図7. メチレンブルー硝酸塩 2 水和物結晶中の π - π スタッキング。¹⁰⁾ 面間距離は3.704(2) Å

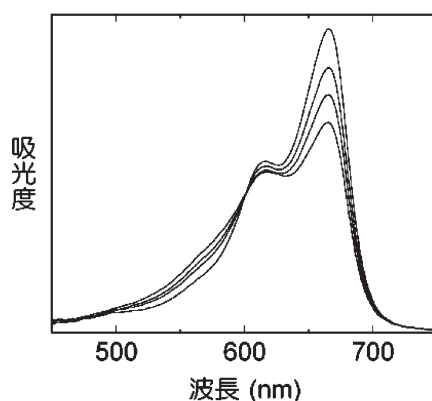


図8. メチレンブルーの0.3M NaOH溶液中におけるスペクトル変化 (測定は5分毎)。長波長側の吸収 (665 nm) が時間とともに急激に減少する。

メチルアミノ基のメチルが順次脱離していく反応であり、トリメチル体 (アズールB) そして非対称なジメチル体 (アズールA) が生じる (図9)。¹¹⁾ ただし、その先の反応は液性によって異なり、アルカリ条件下では、アミノ基がはずれてケトンとなり (メチレンバイオレット)、酸性条件下では、モノメチル体 (アズールC) に変わる。¹¹⁾ 市販のメチレンバイオレットには、脱メチル化した不純物が10%以上も含まれているが、それを水に溶かしたときのスペクトルも図6に示す。

アルカリ条件下でのメチレンブルーの分解反応速度は、水酸化ナトリウムおよびメチレンブルーの濃度に比例する。⁹⁾ このことから、反応中間体はメチレンブルーと水酸化物イオンとの錯合体であると推定される。NaOH のかわりに NaSCN 水溶液を用いると、分解反応がもっと速くなる。これは、OH⁻ に比べて SCN⁻ イオンの求核性が強いことで説明できる。⁹⁾

メチレンブルーの分解による退色を防ぐには、強アルカリ条件下におこななければならないのであるが、そうすると今度はロイコメチレンブルーが溶存酸素によって酸化されなくなってしまう。この状況を解決するために触媒として硫酸銅を加え、また還元剤としてグルコースのかわりに

