

# ベンチジン呈色反應に関する研究

(第 2 報)

児 玉 栄 一 郎

## I. 緒 言

前報で私はベンチジン、 $\text{H}_2\text{N}-\langle \text{—} \rangle-\langle \text{—} \rangle-\text{NH}_2$  がエタノール溶媒内で酸化せられて所謂 Benzidine blue なる色彩を生ずるための種々な因子について述べた。

ベンチジンがエタノールを溶媒とする場合でもまた醋酸に溶解した場合でも、青呈色にどうしてもベンチジンの褐色が付きまとうので色彩上の不鮮明さに不便を感じていた。

ところがこの Benzidine acetate 液に  $\text{NaBr}$ 、その他の塩類を加えると白色の沈澱が生じて来ることを知つた。今ここで  $\text{NaBr}$  の場合を対象として実験の経過を述べると、この  $\text{NaBr}$  によつて生じた沈澱はエタノールに不溶、水にも難溶であるが、この水溶液は血色素をもつて呈色反応を試みるとき美しい青色、または藍色が現われ、然かも Benzidine acetate につき纏う褐色がなく、色彩が格段に鮮明であることを知つた。すなわちこのものは水溶性であること、色調に不愉快な褐色の混入することが無いこと、エタノールを使用する必要のないことなどを考慮するとき、臨床検査により都合がよいと考えたので、ここに報告する次第である。

なお Benzidine acetate (針状) 以外に Benzidine hydrochloride も Benzidine nitrate も板状の結晶をつくるが、Benzidine nitrate 以外は水に易溶すぎて、取扱が困難である。

## II. 實 験 成 績

### [A] ベンチジン複塩の合成

Benzidine acetate 水溶液 (醋酸のみならず、 $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ , 砒酸などの酸抱合 Benzidine から出発しても同様であるが) に  $\text{NaBr}$  の粉末を投ずるとき白色の沈澱を生じて来ることは上述のとおりであるが、このことは強ち  $\text{NaBr}$  に限られたものでないことがその後の実験で知り得た。しかしかかる複塩の合成は附加する塩の種類によつて異りある場合には収量が少く、ある場合には全く複塩を合成することが無い。これらの事情について次に述べたいと思う。

#### a. ベンチジン複塩合成に與る塩類

ベンチジンのエタノール溶液、または醋酸溶液に加えられて複塩を作り、比較的明瞭な白色の沈澱を來す塩類を挙げると次のとおりである。

$\text{NaBr}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na-molybdate}$ ,  $\text{Na-tungstate}$ ,  
 $\text{KCl}$ ,  $\text{KBr}$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KClO}_4$ ,  
 $\text{KCNS}$ ,  $\text{K-oxalate}$ ,  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{K-Ferrocyanide}$ ,  
 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Ammonium oxalate}$ ,  $\text{Ammonium citrate}$ ,  
 $\text{BaCl}_2$ ,  
 $\text{CaCl}_2$ ,  
 $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  
 $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Zn-acetate}$ ,

Ferro chloride, K-Ferrocyanide, Ferri-phosphate,

CuSO<sub>4</sub>,

CO(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>,

AgNO<sub>3</sub>, Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

CdCl<sub>2</sub>,

SnCl<sub>4</sub>,

次に沈澱を作らないか、または反応が行き過ぎて着色（青または藍）し、沈澱物が青呈色反応に不適合なものを挙げると次のとおりである。

Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

K-chromate, K-bichromate,

Ferri chloride, K-Ferri cyanide

CuCl<sub>2</sub>,

AgNO<sub>2</sub>,

HgI,

U-acetate,

以上の実験では勿論酸化剤であるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の附加はないのであるから、最初の group の K I, K C N S, K-Ferrocyanide, 塩化鉄などを投入しても沈澱こそ造つても青色の発色がないことは当然と言える。然るに K-Chromate, K-bichromate などのCr化合物は酸化剤の無いに拘らず速かに反応して青藍色を呈す。

