UDC 615.778.47-07

45. 赤塚政美：キノン類の研究(第1報) イソニコチン酸ヒドラジドおよび
2,3-ジクロロ- α -ナフトキノンの比色定量について

Masami Akatsuka : Studies on Quinones. I. Colorimetric Determinations
of Isonicotinic Acid Hydrazide and 2,3-Dichloro- α -naphthoquinone.

(Pharmaceutical Faculty, Kumamoto University*1)

Coloration reaction of acid hydrazides and amine compounds with α - and β -naphthoquinones and their derivatives in alkaline state was examined and it was found that a blue coloration occurred between acid hydrazides and α -naphthoquinone derivatives and a red coloration between acid hydrazides and β -naphthoquinone derivatives. Based on this coloration, colorimetric determination of INAH with 2,3-dichloro- α -naphthoquinone was devised, to be carried out in the following manner.

One cc. each of 0.03% ethanolic solution of 2,3-dichloro- α -naphthoquinone and 0.1% potassium carbonate solution are added to 3 cc. of aqueous solution of INAH, containing 1~10 γ /cc., the mixture is allowed to stand for 10 minutes, and its optical density is measured at 620 $m\mu$. The content of INAH is calculated from the calibration curve.

Determination of INAH by this method, in the presence of Thioacetazone, pyrazinamide, PAS, and sulfanilamide showed that these substances did not affect its optical density and it is believed that 2,3-dichloro- α -naphthoquinone is a reagent which might replace sodium β -naphthoquinone-4-sulfonate.

The foregoing process was reversed to carry out the colorimetric determination of 2,3-dichloro- α -naphthoquinone (Dichlone) with INAH, which is carried out in the following manner.

To 4 cc. of methanolic solution of 2,3-dichloro- α -naphthoquinone, containing up to 25 γ /cc., 0.5 cc. each of 0.3% aqueous solution of INAH and 0.1% potassium carbonate solution are added, the mixture is allowed to stand for 10 minutes, and its optical density is measured at 620 $m\mu$. The content is calculated from the calibration curve. This colorimetric determination was found to be possible in the presence of chloranil, used as an agricultural chemical in the same way as Dichlone. Although ethyl cyanoacetate, the coloration reagent for Dichlone and chloranil, can be used to determine either one alone, it cannot determine each in a mixture of Dichlone and chloranil.

(Received August 24, 1962)

イソニコチン酸ヒドラジドの定量

isonicotinic acid hydrazide (INAH) の比色定量は *p*-dimethylaminobenzaldehyde,¹⁾ cyanogenbromide,²⁾ sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate,³⁾ N-pyridylpyridinium chloride hydrochloride,⁴⁾ 2,4-dinitrochlorobenzene および 2,4-dinitrofluorobenzene,⁵⁾ sodium ferrocyanate,⁶⁾ picryl chloride,⁷⁾ 2-bromo-1'-acetonaphthone,⁸⁾ *o*-aminobenzenethiol⁹⁾ などの種々の方法があり特に sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate は薬品分析、臨床化学分析の両面に大きな貢献をしているが、しかし共存するアミン性化合物特にチオアセタゾン、PAS は実用面においてその障害となることが報じられている。

*1 Ōe-machi, Kuhonji, Kumamoto.

1) P.G. Scott : J. Pharm. and Pharmacol., **4**, 681 (1952).

2) H. Wozahn : Arzneimittel Forsch., **3**, 191 (1953); S.H. Rubin : Disease of Chest., **21**, 439 (1952).

3) E.L. Pratt : Anal. Chem., **25**, 814 (1952); 青木 : 最新医学 **7**, 643 (1952); 掛見, 宇野 : 診断と治療, **40**, 55 (1952).

4) B. Prescott : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **84**, 704 (1953) (C.A., **48**, 4620 (1954)); J. Lab. Clin. Med., **44**, 600 (1954) (C.A., **49**, 1131 (1955)).

5) M. Schoog : Münch. Med. Wochschr., **94**, 2135 (1952) (C.A., **47**, 2645 (1953)).

6) E.F.G. Herington : Analyst, **78**, 174 (1953) (C.A., **47**, 5308 (1953)).

