

ブルーボトル反応における溶液劣化の研究

川添慧 篠原史也

【概要】

ブルーボトル反応は科学マジックなどでよく知られる実験である。青色の染料であるメチレンブルーに還元糖、塩基を加えることで、ロイコ体を作り無色とし、さらにボトルの振動により酸素を加え青色に復色する酸化還元反応である。この反応は主反応のみしか起こらないなら繰り返し行えるはずだが、副反応により時間経過で劣化して黄褐色に変色してしまう。この劣化を防ぐにはどうすればよいかというのを目的として研究を始めた。私たちは塩基性条件下でメチレンブルーと還元糖を分けて反応を起こし、メチレンブルーの脱メチル化と糖の糖塩基反応のそれぞれについて吸光度を測定した。主反応はロイコ体を作る酸化還元反応という点で、徳島県の伝統産業である「藍染め」と類似の反応である。副反応である糖塩基反応は塩基性水溶液の中で糖が不安定な状態になり、さまざまな形をとる。この反応を利用して高純度のものは高価である希少糖を含むシロップなどが製造されてダイエット食品として流通している。

Blue Bottle Reaction is a color change in a liquid reaction caused by the introduction of oxygen though agitation. But, this reaction has features which deteriorate and change color as time goes by. So, we tried to discover the reason why Blue Bottle Reaction changed color over time. Also, we thought we would make the Blue Bottle which could keep the original color for a long time because a reagent was wasted. This reaction quite similar to “Indigo dyeing” which is traditional industry in Tokushima. Because these reactions make “Leuco compound” in the course of each reaction.

Therefore, we hypothesized that methylene blue and sugar might show a totally different reaction under the basic as to the Blue Bottle Reaction changing color over time.

【研究動機・目的】

科学部として小中学生に実験講座をする際に、ブルーボトル反応は人気のある実験である。原理的には何度も使えそうだと考え、実験講座で使ったものを保管しておいたところ数日後、溶液が黄色に変色しており、ペットボトルが内側にへこんでいる様子を発見した。ペットボトルを振って反応を起こさせようと試みたが反応は起こらなかった。結局作った溶液は捨てることとなり、貴重な試薬が無駄になってしまった。

そこで、私たちは長時間保存しても黄色に変色せず、反応が起こるブルーボトルを作ることはできないかと考えた。

また、その目的に向けて濃度、温度などの条件を変えながら試行実験を行い、反応機構についても調べたところ、ブルーボトル反応は3つの物質「メチレンブルー」、「還元糖（グルコース等）」、「塩基（水酸化ナトリウム等）」が必要であるが、劣化に関してはメチレンブルーと塩基、還元糖

と塩基それぞれが別の反応をしている可能性がでてきた。そこでそれぞれの組み合わせに分けて予備実験を行うと前者は赤みを帯び、後者は黄色に変色するという全く異なった反応を示すことがわかった。メインの反応であるブルーボトル反応は徳島の伝統産業である藍染の建て染めと反応の過程で同類の「ロイコ体」を作るという点で類似しているということと、劣化に関する2つの反応をうまく組み合わせると様々な色ができることから藍染においても藍色以外の色で染色することができないかと考えた。また、メチレンブルーと塩基では脱メチル化からメチルバイオレットの合成、還元糖と塩基では、糖塩基反応として様々な転移が起きて希少糖シロップ製造にも役立っていることなどから、反応そのものが興味深く実用性に富むものと知り、条件を変えながら詳細な実験を行うことにした。

【仮説】

私たちはブルーボトルの変色劣化は、何らかの酸化反応が影響を与えているのではないかと考えた。また、それがいつも同じ色になるとは限らないことから次のように仮説を立てた。ブルーボトル反応における3成分のうち水酸化ナトリウムは液性を塩基性にするのに働き変化しない。メチレンブルーと糖が、それぞれ独立して変化していると考えた。そこで、塩基とメチレンブルーの反応と、塩基と糖の反応を別個に行い反応後のそれらを混合すれば、最初からすべてを混合した溶液の状態を再現できると考えた。色の違いは、それぞれの反応の進行具合と混合比により生まれると考えた。よって、それぞれの反応について条件を変えて時間変化を追うことにした。