また鉄塩のうちでも Ferro chloride, K-Ferrocyanideのような2価の鉄は白色の沈澱をつくるが、Ferri-chloride, K-Ferri cyanide のような 3 価の鉄塩は沈澱と同時に紺色を発色して来る。但しFerri-Phosphate は3価の鉄でありながら白色の沈澱をつくり、酸化剤の附加によつて初めて呈色する。

なおまたAgNO<sub>3</sub>, Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>などの銀塩は最初立派に白色の沈澱を生ずるのであるが、徐々に自酸化が起り、比較的短時間に緑色から青色を経て藍色、または紫色に移行してしまうのである。

## b. 酸の必要性

ベンチジンが塩類を抱合して複塩をつくる場合醋酸のような酸を必要とするか否かについて実験した。この場合のベンチジンは2%エタノール溶液とし、酸としては $\frac{N}{10}$ HCl, 塩類としてはNaBrとし、試験管内に起る沈澱の多少を観察した。但しNaBrの量は経験的なものである。

成績は次に示すとおりで、生じた沈澱は白色板状の結晶で、水に溶けて酸性を呈す。

なおこの複塩は水に難溶、エタノールに不溶である。またかかる複塩をつくるためにはベンチジンの溶媒として必ずしもエタノールを必要としない。

第 1 表

ベンチジン複塩合成に対する  
酸の必要性

| 2%ベンチジンエ<br>タノール溶液<br>mℓ | NHcl<br>mℓ | NaBr<br>0.3g | 沈 澱 の<br>程 度 |
|--------------------------|------------|--------------|--------------|
| 20.0                     | 0.5        | 0.3          | (-)          |
| "                        | 1.0        | "            | (+)          |
| "                        | 1.5        | "            | (+)          |
| "                        | 2.0        | "            | (++)         |
| "                        | 3.0        | "            | (###)        |

## C. ベンチジン複塩の呈色反応に與る 諸種塩類の影響

すでに第1報において報告したような塩類のそれぞれについて今回も実験したのであるが、大体陽性に出るものは陽性に出、陰性に終るものは陰性に終つたのであるが、しかし、2, 3異なる成績もあるので、それらに就いてここに報告したい。

但し前回の実験ではエタノールを溶媒としたBenzidine acetateを使用したか、今回は Benzidine acetate と NaBr との抱合体、すなわちベンチジンのNaBr複塩の0.1%水溶液を使用した。

まず陽性に出るものを列挙すると

Hb,

CuCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>,

KI, KIO<sub>4</sub>, BiI<sub>3</sub>,

KCNS,

KMnO<sub>4</sub>,

K-Ferrocyanide, K-Ferricyanide, Fe-Ammon citrate,

K-chromate, K-bichromate,

陰性に終るものは

Fe-phosphate, Fe-Ammon-sulfate

Ferro chloride, Ferrichloride, Fe-sulfate, Co nifrate

MnSO<sub>4</sub>,

以上の成績から気付くように、Benzidine acetateのエタノール溶媒中では磷酸鉄を除く大部分の鉄化合物は陽性に出たのであるが、ベンチジン複塩の水溶液では醋塩と見做される K-Ferrocyanide, K-Ferricyanideや、また Fe-Ammon-citrate など陽性に出るが、鉄と雖も錯塩に非る Ferro chloride, Ferri chloride, Ferro sulfateなどは陰性に終るのである。

畢境ベンチジン呈色反応はベンチジンの酸化に因るものであり、血色素を初め Fe, Cu, Co, Mn, CNS, CN, I など塩類は酸化を容易ならしめる1種の触媒体と見做することができるのである。Randisch u. j. f (1927)によると、 $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_2]\text{NH}_4$ ,  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]\text{Na}_3$  などの無機金属錯塩にはカタラーゼの作用のあることが述べられ、また岡柴田教授(1936)も Co-, Ni-, Cr, Mn-などの諸種金属錯塩20数種について、それらにカタラーゼに類する触媒作用のあることを述べているし、更にまた Langenbeck, Hawitz らは Hemin の1種についてその触媒作用を述べ、この場合 Pyridin,