7) W.F.J. Cuthbertson : J. Pharm. and Pharmacol., **6**, 752 (1954).

8) 広瀬, 宇野 : 本誌, **81**, 1623 (1961).

9) E. Sawicki, T.W. Stanley, S. McPherson : Chemist-Analyst, **50**, 103 (1961).

Table I. Color Reactions of Acylhydrazides or Amines with Quinone-Derivatives in Caustic Alkali

Blank	l-V	—	l-YBr	Y	l-Y	—	—	Y	l-Y
Acetic acid hydrazide	V	B	BV	B	YBr	—	l-YR	YBr	YR
Benzoic acid hydrazide	B→V	G	BV	B→V	B	YR	YR	YBr	Br
Isonicotinic acid hydrazide	B	G	V	B	R	YR	YR	YBr	Y
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid hydrazide	V→Br	YG	d-BG	d-BrB	YR	d-RV	RV	YG	l-YBr
<i>p</i> -Nitrobenzoic acid hydrazide	G	i-Y	YG→R	BG	R	R	R	Br	Y
<i>p</i> -Toluenesulfonic acid hydrazide	V→YBr	YBr	l-YBr	R	d-YBr	l-Y	Y	Y	YBr
4'-Formylacetanilide thiosemicarbazone	VBr	RBr	RV	V	YBr	l-YBr	RV	l-Br	l-Y
Pyrazinamide	l-V	—	Y	YR	YBr	l-Y	—	Y	l-Y
Sodium <i>p</i> -aminosalicylate	V→YBr	l-Y	Y	RBr	Y	l-Y	YR	YBr	l-Y
Sulfanilamide	V→Br	YG	YBr	YR	YBr	Y	Y	YBr	l-Y
α -Amino- <i>p</i> -toluenesulfonamide	V→Br	YR	Y	R	RV	l-Y	—	RBr	l-Y
Phenyl hydrazine	B→d-Br	R	l-Br	G	YO	l-YBr	l-RV	l-Y	l-Y
Semicarbazide·HCl	V	—	Br	RBr	R	l-Y	YR	Y	l-Y
Cyclohexylamine	V→RBr	l-G	l-YBr	RO	Y	l-Y	l-Y	Y	l-Y
Aniline	V	l-YG	l-BrV	YR	d-Br	Y	YR	YBr	l-Y
Nicotinamide	V	—	YG	R	d-Y	l-Y	—	YBr	l-Y
Rhodanine	G	l-G	G	G	i-V	l-Y	B	G	YG

d : dark, i : intense, l : light, — : colorless

B : blue, Br : brown, G : green, O : orange, R : red, V : violet, Y : yellow

Fig. 1.

Table II. Optical Absorption of Acid Hydrazides and Amines Colored by 2,3-Dichloro- α -naphthoquinone and K_2CO_3

Compd.	$\lambda_{max} m\mu$	Absorbancy/concn. at	
		λ_{max}	610 $m\mu$
Acetic acid hydrazide	480	4500	450
Benzoic acid hydrazide	490	4300	2700
Isonicotinic acid hydrazide	610	5500	—
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid hydrazide	475	5500	800
<i>p</i> -Nitrobenzoic acid hydrazide	610	5650	—
<i>p</i> -Toluenesulfonic acid hydrazide	480	4060	950
4'-Formylacetanilide thiosemicarbazone	520	3090	400
Pyrazinamide	475	4960	200
Sodium <i>p</i> -aminosalicylate	480	5140	650
Sulfanilamide	480	3400	100
Pyridine	470	4100	1000
Phenylhydrazine	480	3740	180
Semicarbazide·HCl	480	4650	500
Hydroxylamine·HCl	480	3730	800
Aniline	480	4100	800
Nicotinamide	475	4800	400
Hydrazine·H ₂ SO ₄	470	3650	1100
Urea	480	4650	600
Blank	480	4010	300