【実験機器】

紫外可視分光光度計、恒温水槽
手持屈折糖度計、サイエンスメイト



図1 加工した攪拌機 図2 光学セル

赤…市販の攪拌機

左：マイクロセル

青…加工した攪拌機

右：通常のセル

【実験器具】

ビーカー50mL、サンプル管(10mL 5mL)
分光セル(ディスポセル)

【実験方法】

<実験①>メチレンブルーと塩基

$3.21 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ のメチレンブルー水溶液 40mL を 50mL のビーカーに入れ、恒温水槽(60°Cに設定したもの)に浸した。ビーカー内の溶液の温度が恒温水槽の水と同じになるのを待って 4mol/L の水酸化ナトリウム水溶液を 10ml 滴下した。そのときの時間を 0 秒として 30 秒おきに一部をセルにとって 5 分間紫外可視分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定した。(10 測定点) その後、経時変化が顕著な波長 662nm における吸光度の変化を調べた。

(グラフ 1, グラフ 2)

<実験②>糖と塩基(糖塩基反応) 100mL

のメスフラスコを用いて 3% の D-グルコース水溶液を作り、100ml のビーカーに全て移して恒温水槽(60°Cに設定したもの)に浸した。ビーカー内の溶液の温度が恒温水槽の水と同じになるのを待って 4mol/L の水酸化ナトリウム水溶液を滴下し、そのと

きの時間を 0 秒として 30 秒おきに 5 分間紫外可視分光光度計を用いて固定波長 371nm*¹で測定した。(グラフ 3)

* 1 固定波長 371nm にした理由

吸光スペクトルのピーク付近で、吸光度が適切範囲に収まり LED の波長とも近い。

<実験③>糖塩基反応 (希少糖使用)

提供を受けた希少糖サンプル*²は各 5g であったため、条件を変えながらの測定には 1 回の使用量を減の必要に迫られた。そこでまず、スケールダウンで結果に影響が出ないかグルコースで予備実験を行った。

(a) 容器を 10mL サンプル管に変更,

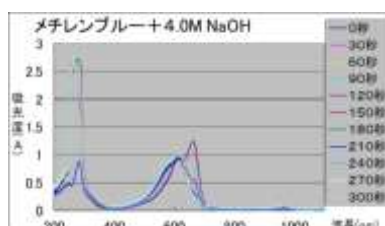
(b) セルをマイクロセルに変更, (c) 溶液はピペッターの使用、などを行った。

(実験器具参照) さらに、サンプル管内の濃度を均一化するために市販の攪拌機を改良し溶液内の保温状況をサイエンスメイトで一確認しながら実験を行った。(実験機器参照) 実験に使用する糖は希少糖 (アルロース、アロース)、果糖 (フルクトース)、ガラクトース、マンノース、ソルボース、に決めてメスフラスコ 10ml、各種糖 3%の水溶液を作った。また、この実験では上記に加え手持屈折糖度計を用いて反応前後の糖度を測定した。(グラフ 4,5,)

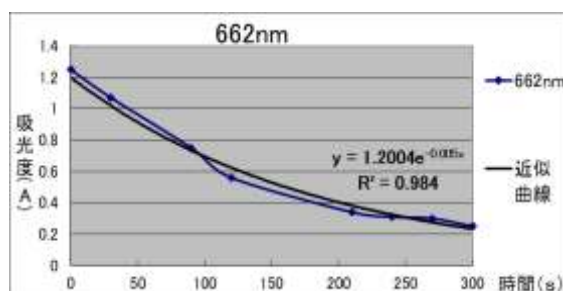
* 2 希少糖の提供：株式会社希少糖産業技術研究所様より

【結果と考察】

<実験①>



グラフ 1 実験①の吸光スペクトル (全波長)