Nicotin及びImidazolなどの存在によつてその触媒作用が増強されるのみならず、更に活性の大なる Hemochromogen ような色調を帯びて来るとさへ述べている。

#### d. ベンチジン複塩の呈色に関與する至適水素イオン濃度について

Benzidine acetate、または Benzidine hydrochloride と NaBr とからつくつたベンチジン複塩、並びに Benzidine nitrate それ自体について発色に至適な水素イオン濃度を求め、また PH 値の推移に伴う色彩の変化を検査してみた。

ベンチジンの複塩並びに Benzidine nitrate は 0.1% 水溶液とし、酸化剤としては 30% 過酸化水素液、触媒体としては人血血色素、また酸としては  $\text{N}/_{10} \sim \text{N}/_{20}$  HCl 液、鹼としては  $\text{N}/_{10} \sim \text{N}/_{30}$  NaOH 液を使用した。なお PH 測定は東洋濾紙社の Toyo PH Test paper を使用した。

3度 Aqua dest で結晶を繰りかえした Benzidine-acetate の NaBr 複塩の 0.1% 水溶液の PH は 4.4 であり、Benzidine hydrochloride のそれは、3.6. Benzidine nitrate のそれは 4.0 であり、そして Benzidine nitrate そのものの 0.1% 液の PH は 3.6 であつた。

各溶液を HCl または NaOH で PH を変えて見た色彩の変化は第 2 表に示すとおりである。すなわちこれら 4 通り行つた実験成績について判定されることは、

(1) 発色は何れの場合も酸性側にあり、典型的な色彩は青藍色である。Benzidine hydrochloride からの複塩は多少ずれているが、他の 3 者は申し合わせたように PH 4.4 から 5.6 の間に特異な青藍の発色帯が存在することである。

(2) 4 者とも酸に傾き、PH 値の減少するに従つて青藍から青、青から緑、緑から黄緑、黄緑から黄に至るまで色彩の移行があること。更に PH

値が減じて1.6以下では黄色も淡くなつて行く傾向がある。

(3) 4者とも滴に傾きPH値の増すに従つて急激に青藍色が退き、淡青または淡黄となり、時に発色のない場合もある。

なおこの実験では初めに断わつてあるように触媒体として血色素を使用したのであるが、この血色素またはヘミンは、これに還元剤と  $O_2$ 、或いは  $H_2O_2$  とを同時に作用せしめると、試験管内で胆汁色素に変化して緑色を呈するが、この変化の第一段階はメチン基の酸化と、ヒドロオキシポルフィリンの生成で、ヒドロオキシメチン基は更に酸化を受けて開裂し、Verdohemineが生成されるというのである。また一方補欠分子団からはCholeryglobinが生成されて緑色を呈することがあるのでこれらのことを考慮して私はHbの換りに0.02% KI液を触媒体として実験を重ねたが、青色を呈する位置はPH4.0から5.6の間であつてHbの場合と一致した成績が得られたのである。すなわち呈する青色は結局Hbに由来するものではなく、Benzidine blueそのものであると思われる。

なおBenzidine acetateそれ自身とBenzidine acetateの複塩とは本質上異なる化学物質であるが故に、細部に亘つて比較検討することは当を得たものではないが、Benzidine acetateがエタノールを溶媒とする場合でも、水素イオン濃度を考慮しながら検査を行わないと思わぬ過誤を来す恐れのあることを私はこゝに強調したいのである。