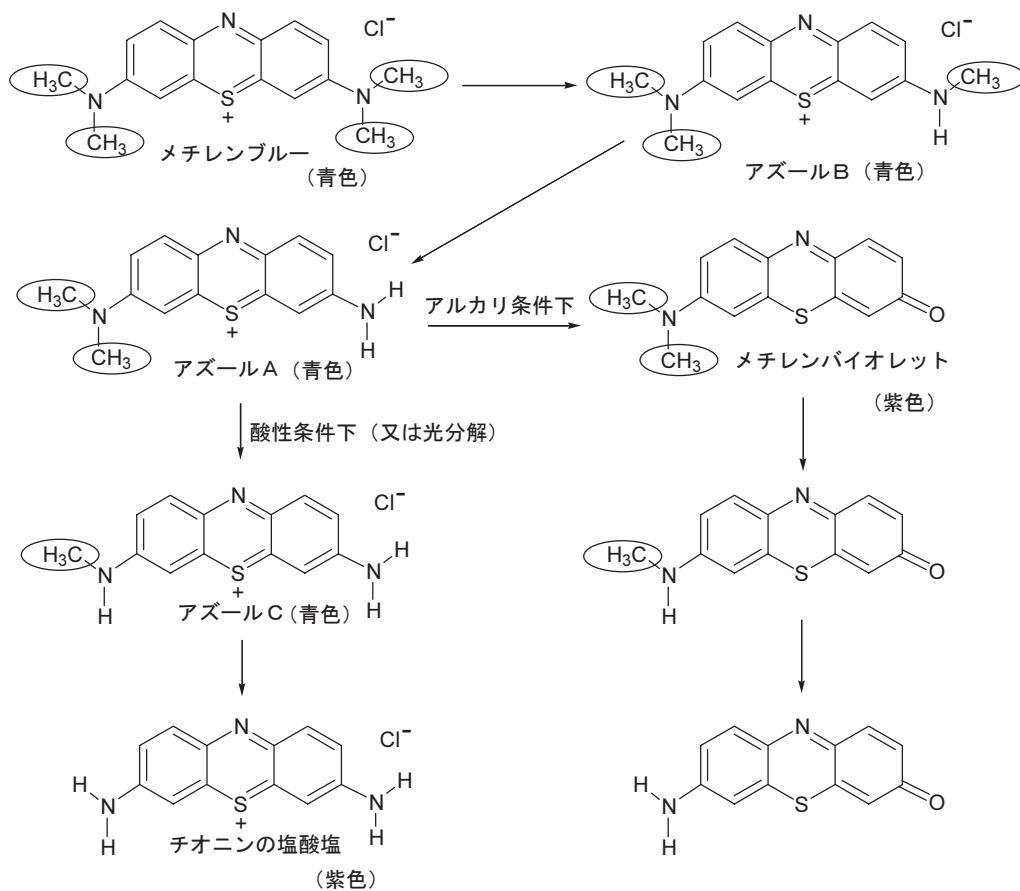


図9. メチレンブルーの分解反応

アスコルビン酸を用いる方法が提案されている。¹²⁾

3-5. 光酸化

TiO₂を光触媒として利用し、有機化合物を分解する研究が近年盛んに行われている。その活性試験にメチレンブルーが使われている。青い色素が光触媒によって分解され、無色になっていく。吸収スペクトルの変化や高速液体クロマトグラフィーの分析結果などから、この分解反応は酸性水溶液中におけるメチレンブルーの分解とまったく同じで、メチル基が順次はずれてアズールC、そしてチオニンになり (図9)、さらに分解されると推定される。^{13, 14)}

メチレンバイオレットの光分解についても調べられており、ジメチルアミノ基のメチルが順次はずれる反応が起こる。市販のメチレンバイオレットの純度が7～8割程度であるが、既に脱メチル化した成分が1割以上も不純物として含まれていることがわかっている。¹⁵⁾

4. 実験

4-1. 試薬の濃度および温度による影響

反応の速さは温度と振動回数によって違って来る。しかし、たとえ室温において振動回数10回という場合に限定しても、溶液の調製の仕方や振動のさせ方によって脱色時間が変わる。また、メチレンブルーの分解速度を下げるには、アルカリ濃度を低くすればよいが、そうすると酸化還元反応も遅くなってしまふ。そこで、試薬の濃度を変えて実際に脱色時間の測定を行い、どの程度の影響が出るかを調べた。

まず、室温(21°C)において通常の実験条件(2-1節に記載)で振動回数10, 20, 30回について、脱色時間の測定を、溶液調製後1回試運転(振動させ放置して色素の色が消えることを確認)してから、続けて繰り返した(表1)。脱色時間は初めに比べて次第に短くなり、測定4セット目以降はほぼ一定となった(図10)。そこで、これ以降は溶液を調製後1回試運転し、10分以上放置後に脱色時間を測定することにした。表2および図11にその結果を示す。(a)水酸化ナトリウムの濃度を薄くすると、急激に脱色時間が長くなる。つまりNaOHの濃度が脱色時間に敏感に影響することがわかる。(b)メチレンブルーの濃度を2倍にしても、脱色時間はほとんど変化しない。(c)グルコースの濃度を下げると脱色時間は長くなるが、NaOHの濃度依存性に比べると、変化はおだやかである。報告されているように、グルコースの濃度がある程度高いと、反応速度はグルコースの濃度にかかわらないことが確認できた。

ウォーターバススターラーを用いて、室温から10°そしてさらに10°温度を上げて、脱色時間の測定を行った。また、それとは別に、氷水で冷却して室温よりも10°下の温度での脱色時間も測定した(表3および図12)。温度を下げると、反応が急激に遅くなる様子がわかる。また、室温やその上の温度では、振動回数20回と30回とで脱色時間の違いがほとんどみられないが、低温のときには差が検出された。

4-2. 溶液調製後の経過時間

溶液調製直後にくりかえし測定すると、脱色時間が次第に短くなっていく理由として、(a)色素の分解反応、(b)グルコースの α 型から β 型への変化、(c)溶液の不均一性、などが考えられた。そこで、 β -グルコース(ただし市販されている試薬中には α 型も多少含まれている)を使って、 α -グルコースの場合と比較したところ、違いはみられなかった。また、初めによく振り混ぜても、脱色時間が同様の傾向を示したことから、(b)と(c)ではなく、(a)が主な原因と推定された。色素の0.3M NaOH溶液を調製し10分以上放置後、グルコース溶液を調製して混合し、脱色時間の変化を追ってみたが、このような前処理をせずに混合した場合と結果はほとんど同じであった。アルカリ条件下でメチレンブルーの分解が進むが、グルコースを混合することによりそれがさらに加速されると推定される。

図5に示したように、メチレンブルーからメチル基が1つ脱離したアズールBでは、脱色

表1. 通常の試薬濃度*における脱色時間の経過依存性 (室温21°C)

