designed quartz ashing vessel was used to control the temperature and atmospheric composition for the ashing. Recoveries of four elements decreased with increasing ashing temperature, being dependent on crucible materials. The recoveries of copper and sodium were not satisfactory when the platinum and quartz crucible were used, respectively. These losses were attributed to the retention of respective metal on the crucible used, which was demonstrated by radioisotopic tracer method. The increase of oxygen content in atmospheric gases resulted in a slight increase of temperature and shortened the ashing time. In practice volatile organic solvent in the resin was first removed by increasing the heating temperature from 100 to 500°C and then the oxidant gases consisting of oxygen and air in equivalent volume was supplied to the ashing vessel at a flow rate of 1.2 l/min. The temperature was raised to 600°C to complete the ashing for one hour. The ash was dissolved in 1 ml of nitric acid and stored in 2 N nitric acid, followed by atomic absorption measurements. The standard deviation of (3.3~7.9)% came out. (Received Apr. 20, 1978)

Keywords

Atomic absorption spectrometry

Dry ashing

Polyimide resin

2-ヒドロキシアゾメチン誘導体のアルミニウムキレート のけい光強度に対する Free-Wilson の解析法の適用*

山本 金平[®], 砂田 久一,
米沢 頼信, 大塚 昭信**

(1978年7月7日受理)

1 緒 言

一般にけい光強度は、化合物の誘起効果や共鳴効果などの電子的な分極能力及び分子の立体構造など、いろいろな要因により影響を受けると考えられているが、これらの間の一般的な法則や定量的な関係を見いだすのは非常に困難である。同一系列の化合物においてさえも、置

換基の位置及び種類とけい光強度との間の規則性を見付けることは容易ではない。これはけい光強度に影響を与える種々の要因が、互いに複雑に干渉し合っているために、それぞれの要因の効果を分離して考察することができないのであろうと推察される。

一方、近年になって同一系列の医薬品の薬効に置換基がどのような影響を与えるか、ということ解析する手段の一つとして Free-Wilson の解析法¹⁾ が用いられている。これはある化合物の薬効を、その母核と置換基の寄与分の和として表すことができるという考えに基づいて、それぞれの寄与分を数学的な方法を用いて算出するものである。

けい光強度についても、この解析法を適用することができるのなら、種々の要因効果を総合したものを、母核と置換基の寄与に分けて検討を行い、場合によっては、未知の化合物のけい光強度の予測も可能になると考えられる。

今回は 13 種の 2-ヒドロキシアゾメチン誘導体のアルミニウムキレートのけい光強度を測定し、その結果について Free-Wilson の解析を試みた。

2 試薬、試料及び装置

2.1 試薬

ウラニン標準液：ウラニン 0.100 g を水に溶解し、全量を 1000 ml としたものを希釈し、0.2 µg/ml の濃度とした。

アゾメチン溶液：アゾメチン 0.100 g を *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解し、全量を 100 ml とし、1 mg/ml の濃度とした。

アルミニウム標準液：純アルミニウム末 1.000 g を 4% 水酸化ナトリウム溶液に加温溶解し、1 l メスフラスコに塩酸 30 ml を入れた中に移す。冷後水で希釈し、1 mg/ml の濃度とした。

2.2 試料

Table 1 には、実験に用いた種々の置換基を有する 13 種の 2-ヒドロキシアゾメチン誘導体と、原料であるアミン類及びアルデヒド類が示されている。

合成方法はいずれも文献²⁾³⁾ を参照し、元素分析と質量分析により、理論値と一致することを確認した。

2.3 装置

けい光強度の測定には、日立製作所製 MPF-2A 型けい光分光光度計（光源：キセノンランプ使用）を用いた。

3 実験操作及び結果

50 ml のメスフラスコに、アゾメチン溶液 4 ml を採り、20% 酢酸アンモニウム溶液 4 ml、アルミニウム標

* けい光強度に与える置換基の効果 (I)

** 名城大学薬学部：愛知県名古屋市天白区天白町八事裏山 15

Table 1 Azomethine derivatives and their raw materials

No.	Azomethine derivatives	Amino component	Aldehyde component
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			

準溶液 0.5 ml を加えた後、塩酸により pH を 5.5 付近に調節し、全量を 50 ml として 50°C で 10 分間反応させ、励起極大波長におけるけい光強度を測定した。

Table 2 には、励起極大波長、けい光極大波長、測定 pH、アゾメチン誘導体のモル数及びけい光強度の測定値が示されている。なお、励起波長を (400~425) nm の範囲に変化させても、けい光強度は No. 13 で数パーセント、No. 8 では 1 パーセント以下の変化しか認められなかったため励起波長の違いによるけい光強度の補正は行わなかった。又、標準物質として用いたウラニンのけい光スペクトルは、文献値⁴⁾では (490~535) nm 付近では見掛けのスペクトルと真のスペクトルとのずれが一定値であることが示されている。従って、Table 2 に示したけい光強度は一定の誤差を含んでいるが、この誤差は式 (1) を平行移動させるものであり、式 (1) 中の μ 、すなわちけい光強度に対する母核の寄与分が変化す