## 第 2 表

各種酸 ( $CH_3COOH, HCl, HNO_3$ ) による Benzidine 複塩及び Benzidine nitrate の発色と水素イオン濃度との関係

| PH  | 色 彩                    |                              |                        |                   |
|-----|------------------------|------------------------------|------------------------|-------------------|
|     | Benzidine-Acetate-NaBr | Benzidine-hydrochloride NaBr | Benzidine-nitrate NaBr | Benzidine-nitrate |
| 1.2 | 黄 淡                    |                              |                        |                   |
| 1.4 | 黄 淡                    |                              |                        |                   |
| 1.6 | 黄                      |                              |                        |                   |
| 1.8 | 黄 濃                    | 黄                            |                        |                   |
| 2.0 | 黄 緑                    | 淡 黄                          | 黄 淡                    | 黄                 |
| 2.2 |                        | 黄 緑                          | 黄 緑                    | 黄 淡               |
| 2.4 | 黄 緑                    | 黄 緑                          | 黄 緑                    |                   |
| 2.8 |                        | 黄 緑                          | 黄 緑                    | 黄 緑               |
| 3.0 | 黄 緑                    |                              |                        |                   |
| 3.2 | 緑                      | 緑                            | 黄 緑                    | 緑 黄               |
| 3.6 |                        | 緑 青                          |                        | 緑                 |
| 3.8 | 緑                      | 青                            | 緑                      |                   |
| 4.0 | 青 緑                    | 青 藍                          | 緑 青                    |                   |
| 4.2 | 青                      |                              | 緑 青                    | 青                 |
| 4.4 | 青                      | 青 藍                          | 青                      | 青 藍               |
| 4.6 | 青                      | 青 藍                          | 青 藍                    | 青 藍               |
| 4.8 |                        | 青 藍                          | 青 藍                    | 青 藍               |
| 5.0 | 青 藍                    | 青                            |                        | 青 藍               |
| 5.2 | 青 藍                    | 青                            | 青 藍                    | 青 藍               |
| 5.4 |                        | 青                            | 青 藍                    | 青 藍               |
| 5.6 | 青 藍                    |                              | 青 藍                    | 青 藍               |
| 5.8 |                        | 緑 淡                          | 黄 青                    | 青                 |
| 6.0 | 緑 淡                    | 黄 淡                          | 黄 青                    | 青 淡               |
| 6.2 | 黄 淡                    | 黄 淡                          |                        | 青 淡               |
| 6.4 |                        | 黄 淡                          | 黄 淡                    |                   |
| 6.6 | 黄 淡                    |                              |                        |                   |

### Ⅲ. 結 論

1. Benzidine acetate (エタノール溶液でも水溶液でも略同じ) に Na, K,  $\text{NH}_4$ , Al, Ba, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Co, Ag, Cd, Sn, などの塩類を加えると白色結晶性の沈澱が得られる。但し  $\text{Fe}^{3+}$ , Cr, 塩は例外であり、また Ba, Fe,  $\text{As}_2$  などアニオンの種類によつて異なる結果を来す。

そしてこれらの結晶性沈澱物はエタノールに不溶于水に難溶であるが、NaBr, NaCl などから得られた複塩は酸化剤 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) の存在で色彩鮮かな Benzidine blue の色彩反応を呈し、Benzidine acetate に見るが如き不愉快な「褐色」を混じない。

2. 上記複塩をつくるためにはベンチジンと結合する酸が必要であり、また酸としては HCl,  $\text{HNO}_3$ , 蔦酸などをもつて  $\text{CH}_3\text{COOH}$  に代用し得る。

3. Benzidine acetate と鉄塩との複塩は多く 2 価の場合であり、3 価の場合は多くベンチジンの酸化を伴う。

4. ベンチジンの複塩は水に溶けて酸性を呈す。例せば Benzidine acetate と NaBr との複塩の 0.1 % 水溶液は PH 4.4, Benzidine hydrochloride のそれは PH 3.6, Benzidine nitrate のそれは PH 4.0 である。

5. 上記の複塩をもつて呈色反応を試みるとき、Benzidine-acetate-NaBr の複塩では典型的な紫紺色は PH の 4.2~5.6, HCl からの複塩では PH 3.8~5.0,  $\text{HNO}_3$  からの複塩では、PH 4.4~5.6 の間にある。