振動回数	脱色時間 (秒)						平均値 (No.4-6)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	
10回	46	37	35	32	34	35	34
20回	55	44	43	37	40	40	39
30回	47	44	43	39	38	37	38

*通常の試薬濃度については表2を参照。振動回数10回, 20回, 30回をセットにして続けて測定している。

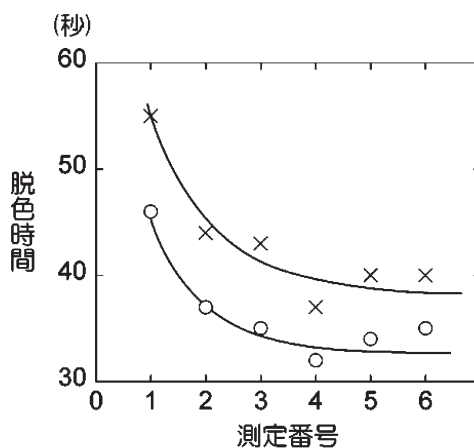


図10. 脱色時間の経過依存性 (21°C, 振動回数10回 (○), 20回 (×))

表2. 脱色時間の試薬濃度依存性 (室温21°C, 振動回数10回)

No.	蒸留水 (ml)	グルコース (g)	3M NaOH (ml)	0.05% メチレンブルー (ml)	脱色時間の平均値 (秒)**
通常	30	2.00	4.0	1.0	34
a1	32*	通常通り	2.0	通常通り	136
a2	33		1.0		316
a3	33.5		0.5		1108
b1	通常通り	通常通り	通常通り	2.0	38
b2				4.0	39
c1	通常通り	1.00	通常通り	通常通り	59
c2		0.50			95
c3		0.25			238

*蒸留水と3M NaOHの体積の合計が一定 (34 ml) になるようにした。

**脱色時間を4回測定し, 平均値を求めた。

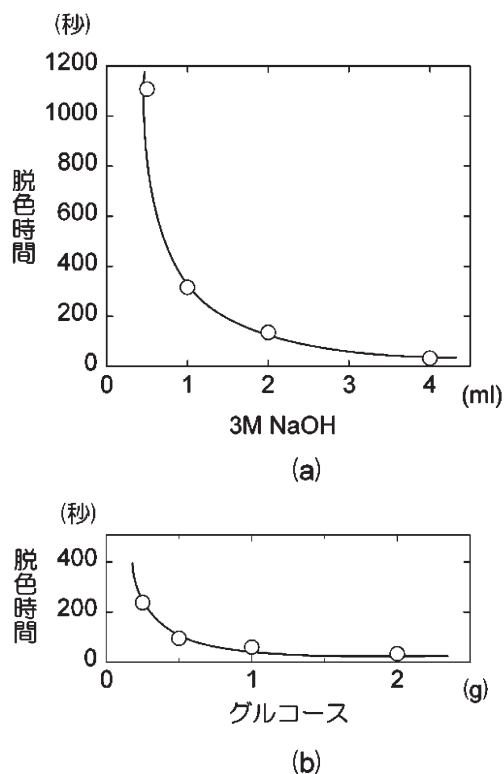


図11. 脱色時間の (a) NaOH濃度と、(b) グルコース濃度に対する依存性 (21°C, 振動回数10回)

表3. 通常の試薬濃度*における脱色時間(平均値)の温度依存性

振動回数	脱色時間の平均値(秒)**			
	11°C	21°C	31°C	41°C
10回	180	34	19	5.8
20回	211	39	22	7.3
30回	243	38	23	7.3

*通常の試薬濃度については表2を参照。

**脱色時間を4回測定し、平均値を求めた。

反応が速くなる。これが、溶液調製後に順次、脱色時間が短くなる原因と思われる。メチレンブルーがアズールBに数割程度変化すると、反応の速い方の寄与で脱色時間が決まるため、それ以降は脱色時間がそれ以上短くならないと解釈できる。図5でメチレンバイオレットが8番目の順位であるが、実際に市販されている試薬を購入して脱色時間を測定してみると、メチレンブルーに比べて明らかに反応が遅いことが確認できた(22°Cにおいて振動回数10回でも20回でも脱色時間は約70秒)。アズールBが脱メチル化すると、アズールAそしてさらにはメチレンバイオレットとなるが、アズールBが数割程度残っている限り脱色時間はあまり変化しないと推定される。結局、青いフラスコの実験はメチレンブルーではなく、本当のところはア