ここにこの障害のない比色試薬を得る目的で本試験を行なった。まず α - および β -naphthoquinone およびその chloro 化合物と酸ヒドラジドを初めアミン性化合物と水酸化ナトリウムアルカリ性における呈色状況を見ると (Table I), おおむね酸ヒドラジドは α -naphthoquinone およびその誘導体には青色, また β -naphthoquinone およびその誘導体には赤色の系統の呈色を示すが, アミン性化合物についてはこのような呈色は全く認められない。2,3-dichloro- α -naphthoquinone および 3,4-dichloro- β -naphthoquinone と acylhydrazide との炭酸カリウムアルカリ性における吸収スペクトルを示すと Fig. 1 のようで, さらに 2,3-dichloro- α -naphthoquinone と acylhydrazide および amine 性化合物とその極大吸収および 610 $m\mu$ における吸光度と濃度の逆数の積をもって比較すると Table II のようである。isonicotinic acid hydrazide の吸収帯は他の化合物よりはるかに長波長に吸収極大を有しかつ強い事実は一特異の現象というべきである。

ここでまず 2,3-dichloro- α -naphthoquinone (DCN と略) を試薬として選び isonicotinic acid hydrazide (INAH と略) の水溶液に DCN のエタノール溶液を加え、炭酸カリウム水溶液でアルカリ性とする時 610 m μ に極大吸収を有するも試薬のみより生ずる色調 (盲検値) は 480 m μ に大きな吸収を有する黄色液で、長波長に進むにつれ弱くなり 600 m μ 付近においては僅少の吸収を有するのみである。

以下実験の部に述べる方法に従つて波長 620 m μ において検体溶液の濃度と反応溶液の吸光度の関係を求めたところその間に比例が成立し、その関係を原点を通る直線として表わすことができ、この反応では Lambert-Beer の法則に適合することが明らかになつた。したがって本法はあらかじめ定量しようとする検体の標準品について 1 ml. 中 10 γ に対する吸光度を座標上にとり座標原点と結んだ直線を検量線として標準の濃度と吸光度との関係を求めておけば検体の吸光度からその検体の濃度 (C) を容易に算出することができる。

さらに近縁薬品の共存下における INAH の比色定量を行ないチオアセタゾンの場合極めて僅少の吸光度の増大を示したのみで PAS, ピラジニアミド, スルファミンについて吸光度に変化なく臨床化学分析においてもその障害となるような事実がなく, sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate にかわるべき INAH の比色定量の試薬であると考えらる。

2,3-ジクロロ- α -ナフトキノ (Dichlone) の定量

dichlone (DCN), chloranil (CA) は塩化キノ系殺菌剤として汎用され農薬用特に種子殺菌剤として広く用いられているがこれらの検出法はキノ系一般の反応としてシアン酢酸エチルエステルおよびアンモニア¹⁰⁾ により前者は青紫色に、後者は紫色を呈することにより特徴づけられている。さらにこれらキノ剤の定量¹¹⁾ はアセトン溶液にアミンを作用させて得られる DCN の赤色, CA の黄色を比色の対称としているが、その呈色の傾向が類似しその混合の場合には相互の量を定量することは不能であることが予想される。また相互混合夾雑する場合については全く考慮されていない現況である。

まずキノ系化合物とアミン性化合物との呈色を見ると一般に α -naphthoquinone およびその誘導体は β -naphthoquinone, benzoquinone およびその誘導体に比し鮮明かつ深色であることが認められ、さらに酸ヒドラジドと α -naphthoquinone およびその誘導体との呈色は特異なることが示された。DCN および CA の INAH について異なる呈色をなし、かつ色調の傾向を異にするために DCN の比色定量の可能なることおよび DCN 中 CA の混ざるもその比色定量に障害とならないことが予想される。ここに INAH による DCN の比色定量について述べるとともに既存の Craven 反応に基づくキノの一般定量試薬シアン酢酸エチルエステル (CNE と略) について同様に相互の比色定量の知見を述べる。

まず試薬として INAH および CNE を用い以下述べる反応条件に従つて発色させ、その吸光度を測定して吸収曲線 Fig. 2 を得た。

DCN および CA の INAH による極大吸収はそれぞれ 620, 460 m μ , CNE による極大吸収はそれぞれ 595 および 680 m μ にあり各試薬のみによる盲検の色調は全く認められない。

Fig. 2.
Absorption Spectra of Chloranil and
Dichlone Colored by Reagents

----- chloranil by INAH
- · - · - chloranil by CNE
····· Dichlone by INAH
———— Dichlone by CNE

さらに実験の部に示すように DCN および CA について検体溶液の濃度と反応溶液の吸光度の関係を求めたところ、それぞれその間に各吸収極大において比例が成立しその関係を原点を通る直線として表わすことができ、

10) R. Craven : J. Chem. Soc., 1931, 1605.