そしていずれの場合においても酸度が増すにつれて紫紺色から青色、青色から緑色、緑から黄緑色、黄緑色から黄色となり、この黄色も PH 1.8 以下になると淡くなる傾向が見られる。しかし反対に PH 値が大となり、中性に近づくに従つて、

ある酸度を限界として急に特異な色彩を失い、淡黄、淡青、または無色となる。

6. 上記複塩水溶液について各種塩類の示す呈色態度は Benzidine acetate のエタノール溶液の場合と略同一であるが、異なる態度を示したものうち鉄塩について言えば、Ferri-Phosphate は勿論、Fe-sulfate, Ferro-chloride, Ferri-Chloride など陰性で、陽性を示すものは 2 価、3 価の鉄の錯塩であつた。

### Ⅳ. 主 要 文 献

- (1) Berkman, Sophia, Marrell, Jacques, and Fgloff, Gustav, "Catalysis Inorganic and Organic." 1940.
- (2) Cullinane, H. M. et Chard, S. J., Analyst. 73:863, 1948.
- (3) Deniges, G. Precis de Chimie Analytique. 4th Ed 1913.
- (4) Feigl, F., Oesterr. Chem. Ztg., 22:124, 1919.
- (5) Feigl, F. et Stern, R., Z. and. Chem., 60:24, 1921
- (6) Feigl, F., Z. anal. Chem., 61:474, 1922. 74:386, 1928. 77:299, 1929
- (7) Feigl, F., et Neuber., Z. anal. Chem., 62:375, 1923.
- (8) Feigl, F. et Krumholz, P., Mikrochemie, Pregl Festschrift 1929.
- (9) Feigl, F. et Singer, A., Pharm. Presse. 6:37, 1938
- (10) Feigl, F., "Chemistry of Specific, Selective and Sensitive Reactions" 1949.
- (11) Haase, L. W., Z. angew. Chem., 40:

- 595, 1927
- (12) Hawk, P. B. and Bergeim, O., "Practical Physiol. Chem." XEd, 1931
- (13) Komarowsky, A. S. et Poluektoff, N. S., Mikrochemie, 18:66, 1935
- (14) Kulberg, L., Mikrochemie, 20:153, 1936.
- (15) Lynn, E. V., "Organic Chemistry" 3rd. Ed. 1948.
- (16) Müller, W. J., Ber. 35:1587, 1902.
- (17) Moir, J., Chem. News., 102:17, 1910.
- (18) Malasesta, G. et Nola, E. D., Chem. Abstr., 8:1397, 1914.
- (19) Mounier, A., Chem. Abstr., 11:426, 1917.
- (20) Rashig, F., Z. angew. Chem., 16:617, 1903
- (21) Schlenk, W., Ann. 363:313, 1908
- (22) Sieverts et Hermsdorf, A., Z. angew. Chem., 34:3, 1921
- (23) Schmidt, J. et Hinderer, W., Ber. 65:87, 1932
- (24) Tonanaeff, N. A., Z. anorg. allg. Chem., 140:327, 1924.
- (25) Tonanaeff, N. A. et Dolgow, K. A., Chem. Abstr., 24:1313, 1930
- (26) Vaubel, W., Z. anal. Chem., 35:163, 1896
- (27) Zinin, N., J. pract. Chem., 36:95, 1845.
- (28) 石館守三, 「微量定量分析」昭和24年
- (29) 小竹無二雄, 「有機化学」(改訂) 下巻 昭和24年
- (30) 小竹無二雄, 赤堀四郎, 「有機化学の進歩」第3輯, 昭和21年
- (31) 高木誠司, 「定性分析化学」上巻, 昭和9年
- (32) 槌田竜太郎, 細胞化学シンポジウム 1:1, 1953.
- (33) 有機合成化学協会, 「有機化学ハンドブック」昭和29年