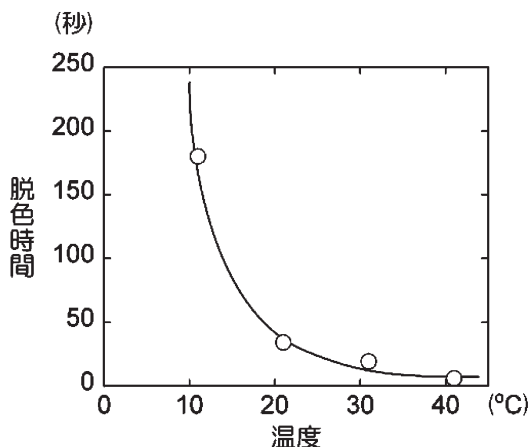


図12. 脱色時間の温度依存性 (振動回数10回)

表4. アルカリ溶液中の分解による色の変化 (25°C)

溶質	調製直後	9時間後	24時間後	3週間後
メチレンブルーとグルコース	無色 (振ると青色になり、放置すると無色に戻る)	淡黄色 (振ると青紫になり、放置すると無色、そして淡黄色に戻る)	にごった黄色 (振り続けているときは青味あり)	濃い褐色
メチレンバイオレットとグルコース	無色 (振ると青紫になり、放置すると無色に戻る)	淡黄色 (振ると青紫になり、放置すると無色、そして淡黄色に戻る)	透明感のある黄色 (振り続けているときは青味が復活)	濃い褐色
メチレンブルー	青	青	青紫	無色
グルコース	無色	無色	淡黄色	淡黄色
グルコン酸ナトリウム	無色	無色	無色	無色

ズールBの脱色実験をしていることになる。

4-3. 溶液の色の変化

青いフラスコの溶液を1晩放置すると黄色になるが、これは酸化された糖の生成物のためであると記述している論文があった。¹²⁾そこで、その真偽を確かめるためにNaOHの各種溶液を作って、色の経時変化を調べた(表4)。まず、メチレンブルーとグルコースを両方含むアルカリ溶液についてであるが、室温約25°Cにおいて24時間後は黄色であるが、そのまま放置しておく次第に色が濃くなり、3週間後には褐色となることがわかった。その一方、メチレンブルーだけのアルカリ溶液は、3週間後には無色となる。また、グルコースあるいはグルコン酸イオンだけでは、褐色にはならないことがわかった。よって、色素の分解生成物とグルコー

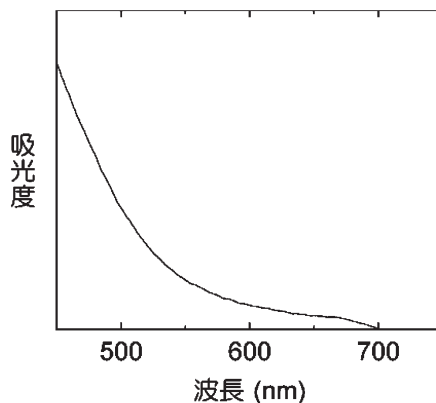


図13. メチレンブルーとグルコース混合液の褐変後における吸収スペクトル

スとが反応して褐変が生じていることが判明した。

グルコースとメチレンブルー（あるいはメチレンバイオレット）の水酸化ナトリウム水溶液を1ヶ月以上放置すると、かなり黒くなるが沈殿は生じない。蒸留水で希釈すると褐色であることがわかる。その可視吸収スペクトルを図13に示す。メイラード反応の生成物の特徴として知られているように、可視部の短波長側（400 nm 付近）に吸収極大をもち、その山すそが可視部全体に広がっている。（メイラード反応については付録を参照）。なお、冬期（室温20°C以下）においては、褐変の進行は非常に遅くなる。

5. 考察

5-1. 色素の分解と褐変

メチレンブルーとグルコースのアルカリ混合液が、室温下においても一晩で黄色くなる原因は、メイラード反応であることがわかった。これは還元糖とアミンとが種々の反応過程を経て重合する反応である（詳細は付録を参照）。重合の主体は還元糖の脱水物であり、それを生じさせる際にアミンが触媒の役割を果たす。つまり、アルカリ溶液中でのメチレンブルーの脱メチル化によるアミノ基の発生が、メイラード反応を誘発している。また、この反応にかかわるのはグルコースなどの還元糖の特徴である。ちなみに、食品が加熱あるいは保存中に褐色を呈する原因として、酵素によるポリフェノールの酸化（例えばリンゴの切り口の褐変）と非酵素的褐変とがある。後者のほとんどはアミノカルボニル反応による高分子褐色色素の生成によるものであり、糖だけでも重合して褐変を起こす（これをカルメル化反応という）¹⁶⁾。これらの褐変は温度が上がるほど、反応が加速される。したがって、青いフラスコの実験において、温度を50°C以上に上げてはならない理由は、メチレンブルーの脱メチル化およびメイラード反応が、短時間のうちに起こるのを避けるためであった。温度が50°C以下であっても、温度が高いほどメチレンブルーの分解とそれに伴う褐変が速く進むのは明らかである。