Table 2 Optimal fluorescence conditions and their fluorescence intensities for aluminum chelates with azomethine derivatives

No.	R	R'	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	pH	Azo. ^{a)} (μ mol)	Fluorescence ^{b)} intensity
1	H	H	405	505	5.52	18.8	1395
4	H	Cl	415	525	5.55	16.2	1100
5	H	CH ₃	400	525	5.60	17.6	420
8	H	SO ₃ H	405	490	5.50	13.7	3372
9	H	C ₆ H ₅	400	535	5.59	13.8	318
10	Cl	H	400	525	5.61	16.2	1016
11	Cl	Cl	420	525	5.60	14.2	720
12	Cl	CH ₃	400	535	5.62	15.3	181
13	Cl	C ₆ H ₅	425	545	5.65	12.4	67

a) Aluminum concentration = 18.5 μ mol/50 ml; b) Al/Azo. = 1; Fluorescence intensity of uranine = 100 (0.2 μ g/ml)

るだけであって、各置換基の寄与分にはなんら影響を及ぼさないで、けい光スペクトルの補正は行わなかった。なお、545 nm 付近では見掛けのスペクトルと真のスペクトルとはほぼ一致しているが、No. 13 のけい光強度が非常に弱いのでその誤差は無視した。又、励起極大波長におけるけい光極大波長付近のけい光スペクトルを調べたところ、けい光強度の最も大きい No. 8 は (480~505) nm の範囲で数%、その他の化合物では (525~535) nm の範囲で (2~5) %、けい光極大波長がこの範囲に存在しない No. 1 でも 3 % 以下の変化しか認められなかった。No. 13 はけい光強度が非常に弱いので、この検討は行わなかった。以下に述べる解析法では、この程度の変化は解析の際の誤差の中に隠れてしまうので、けい光強度の比較は、けい光極大波長におけるけい光強度を用いて行った。No. 2, 3 の化合物、すなわち No. 1 の化合物の N-ring のオルト位のヒドロキシル基がメタ位、パラ位にあるもの、No. 6, 7 の化合物のようにニトロ基のあるものはけい光性を示さなかった。

4 Free-Wilson の解析

けい光を示した 9 種の化合物に対し、Free-Wilson の解析法を適用し、けい光強度 [I] に対する母核の寄与分 μ (けい光強度の全平均に相当する) 及び置換基の寄与分 [R] を算出した。

すなわち、 $\sum[R]$ を置換基の寄与分の総和とすれば

$$\mu + \sum[R] = [I] \quad \dots\dots\dots (1)$$

の関係が成立するので、けい光を示す 9 種の誘導体について式 (1) に従い方程式をたてると

$$\begin{array}{l}
 \mu + [\text{H}]_{\text{R}} + [\text{H}]_{\text{R}'} = 1395 \quad (\text{No. 1}) \\
 \mu + [\text{H}]_{\text{R}} + [\text{Cl}]_{\text{R}'} = 1100 \quad (\text{No. 4}) \\
 \mu + [\text{H}]_{\text{R}} + [\text{CH}_3]_{\text{R}'} = 420 \quad (\text{No. 5}) \\
 \mu + [\text{H}]_{\text{R}} + [\text{SO}_3\text{H}]_{\text{R}'} = 3372 \quad (\text{No. 8}) \\
 \mu + [\text{H}]_{\text{R}} + [\text{C}_6\text{H}_5]_{\text{R}'} = 318 \quad (\text{No. 9}) \\
 \mu + [\text{Cl}]_{\text{R}} + [\text{H}]_{\text{R}'} = 1016 \quad (\text{No. 10}) \\
 \mu + [\text{Cl}]_{\text{R}} + [\text{Cl}]_{\text{R}'} = 720 \quad (\text{No. 11}) \\
 \mu + [\text{Cl}]_{\text{R}} + [\text{CH}_3]_{\text{R}'} = 181 \quad (\text{No. 12}) \\
 \mu + [\text{Cl}]_{\text{R}} + [\text{C}_6\text{H}_5]_{\text{R}'} = 67 \quad (\text{No. 13})
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} \mu + [\text{H}]_{\text{R}} + [\text{H}]_{\text{R}'} = 1395 \\ \mu + [\text{H}]_{\text{R}} + [\text{Cl}]_{\text{R}'} = 1100 \\ \mu + [\text{H}]_{\text{R}} + [\text{CH}_3]_{\text{R}'} = 420 \\ \mu + [\text{H}]_{\text{R}} + [\text{SO}_3\text{H}]_{\text{R}'} = 3372 \\ \mu + [\text{H}]_{\text{R}} + [\text{C}_6\text{H}_5]_{\text{R}'} = 318 \\ \mu + [\text{Cl}]_{\text{R}} + [\text{H}]_{\text{R}'} = 1016 \\ \mu + [\text{Cl}]_{\text{R}} + [\text{Cl}]_{\text{R}'} = 720 \\ \mu + [\text{Cl}]_{\text{R}} + [\text{CH}_3]_{\text{R}'} = 181 \\ \mu + [\text{Cl}]_{\text{R}} + [\text{C}_6\text{H}_5]_{\text{R}'} = 67 \end{array}} \right\} \dots\dots (2)$$