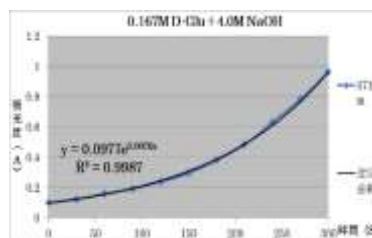


グラフ 2 実験①の吸光スペクトル(662nmのみ)

グラフ 1 を見てみると波長 650nm～700nm 間に各秒における吸光度のピークが示されている。その付近の波長を詳細に調べたところ、そのときの波長が 662nm であり時間が経過するにつれて吸光度が低下していることが分かった。(グラフ 2 参照) 波長 662nm は赤色であることから、本来青色であるメチレンブルー水溶液が時間の経過に伴って赤みを帯び、紫色に変化したという結果が得られた。

この光吸収を変えるような構造変化として共役結合の長さを変えるようなことが起こるのではないかと考え先行研究を探したところメチレンブルーは塩基性下で脱メチル化され、メチルバイオレットという紫色の物質に変わることを見つけた。これが正しいとすると構造が違うので藍染のインジゴを同様の方法で赤くするのは難しいと判断した。

<実験②>

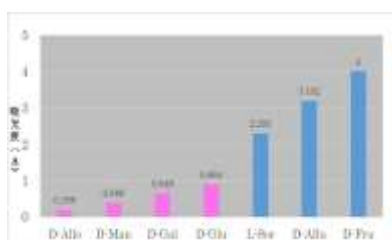


グラフ 3 実験②の吸光スペクトル (371nmのみ)

グラフ 3 は固定波長 371nm で測定したものであり、時間の経過に伴って吸光度が増加している。

また、このグラフの0秒に関して実験の操作上正確な値を測定するのは不可能と判断したので近似曲線から値を定めることにより、 R^2 値 0.9987 (1に近いほど良い) という結果が得られたことから温度・濃度などの条件を変えて反応速度を求めることができるのではないかと考えた。

<実験③>



グラフ 4 実験③の吸光グラフ(371nmのみ)

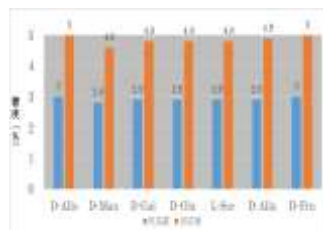


図 3 Izumoring

グラフ 4 より D-allose、D-mannose、D-galactose、D-glucose

これらは反応による吸光度が小さい。一方で L-sorbose、D-allulose、D-fructose、これらは反応による吸光度が大きい。この7種類の糖を Izumoring (希少糖を分子構造で分類し、ある糖から別の糖にするための酵素反応の経路を図式化したもの) に照らし合わせたところ、前者はアルドース、後者はケトースに分類されるということが分かった。また、Izumoring を時計に見立てたとき上側を 12 時とすると実験に使用した糖は D-galactose を除いて 12 時に近い糖ほど反応による吸光度が大きくなっていると判断した。

(図 3 参照) このことから、ブルーボトル反応を長持ちさせるには D-allose を使い、実験講座を開く際に早く反応を起こさせたいときには D-fructose を用いれば効果があるという結論に至った。



グラフ 5 実験③の反応前後での糖度

またグラフ 5 において、どの糖も反応の前後で糖度がおおよそ 2 ずつ増えていることに気付いた。この原因として実験で用いた糖度計は光の屈折で糖度を測っているので反応後の溶液内に光の屈折を変える構造変化が含まれているのではないかと考えた。

【参考文献】

John A. Kiernan(DAKO).

“Chapter 19 | On Chemical Reactions and Staining Mechanisms.”

Education Guide Special Stains and

H & E Second Edition, 日付不明: P167.

阿武喜美子・瀬野信子. 糖化学の基礎.

講談社, 1984.

何森健. 希少糖秘話. 希少糖文庫, 2013.

平山令名. 実践量子化学入門.

講談社, 2002.

【謝辞】

本研究について株式会社希少糖産業技術研究所様には希少糖のサンプルを提供していただき、香川大学農学部特任教授何森健先生には、Izumoring 画像提供・希少糖命名等に関する情報提供・助言をいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。