5-2. 溶液調製直後の変化

無水グルコースの結晶中ではすべてが α 型であり、それを水に溶解させると β 型に徐々に変わっていき平衡に達する(付録を参照)。色素(メチレンブルー)の還元は、グルコシドイオンとの錯合体形成を経由し、それと水酸化物イオンとの反応(4-2式)が律則段階と考えられている。図4からわかるように、還元糖の α 型よりも β 型の方が活性化エネルギーが低いということは、 α 型と β 型による錯合体の立体構造の違いが、水酸化物イオンとの反応のしやすさの違いとして表れているといえる。

しかし、 β -グルコースを水に溶かした直後でも、 α -グルコースを溶かした場合とで脱色時間の経時変化に違いはみられなかった。これは、アルカリ条件下では α と β 間の化学平衡にすぐ達してしまうためと考えられる。グルコースの水溶液中での異性化速度に対するpHの影響を報告した論文によると、反応速度が最小となるのはpHが3付近のときであり、それよりもpHが低くても高くても異性化反応が速くなる。pH=7ではpH=3のときに比べて反応速度が約8倍となり、アルカリ条件下では反応はさらに速くなり、短時間のうちに平衡に達してしまう。¹⁷⁾したがって、青いフラスコの実験の際に、 α -グルコースの結晶を直前にアルカリ水溶液に溶かしても、影響はないことが理解できる。

6. 学生実験への対応

6-1. 実験操作などの改良

メチレンブルーの酸化と還元による色の変化について、これまでその反応機構を実験テキストで解説していなかった。しかし、振動回数と脱色時間との関係を考察する上で、この反応には溶存酸素が深くかかわっていることを説明することにした。これにより、溶液を振り混ぜた後にしばらくは同程度の青色を保つが、急に色の減衰が始まる理由が理解できる。

メチレンブルーの分解と褐変化をおさえるためには、温度をあまり上げるべきではない。そこで、室温での脱色時間を測定した後に、大きいビーカーに氷と水を混ぜて室温よりも約10°低い冷水を作り、その温度についての脱色時間を測定する。その後、ウォーターバスターラーを用いて、室温より10°高い温度についてのデータを集めることにした(室温より20°高い温度での測定はやめる)。

このメチレンブルーに関する実験は、同一条件で全グループが脱色時間を測定してもおもしろみがないため、グルコースと水の量をグループ毎に指定してその結果を集計し、どのような傾向が見られるかを調べることにしている。その際に、各実験テーブルに置いてある3M NaOHの滴びんをそれぞれ使用すると、脱色時間のデータのばらつきが大きくなる。そこで、NaOHの溶液を教卓におき、それを全グループが共通で使用することにした。これにより、グループ間のデータのばらつきを、ある程度抑えることができた。これは、脱色時間がNaOHの濃度や量に強く依存することを反映している。

6-2. 実験指導上の注意

- ①試薬を調製して振り混ぜて放置しても、青色が消えない場合があった。これは3M NaOHを4 ml 加えるべきところ4滴しか入れていなかったり、グルコースを2 gのところ0.2 gと間違ったりしたからであった。また、蒸留水を使うべきところ、手違いによりNH₄Cl水溶液を使っていたため、脱色しないということもあった。これはNH₄Clの緩衝効果によって、NaOHを規定量入れてもアルカリ性が弱められてしまうからである。
- ②初回到測定した脱色時間が異常に長い場合があった。これは、グルコースを水に溶かさずに直接フラスコに入れたため、水に溶けきっていなかったからである。また、溶解直後では、メチレンブルーからアズールBへの変化が急速に起こっているため、脱色時間の測定はすぐに開始せずに、溶液を数回振って脱色の試運転を行ってからにする。
- ③丸底フラスコを振ったあとは、コルク台の上にはのせずに、フラスコの真横から見るようにする。空気と接触している液面は、青色が残ってしまうため、フラスコの上の方から見たのでは、脱色の様子がわからない。
- ④温度変化の実験には冷水あるいはお湯を使うが、フラスコを振るときだけ外に出し、その前後は目的の温度に保つようにしなければならない。