更にこの解析法では、ある置換位置についての置換基の寄与の総和はゼロとなる制約があるので

Rの位置については

$$\begin{array}{l}
 5[\text{H}]_{\text{R}} + 4[\text{Cl}]_{\text{R}} = 0 \\
 \text{R}' \text{ の位置については} \\
 2[\text{H}]_{\text{R}'} + 2[\text{CH}_3]_{\text{R}'} + 2[\text{C}_6\text{H}_5]_{\text{R}'} \\
 + [\text{SO}_3\text{H}]_{\text{R}'} = 0
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} 5[\text{H}]_{\text{R}} + 4[\text{Cl}]_{\text{R}} = 0 \\ 2[\text{H}]_{\text{R}'} + 2[\text{CH}_3]_{\text{R}'} + 2[\text{C}_6\text{H}_5]_{\text{R}'} \\ + [\text{SO}_3\text{H}]_{\text{R}'} = 0 \end{array}} \right\} \dots\dots\dots (3)$$

が成立する。ただし、ここで $[\]_{\text{R}}$ は R の位置にある置換基の寄与分を、 $[\]_{\text{R}'}$ は R' の位置にある置換基の寄与分を表す。

式 (2) と式 (3) を連立させて解くのであるが、未知数の数より式の数のほうが多いので、最小二乗法を用いて解くと Table 3 のような結果が得られた。

Table 3 Estimated contributions of all substituents

		Effect	Std. error
R	H	139	17
	Cl	-174	17
R'	H	269	34
	Cl	-27	34
	CH ₃	-636	34
	C ₆ H ₅	-744	34
	SO ₃ H	1138	34
μ		954	—
Multiple R.		0.99945	

Table 4 の Calc. の欄には、これらの値をもとにして算出したけい光強度及び実測値との差が示されている。これより、けい光強度の大きい化合物ほど実測値と計算値がよく一致し、しかも Table 3 に示したように、重相関係数が 0.99945 であることから、けい光強度に関しても Free-Wilson の解析法を適用することができることが分かった。

4 おわりに

2-ヒドロキシアゾメチン誘導体のアルミニウムキレート のけい光強度に、Free-Wilson の解析法を適用し、けい光強度に対する母核及び置換基の寄与分を算出するこ

Table 4 Fluorescence intensities of nine compounds and their calculated values

No.	R			R'				Exp.	Calc.	Res.
	H	Cl	H	Cl	CH ₃	C ₆ H ₅	SO ₃ H			
1	1		1					1395	1362	33
4	1			1				1100	1066	34
5	1				1			420	457	-37
8	1						1	3372	3372	0
9	1					1		318	349	-31
10		1	1					1016	1049	-33
11		1		1				720	754	-34
12		1			1			181	144	37
13		1				1		67	36	31

とができたが、この解析法をすべての化合物のけい光強度の解析に適用することができるかどうかは、この段階では確言することはできない。今後、他の化合物、他の系列についても実験を試みる予定である。又、この解析法ではけい光強度に与える種々の要因の定量的な解析することは原理的には不可能であるが、今後、他の物理化学的性質とけい光強度の関係などを調べ、その相関性について解析することも予定している。

終わりに、本研究に協力された当時学生の大橋綾子君に感謝する。又本研究に対し、御指導いただいた本学古川秀之、古川 宏両助教授に深謝します。

文 献

- 1) S. M. Free, J. M. Wilson: *J. Med. Chem.*, **7**, 398 (1964).
- 2) R. J. Argauer, C. E. White: *Anal. Chem.*, **36**, 2141 (1964).
- 3) K. Morisige: *Anal. Chim. Acta*, **72**, 295 (1974).
- 4) C. A. Parker, W. T. Rees: *Analyst* (London), **87**, 83 (1961).