11) H. P. Burchfield, G. L. McNew : Phytopathology, 38, 299 (C. A., 42, 5154 (1948)), 665 (1948) (C. A., 42, 9037 (1948)).

いずれもその反応条件では Lambert-Beer の法則に適合することを明らかにした。しかし CA の INAH による定量では色調の生成が濃度に比例して表わすことができず、Lambert-Beer の法則に従わないためこの方法にては比色定量不能である。

さらに DCN, CA の共存する場合 INAH により DCN の濃度小の時吸光度の少々の増加を示すが濃度大の場合は全くその影響なく実用的に CA の混入する DCN の定量はほとんど障害とならない。しかし CNE による場合 DCN による発色と同時に CA の発色が見られすなわち 595 m μ においては CA の発色が相当大きい吸光度の加算された結果となって表われ CA の増量とともにその差大きく、また反面 CA の 680 m μ においても DCN による発色が大きく、前同様に CA 中 DCN の増量に伴ない吸光度が大となりその影響が大きく、相互に混在する場合全く定量不能である。

実験の部

イソニコチン酸ヒドラジドの定量 1. 試薬 a) 溶媒 EtOH (99%). b) 2,3-dichloro- α -naphthoquinone, EtOH より数回再結晶, 淡黄色柱状晶 m.p. 194.5°. c) K₂CO₃.

2. 反応条件の検討 a) DCN 試薬自身がアルカリにより発色する色調は黄色の部 (480 m μ に極大吸収) に吸収が認められる他には全く吸収を認めず。

b) DCN 試薬の量一定のときは加えるアルカリ量が増加するに伴い検体反応溶液の発色の増大が認められ僅微ながら濃度に比例して生成色素の安定性がくずれる。アルカリ濃度大となるにしたがい分解も急速である。

c) アルカリ量一定にして加える DCN 試薬の量が増大するにしたがい反応溶液の発色は増大するが幾分呈色生成物の不安定が認められる。

以上試薬とアルカリによる発色にはできる限り小さい値をとり、同時に検体と試薬とによる発色が比較的短時間内に最大値を示し、かつその呈色の持続時間が長いことが望ましいという比色定量の要求に対してよく適合する。

以上の知見に基づき検体溶液の濃度を 3~30 γ の間に選定しその発色条件として検体水溶液 3 ml. に DCN・EtOH 溶液, K₂CO₃ 溶液各 1 ml. を加えて反応させるのが適当と考える。

3. 測定波長の決定 時間経過中反応液は次第に黄色を帯びることはその吸収曲線の変化より明らかである (Fig. 3). 初めの吸収極大は 610 m μ で、時間とともに極大が短波長に移動するが、INAH と DCN のアルカリ性における青色の呈色はほとんど変化なく、検量線測定などには時間的に吸収の変化が少なく、かつ盲検の吸収がなるべく小になるように波長 620 m μ を選んだ。

Fig. 3.
Variation of Absorption Spectrum of
INAH colored by Reagent

I immediate
II after 5 min.
III after 10 min.
IV after 17 min.
V after 25 min.
VI after 35 min.

4. 反応時間および DCN 試薬, アルカリ濃度の決定 検体 1 ml. 中 10 γ 含有水溶液 3 ml., DCN 試薬 EtOH 溶液, K₂CO₃ 水溶液を各 1 ml. ずつ加えて合計 5 ml. の反応液を充分混和し室温で発色の程度と時間の関係を見た (Table III).