謝辞

ここで報告したメチレンブルーに関する実験の改良は、慶應義塾大学調整費からの助成金を用いて行われた。予備実験に協力してくれた学生諸君に感謝する。

参考文献

- (1) Campbell, J. A. (1963). "Kinetics-early and often," J. Chem. Educ. 40, 578-583.
- (2) 「化学実験とゲーテ、化学をおもしろくする104の方法」(Roesky, H. W., Möckel, K. 著, 戸嶋直樹, 尾方一郎, 大野尚典訳, 丸善, 2002年) p.66-67.
- (3) Mills, A., Lawrie, K. & McFarlane, M. (2009). "Blue bottle light: lecture demonstrations of homogeneous and heterogeneous photo-induced electron transfer reactions," Photochem. Photobiol. Sci. 8, 421-425.
- (4) Amamcikova, L., Pavlikova, K. & Sevcik, P. (1999). "The methylene blue-D-glucose-O₂ system. Oxidation of D-glucose by methylene blue in the presence and the absence of oxygen," Int. J. Chem. Kinet. 31, 463-468.
- (5) Cook, A. G., Tolliver, R. M. & Williams, J. E. (2003). "The blue bottle experiment revisited. How blue? How sweet?" J. Chem. Educ. 71, 160-161.
- (6) Engerer, S. & Cook, A. G. (1999). "The blue bottle reaction as a general chemistry experiment on reaction mechanisms," J. Chem. Educ. 76, 1519-1520.
- (7) Adamcikova, L. & Sevcik, P. (1998). "The blue bottle experiment - simple demonstration

- of self-organization,” *J. Chem. Educ.* 75, 1580.
- (8) Pons, A. J., Sagues, F. & Bees, M. A. (2004). “Chemoconvection patterns in the methylene-blue-glucose system: weakly nonlinear analysis,” *Phys. Rev. E* 70, 066304 (1-9).
- (9) Adamcikova, L., Pavlikova, K. & Sevcik, P. (2000). “The decay of methylene blue in alkaline solution,” *React. Kinet. Catal. Lett.* 69, 91-94.
- (10) Kavitha, S. J., Raj, M. M., Panchanatheswaran, K. & Lynch, D. E. (2004). “3,7-Bis(dimethylamino)phenothiazin-5-ium nitrate dihydrate,” *Acta Cryst.* E60, o1367-o1369.
- (11) Holmes, W. C. & French, B. W. (1926). “The oxidation products of methylene blue,” *Biotech. Histochem.* 1, 17-26 (1926).
- (12) Wellman, W. E. & Noble, M. E. (2003). “Greening the blue bottle,” *J. Chem. Educ.* 80, 537-540.
- (13) Zhang, T.-Y., Oyama, T., Aoshima, A., Hidaka, H., Zhao, J.-C. & Serpone, N. (2001). “Photooxidative N-demethylation of methylene blue in aqueous TiO₂ dispersions under UV irradiation,” *J. Photochem. Photobio. A: Chemistry* 140, 163-172.
- (14) 堀切智, 手嶋紀雄, 猿木友理恵, 西川治光, 酒井忠雄 (2003), 「メチレンブルーの多孔質光触媒による分解と分解生成物の高速液体クロマトグラフィー及び質量分析」*分析化学*, 52, 881-885.
- (15) Mohammad, T. & Morrison, H. (1997). “Simultaneous determination of methylene violet, halogenated methylene violet and their photoproducts in the presence of DNA by high-performance liquid chromatography using an internal surface reversed-phase column,” *J. Chromatogr.* B704, 265-275.
- (16) 「食品の変色の化学」(木村進著, 光琳, 1995年) p.291-321。
- (17) Vogel, J., Westphal, G. & Pipping, C. (1988). “Mutarotation von D-glucose in abhängigkeit vom reaktionsmilieu,” *Die Nahrung*, 32, 709-714.
- (18) Ajandouz, E. H., Desseaux, V., Tazi, S. & Puigserver, A. (2008), “Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation, protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems,” *Food Chem.* 107, 1244-1252.
- (19) Pizzi, G. P. (1997). “Chemical structure of colored Maillard reaction products,” *Food Rev. Int.* 13, 1-28.
- (20) Phongkanpai, V., Benjakul, S. & Tanaka, M. (2006). “Effect of pH on antioxidative activity and other characteristics of caramelization products,” *J. Food Biochem.* 30, 174-186.