☆

Application of Free-Wilson's analytical method to the fluorescence intensities of aluminum chelates of 2-hydroxyazomethine derivatives. (Effect of substituent groups on fluorescence. I.) Kinpei YAMAMOTO, Hisakazu SUNADA, Nobuyori YONEZAWA and Akinobu OTSUKA (Faculty of Pharmacy, Meijo University, 15, Tenpaku-cho, Tenpaku-ku, Nagoya-shi, Aichi)

Several 2-hydroxyazomethines having various substituent groups were prepared and the effect of the substituent groups on the fluorescence intensity of aluminum chelates of these compounds was investigated by the use of Free-Wilson's method, which has been known as a mathematical technique describing structure-biological activity relationships of a series of chemical analogs. The mathematical model used is based upon the assumption that the fluorescence intensity in a

series of analog can be given as the sum of the "over-all average" values and the contribution of each substituent. For the testing compounds successful solutions of the equations based on the model were obtained. So it became obvious that this method could be applicable to the studies of fluorescence intensity-structure relationships as well as structure-biological activity relationships.

(Received July 7, 1978)

Keywords

Effect of substituent group

Fluorescence intensity

Free-Wilson

2-Hydroxyazomethine-Al chelate

鉄(II)-1,10-フェナントロリンキレートとメチルオレンジのイオン会合による鉄の高感度抽出吸光光度法

西村雅吉, 新野晶子, 乗木新一郎*[Ⓡ]

(1978年9月5日受理)

1 緒言

1,10-フェナントロリン (以下 phen と略記) は鉄の比色試薬として広く利用され, 又, 鉄(II)-phen キレートとのイオン会合体抽出を利用する陰イオンの比色定量法が報告されている^{1)~6)}.

鉄(II)-phen キレートのモル吸光係数は 1.1×10^4 と大きい, 著者らは, 有色のメチルオレンジ (以下 MO と略記) との会合体を抽出することにより感度の増大を図り, 通常鉄(II)-phen キレートの約4倍, 4.5×10^4 のモル吸光係数を得た.

2 試薬及び装置

2.1 試薬

鉄標準溶液 (5×10^{-3} M): 硫酸鉄(II) アンモニウム $\{\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}$ 1.96 g を少量の水に溶解の後, 濃塩酸 10 ml を加えて水で 1 l とする. 使用の際には希釈して用いる.

phen 溶液 (1×10^{-3} M): 1,10-フェナントロリン ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.2 g を 1 M 塩酸 (2~3) ml に溶解し, 水で 1 l とする.

MO 溶液 (3×10^{-3} M): メチルオレンジ (和光純薬製, $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_3\text{S} \cdot \text{Na}$) を再結晶し, その 0.99 g を水に溶解して 1 l とする.

塩酸ヒドロキシルアミン溶液 (10%): 塩酸ヒドロキシルアミン ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$) 5 g を水に溶解して 50 ml とし, 使用時に調製する.

その他の試薬はすべて市販の特級品をそのまま使用した.

2.2 装置

分光光度計: 日立 139 型分光光度計, 1 cm セル

pH メーター: 日立-堀場 M-5 型 pH メーター

振り混ぜ機: イワキ KM 型シェーカー

3 定量操作

2×10^{-7} mol までの鉄を含む約 40 ml の溶液をビーカーに採り, 3M 塩酸 5 ml, 10% 塩酸ヒドロキシルアミン溶液 1 ml を加える. 10 分間室温で放置後, 1×10^{-3} M phen 溶液 1 ml を加えて発色させる. 6M アンモニア水で pH を 6.0 に調節して, 30 分間放置する. 発色した溶液を分液漏斗に移して水で全量を約 50 ml とした後, 3×10^{-3} M MO 溶液 10 ml, 1,2-ジクロロエタン 10 ml を加えて 5 分間振り混ぜる. 相分離後, 有機相を濾紙 (No. 5A) を通して分取し, 試薬空試験液を対照に 1 cm セルで 422 nm における吸光度を測定する.

4 結果及び考察

4.1 吸収曲線

水相における鉄(II)-phen キレート, MO, 並びに有機相に抽出された鉄(II)-phen-MO 会合体の吸収曲線を Fig. 1 に示す. 鉄(II)-phen キレートが 512 nm, MO が 470 nm に吸収極大を示すのに対し, 抽出会合体の吸収極大波長は 422 nm である. 以後, 抽出された鉄会合体の吸光度は 422 nm で測定した.

4.2 諸条件の影響

通常法で生成した鉄(II)-phen キレートを MO とのイオン会合体として抽出するときの pH の影響を検討した結果, pH 5~7 で一定かつ最大の吸光度を得た. 又, pH 5~9 で抽出した会合体の吸収極大波長には変化がなく, 以後の実験は pH 6.0 で行った. 2分以上の振り混ぜで抽出は完全であり, 振り混ぜ終了から少なくとも 3 時間は吸光度に変化は認められなかった.

* 北海道大学水産学部水産化学科: 北海道函館市港町 3-1-1