Table III. Correlation between Concentration, Time and Absorbance
INAH 30 γ in 3 ml., $\lambda=620$ m μ

	K ₂ CO ₃ %											
	0.05			0.1			0.15			0.2		
DCN%	0.02	0.03	0.04	0.02	0.03	0.04	0.02	0.03	0.04	0.02	0.03	0.04
3 min.	0.293	0.458	0.615	0.320	0.370	0.472	0.315	0.352	0.507	0.322	0.362	0.460
5 min.	0.316	0.445	0.610	0.340	0.374	0.422	0.340	0.372	0.468	0.345	0.380	0.398
7.5 min.	0.339	0.429	0.585	0.355	0.384	0.392	0.357	0.385	0.410	0.356	0.389	0.387
10 min.	0.347	0.412	0.560	0.359	0.385	0.392	0.363	0.387	0.402	0.360	0.390	0.390

12.5 min.	0.354	0.395	0.521	0.359	0.386	0.390	0.368	0.392	0.402	0.360	0.390	0.390
15 min.	0.360	0.390	0.501	0.360	0.388	0.390	0.370	0.392	0.402	0.362	0.392	0.390
17.5 min.	0.361	0.380	0.468	0.362	0.388	0.390	0.370	0.393	0.402	0.362	0.392	0.390
20 min.	0.363	0.382	0.452	0.363	0.388	0.390	0.370	0.393	0.401	0.362	0.392	0.390
22.5 min.	0.365	0.383	0.435	0.363	0.388	0.390	0.370	0.393	0.401	0.362	0.392	0.390
25 min.	0.368	0.383	0.420	0.363	0.388	0.390	0.370	0.393	0.401	0.362	0.392	0.390
27.5 min.	0.375	0.387	0.402	0.363	0.388	0.390	0.370	0.393	0.401	0.362	0.392	0.390
30 min.	0.374	0.387	0.396	0.363	0.388	0.390	0.370	0.393	0.401	0.362	0.392	0.390

以上の知見より DCN 試薬 0.03% EtOH 溶液, K_2CO_3 0.1% 水溶液において放置時間 10 min. を最適と認める。

Fig. 4. Calibration Curve

15 γ にさらにチオアセタゾン, PAS, ピラチンアミドおよびスルファミンをおのおの含有する場合の 620 mμ における吸光度を示す (Fig. 5).

Fig. 5.
Effect of Admixture

I 30 γ of INAH at 620 mμ.
II 15 γ

- 2,3-ジクロロ α-ナフトキノン (Dichlone) の定量** 試薬 a) 溶剤: 特級 MeOH あるいは精留 EtOH. b) イソニコチン酸ヒドラジド, 市販品を EtOH より再結晶. シアン酢酸エチルエステル, 精留. c) K_2CO_3 . 反応条件の検討, 呈色試薬の量, 濃度および反応時間などの最適条件をもとめてつぎのように操作. 検体の EtOH 溶液 4 ml. (100 γ まで溶存) を正確にとりこれに INAH 水溶液あるいは CNE·EtOH 溶液および K_2CO_3 水溶液を正確におのおの 0.5 ml. ずつ加えてよく混和し, 一定時間室温に放置した後各極大吸収において島津 QB 50 光電分光光度計を用いて吸光度を測定.

	$\lambda_{\max}$ m μ	Reaction time (min.)	INAH 0.5 ml. (%)	K ₂ CO ₃ 0.5 ml. (%)
DCN	620	10	0.3	0.1
CA	460	—	—	—
	$\lambda_{\max}$ m μ	Reaction time (min.)	CNE 0.5 ml. (%)	K ₂ CO ₃ 0.5 ml. (%)
DCN	595	0~10	0.3	0.1
CA	680	0	0.3	0.05

検体濃度と検体反応溶液の吸光度との関係
度との関係を求めた (Fig. 6).

以上の操作にしたがい各極大吸収波長における 検体濃度と吸光

Fig. 6.
Calibration Curve

I dichlone by INAH at 620 m μ
II dichlone by CNE at 595 m μ
III chloranil by CNE at 680 m μ

つぎに DCN 中 CA をあるいは CA 中 DCN を混入する場合の定量についてその相互の濃度と吸光度との関係を求めた (Fig. 7).

Fig. 7. Effect of Admixture

本研究に当たり終始御激励を頂いた第一薬科大学 藤田 穆学長に深謝致します。また御協力された 岡本カズ子、斎藤範子両嬢に感謝致します。

熊本大学薬学部