参考

(1) グルコースの α 型と β 型の化学平衡

グルコースを水から再結晶すると、 α -D-グルコースの結晶が得られる。そのグルコースを水に溶解させると、 α 型から β 型へ変化し、またその逆反応も起こり、最終的に平衡に達する。(このとき α 型が約36.4%、 β 型が約63.6%である)。比旋光度は溶解直後の $+112.2^\circ$ から 52.7° へ変わる。旋光度が変化するので、これを変旋光と呼ぶ(図14)。

(2) キノイド型構造と色

ベンゼン環による光の吸収は紫外部にあり、可視部にはない。このため通常は無色である。しかし、キノイド型になると色が出てくる。これは、二重結合と単結合が交互に並んだ構造(π 共役系)に、酸素や窒素など非結合電子対をもつ原子が二重結合を介して加わると、発色団となるからである。ロイコメチレンブルーは無色であり、ベンゼン環は発色団とはなっていないが、メチレンブルーでは一方のベンゼン環がキノイド型構造となっているため色を呈する。分子の結合状態の変化で色が変わる類似の例としては、酸塩基指示薬のフェノールフタレインがある。これは酸性側で無色、アルカリ性側で赤であるが、分子中のベンゼン環の1つがキノイド型構造に変わるにより色が生じている(図15)。

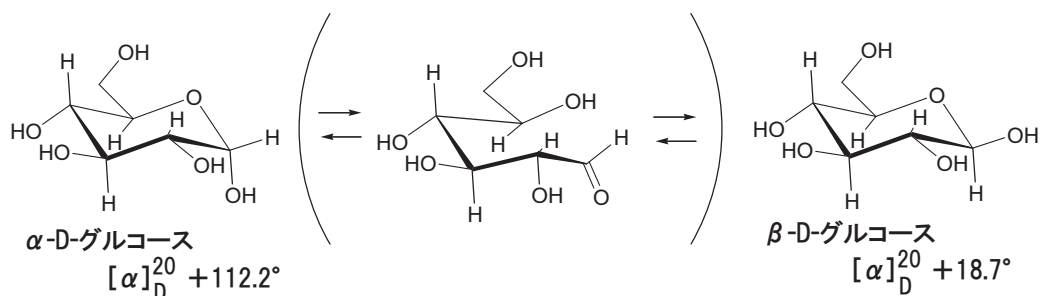


図14. グルコースの α 型と β 型の化学平衡。水溶液中で環が開き、 α 型から β 型へ、あるいはその逆の変化がおこる。

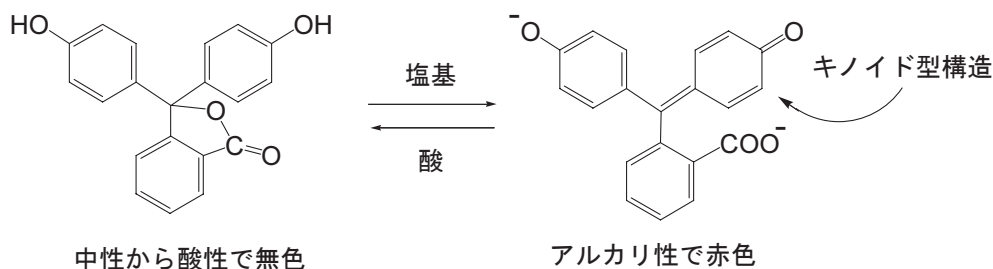


図15. フェノールフタレインの分子構造と色の変化

(3) メイラード反応とカラメル化反応

グルコースなど還元性を示す糖とアミン（あるいはアミノ酸、タンパク質など）の混合液を加熱すると褐色の重合体が生成する反応を、発見者の名前にちなんでメイラード反応とよぶ。これは一種のアミノ-カルボニル反応である。¹⁶⁾ 加熱温度（100℃位まで）が高くなるほど、またアルカリ性が強くなるほど、反応が速くなる。¹⁸⁾ この反応の初期過程を単純化して示すと図16のようになる。¹⁹⁾ 還元糖のアルデヒド基にアミンが結合し、水がはずれてシッフ塩基とな

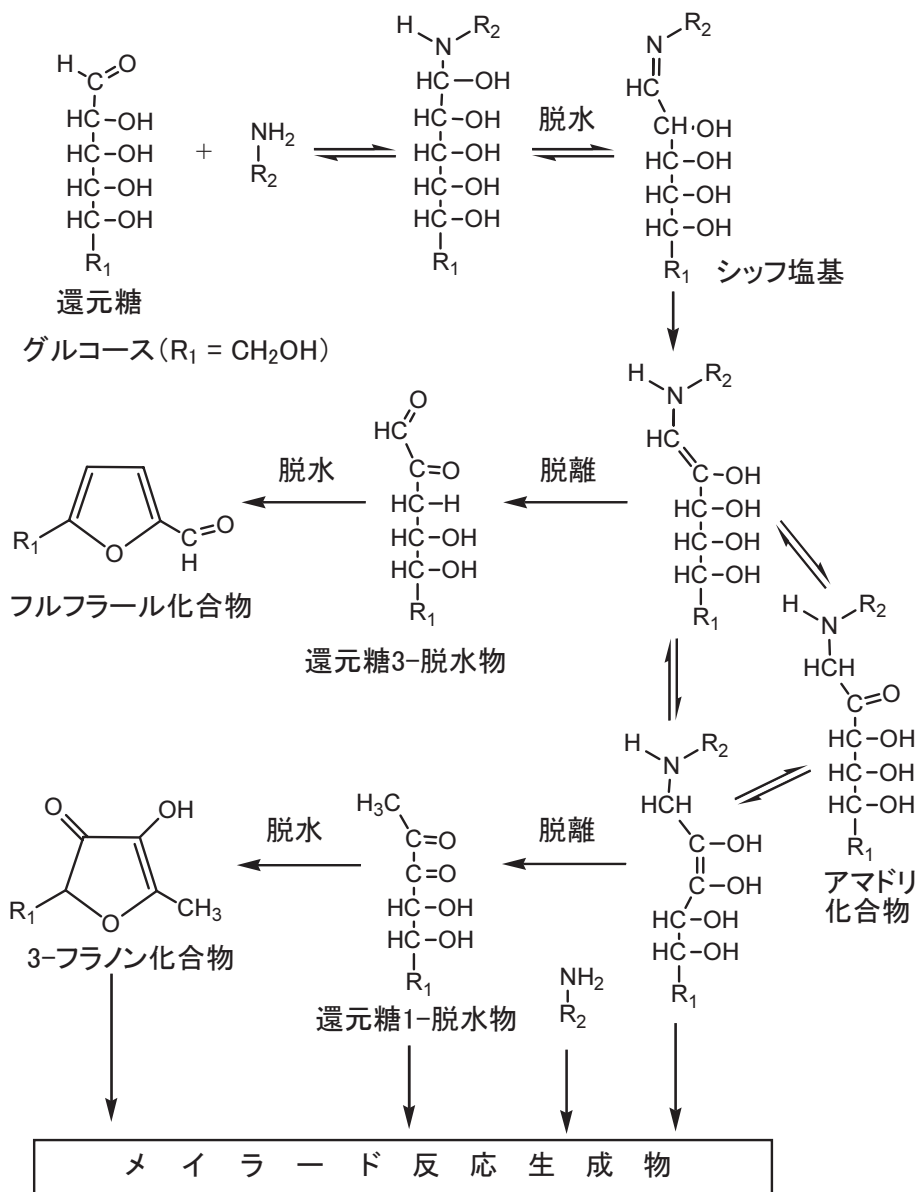
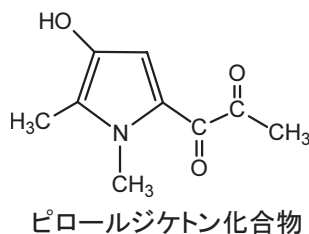


図16. メイラード反応の初期段階¹⁹⁾

図17. グルコースとメチルアミンの反応により得られた黄色物質の1つ¹⁹⁾

り、さらに転位してアマドリ化合物になる。その後、アミンが脱離して還元糖の脱水物が生じる（つまり、アミンは還元糖脱水物生成反応の触媒として働く）。この還元糖脱水物はとても反応性が高く、分子内環化反応や分子間縮合反応などが活発に起こり、元のアミンも加わって重合が進む。メイラード反応生成物の吸収スペクトルは、400 nm 以下に極大があり、可視部全域にわたって長波長側へなだらかなすそを引き、断続的な吸収ピークは一切みられない。このことから、発色団は π 共役系に N や O が加わったものであろうが、重合体の化学構造は不均一であると推定される。メイラード反応の初期過程は、種々のモデル反応系について研究されている。図17に示す化合物は、グルコースとメチルアミンを酢酸水溶液中で加熱して得られた黄色物質のうちの一つである。¹⁹⁾ このような反応中間体がさらに縮合をくりかえすことで、黒色の高分子化合物が形成される。

糖類だけを加熱しても、重合して褐色を呈する。これをカラメル化反応という。加熱が強いほど、また溶液のアルカリ性が強いほど、褐変化が速くなる。²⁰⁾ このようなアミノカルボニル反応などによる非酵素的褐変化は、食品の変質の原因となるやっかいな現象である。しかし、逆にその反応によって生じる色や香り（および抗酸化性）を利用している食品もあり、代表的な例として味噌、しょうゆ、ビール、パンなどがあげられる。¹⁶⁾